(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0121096
(43) 공개일자 2023년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*C12N 15/86* (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 25/00* (2006.01)
*C07K 16/18* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*C12N 15/86* (2013.01)
*A61K 48/005* (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7023349
(22) 출원일자(국제) 2021년12월17일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년07월10일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2021/086645
(87) 국제공개번호 WO 2022/129609
국제공개일자 2022년06월23일
(30) 우선권주장
20215823.4 2020년12월18일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
**에이씨 이뮨 에스에이**
스위스, 체하-1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션 파크
(72) 발명자
**델 발, 그레고리오**
스위스, 1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션파크, 에이씨 이뮨 에스에이 내.
**네볼트리스, 다미엔**
스위스, 1015 라우산느, 빌딩 비, 이피에프엘 이노베이션파크, 에이씨 이뮨 에스에이 내.
(74) 대리인
**특허법인정진**

전체 청구항 수 : 총 62 항

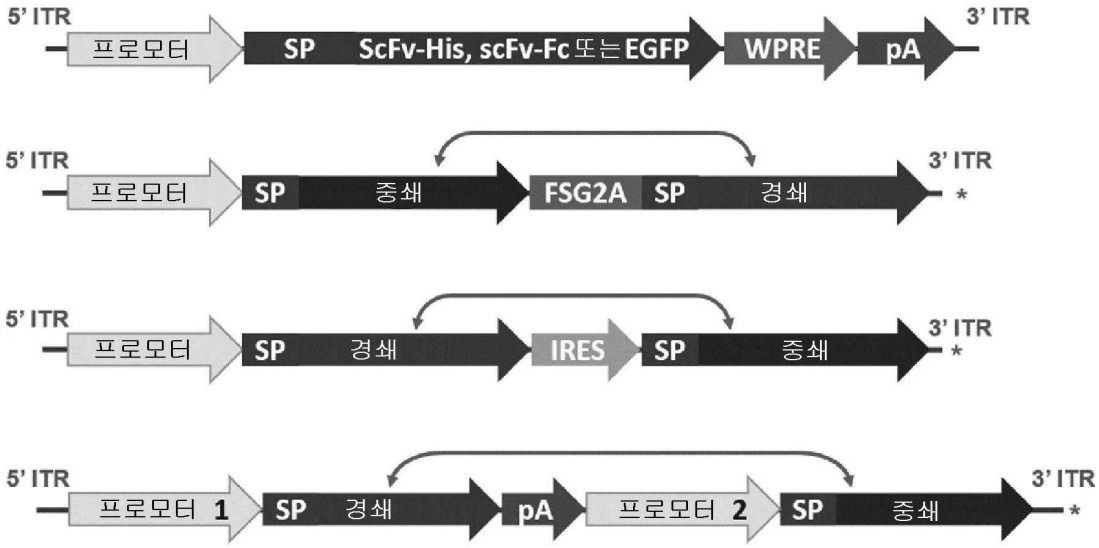
(54) 발명의 명칭 **항체 전달**

## (57) 요 약

벡터는 대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 BBB 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로

(뒷면에 계속)

*대 표 도* - 도1



항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다. 이러한 벡터에서 유용한 발현 카세트는 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함할 수 있고 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 IRES를 추가로 포함하거나 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함한다. 생산되는 항체 및 항체 단편은 따라서 보다 낮은 수준의 응집 및 원치 않는 면역원성을 나타내는, 고품질일 수 있다.

(52) CPC특허분류
***A61P 25/00*** (2018.01)
***C07K 16/18*** (2013.01)
*A61K 2039/5256* (2013.01)
*C12N 2750/14143* (2013.01)
*C12N 2750/14145* (2013.01)
*C12N 2830/20* (2013.01)
*C12N 2840/203* (2013.01)

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터로서,

상기 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 BBB 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 벡터.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 뇌 실질 내로 전달되고, 선택적으로 항체 또는 항체 단편은 뇌 실질 내로 분비되는, 벡터.

### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

벡터는 BBB의 내피 세포를 형질도입하거나 형질감염시키는, 벡터.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 BBB의 주피세포 또는 성상세포를 형질도입하거나 형질감염시키는, 벡터.

### 청구항 5

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 야생형 바이러스 벡터 또는 조작된 바이러스 벡터를 포함하는, 벡터.

### 청구항 6

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 향신경성 벡터를 포함하는, 벡터.

### 청구항 7

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 펩티드, 소분자, 항체 또는 이의 항체 단편, 단백질, 나노입자, 지질, 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 벡터를 BBB의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상의 양이온성 분자를 발현하는, 벡터.

### 청구항 8

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 벡터를 BBB의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상의 변형을 포함하는, 벡터.

### 청구항 9

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 유기 나노물질 예를 들어, 리포좀, 엑소좀, 덴드리머, 미셀, 무기 나노물질 예를 들어 금 나노입자, 실리카 나노입자 또는 탄소 나노튜브를 포함하는, 벡터.

**청구항 10**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 리노바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 단순 바이러스(HSV) 또는 임의의 바이러스-유사 입자로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 11**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV 혈청형 2(AAV2), AAV 혈청형 8(AAV8), AAV 혈청형 9(AAV9) 및 AAV 혈청형 10(AAV10)으로부터 선택되는 AAV인, 벡터.

**청구항 12**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 조작된 AAV 벡터이고, 선택적으로

(i) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV2 벡터, 바람직하게는 AAV-BR1이거나;

(ii) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV9 벡터, 예를 들어 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB, AAV9-PHP-V1이거나;

(iii) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV1 벡터, 예를 들어 AAV1RX, AAV1R6 또는 AAV1R7이거나,

(iv) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV10 벡터인, 벡터.

**청구항 13**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 AAV-BR1 또는 AAV9-PHP-V1인, 벡터.

**청구항 14**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

CNS의 질환 또는 장애는 아밀로이드-베타 단백질과 관련된 질환, TDP-43-단백질병증, 알파-시누클레오병증, 타우병증, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 포함하는 트리뉴클레오티드 반복 장애, 뇌-관련 암 및 종양, 간질, 정신 질환, 신경염증성 질환, 신경근 질환, 바이러스-유도된 뇌염 및 미세아교세포 기능장애를 특징으로 하는 질환으로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 15**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

CNS의 질환 또는 장애는 전두측두엽 치매(FTD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증(LATE), 및 다발성 경화증으로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 16**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 항-ErbB2, 항-TDP-43(NI-205), 항-A베타(예를 들어 바피뉴주맙, 솔라네주맙, 레카네맙, 아두카누맙, 도나네맙, 간테네루맙 또는 크레네주맙), 항-ApoE4(아포리포단백질 E4) 및 항-DDX3X (ATP-의존적 RNA 헬리카제), 항-Tau(틸라보네맙, 고수라네맙, 자고테네맙, 세모리네맙, 베프라네맙, BIIB076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), 항-LINGO-1(예를 들어 오피시누맙), 항-알파-아이누클레인(신파네맙, 프라시네주맙, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), 항-ASC(IC-100), 항-NLRP3, 항-C5(라불리주맙, 에쿨리주맙), 항-C1q(ANX-005), 항-C3, 항-헌팅틴(C-617, NI-302), 항-프리온, 항-CD20(예를 들어 오파투무맙, 오크렐리주맙, 리툭시맙, BCD-132, 우빌리툭시맙, BAT-4406F, AL-014), 항-PD-1(IBC-Ab002) 또는 항-VEGF-A(베바시주맙, 라니

비주맙, 브롤루시주맙, 파리시맙, 바누시주맙) 항체 또는 항체 단편으로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 17**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 비경구적으로 대상체에 투여되는, 벡터.

**청구항 18**

제17항에 있어서,

벡터는 정맥 내 주사 또는 정맥 내 주입에 의해 대상체에 투여되는, 벡터.

**청구항 19**

선행하는 항 중 어느 한 항에 있어서,

폴리뉴클레오티드는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, EF1A(인간 진핵 번역 신장 인자 1 알파 1), CAG(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), CBh(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), SV40(시미안 바이러스 40 인핸서/초기 프로모터), GFAP(인간 신경교 원섬유 산성 단백질 프로모터), ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2), TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b), PDYN_1(프로디노르핀), GH1_1(인간 성장 호르몬), 오팔린_1(오팔린), SYN1_1(시냅신 1), CAMK2A_1(칼슘/칼모듈린 의존적 단백질 키나제 II 알파), NEFH_1(신경필라멘트 중쇄 폴리펩티드), NEUROD6_1(신경 분화 인자 6) 또는 OLIG2_1(희소돌기아교세포 전사 인자 2), GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1. 오팔린_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 또는 OLIG2_1 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서로부터 선택되는 적어도 하나의 프로모터, 바람직하게는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 또는 CBh 프로모터를 포함하고, 상기 적어도 하나의 프로모터는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

**청구항 20**

제19항에 있어서,

적어도 하나의 프로모터는 ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2) 및 TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b)로부터 선택되고, 선택적으로 적어도 하나의 프로모터는 인핸서 예를 들어 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

**청구항 21**

항체 또는 항체 단편을 대상체의 BBB에 전달하기 위한 방법으로서,

상기 방법은 항체 또는 항체 단편를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하는, 방법.

**청구항 22**

항체 또는 항체 단편을 대상체의 CNS에 전달하기 위한 방법으로서,

상기 방법은 항체 또는 항체 단편를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에 투여하는 단계를 포함하고, 상기 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 방법.

**청구항 23**

대상체에서 CNS의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 방법으로서,

상기 방법은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에 투여하는 단계를 포함하며, 상기 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 방법.

**청구항 24**

대상체에서 CNS의 질환 또는 장애를 치료하기 위한 약제의 제조를 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 용도로서,

상기 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 용도.

**청구항 25**

대상체의 BBB에 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 용도로서,

상기 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 용도.

**청구항 26**

제21항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

제2항 내지 제20항 중 어느 한 항에 따른 특징에 따라 추가로 정의되는, 방법 또는 용도.

**청구항 27**

대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터로서,

상기 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB) 또는 CNS의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 벡터.

**청구항 28**

대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터로서,

상기 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB) 또는 CNS의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래하는, 벡터.

**청구항 29**

제27항 또는 제28항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 뇌 실질 내로 전달되고, 선택적으로 항체 또는 항체 단편은 뇌 실질 내로 분비되는, 벡터.

**청구항 30**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 CNS의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 세포가 뇌 내피 세포, 뉴런, 주피세포, 성상세포, 희소돌기아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 31**

제27항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 BBB의 내피 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는, 벡터.

**청구항 32**

제27항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 BBB의 주피세포 또는 성상세포를 형질도입 또는 형질감염시키는, 벡터.

**청구항 33**

제27항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 CNS 내로 분비되고, 바람직하게는 뇌 실질 내로 분비되는, 벡터.

**청구항 34**

제27항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 벡터를 BBB의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상의 변형을 포함하는, 벡터.

**청구항 35**

제27항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 펩티드, 소분자, 항체 또는 이의 항체 단편, 단백질, 나노입자, 지질, 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 벡터를 BBB 또는 CNS의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상의 양이온성 분자를 발현하는, 벡터.

**청구항 36**

제27항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 향신경성 벡터를 포함하는, 벡터.

**청구항 37**

제27항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 유기 나노물질 예를 들어, 리포좀, 엑소좀, 덴드리머, 및 미셀 또는 무기 나노물질 예를 들어 금 나노입자, 실리카 나노입자 및 탄소 나노튜브를 포함하는, 벡터.

**청구항 38**

제27항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 야생형 바이러스 벡터 또는 조작된 바이러스 벡터를 포함하는, 벡터.

**청구항 39**

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 아데노 관련 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 리노바이러스, 렌티바이러스, 헤르페스 단순 바이러스(HSV) 또는 바이러스-유사 입자로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 40**

제27항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV 혈청형 2(AAV2), AAV 혈청형 8(AAV8), AAV 혈청형 9(AAV9) 및 AAV 혈청형 10(AAV10)으로부터 선택되는 AAV인, 벡터.

**청구항 41**

제27항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 조작된 AAV 벡터이고, 선택적으로

(i) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV2 벡터, 바람직하게는 AAV-BR1이거나;

(ii) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV9 벡터, 예를 들어 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB, AAV9-PHP-V1이거나;

(iii) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV1 벡터, 예를 들어 AAV1RX, AAV1R6 또는 AAV1R7이거나,

(iv) 조작된 AAV 벡터는 조작된 AAV10 벡터인, 벡터.

**청구항 42**

제27항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

CNS의 질환 또는 장애는 아밀로이드-베타 단백질과 관련된 질환, TDP-43-단백질병증, 알파-시누클레오병증, 타우병증, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 포함하는 트리뉴클레오티드 반복 장애, 뇌-관련 암 및 종양, 간질, 정신 질환, 신경염증성 질환, 신경근 질환, 바이러스-유도된 뇌염 및 미세아교세포 기능장애를 특징으로 하는 질환으로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 43**

제27항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

CNS의 질환 또는 장애는 전두측두엽 치매(FTD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증(LATE) 및 다발성 경화증으로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 44**

제27항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 항-ErbB2, 항-TDP-43(NI-205), 항-A베타(예를 들어 바피뉴주맙, 솔라네주맙, 레카네맙, 아두카누맙, 도나네맙, 간테네루맙 또는 크레네주맙), 항-ApoE4(아포리포단백질 E4) 및 항-DDX3X(ATP-의존적 RNA 헬리카제), 항-Tau(틸라보네맙, 고수라네맙, 자고테네맙, 세모리네맙, 베프라네맙, BIIB076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), 항-LINGO-1(예를 들어 오피시누맙), 항-알파-시누클레인(신파네맙, 프라시네주맙, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), 항-ASC(IC-100), 항-NLRP3, 항-C5(라불리주맙, 에쿨리주맙), 항-C1q(ANX-005), 항-C3, 항-헌팅틴(C-617, NI-302), 항-프리온, 항-CD20(예를 들어 오파투무맙, 오크렐리주맙, 리툭시맙, BCD-132, 우빌리툭시맙, BAT-4406F, AL-014), 항-PD-1(IBC-Ab002) 또는 항-VEGF-A(베바시주맙, 라니비주맙, 브롤루시주맙, 파리시맙, 바누시주맙)로부터 선택되는, 벡터.

**청구항 45**

제27항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서,

벡터는 비경구적으로 대상체에 투여되는, 벡터.

**청구항 46**

제45항에 있어서,

벡터는 정맥 내 주사 또는 정맥 내 주입에 의해 대상체에 투여되는, 벡터.

**청구항 47**

제27항 내지 제46항 중 어느 한 항에 있어서,

발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 푸린-2A 절단 부위를 추가로 포함하는, 벡터.

**청구항 48**

제47항에 있어서,

IRES는 뇌심근염 바이러스로부터 유도되고, 선택적으로 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 8을 포함하는, 벡터.

**청구항 49**

제27항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자는 분비 펩티드를 추가로 포함하고/하거나 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자는 분비 펩티드를 추가로 포함하는, 벡터.

**청구항 50**

제27항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서,

적어도 하나의 프로모터 및/또는 제1 프로모터 및/또는 제2 프로모터는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, EF1A(인간 진핵 번역 신장 인자 1 알파 1), CAG(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), CBh(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), SV40(시미안 바이러스 40 인핸서/초기 프로모터), GFAP(인간 신경교 원섬유 산성 단백질 프로모터), ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2), TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b), PDYN_1(프로디노르핀), GH1_1(인간 성장 호르몬), 오팔린_1(오팔린), SYN1_1(시냅신 1), CAMK2A_1(칼슘/칼모듈린 의존적 단백질 키나제 II 알파), NEFH_1(신경필라멘트 중쇄 폴리펩티드), NEUROD6_1(신경 분화 인자 6) 또는 OLIG2_1(희소돌기아교세포 전사 인자 2), CBh, GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1. 오팔린_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 또는 OLIG2_1 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서로부터 선택되고, 바람직하게는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터 또는 CBh 프로모터이고, 상기 적어도 하나의 프로모터는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 서열에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

**청구항 51**

제50항에 있어서,

적어도 하나의 프로모터 및/또는 제1 프로모터 및/또는 제2 프로모터는 ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2) 및 TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b)로부터 선택되고, 선택적으로 상기 적어도 하나의 프로모터 및/또는 제1 프로모터 및/또는 제2 프로모터는 인핸서 예를 들어 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된, 벡터.

**청구항 52**

제27항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서,

발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10로부터 선택되는 서열 또는 이들과 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 벡터.

**청구항 53**

항체 또는 항체 단편 응집을 감소, 항체 또는 항체 단편 성숙 및/또는 품질을 개선하는 방법으로서,

상기 방법은 하기 단계를 포함하는, 방법:

(i) 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 상기 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함하며; 또는 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

(ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

**청구항 54**

항체 또는 항체 단편 역가를 증가시키는 방법으로서,

상기 방법은 하기 단계를 포함하는, 방법:

(i) 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가

능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 상기 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가(예를 들어 푸린-2A) 절단 부위를 추가로 포함하며; 또는 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

(ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

**청구항 55**

원치 않는 항체 또는 항체 단편 면역원성 및/또는 항체 또는 항체 단편 요법과 관련된 이상 반응을 감소시키는 방법으로서,

상기 방법은 하기 단계를 포함하는, 방법:

(i) 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 상기 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함하며; 또는 세포를 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

(ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

**청구항 56**

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서,

항체 또는 항체 단편은 자가-절단 요소가 없는, 방법.

**청구항 57**

제53항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서,

발현 카세트는 벡터에 포함되어 있고, 상기 방법은 제29항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따른 특징에 따라 추가로 정의되는, 방법.

**청구항 58**

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 수득되는, 항체 또는 항체 단편.

**청구항 59**

조작된 AAV2 벡터, 바람직하게는 AAV-BR1 또는 조작된 AAV9 벡터, 예를 들어 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB 또는 AAV9-PHP-V1 또는 조작된 AAV1 벡터, 예를 들어 AAV1RX, AAV1R6, AAV1R7 또는 조작된 AAV10 벡터를 포함하는 바이러스 벡터로서,

상기 조작된 바이러스 벡터는 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하고, 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 IRES를 추가로 포함하는, 바이러스 벡터.

**청구항 60**

조작된 AAV2 벡터, 바람직하게는 AAV-BR1 또는 조작된 AAV9 벡터, 예를 들어 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB 또는 AAV9-PHP-V1 또는 조작된 AAV1 벡터, 예를 들어 AAV1RX, AAV1R6 또는 AAV1R7 또는 조작된 AAV10 벡터를 포함하는 바이러스 벡터로서,

상기 조작된 바이러스 벡터는 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프

로모터를 포함하는 발현 카세트를 포함하는, 바이러스 벡터.

**청구항 61**

제59항 또는 제60항에 있어서,

조작된 바이러스 벡터는 AAV-BR1 또는 AAV9-PHP-V1인, 조작된 바이러스 벡터.

**청구항 62**

제59항 내지 제61항 중 어느 한 항에 있어서,

제29항 내지 제52항 중 어느 한 항에 따라 추가로 정의되는, 바이러스 벡터.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 예를 들어, 특히 바이러스 벡터와 같은 벡터를 통해 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 유전자를 혈액-뇌 장벽(BBB: blood-brain barrier) 또는 중추신경계(CNS: central nervous system)로부터 세포로 효과적으로 전달하여 CNS로, 바람직하게는 뇌 실질(brain parenchyma) 내로 방출되는 세포에서 항체 분자를 생성하기 위한 수단 및 방법에 관한 것이다. 항체 유전자를 BBB 또는 CNS, 특히 뇌 내피 세포로 전달함으로써, 본 발명은 또한 중추 신경계(CNS)에서 항체 농도를 증가시키는 방법에 관한 것이다. 이러한 접근법에 의한 치료 항체의 전달은 CNS로부터 기원하는 다양한 질환 또는 장애, 예를 들어 특히 신경퇴행성 질환 또는 장애, 운동 질환 또는 장애, 뇌-관련 종양, 정신병 및 CNS 신경 염증을 치료하는데 유용하다. 일 양태에서, 본 발명은 벡터 예를 들어 아데노-관련 바이러스(AAV: adeno-associated virus)에 의해 *시험관 내*에서 뇌 내피 세포의 형질도입이 고품질 항체를 기저외측 공간으로 대량으로 분비하게 한다는 예상치 못한 발견으로부터 유래한다. 본 발명은 또한 놀랍게도 높은 항체 발현 수율, 및 상이한 분비 펩티드를 사용하여 사슬 위치를 교대시키고, 상류, 내부(intra)- 및 하류 조절요소를 맞춤화하여 개선된 단백질 품질을 기술한다. 본 발명은 충분한 치료 용량으로 혈액 뇌 장벽을 통과해야 하는 필요성을 통해 치료 항체를 뇌로 전달하는 것과 관련된 어려움을 회피한다. 본 발명은 임의의 포유류, 특히 인간 대상체에게 적용가능하며 치료 항체의 뇌로의 전달을 개선하는 것을 목표로 한다. 따라서 본 발명은, 비제한적으로 아밀로이드-베타 단백질과 관련된 질환, TDP-43-단백질병증, 알파-시누클레오병증, 타우병증, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 포함하는 트리뉴클레오티드 반복 장애, 뇌-관련 암 및 종양, 간질, 정신 질환, 신경염증성 질환, 신경근 질환, 바이러스-유도된 뇌염 및 미세아교세포 기능장애를 특징으로 하는 질환을 포함하여, CNS 질환 또는 장애를 앓고 있는 환자의 관련된 질환, 장애 또는 병태의 치료를 위해 사용될 수 있다.

### *배 경 기 술*

[0002] 혈액 뇌 장벽(BBB)은 구조적 및 기능적 장벽으로서 이는 혈액 매개 병원체 및 독소로부터 뇌를 보호할 뿐만 아니라 중추 신경계(CNS)로의 적절한 신경 기능에 필요한 엄격하게 조절된 미세 환경을 유지한다[1, 2]. BBB는 혈류와 뇌 사이의 물리적 장벽을 형성하는 내피 세포(EC, endothelial cell)와 EC 층의 비내강(abluminal) 표면에 위치하는 두 개의 벽 세포(mural cell)인 주피세포(pericyte) 및 성상세포(astrocyte)의 세 가지 세포 유형으로 구성된다[3]. 뇌 내피 세포가 BBB의 주요 기능에 기여하지만, 이들 세 가지 세포 유형은 대부분의 척추동물의 전체 혈액-뇌 장벽을 구성한다. 이들의 상호작용과 의사소통은 엄격하게 규제되는 CNS 항상성을 유지하는 데 중요하다.

[0003] 뇌 내피 세포는 내피 세포와 비교하여 독특한 특성을 가지고 있다; 이는 세포주위 공간을 통해 화합물의 확산을 제한하는 다중단백질 접합 네트워크인 밀착 접합부(TJ: tight junction)에 의해 함께 유지된다. 물, 산소 및 작은 지용성 물질과 같은 작은 분자는 혈액에서 뇌로 쉽게 가로지를 수 있지만, 밀착 접합부는 항체를 포함하여 뇌로 들어가는 큰 분자의 확산을 방지한다. [4]

[0004] 뇌로의 이러한 엄격하게 조절된 진입은 중추 신경계(CNS)와 관련된 질환에 대한 생물학적 제제 개발의 주요 과제 중 하나이다. 실제로, 주입된 항체의 약 0.1% 내지 0.3%가 말초 투여 후 뇌에 도달하는 것으로 보고되었다[5][6]. 주사 용량이 높더라도, 치료 반응을 이끌어내기 위해 뇌에 충분한 항체 농도를 달성하는 것은 종종 어려울 수 있다. 이러한 결점은 임상 시험 동안 수동적 면역요법의 실패의 가능한 원인 중 하나로 기술되었

다.([7])

[0005] 지난 수십 년 동안, 뇌의 거대 분자 침투를 증가시키기 위해, 수용체 매개 트랜스사이토시스([8]), 나노입자 전달[9][10] 비강내 전달[11, 12] 또는 세포-기반 기술([13, 14])과 같은 대안적인 비-침습적인 접근법이 개발되었다. 그러나, 주로 제조 문제[15], *생체 내* 표적 매개 약물 배치[16][17] 또는 변형된 단백질의 의심되는 항원성[18]과 관련된 제한된 효능이 보고되었다.

[0006] 최근 연구[14]에서, 저자는 BBB에 귀소할 수 있고 치료 항체를 발현할 수 있는 *생체 외* 형질감염된 자가 내피 전구 세포(EPC: endothelial precursor cell)로 이루어진 세포 표적화된 전달 시스템을 보고하였다. 그러나, 성공적인 *생체 외* 형질감염이 관찰되었음에도 불구하고, 정맥 내 이식 후 조작된 EPC의 제한적인 귀소가 예상되어[19], 이러한 접근법의 치료 가능성을 감소시켰다. 동맥 내 주입은 적절한 대안이 될 수 있지만 세포 용량, 주입 속도 및 세포 유형을 신중하게 평가하고 최적화해야 하기 때문에 여전히 어려운 일이다. [20]

[0007] 바이러스 벡터를 이용한 유전자 요법에 따르면, 이들의 게놈에 관심 유전자를 포함하도록 변형된 바이러스를 사용하여 특정 장기, 조직 또는 세포 유형에 치료 유전자를 도입하는 것에 기초하여 관심 유전자가 CNS에 직접 전달될 수 있다. 유전자 전달 요법에 사용된 바이러스 벡터는 레트로바이러스, 렌티바이러스, 아데노바이러스 및 아데노-관련 바이러스를 기반으로 하지만 이에 제한되지 않는다.

[0008] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 최근 승인에서 입증된 바와 같이 유전자 전달을 위한 효율적이고 임상적으로 안전한 플랫폼을 제시한다: 최초로 승인된 AAV2-기반 치료제인 Luxturna®(보레티진 네파르보벡-르질)는 RPE65 유전자의 두 사본 모두에서 돌연변이로 인해 유전성 망막 질환이 있는 환자에게 RPE65 유전자의 기능적 사본을 전달하고, AAV9 벡터인 Zolgensma®(오나셈노진 아베파르보벡-엑시오이)는 척수성 근 위축증(SMA: spinal muscular atrophy) 환자의 운동 뉴런에 SMN1 유전자의 기능적인 사본을 전달한다.

[0009] AAV는 또한 유전자 발현, 녹다운 및 유전자 편집을 가능하게 하는 신경계로의 유전자 전달을 위한 매개체로 사용되었다[21]. 그러나, 이러한 적용의 대부분은 1) 혈뇌-장벽을 우회하고 2) 시간적 및 공간적으로 이식유전자 발현을 제한하기 위해 AAV 벡터의 침습적 국소 주입(뇌실 내, 척추강 내 또는 수조 내 투여)에 의존한다.

[0010] AAV2를 포함한 상이한 야생형 혈청형은 BBB를 형질도입할 수 있지만, 가로지르지는 않으므로 뇌로 전달하기 위해서는 침습적 수술이 필요하다[22, 23]. 대조적으로, 정맥 내로 투여된 AAV9 혈청형은 BBB를 극복하고 CNS로 들어갈 수 있으며, 그 결과 뇌 및 척수로 유전자 전달이 일어난다[24, 25].

[0011] AAV-S, AAV-F[26] 또는 AAV9([27-29])에 기반한 AAV-PHP.eB와 같은 최근에 보고된 조작된 캡시드 벡터는 우수한 뇌 형질도입을 제공하며, 여기에서 성체 마우스의 여러 영역에 걸쳐 대부분의 뉴런과 성상세포가 정맥 투여 경로를 사용하여 형질도입되었다. 유사하게, AAV2, 또는 보다 최근에는 AAV9-PHP.V1[31]에 기반한 AAV-BR1(본원에서 AAV2-BR1로 상호교환적으로 언급됨) 캡시드[30]는 오래 지속되는 트랜스진 발현으로 뇌 내피 세포를 선택적으로 형질도입하는 것으로 보고되었으며, 이는 신경혈관 질환을 치료할 가능성이 있다.

[0012] 전체 면역글로불린(IgG) 또는 Fc 도메인이 없는 항체 단편의 AAV-매개된 발현은 다양한 적응증에 대해 CNS 내에서 입증되었지만[32-44] 두 형식 모두에 대한 내재적 한계도 또한 보고되었다[[32, 45, 46]]. 실제로, AAV 발현 카세트의 패키징 크기는 중쇄 및 경쇄 유전자를 모두 포함하는 전사 및 번역에 필요한 모든 요소가 4.7kb 미만이어야 하는 전체 IgG 유전자에 대한 설계 제약을 부과한다. 현재까지, 대부분의 작제물은 단일-프로모터로 구성되어 있으므로 항체 중쇄 유전자(HC)와 경쇄(LC) 사이에 푸린(Furin)-2A(F2A)와 같은 자가-처리 서열을 사용해야 한다[47-49]. 연구자들은 높은 발현 역가, 작은 F2A 서열 크기(단지 60 내지 80 염기쌍) 및 항체 사슬 발현의 등몰농도로 인해 이러한 작제물을 상당히 선호한다. 그러나, 대부분의 경우 F2A 펩티드는 중쇄 또는 경쇄에 부착되어 발현된 단백질 또는 항체 발현 세포의 원치 않는 면역원성을 잠재적으로 유발할 수 있다[45]. 바이시스트론 항체 발현을 위한 내부 리보솜 진입 부위(IRES: Internal ribosomal entry site)는 자가-절단 서열에 대한 대안으로 기술되었지만 일반적으로 중쇄 및 경쇄 발현의 불균형으로 인해 단백질 발현이 더 낮다. scFv 또는 단일 도메인 항체와 같은 항체 단편은 모노시스트론 발현으로 인해 전체 IgG 분자와 비교하여 더 높은 단백질 역가와 같은 몇 가지 이점을 제시하지만, 상기 단편은 Fc 이펙터 기능이 부족하고 FcRn 결합 능력이 없어 *생체 내* 반감기가 더 짧다. 이어서 Fc 도메인이 없는 단편은 뇌 실질의 병리학적 복합체를 제거하기 위해 효과기 세포를 동원할 수 없으며 역 트랜스사이토시스를 통해 결합된 항원이 뇌에서 혈액으로 감소된 유출을 나타낸다[32, 50-52]. 이러한 분자의 1가 결합 능력으로 인해, IgG 대응물에 비해 더 낮은 친화도가 관찰된다. 이와 같이, 세포 외 단백질병증을 표적화하고 제거하기 위한 분비된 전체 IgG는 단편과 비교할 때 선호되는 선택사항일 수 있지만, 현재의 한계를 우회하여 고품질 발현을 허용하여 항체 노출을 증가시키고 효과기 세포를 동원하고

제자리(*in situ*)에서 생산된 IgG의 원치 않는 면역원성의 위험을 감소시키는 방법을 개발할 필요가 있다.

## *발명의 내용*

[0013] 본원에서 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터, 또는 또 다른 벡터 예를 들어 리포좀, 또는 나노입자를 사용하여 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 유전자를 혈액-뇌 장벽(BBB) 유래의 세포, 예를 들어 비제한적으로 뇌 내피 세포에 전달하여 CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로 치료 항체 분자를 국소적으로 생산함으로써, 중추신경계(CNS)에서 (치료) 항체 또는 항체 단편 농도를 증가시키는 전달 방법이 최초로 기술된다. 이러한 신규한 접근법에 의해 생산된 항체는 CNS-관련 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 시나리오에서, BBB의 세포(뇌 내피 세포 및/또는 주피세포 및/또는 성상세포)는 CNS, 특히 뇌 실질에 고품질 항체의 장기간 발현을 제공한다.

[0014] 이러한 신규한 전략은 CNS, 바람직하게는 뇌 실질에 항체의 충분한 치료 용량에 도달하기 위해 혈액 뇌 장벽을 통과해야 하는 기존의 수동 면역화 전략의 방해 요소를 우회한다.

[0015] 본 발명은 또한 예상치 못한 더 높은 항체 발현 수율을 생성하는 항체 및 항체 단편의 생산을 위한 발현 카세트 개선, 및 사슬 위치를 교대하고, 상이한 분비 펩티드를 사용하고, 선행 기술에서 이전에 보고된 전략과 관련하여 내부(intra)- 및 하류 조절 요소를 맞춤화함으로써 단백질 품질 개선에 관한 것이다.

[0016] 본 발명은 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포에 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위해 벡터가 사용될 수 있다는 발견에 부분적으로 기초한다. BBB의 세포에 의한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현은 항체 또는 항체 단편을 CNS로, 바람직하게는 뇌 실질로 전달하게 한다. 이러한 발견은 CNS의 질환 또는 장애를 치료하기 위해 CNS, 바람직하게는 뇌 실질에 항체의 충분한 치료 용량에 도달하기 위해 BBB를 가로지르는 치료 항체에 의존하는 기존 전략의 한계를 우회하는 새로운 전략을 제시한다.

[0017] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은 대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 제공하며, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고, 형질도입되거나 형질감염된 BBB 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 항체 또는 항체 단편을 CNS로 전달한다.

[0018] 본원에 기술된 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 BBB에 표적화함으로써, 대상체에 항체 또는 항체 단편을 직접적으로 전달하는 것에 의존하는 기존 항체 치료제와 비교하여, CNS, 바람직하게는 뇌 실질로 전달되는 항체 또는 항체 단편의 양이 증가한다. 다른 곳에서 설명한 바와 같이, 주입된 항체의 약 0.1% 내지 0.3%만이 말초 투여 후 뇌에 도달하는 것으로 보고되었다. 대조적으로, 본 발명자들은 항체(MAB1)를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 뇌 내피 세포주에 도입하기 위해 AAV 벡터를 사용하여 MAB1의 무분극 분비를 초래한다는 것을 발견하였다. 이는 이러한 기술이 항체 또는 항체 단편을 CNS, 바람직하게는 뇌 실질로 발현시키기 위해 사용될 수 있음을 의미한다.

[0019] CNS는 뇌와 척수라는 두 가지 주요 구성요소로 구성된다. 감각 자극은 CNS로 전달되고 운동 자극은 CNS로부터 전달된다. CNS는 또한 전체 신경계의 활성을 조정한다. 일 실시형태에서, 본 발명에 따라 사용하기 위한 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 BBB 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현시켜 항체 또는 항체 단편을 CNS로 전달한다. CNS는 다중 세포 유형을 포함하고, 일 실시형태에서 항체 또는 항체 단편은 CNS에서 적어도 하나의(최대 전체) 세포 유형으로 전달된다. 일 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 뇌 내피 세포, 뉴런, 주피세포, 성상세포, 희소돌기아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포로 전달될 수 있다. 따라서 전달은 CNS의 뉴런 및 비뉴런(신경교) 세포에 대한 것일 수 있다. 일 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 BBB 세포에서 CNS로 분비된다. 예를 들어, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 20%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 30%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 40%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 50%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 60%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 70%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 80%는 CNS로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 90%는 CNS로 전달된다.

[0020] 바람직한 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 뇌 실질 내로 전달된다. 본원에서 사용된 바와 같이 "뇌 실질"은 뉴런과 신경교 세포로 구성된 뇌의 기능적인 조직을 지칭한다. 본 발명에 따라 사용하기 위한 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 BBB 세포는 항체 또는 항체

단편을 발현하여 항체 또는 항체 단편이 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 BBB 세포로부터 뇌 실질 내로 분비된다. 예를 들어, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 20%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 30%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 40%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 50%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 60%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 70%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 80%가 뇌 실질 내로 전달된다. 일 실시형태에서, BBB 세포에서 발현된 항체 또는 항체 단편의 적어도 90%가 뇌 실질 내로 전달된다.

[0021] 이미 다른 곳에서 기술된 바와 같이, BBB는 혈액 매개 병원체 및 독소로부터 뇌를 보호하는 구조적 및 기능적 장벽이다. BBB는 내피 세포, 주피 세포 및 성상 세포의 세 가지 세포 유형으로 구성된다. 본 발명자들의 발견이 주로 BBB의 내피 세포에 관한 것이지만, 이들의 관찰은 BBB의 다른 세포에도 동등하게 적용될 수 있다. 이와 같이, 일 실시형태에서 벡터는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 내피 세포, 주피세포 및 성상세포로부터 선택된 세포 유형으로 형질도입 또는 형질감염시킨다. 벡터는 BBB의 하나의 특정 세포 유형을 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 예를 들어, 벡터는 BBB의 주피세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 추가 예에서, 벡터는 BBB의 성상세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 형질도입 또는 형질감염 후에, 항체 또는 항체 단편이 발현된다.

[0022] 바람직한 실시형태에서, 벡터는 BBB의 내피 세포를 형질도입하거나 형질감염시킨다. BBB 내피 세포를 본원에 기술된 폴리뉴클레오티드로 형질감염 또는 형질도입하는 것이 바람직하며, 이는 BBB 내피 세포가 CNS, 바람직하게는 뇌 실질로의 항체 또는 항체 단편의 *생체 내* 장기간 발현에 대해 최적임을 입증할 수 있는 느린 회전율을 갖기 때문이다.

[0023] 대안적으로, 벡터는 BBB의 다수의 세포 유형을 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 예를 들어, 벡터는 BBB의 내피 세포 및 성상세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 대안적으로, 벡터는 BBB의 내피 세포 및 주피세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 추가의 대안으로서, 벡터는 BBB의 성상세포 및 주피세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 또 다른 대안에서, 벡터는 BBB의 내피 세포, 성상세포 및 주피세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 상기 언급한 바와 같이, 형질도입 또는 형질감염 후, 항체 또는 항체 단편이 발현된다.

[0024] 일부 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는 BBB의 세포를 선택적으로 표적화한다. BBB의 특정 세포를 표적화 하는 것은, 예를 들어, 향신경성(neurotropic) 벡터를 사용하여 달성될 수 있다. 향신경성 벡터는 바이러스 벡터일 수 있으며, 이러한 용어는 조작된 버전을 포함한다. 바이러스 벡터는 전형적으로 복제 능력이 없다. 폴리뉴클레오티드는 BBB의 세포의 게놈 내로 통합될 수 있다. 향신경성 벡터의 하나의 예는 헤르페스 단순 바이러스(HSV, herpes simplex virus)이다. 본원에서 사용된 바와 같이 "향신경성 벡터"는 비-BBB 및/또는 비-CNS 세포 각각에 비해 BBB 및/또는 CNS의 세포를 우선적으로 형질도입 또는 형질감염시키는 벡터를 지칭한다. 따라서, 일 실시형태에서, 벡터는 향신경성 벡터를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 벡터는 변형된 HSV를 포함한다.

[0025] BBB의 세포를 선택적으로 표적화하는 대안적인 경로는 펩티드, 소분자(SME), 항체 또는 이의 항체 단편, 단백질, 나노입자, 지질, 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 벡터를 BBB의 세포로 표적화하는 벡터 표면의 양이온성 분자를 (특히 바이러스 캡시드와 같은 표면 상에) 발현하거나 포함하는 벡터를 이용하는 것이다.

[0026] 일 실시형태에서, 벡터는 벡터를 BBB의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상의 펩티드를 발현한다. 즉, 벡터 표면 상에 발현되거나 포함된 펩티드, 소분자, 항체 또는 이의 항체 단편, 단백질, 나노입자, 지질, 올리고뉴클레오티드, 압타머, 또는 양이온성 분자는 BBB의 세포에 표적화의 특이성을 부여한다. 또 다른 실시형태에서, 벡터 표면 상에 발현되거나 포함된 펩티드 또는 다른 열거된 분자는 벡터를 BBB의 특정 세포-유형에 표적화한다. 적합한 펩티드, 및 파지 디스플레이 방법을 비롯한 이러한 펩티드의 생성 및 시험 방법의 예가 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, 펩티드는 세포 트랜스사이토시스와 관련된 리간드 또는 수용체-표적화 펩티드를 포함할 수 있다. 이러한 펩티드는 수용체-매개된 트랜스사이토시스를 사용하여 BBB의 세포 내로 벡터의 흡수를 가능케 한다. 일 실시형태에서, 펩티드는 하기로부터 선택되는 수용체를 표적으로 한다: 트랜스페린 수용체, 인슐린 수용체 및 저밀도 지단백질 수용체. 추가의 실시형태에서, 펩티드는 트랜스페린 펩티드를 포함한다. BBB 표적화 펩티드의 예는 AAV2 균주에 포함된 NRGTEWD(SEQ ID NO: 15) 펩티드이고, 이들과 같은 AAV-BR1 펩티드는 일부 실시형

태에서 비-바이러스 벡터에 통합될 수 있다.

[0027] 따라서, 벡터는 바이러스 캡시드 단백질과 같은 벡터 표면 단백질에서의 삽입, 결실 또는 치환과 같은 돌연변이를 수반할 수 있으며, 이는 BBB의 세포에 대한 벡터의 표적화를 초래한다. 특정한 실시형태에서, 벡터는 벡터를 BBB의 세포로 표적화하는 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0028] 대안적으로 또는 추가로서, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 향신경성 바이러스 벡터는 BBB의 세포를 특이적으로 표적화하기 위해 사용될 수 있다.

[0029] 용어 "벡터"는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 발명의 맥락에서 적합하게는 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포 내로 (형질도입 또는 형질감염에 의해) 수송하기 위해 사용된다. 이러한 정의는 비-바이러스 및 바이러스 벡터 둘 모두를 포함한다. 바이러스 또는 비-바이러스 벡터는 BBB 또는 CNS 유래의 세포, 예를 들어 비제한적으로 뇌 내피 세포를 표적화 하여, CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로 치료 항체 분자를 국소적으로 생산할 수 있다. 이러한 신규한 접근법에 의해 생산된 항체, 특히 치료 항체는 CNS-관련 장애를 치료하는데 사용될 수 있다. 이러한 시나리오에서, 뇌 내피 세포 및/또는 주피세포 및/또는 성상세포는 CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로 항체의 고품질 및 장기간 발현을 제공하는 저장소로서 작용한다.

[0030] 비-바이러스 벡터는 비제한적으로 유기 나노물질 예를 들어, 리포좀, 엑소좀, 덴드리머, 및 미셀 또는 무기 나노물질 예를 들어 금 나노입자, 실리카 나노입자 및 탄소 나노튜브를 포함한다. 일 실시형태에서, 비-바이러스 벡터는 벡터를 BBB의 세포에 표적화하는 벡터 표면 상에 펩티드, 소분자(SME), 항체 또는 이의 항체 단편, 단백질, 나노입자, 지질, 올리고뉴클레오티드, 압타머 또는 양이온성 분자를 발현한다.

[0031] 바이러스 벡터는 비제한적으로 야생형 바이러스 및 조작된(예를 들어 변형된) 바이러스를 포함한다. 바이러스 벡터의 예는 비제한적으로 아데노 관련 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 레트로바이러스, 리노바이러스, 렌티바이러스, 간염, HSV 및 임의의 바이러스-유사 입자를 포함한다. 당업계에 알려진 바와 같이, 바이러스-유사 입자(VLP, virus-like particle)는 실제 고유 바이러스의 조직화 및 형태를 모방하지만 바이러스 게놈이 없는 다중 단백질 구조이다. 본 발명은 AAV 벡터에 의한 뇌 내피 세포의 형질도입이 뇌 내피 세포에 의한 고품질 및 다량의 항체 분비로 이어진다는 예상치 못한 발견에 기인한다. 따라서, 일 실시형태에서, 바이러스 벡터는 AAV이다. AAV는 임의의 적합한 혈청형일 수 있으며, 이의 예는 비제한적으로 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV 혈청형 2(AAV2), AAV 혈청형 3(AAV3), AAV 혈청형 4(AAV4), AAV 혈청형 5(AAV5), AAV 혈청형 6(AAV6), AAV 혈청형 7(AAV7), AAV 혈청형 8(AAV8), AAV 혈청형 9(AAV9), AAV 혈청형 10(AAV10), AAV 혈청형 11(AAV11), 또는 AAV 혈청형 12(AAV12), 또는 임의의 다른 야생형 혈청형 또는 조작된 AAV를 포함한다. 보다 구체적으로, AAV는 AAV 혈청형 1(AAV1), AAV 혈청형 2(AAV2), AAV 혈청형 8(AAV8), AAV 혈청형 9(AAV9) 및 AAV 혈청형 10(AAV10)으로부터 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 바이러스 벡터는 AAV2, AAV8 AAV9 및 AAVrh.10(AAV 레수스 단리물10)으로부터 선택된다.

[0032] 추가의 실시형태에서, 바이러스 벡터는 조작된 AAV이다. 조작된 AAV는 조작된 AAV2, 조작된 AAV9, 조작된 AAV1 또는 조작된 AAV10일 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 조작된 AAV2는 AAV-BR1이다. 또 다른 바람직한 실시형태에서, 조작된 AAV9는 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB 또는 AAV9-PHP-V이다. 추가의 바람직한 실시형태에서, 조작된 AAV1는 AAV1RX, AAV1R6 또는 AAV1R7이다. 조작된 AAV1의 추가의 세부사항이 인용되어 본원에 포함된 Albright BH 등의 문헌 [53, 54]에 제공되어 있다. 가장 바람직한 실시형태에서, 벡터는 BBB 내피 세포에 특이적인 AAV-BR1 또는 AAV9-PHP-V1이다.

[0033] 추가의 실시형태에서, 벡터는 바이러스 및 비-바이러스 요소를 포함한다. 비로좀은 바이러스 및 비-바이러스 요소 둘 모두를 포함하는 벡터의 예이다. 추가의 예는 양이온성 지질과 혼합된 바이러스 벡터이다.

[0034] 본원에 기술된 모든 벡터는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 DNA 또는 RNA를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 예를 들어, BBB의 세포에서 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 서열의 발현(예를 들어 번역)을 도울 수 있도록 추가의 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 발현 카세트 내에 포함될 수 있다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열을 포함하거나, 이로 필수적으로 이루어지거나 이로 이루어진다.

[0035] 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오

티드서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 91% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 92% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 93% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 94% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 96% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 97% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 98% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 또는 SEQ ID NO: 10으로부터 선택되는 뉴클레오티드 서열과 적어도 99% 동일성을 갖는 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0036] 본원에서 사용된 바와 같이 "동일성 %"는 뉴클레오티드 서열 및 아미노산 서열과 같은 2개의 서열 사이의 서열 유사성을 기술하기 위해 사용된다. 이는 최적의 방식으로 정렬된 2개의 서열을 비교함으로써 결정될 수 있고 여기서 비교될 뉴클레오티드 서열은 이들 2개의 서열 사이의 최적의 정렬을 위해 참조 서열에 대해 추가 또는 결실을 포함할 수 있다. 동일성 백분율은 두 서열 사이에 잔기가 동일한 동일한 위치의 수를 결정하고, 이 동일한 위치의 수를 비교 창의 총 위치 수로 나눈 다음 얻은 결과에 100을 곱하여 이 두 서열 간의 동일성 백분율을 얻음으로써 계산된다. 예를 들어, https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi 사이트에서 이용가능한 BLAST 프로그램인 "BLAST 2 서열"(문헌[Tatusova et al, "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250])을 이용할 수 있고, 사용되는 파라미터는 기본적으로 제공되는 것이며(특히 매개변수 "오픈 갭 페널티": 5 및 "확장 갭 페널티": 2; 선택한 매트릭스는 예를 들어 프로그램에서 제안한 매트릭스 "BLOSUM 62"임), 비교될 두 서열 사이의 동일성 백분율은 프로그램에서 직접 계산된다.

[0037] 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편, 리보솜 결합 부위, 개시 코돈, 정지 코돈, 및 전사 종결 서열을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 바람직하게는 모두의 프로모터를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 적합하게는 발현 카세트는 전사 후 조절 요소를 코딩하는 핵산을 추가로 포함할 수 있다. 적합하게는 발현 카세트는 polyA(폴리아데닐화) 요소를 코딩하는 핵산을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0038] 본원에서 사용된 바와 같이, 어구 "프로모터"는 전사가 발생하기 위해, 예를 들어 개시되기 위해 필요한 전사될 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열)의 상류에 일반적으로 위치하는 DNA의 영역을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 프로모터는 거대세포바이러스(CMV, cytomegalovirus) 프로모터, EF1A(인간 진핵 번역 신장 인자 1 알파 1), CAG(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), CBh(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), SV40(시미안 바이러스 40 인핸서/초기 프로

모터), GFAP(인간 신경교 원섬유 산성 단백질 프로모터), ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2), TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b), PDYN_1(프로디노르핀), GH1_1(인간 성장 호르몬), 오팔린_1(오팔린), SYN1_1(시냅신 1), CAMK2A_1(칼슘/칼모듈린 의존적 단백질 키나제 II 알파), NEFH_1(신경필라멘트 중쇄 폴리펩티드), NEUROD6_1(신경 분화 인자 6) 또는 OLIG2_1(희소돌기아교세포 전사 인자 2)로부터 선택된다. 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, CBh, GFAP, ATP1A2_1, CLDN_5, ADRB2_1, TNFRSF6B_1, PDYN_1, GH1_1. 오팔린_1, SYN1_1, CAMK2A_1, NEFH_1, NEUROD6_1 또는 OLIG2_1 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서이다. 보다 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 CBh, CMV, 또는 GFAP 또는 OLIG2에 융합된 CMV 초기 인핸서이다. 보다 더 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 CMV 프로모터 또는 CBh 프로모터이다.

[0039] 용어 프로모터는 합성 프로모터를 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "합성 프로모터"는 자연에서 발생하지 않는 프로모터와 관련된다. 예를 들어, 천연 발생 프로모터의 기능적 변이체가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 프로모터의 "기능적 변이체"는 참조 프로모터와 동일한 방식으로 기능하는 능력을 보유하는 참조 프로모터의 변이체이다. 추가 실시형태에서, 자연 발생 프로모터의 절단된 형태가 사용된다. 바람직한 실시형태에서, 프로모터는 CMV 초기 인핸서와 같은 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 절단되거나 변형된 자연 발생 프로모터는 벡터, 특히 바이러스 벡터에 상대적으로 큰 항체 코딩 서열의 삽입을 용이하게 하기 위해 사용될 수 있다.

[0040] 다른 곳에서 상세히 기술된 바와 같이, 벡터는 BBB(및/또는 CNS)의 세포를 특이적으로 표적화할 수 있다. 그러나, 다른 경우에 벡터는 특별히 BBB(및/또는 CNS)를 표적화 하지 않는다. 예를 들어, 많은 야생형 바이러스 벡터는 임의의 조직 또는 세포 유형을 표적화한다. 이러한 경우에, BBB-특이적 또는 CNS-특이적 프로모터는 다른 조직과 비교하여 우선적 또는 우세한 방식으로 BBB 또는 CNS의 세포에서 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도하기 위해 사용될 수 있다.

[0041] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 GFAP(인간 신경교 원섬유 산성 단백질) 프로모터를 포함한다. 추가의 실시형태에서, GFAP 프로모터는 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 예에서 성상세포에서 항체 또는 항체 단편의 우선적인 또는 우세한 발현이 존재한다.

[0042] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 ATP1A2_1(Na, K ATPase α2), CLDN_5(클라우딘 5), ADRB2_1(아드레노셉터 베타 2) 및 TNFRSF6B_1(TNF 수용체 수퍼패밀리 구성원 6b)로부터 선택되는 프로모터를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 프로모터는 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 예에서 BBB의 내피 세포에서 항체 또는 항체 단편의 우선적인 또는 우세한 발현이 존재한다.

[0043] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 PDYN_1(프로디노르핀), GH1_1(인간 성장 호르몬) 및 오팔린_1(오팔린)로부터 선택되는 프로모터를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 프로모터는 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 예에서 뇌 세포에서 항체 또는 항체 단편의 우선적인 또는 우세한 발현이 존재한다.

[0044] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 SYN1_1(시냅신 1), CAMK2A_1(칼슘/칼모듈린 의존적 단백질 키나제 II 알파), NEFH_1(신경필라멘트 중쇄 폴리펩티드), NEUROD6_1(신경 분화 인자 6)로부터 선택되는 프로모터를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 프로모터는 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 예에서 뉴런에서 항체 또는 항체 단편의 우선적인 또는 우세한 발현이 존재한다.

[0045] 일 실시형태에서, 폴리뉴클레오티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된 OLIG2_1(희소돌기아교세포 전사 인자 2) 프로모터를 포함한다. 추가의 실시형태에서, OLIG2_1 프로모터는 CMV 초기 인핸서에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 예에서 희소돌기아교세포에서 항체 또는 항체 단편의 우선적인 또는 우세한 발현이 존재한다.

[0046] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "작동 가능하게 연결된"은 요소가 기능적으로 연결되고 의도된 방식으로 서로 상호작용할 수 있도록 각각에 대한 다양한 폴리뉴클레오티드 요소의 배열을 지칭한다. 이러한 요소는 제한 없이 프로모터, 인핸서 및/또는 조절 요소, 폴리아데닐화 서열, 하나 이상의 인트론 및/또는 엑손, 및 발현될 관심 유전자의 코딩 서열을 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드 요소는, 적절하게 배향되거나 작동 가능하게 연결된

경우, 함께 작용하여 서로의 활성을 조절하고, 궁극적으로 생성물(예를 들어, 항체 또는 항체 단편)의 발현 수준에 영향을 미칠 수 있다. 조절한다는 것은 특정 요소의 활성 수준을 증가, 감소 또는 유지하는 것을 의미한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 작동 가능하게 연결된 것은 기능적 활성을 의미하며, 반드시 자연적인 위치 연결와 관련된 것은 아니다.

[0047] 전술된 바와 같이, 발현 카세트는 리보솜 결합 부위(RBS)를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, RBS는 내부 리소좀 진입 부위(IRES)이다. 일 실시형태에서, IRES는 뇌심근염 바이러스로부터 유도된다. 추가의 실시형태에서, IRES는 SEQ ID NO: 1 또는 SEQ ID NO: 8을 포함한다. IRES는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 하나 초과의 유전자를 포함하는 발현 카세트에서 특히 유리하다. 예를 들어, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자를 포함한다.

[0048] 본 발명의 모든 양태에 따르면, 발현 카세트는 추가로 도 1의 최상위 작제물에서 도표로 나타낸 바와 같이 작제물의 3' 말단에서 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE)를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. WPRE 서열은 바이러스 벡터에 의해 전달되는 유전자의 발현을 증가시키기 위해 일상적으로 사용된다. 이론에 구애됨이 없이, 발현 카세트에 서열을 포함시키면 mRNA 안정성이 증가하여 단백질 수율이 증가할 수 있다.

[0049] 대안적으로, 발현 카세트는 자가-절단 펩티드를 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 상기 자가-절단 펩티드는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 하나 초과의 유전자를 포함하는 발현 카세트에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자에 작동 가능하게 연결된 단일 프로모터를 포함한다. 이러한 예에서, 자가-절단 펩티드를 코딩하는 서열은 제1 유전자(예를 들어 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자)의 이후 및 제2 유전자(예를 들어 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자)의 이전에 위치할 수 있다. 이러한 시스템은 리보솜 스키핑(예를 들어, 단일 mRNA 전사물로부터 항체 또는 항체 단편의 분리된 중쇄 및 경쇄 폴리펩티드를 생성함)을 통해 동시번역적으로 일어나는 펩티드의 자가-절단을 가능케할 수 있다. 자가-절단 펩티드의 한 특정 부류는 DxExNPGP(SEQ ID NO: 16)의 핵심 서열 모티프를 공유하는 2A 펩티드 패밀리(구제역 바이러스로부터 유도된 F2A 펩티드 포함)이다. 따라서, 일 실시형태에서 발현 카세트는 2A 패밀리로부터의 자가-절단 펩티드를 코딩하는 서열을 포함한다. 추가 실시형태에서, 발현 카세트는 자가-절단 부위 상류의 푸린 절단 부위를 코딩하는 서열을 추가로 포함한다. 즉, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자에 작동 가능하게 연결된 단일 프로모터를 포함하며, 여기서 푸린 절단 펩티드 및 자가-절단 펩티드를 코딩하는 서열은 제1 유전자의 이후 및 제2 유전자의 이전에 위치한다. 푸린 절단 부위의 추가는 자가-절단 후 상류 단백질(예를 들어, 항체 또는 항체 단편의 경쇄)에 부착된 상태로 유지될 자가-절단 펩티드의 추가 아미노산을 제거하기 위해 이루어질 수 있다. 그러나, 자가-절단 펩티드의 상류에 푸린 절단 부위가 있더라도 추가 아미노산이 일부 상류 단백질(예를 들어 항체 또는 항체 단편의 경쇄)에 남아 있을 수 있으며 이로 인해 상류 단백질에 대한 면역 반응(예를 들어 면역원성)을 유발할 수 있다는 점은 주목할만 하다. 더욱이, 본 발명자들은 놀랍게도 푸린 및 2A를 함유하는 작제물의 증가된 응집이 자가-절단을 허용하는 것을 관찰하였다. 따라서, 바람직한 실시형태에서 발현 카세트는 제1 유전자 이후 및 제2 유전자 이전에 자가-절단 펩티드를 코딩하는 서열을 포함하지 않는다.

[0050] 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 5' 말단에 분비 펩티드를 추가로 포함할 수 있다. 본 발명의 맥락에서 분비 펩티드는 항체 또는 항체 단편을 CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로 전달하는 것을 돕는다. 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 다수의 유전자가 있는 경우, 모든 유전자는 분비 펩티드를 코딩하는 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명은 특정한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 특정한 폴리뉴클레오티드로 제한되지 않는다. 그러나, 전형적으로, 항체 또는 항체 단편은 치료 항체 또는 항체 단편이다. 치료 항체 또는 항체 단편은 CNS, 특히 뇌에서 그 활성을 유용하게 발휘하는 것이다. 따라서, 치료 항체 또는 항체 단편은 CNS, 특히 뇌 또는 척수에서 발현되는 표적 항원에 결합할 수 있다.

[0052] 일반적으로, 용어 "항체"는 본원에서 가장 넓은 의미로 사용되며, 이들이 원하는 항원-결합 활성을 나타내는 한 비제한적으로 모노클로날 항체, 폴리클로날 항체, 다중특이적 항체(예를 들어, 이특이적 항체), 완전한 인간 항체 및 항체 단편을 비롯하여 다양한 항체 구조를 포함한다. 항체는 또한 키메라 항체(특히 인간 불변 도메인에 융합된 마우스 VH 및 VL 영역), 재조합 항체, 재조합 항체의 항원-결합 단편, 인간화된 항체일 수 있다.

[0053] 항체의 "항체 단편"은 무손상(intact) 항체의 일부를 포함하고 무손상 항체가 결합하는 항원에 결합하는 무손상 항체 이외의 분자를 지칭한다. 일 실시형태에서, 항체 단편은 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')2; 디아바디; 선

형 항체; 단쇄 항체 분자(예를 들어, scFv 및 바람직하게는 scFv); 및 항체 단편으로부터 형성된 다중특이적 항체이다. 이 용어는 또한 단일 도메인 항체(예를 들어, VHH, VNAR 또는 인간 단일 도메인 항체)를 포함한다. 본 발명에 따른 하나의 바람직한 항체 단편은 scFv(일반적으로 약 10 내지 25개 아미노산의 짧은 링커 펩티드와 연결된 VH 및 VL 도메인의 융합 단백질)가 결정화 가능한 단편(Fc) 영역과 결합된 scFv-Fc이다. scFv-Fc에는 CH1 및 CL 도메인이 없다.

[0054] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "모노클로날 항체"는 실질적으로 동종인 항체 집단으로부터 수득된 항체를 지칭하며, 즉 집단을 포함하는 개별 항체는 소량으로 존재할 수 있는 자연 발생 돌연변이를 제외하고는 동일하다. 모노클로날 항체는 매우 특이적이며, 단일 항원 부위에 대해 지시된다. 변형된 "모노클로날"은 실질적으로 동종인 항체 집단에 속하는 항체의 특성을 나타내며 임의의 특정 방법에 의한 항체 생산을 필요로 하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명에 따라 사용되는 모노클로날 항체는 문헌[Kohler, Nature 256 (1975), 495]에 기재된 하이브리도마 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0055] 따라서, 본 발명의 맥락에서, 용어 "항체"는 완전한 면역글로불린 분자뿐만 아니라 이러한 면역글로불린 분자의 일부(즉, "항체 단편")에 관한 것이다. 또한, 이러한 용어는 상기 논의된 바와 같이, 변형 및/또는 변경된 항체 분자에 관한 것이다. 이러한 용어는 또한 재조합적으로 또는 합성적으로 생성된/합성된 항체에 관한 것이다. 이러한 용어는 또한 무손상 항체뿐만 아니라 분리된 경쇄 및 중쇄, Fab, Fv, Fab', Fab'-SH, F(ab')2와 같은 이의 항체 단편에 관한 것이다. "항체"라는 용어는 또한 완전 인간 항체, 키메라 항체, 인간화 항체, CDR-이식된 항체 및 단쇄 Fv(scFv), scFv-Fc 또는 항체-융합 단백질과 같은 항체 작제물을 포함하지만 이에 제한되지 않는다.

[0056] 인간화된 항체는 재구성된(reshaped) 인간 항체라고도 하는 변형된 항체이다. 인간화된 항체는 면역화된 동물로부터 유래된 항체의 CDR을 인간 항체의 상보성 결정 영역에 전사함으로써 구축된다. 이러한 목적을 위한 종래의 유전자 재조합 기술은 공지되어 있다(유럽 특허 출원 공개 EP 239400호; 국제 특허 출원 공개 WO 96/02576호; 문헌[Sato K. et al., Cancer Research 1993, 53: 851-856]; 국제 특허 공개 WO 99/51743호를 참조한다).

[0057] 본원에서 사용된 용어 "CDR"은 당업계에 잘 알려진 "상보적 결정 영역"에 관한 것이다. CDR은 상기 분자의 특이성을 결정하고 특이적 리간드와 접촉하는 면역글로불린의 일부이다. CDR은 분자의 가장 가변적인 부분이며 이러한 분자의 다양성에 기여한다. 각 V 도메인에는 3개의 CDR 영역인 CDR1, CDR2 및 CDR3이 존재한다. VH-CDR 또는 CDR-H는 가변 중쇄의 CDR 영역을 나타내고 VL-CDR 또는 CDR-L은 가변 경쇄의 CDR 영역에 관한 것이다. VH는 가변 중쇄를 의미하고 VL은 가변 경쇄를 의미한다. Ig-유래 영역의 CDR 영역은 문헌[Kabat "Sequences of Proteins of Immunological Interest", 5th edit. NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services (1991)]; 문헌[Chothia J., Mol. Biol. 196 (1987), 901-917] 또는 문헌[Chothia, Nature 342 (1989), 877-883]에 기술된 것과 같이 결정될 수 있다.

[0058] "Fc" 영역은 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 두 개의 중쇄 단편을 함유한다. 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 이황화 결합 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

[0059] "Fab' 단편"은 하나의 경쇄와 VH 도메인과 CH1 도메인 및 CH1과 CH2 도메인 사이의 영역을 또한 함유하는 하나의 중쇄의 일부를 함유하여, 2개의 Fab' 단편의 2개의 중쇄 사이에 사슬간 이황화 결합이 형성되어 F(ab') 2 분자를 형성할 수 있다.

[0060] "F(ab')2 단편"은 2개의 경쇄 및 CH1 도메인과 CH2 도메인 사이에 불변 영역의 일부를 함유하는 2개의 중쇄를 함유하여, 2개의 중쇄 사이에 사슬간 이황화 결합이 형성된다. 따라서 F(ab')2 단편은 2개의 중쇄 사이에 이황화 결합에 의해 함께 유지되는 2개의 Fab' 단편으로 구성된다.

[0061] "Fv 영역"은 중쇄 및 경쇄 모두로부터의 가변 영역을 포함하지만, 불변 영역은 결여되어 있다.

[0062] "scFv-Fc"는 항체의 CH2 및 CH3 도메인을 포함하는 2개의 중쇄 단편을 함유하는 "Fc" 영역에 융합된, 중쇄 및 경쇄 모두로부터의 "Fv" 가변 영역을 포함한다. 2개의 중쇄 단편은 2개 이상의 이황화 결합 및 CH3 도메인의 소수성 상호작용에 의해 함께 유지된다.

[0063] 따라서, 본 발명의 맥락에서, 항체 분자 또는 이의 항체 단편이 제공되며, 이는 인간화되었고 적어도 2개의 항체 분자 또는 이의 항체 단편의 혼합물을 포함하여, 약학 조성물에서 성공적으로 사용될 수 있다.

[0064] 단백질의 정의된 영역 내의 "에피토프에 결합하는 항체"는 단백질에 결합하기 위해 해당 영역 내에 하나 이상의 아미노산이 존재해야 하는 항체이다.

[0065] 특정한 실시형태에서, 단백질의 정의된 영역 내의 "에피토프에 결합하는 항체"는 돌연변이 분석에 의해 식별되

며, 여기서 단백질의 아미노산이 돌연변이되며, 생성된 변경된 단백질(예를 들어, 에피토프를 포함하는 변경된 단백질)에 대한 항체의 결합은 변경되지 않은 단백질에 대한 결합의 적어도 20%인 것으로 결정된다. 일부 실시형태에서, 단백질의 정의된 영역 내의 "에피토프에 결합하는 항체"는 돌연변이 분석에 의해 식별되며, 여기서 단백질의 아미노산이 돌연변이되며, 생성된 변경된 단백질(예를 들어, 에피토프를 포함하는 변경된 단백질)에 대한 항체의 결합은 변경되지 않은 단백질에 대한 결합의 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%인 것으로 결정된다. 특정한 실시형태에서, 항체의 결합은 FACS, WB에 의해 또는 ELISA와 같은 적합한 결합 분석에 의해 결정된다.

[0066] 본 발명에 따라 사용하기 위한 항체 또는 항체 단편은 바람직하게는 CNS에서 에피토프에 결합하는 항체 또는 항체 단편이다. 보다 구체적으로, 항체 또는 항체 단편은 CNS의 질환 또는 장애와 관련된 CNS에서 에피트포에 결합한다. 바람직한 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 하기로부터 선택된다: 항-ErbB2, 항-TDP-43(NI-205), 항-A베타(예를 들어 바피뉴주맙, 솔라네주맙, 레카네맙, 아두카누맙, 도나네맙, 간테네루맙 또는 크레네주맙), 항-ApoE4(아포리포단백질 E4) 및 항-DDX3X(ATP-의존적 RNA 헬리카제), 항-Tau(틸라보네맙, 고수라네맙, 자고테네맙, 세모리네맙, 베프라네맙, BIIB076, JNJ-63733657, Lu AF87908, PNT001, E-2814), 항-LINGO-1(예를 들어 오피시누맙), 항-알파-시누클레인(신파네맙, 프라시네주맙, MEDI-1341, Lu AF82422, BAN0805), 항-ASC(IC-100), 항-NLRP3, 항-C5(라불리주맙, 에쿨리주맙), 항-C1q(ANX-005), 항-C3, 항-헌팅틴(C-617, NI-302), 항-프리온, 항-CD20(예를 들어 오파투무맙, 오크렐리주맙, 리툭시맙, BCD-132, 우빌리툭시맙, BAT-4406F, AL-014), 항-PD-1(IBC-Ab002) 또는 항-VEGF-A(베바시주맙, 라니비주맙, 브롤루시주맙, 파리시맙, 바누시주맙).

[0067] 본 명세서의 실험 섹션에서 설명된 바와 같이, 인간 뇌 내피 세포주 hCMEC/D3는 다음 중 하나를 코딩하는 유전자를 전달하는 AAV2, AAV8, AAV9 및 AAVrh.10(AAV 레수스 단리물10)에 의해 형질도입되었다: 항-TDP-43 항체 MAB1(키메라 인간 IgG1), 항-ErbB2 항체(허셉틴) MAB2 또는 eGFP(향상된 녹색 형광 단백질). 이것은 시간이 지남에 따라 항체의 고품질 및 장기간 발현을 초래하였다. 본 발명자들은 또한 마우스 세포주 및 인간 일차 뇌 내피 세포에서 그들의 관찰을 확인하였다. 전달 시스템은 다양한 항체 형식(전장 항체 및 항체 단편 포함)의 범위에서 올바르게 폴딩된 항체를 생성하였다. 결정적으로, 이러한 실험에서 분비된 항체는 정단측 및 기저외측 모두에서 검출되었고, 이 모델에서 BBB의 뇌 실질측으로의 전달을 확인하였다. 이와 같이, 실시예에 포함된 데이터는 본원에 기술된 방법 및 벡터가 CNS에 올바르게 폴딩된 항체 또는 항체 단편(예를 들어 치료용 항체)을 전달하는데 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0068] 본 발명의 목적은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 CNS 및/또는 BBB의 세포에 전달함으로써 CNS-관련 질환 또는 장애를 치료하기 위해 CNS 내의 항체 농도를 증가시키는 방법을 최초로 제공하는 것이다. 이러한 신규한 접근법은 CNS에서 발생하는 다양한 질환이나 장애를 치료하는데 유용할 수 있다.

[0069] 의심의 여지를 없애기 위해, 본원에서 사용되는 용어 "치료"는 상태의 증상 치료 및 예방뿐만 아니라 치료적 치료를 포함한다. 용어 "치료하다", "치료하는" 또는 "~의 치료"(및 이의 문법적 변형)의 사용은 대상체 상태의 중증도가 감소, 적어도 부분적으로 향상 또는 개선 및/또는 적어도 하나의 임상 증상의 일부 경감, 완화 또는 감소가 달성되고/되거나 질환 또는 장애의 진행이 지연에 있음을 의미한다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이 용어 "대상체"는 CNS 내에 존재하는 특정 상태, 장애 또는 증상을 갖거나 가질 위험이 있는 개체, 예를 들어 인간과 같은 포유류를 지칭한다. 대상체는 본 발명에 따른 치료가 필요한 대상체일 수 있다. 대상체는 상태, 장애 또는 증상에 대한 치료를 받았을 수 있다. 대안적으로, 대상체는 본 발명에 따른 치료 전에 치료를 받지 않았다.

[0071] 본 발명은 인간 대상체를 포함하는 임의의 포유류에서 사용될 수 있고, CNS의 질환 또는 장애를 앓고 있는 대상체와 관련된 질환 또는 장애의 치료를 위해 사용될 수 있는 혁신적인 전략에 관한 것이다. 치료 항체 유전자를 뇌 내피 세포에 전달함으로써, 이들은 CNS 내에 고품질의 장기간 항체 발현을 제공하는 저장소 역할을 한다.

[0072] 일 실시형태에서, 질환 또는 장애는 신경퇴행성 장애이다.

[0073] 추가의 실시형태에서, 질환 또는 장애는 비제한적으로 아밀로이드-베타 단백질과 관련된 질환, TDP-43-단백질병증, 알파-시누클레오병증, 타우병증, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 비롯한 트리뉴클레오티드 반복 장애, 뇌-관련 암 및 종양, 간질, 정신 질환, 신경염증성 질환, 신경근 질환, 바이러스-유도된 뇌염 및 미세아교세포 기능장애를 특징으로 하는 질환을 비롯하여, CNS와 관련되어 있다.

[0074] 또 다른 실시형태에서, 환자의 관련 질환 또는 장애 또는 병태는 아밀로이드-베타 단백질과 관련된 질환, TDP-43-단백질병증, 알파-시누클레오병증, 타우병증, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 포함하는 트리뉴클

레오티드 반복 장애, 뇌-관련 암 및 종양, 간질, 정신 질환, 신경염증성 질환, 신경근 질환, 바이러스-유도된 뇌염, 및 미세아교세포 기능장애를 특징으로 하는 질환이다.

[0075] 일부 실시형태에서, 본 발명에 따른 아밀로이드-베타 관련 질환, 장애 또는 병태는 경도 인지장애(MCI: mild cognitive impairment), 다운 증후군(DS: Down syndrome), 다운 증후군-관련 알츠하이머병, 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA: cerebral amyloid angiopathy), 다발성 경화증, 파킨슨병(PD: Parkinson's disease), 치매 동반 파킨슨병(PDD: Parkinson's Disease with Dementia), 루이소체 동반 치매, ALS(근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis))을 포함한다. 이러한 병태의 대부분은 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하거나 이와 관련이 있다. 본 발명에 따른 인지 기억 능력의 상실을 특징으로 하거나 이와 관련된 병태는 AD, 경도 인지장애(MCI), 다운 증후군(DS), 다운 증후군-관련 알츠하이머병, 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA), 다발성 경화증, 파킨슨병, 치매 동반 파킨슨병(PDD), 루이소체 동반 치매, ALS(근위축성 측삭 경화증)을 포함한다.

[0076] 특히, 아밀로이드-베타 관련 질환, 장애 또는 병태는 알츠하이머병(AD, Alzheimer's Disease), 다운 증후군(DS), 다운 증후군-관련 알츠하이머병, 대뇌 아밀로이드 혈관병증(CAA), 또는 루이 소체 치매로부터 선택될 수 있다.

[0077] 일부 실시형태에서, TDP-43-단백질병증은 전두측두엽 치매(FTD: Frontotemporal dementia, 예를 들어 산발성 또는 가족성인 운동-신경 질환(MND: motor-neuron disease)을 동반하거나 동반하지 않은 것, 프로그래눌린(GRN: progranulin) 돌연변이를 동반한 것, C9orf72 돌연변이를 동반한 것, TARDBP 돌연변이를 동반한 것, 발로신-함유 단백질(VCP: valosine-containing protein) 돌연변이를 동반한 것, 염색체 9p와 관련된 것, 피질기저성 변성, 유비퀴틴-양성 TDP-43 봉입물(FTLD-TDP)을 동반한 전두측두엽 변성(FTLD), 은친화 과립성병, 픽병, 의미 변이 원발성 진행성 실어증(svPPA: semantic variant primary progressive aphasia), 행동 변이형 FTD(bvFTD: behavioural variant FTD), 비유창성 변이성 원발성 진행성 실어증(nfvPPA: Nonfluent Variant Primary Progressive Aphasia) 등), 근위축성 측삭 경화증(ALS, 예를 들어 산발성 ALS, TARDBP 돌연변이를 동반한 것, 혈관신생(ANG: angiogenin) 돌연변이를 동반한 것), 알렉산더병(AxD: Alexander disease), 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증(LATE: Limbic-predominant Age-related TDP-43 Encephalopathy), 만성 외상성 뇌병증(CTE: Chronic Traumatic Encephalopathy), 페리 증후군, 알츠하이머병(AD, AD의 산발성 및 가족성 형태 포함), 다운 증후군, 가족성 영국 치매, 폴리글루타민병(헌팅턴병 및 제3형 척수소뇌 운동실조증(SCA3: spinocerebellar ataxia type 3; 마차도 조셉병이라고도 함)), 해마 경화증 치매 및 근병증(산발성 봉입체 근염, 발로신-함유 단백질(VCP; 뼈의 파제트병 및 전두측두엽 치매)에 돌연변이가 있는 봉입체 근염), 외상성 뇌 손상(TBI), 루이소체를 동반한 치매(DLB: Dementia with Lewy Bodies) 또는 파킨슨병(PD)을 포함한다.

[0078] 특히, TDP-43-단백질병증 질환, 장애 또는 병태는 전두측두엽 치매(FTD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증(LATE) 및 다발성 경화증(MS)으로부터 선택될 수 있다.

[0079] 일부 실시형태에서, 시누클레인병증은 파킨슨병 (산발성, 알파-시누클레인 돌연변이가 있는 가족성, 알파-시누클레인 외 돌연변이가 있는 가족성, 순수 자율신경 부전 및 루이 소체 연하곤란), 루이 소체 치매(LBD; 루이소체를 동반한 치매(DLB)("순수" 루이 소체 치매), 파킨슨병 치매(PDD) 포함), 또는 미만성 루이소체 질환, 산발성 알츠하이머병, APP 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, PS-1, PS-2 또는 기타 돌연변이가 있는 가족성 알츠하이머병, 가족성 영국 치매, 알츠하이머병의 루이 소체 변이, 다계통 위축증(샤이-드래거 증후군, 선조체흑색 변성 및 올리브뇌교소뇌 위축증), 외상성 뇌 손상, 만성 외상성 뇌병증, 권투선수 치매, 타우병증(픽병, 전두측두엽 치매, 진행성 핵상 마비, 피질기저성 변성, 17번 염색체와 니만-픽 유형 C1 질환과 관련된 파킨슨병을 동반한 전두측두엽 치매), 다운 증후군, 크로이츠펠트-야곱병, 헌팅턴병, 운동 신경 질환, 근위축성 측삭 경화증(괌의 산발성, 가족성 및 ALS-치매 복합체), 신경축삭 이영양증, 뇌 철 축적 유형 1을 동반한 신경변성(할러포르덴-스파츠 증후군), 프리온병, 게르스트만-슈트로이슬러-샤인커병, 모세혈관확장성 실조증, 메이그 증후군, 아급성 경화성 범뇌염, 고셔병, 크라베병 및 기타 리소좀 축적 장애(쿠포-라케푸 증후군 및 산필리포 증후군 포함), 또는 급속 안구 운동(REM: rapid eye movement) 수면 행동 장애이다.

[0080] 특히, 시누클레인병증은 파킨슨병, 다계통 위축증, 루이 소체 치매(LBD; 루이소체를 동반한 치매(DLB)("순수" 루이 소체 치매), 파킨슨병 치매(PDD) 포함), 또는 미만성 루이소체 질환으로부터 선택될 수 있다.

[0081] 일부 실시형태에서, 타우병증은 알츠하이머병, 근위축성 측삭 경화증, 파킨슨병, 크로이츠펠트-야곱병, 권투선수 치매, 다운 증후군, 게르스트만-슈트로이슬러-샤인커병, 프리온 단백질 대뇌 아밀로이드 혈관병증, 외상성 뇌 손상, 근위축성 측삭 경화증/괌의 파킨슨병-치매 복합체, 신경원섬유 매듭을 동반한 비-구아마니아 운동 신

경 질환, 은친화 과립성 치매, 피질기저성 변성, 석회화를 동반한 미만성 신경원섬유 매듭, 전두측두엽 치매, 17번 염색체와 연관된 파킨슨병을 동반한 전두측두엽 치매, 할러포르텐-스파츠병, 다계통 위축증, 니만-픽병 유형 C, 팔리도-폰토-니그랄 변성, 픽병, 진행성 피질하 신경교증, 진행성 핵상 마비, 아급성 경화성 범뇌염, 매듭 우세 치매, 뇌염후 파킨슨증, 및 근긴장성 이영양증으로부터 선택된다.

[0082] 특히, 타우병증은 알츠하이머병 또는 진행성 핵상 마비로부터 선택될 수 있다.

[0083] 일부 실시형태에서, 신경염증성 질환, 장애 또는 이상은 알츠하이머병, 파킨슨병, 전두측두엽 치매, 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증, 근위축성 측삭 경화증, 운동 신경 질환, 폴리-글루타민 장애 예를 들어 헌팅턴병을 포함하는 트리뉴클레오티드 반복 장애, 다발성 경화증, 탈수초화, 바이러스 뇌염, 간질, 허혈성 및 출혈성 뇌졸중, 외상성 뇌 손상, 만성 외상성 뇌병증, 크리오피린-관련 주기적 증후군(CAPS: cryopyrin-associated periodic syndrome), 머클-웰스 증후군(MWS: Muckle-Wells syndrome), 가족성 한랭 자가염증 증후군(FCAS: familial cold autoinflammatory syndrome), 신생아-발현 다발성 염증 질환(NOMID: neonatal-onset multisystem inflammatory disease), 주기적 발열 증후군(HIDS: periodic fever syndrome), B-세포 면역결핍을 동반한 철적혈모구 빈혈, 주기적 발열, 발달 지연(SIFD), 베체트병, 쇼그렌 증후군, 뇌성 말라리아, 폐렴구균성 수막염으로 인한 뇌 손상, 치쿤구니아 바이러스, 로스 리버 바이러스, 인플루엔자, HIV, 코로나바이러스, 뎅기열, 지카 바이러스, 기생충 감염, 세균 감염, 우울증, 심리적 스트레스, HIV-관련 신경인지 장애, 코로나바이러스-관련 염증성 병리로부터 선택된다.

[0084] 일부 실시형태에서, 신경염증성 질환, 장애 또는 이상은 바람직하게는 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 전두측두엽 치매, 다발성 경화증, 탈수초화, 바이러스 뇌염, 간질, 뇌졸중, 크리오피린-관련 주기적 증후군(CAPS), 항-호중구 세포질 항체-관련 혈관염, 루푸스, 건선성 관절염, 및 유전성 재발성 발열(HRF: Hereditary Recurrent Fever)로부터 선택된다.

[0085] 일부 실시형태에서, 신경 염증 질환, 장애 또는 이상은 보다 바람직하게는 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭 경화증, 전두측두엽 치매, 다발성 경화증, 탈수초화, 바이러스 뇌염, 뇌졸중, 크리오피린-관련 주기적 증후군(CAPS)으로부터 선택된다.

[0086] 일부 실시형태에서, 신경근 질환은 뇌혈관 사고, 파킨슨병, 다발성 경화증, 헌팅턴병 및 크로이츠펠트-야곱병, 척수 근육 위축 및 근위축성 측삭 경화증을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, CNS 질환 또는 장애는 신경퇴행성 장애이다.

[0087] 바람직한 실시형태에서, CNS의 질환 또는 장애는 전두측두엽 치매(FTD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 만성 외상성 뇌병증(CTE), 및 변연-우세 연령-관련 TDP-43 뇌병증(LATE) 및 다발성 경화증(MS)으로부터 선택된다.

[0088] 본 발명에 따라 또한 치료될 수 있는 뇌 및 CNS의 암 및 종양은 성상세포종(소뇌 및 대뇌 포함), 뇌간 신경교종, 뇌종양, 악성 신경교종, 상의세포종, 교모세포종, 수모세포종, 천막상부 원시 신경외배엽 종양, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 원발성 중추신경계 림프종, 상의세포종, 뇌간 신경교종, 시각 경로 및 시상하부 신경교종, 두개외 생식 세포 종양, 수모세포종, 골수형성부전 증후군, 희소돌기아교세포종, 골수이형성/골수증식성 질환, 골수성(myelogenous) 백혈병, 골수성(myeloid) 백혈병, 다발성 골수종, 골수증식성 장애, 신경모세포종, 형질 세포 신생물/다발성 골수종, 중추신경계 림프종, 내인성 뇌종양, 성상아교세포 뇌종양, 신경교종, 및 중추신경계의 전이성 종양 세포 침입을 포함한다.

[0089] 본원에 기술된 바와 같은 벡터는 주사 또는 시간에 따른 점진적 주입을 포함하는 임의의 통상적인 경로에 의해 대상체에게 투여될 수 있다. 투여는 비경구 투여를 통해 이루어질 수 있다. 투여는 예를 들어 주입에 의하거나 척추강 내, 수조내, 뇌실 내, 실질 내, 비강 내, 유리체 내, 피하 또는 근육 내 경로일 수 있다. 일 실시형태에서, 벡터는 정맥 내 주사 또는 정맥 내 주입에 의해 투여된다. 추가의 예로서, 비경구 주사(피하, 근육 내, 혈관 내 또는 주입 포함)에 적합한 형태는 멸균 용액, 현탁액 또는 에멀젼을 포함한다. 정맥 내 주사가 바람직하다.

[0090] 본 발명의 조성물의 적합한 투여량의 확인은 당업자의 통상적인 능력 내에 있다. 예를 들어, 주어진 대상체에 대한 적절한 투여량은 본 발명에 따라 사용하기 위한 벡터의 작용을 변형시키는 것으로 알려진 다양한 요인을 고려하여 결정될 것이다. 예를 들어, CNS 질환 또는 장애의 중증도 및 유형, 체중, 성별, 식이, 투여 시간 및 투여 경로, 기타 약물 및 기타 관련 임상 요인. 투여량 및 일정은 특정 상태, 장애 또는 증상, 대상체의 전체 상태에 따라 달라질 수 있다. 주어진 질병의 치료를 위해 허용되는 단일 용량이 없지만 용량 범위가 적합한 것

으로 간주되는 경우도 있다. 유효 투여량은 *시험관 내* 또는 *생체 내* 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0091] 또한 대상체에서 CNS의 질병 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 이러한 방법은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 상기 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 일으키고, 유리하게는 형질도입 또는 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 생산(예를 들어 발현)하고 항체 또는 항체 단편은 CNS 내로, 바람직하게는 뇌 실질 내로 전달된다.

[0092] 또 다른 양태에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 BBB로 항체 또는 항체 단편을 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현한다.

[0093] 추가 양태에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CNS로 항체 또는 항체 단편을 전달하는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다.

[0094] 추가 양태에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 CNS의 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 BBB의 세포의 형질도입 또는 형질감염을 초래하고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다.

[0095] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서 CNS의 질환 또는 장애의 치료를 위한 약제의 제조를 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 용도를 제공하며, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입하거나 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다.

[0096] 추가 양태에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 대상체의 BBB로 전달하기 위한 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터의 용도를 제공하며, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB)의 세포를 형질도입하거나 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다.

[0097] 본 발명의 이전 양태에 따라 사용하기 위한 벡터와 관련하여 본원에 기술된 모든 실시형태는 본 발명의 이러한 추가 양태에 동등하게 적용가능하다.

[0098] 본 발명자들은 특정한 발현 카세트 작제물이 생성된 항체의 품질을 향상시킨다는 것을 발견하였다. 이는 *생체 내*에서 항체를 전달할 때 중요하다. 따라서, 본 발명의 발현 카세트(본원의 본 발명의 다양한 양태 및 실시형태에서 상세히 설명됨)를 사용하면 CNS로의 직접 전달 또는 BBB 세포를 통한 전달(본원에 정의된 바와 같은 본 발명에 따름)일 수 있는, CNS로의 항체 및 항체 단편의 유리한 전달을 제공한다. 따라서 하기 양태는 *생체 내*에서 수행될 수 있으며, 여기서 세포는 BBB 세포, 특히 뇌 내피 세포 또는 보다 일반적으로 CNS의 세포이다. 따라서, 항체 또는 항체 단편은 일반적으로 본원에 기재된 바와 같은 치료 항체 또는 항체 단편이다. 하기 양태는 또한 일부 실시형태에서 항체 생산을 위해 *생체 외* 또는 *시험관 내*에서 수행될 수 있다. 이러한 실시형태에서, 임의의 적합한 세포 유형이 이용될 수 있다. 여기서 다시, 항체 또는 항체 단편은 일반적으로 치료 항체 또는 항체 단편이다.

[0099] 따라서, 본 발명은 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다: 대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한, 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB) 또는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 바람직하게는 뇌 실질 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다. 본 발명자들은 이러한 작제물에서 중쇄 앞에 경쇄를 배열하는 것이 상당히 유리하다는 것을 발견하였다. 바람직하게는 IRES는 제1 유전자와 제2 유전자 사이에 위치한다.

[0100] 추가 양태에서, 본 발명은 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 벡터를 제공한다: 대상체에서 중추신경계(CNS)의 질환 또는 장애의 치료 방법에서 사용하기 위한, 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터, 여기서 벡터는 혈액 뇌 장벽(BBB) 또는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감

염시키고 형질도입되거나 형질감염된 세포는 항체 또는 항체 단편을 발현하여 CNS 내로 바람직하게는 뇌 실질 내로 항체 또는 항체 단편의 전달을 초래한다. 이러한 작제물에서, IRES는 필요하지 않다.

[0101] BBB와 마찬가지로 CNS는 다중 세포 유형을 포함하고 일 실시형태에서 벡터는 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 CNS에서 적어도 하나(최대 모두) 세포 유형으로 형질도입 또는 형질감염시킨다. 예를 들어, 벡터는 뇌 내피 세포, 뉴런, 주피세포, 성상세포, 희소돌기아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포로부터 선택되는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 따라서, 벡터는 CNS의 뉴런 및 비뉴런(신경교) 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 대안적으로, 벡터는 CNS의 하나의 특정 세포 유형을 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 예를 들어, 벡터는 CNS의 뇌 내피 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 벡터는 CNS의 뉴런을 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 추가 예에서, 벡터는 CNS의 성상세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 또 다른 예에서, 벡터는 희소돌기아교세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 또 다른 추가의 예에서, 벡터는 CNS의 미세아교세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 대안적으로, 벡터는 CNS의 뇌실막 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다.

[0102] 추가의 실시형태에서, 벡터는 BBB 및 CNS 둘 모두로부터의 다수의 세포 유형을 형질도입하거나 형질감염시킨다.

[0103] 전술된 바와 같이, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터는, 특히 BBB 및/또는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있다. 다른 곳에서 설명된 BBB를 표적화하는 것에 대하여 설명된 것과 동일한 기술이 CNS를 직접적으로 표적화하는 벡터에도 동일하게 적용할 수 있다. 일 실시형태에서, 벡터는 벡터를 BBB 또는 CNS의 세포로 표적화하는 벡터 표면 상의 펩티드를 발현한다. 즉, 벡터 표면에 발현된 펩티드는 BBB 및/또는 CNS에 대한 표적화의 특이성을 부여한다. 또 다른 실시형태에서, 벡터 표면 상에 발현된 펩티드는 벡터를 BBB 및/또는 CNS의 특정 세포 유형에 표적화한다. 적합한 펩티드의 예 뿐만 아니라 파지 디스플레이 방법을 포함하는 이러한 펩티드를 생성하고 시험하는 방법은 당업계에 공지되어 있다.

[0104] 대안적으로 또는 추가로서, 항체 또는 항체 단편을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 향신경성 벡터는 특히 HSV와 같은 BBB 및/또는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감염시키는데 사용될 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 벡터는 향신경성 벡터를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 벡터는 변형된 HSV를 포함한다.

[0105] 본 발명의 이전 양태에 따라 사용하기 위한 벡터와 관련하여 본원에 기술된 모든 실시형태는 본 발명의 이러한 추가 양태에 동등하게 적용가능하다.

[0106] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 5'에서 3'으로 하기를 포함한다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터. 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자 이후 및 항체의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함할 수 있다. 즉, 발현 카세트는 5'에서 3'으로 하기를 포함한다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, IRES 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 5'에서 3'으로 하기를 포함한다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터. 발현 카세트 내의 각 요소의 위치는 다른 요소에 상대적이며 관례에 따라 여기에서 5' 말단에서 시작하여 3' 말단을 향해 이동하는 순서로 표현된다.

[0107] 본 발명은 또한 선행 기술에서 이전에 보고된 전략과 관련하여 상이한 분비 펩티드를 사용하고 내부(intra)- 및 하류 조절 요소를 맞춤화하여 사슬 위치를 교대함으로써 예상치 못한 더 높은 항체 발현 수율 및 개선된 단백질 품질에 관한 것이다.

[0108] 따라서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편 응집을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0109] (i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다; 또는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

[0110] (ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

[0111] 동일한 작제물은 또한 다른 작제물(본원에서 논의된 바와 같이, 특히 카세트에서 경쇄 앞에 중쇄가 있고/있거나 푸린/2A 펩티드와 같은 자가-절단 펩티드를 포함하는 것)이 사용되는 방법과 비교하여 개선된 항체 품질을 초래한다. 따라서 본 발명은 또한 항체 또는 항체 단편 성숙 및/또는 품질을 개선하는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0112] (i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다; 또는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

[0113] (ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

[0114] 즉, 본 발명에 따른 한 가지 방법은 항체 또는 항체 단편의 본래 구성과 동일한 3차원 구조를 갖는 항체 또는 항체 단편의 비율을 증가시킨다. 이는 예를 들어 SDS-PAGE와 같은 전기영동을 사용하여 측정될 수 있다. 또한 샘플을 환원(예를 들어, DTT 사용)한 다음 겔에서 실행하여 정확한 이황화 결합 형성을 확인하고 경쇄와 중쇄가 모두 예상 분자량에서 이동하는지 확인할 수 있다.

[0115] 본 발명자들은 놀랍게도 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자에 대한 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자의 위치가 관찰되는 응집의 비율에 영향을 미친다는 것을 관찰하였다. 실제로, 경쇄를 코딩하는 유전자가 중쇄를 코딩하는 유전자가 뒤따르는 발현 카세트의 제1 유전자인 경우 역배향과 비교하여 발현된 항체의 감소된 응집이 존재한다(예를 들어, 중쇄를 코딩하는 유전자가 경쇄를 코딩하는 유전자가 뒤따르는 발현 카세트의 제1 유전자인 경우).

[0116] 일 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함하고 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포와 비교하여 항체 응집이 감소된다: 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다. 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된 바와 같이, 발현 카세트는 선택적으로 도 1의 최상단 작제물에서 도식적으로 나타낸 바와 같이 작제물의 3' 말단에서 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이후에 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함한다. 이는 본 발명의 모든 관련 작제물 및 방법에 적용됨을 유의한다.

[0117] 추가의 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터, 그리고 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포에 비해 항체 또는 항체 단편 응집이 감소된다: 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터.

[0118] 예를 들어, 항체 또는 항체 단편 응집은 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 감소된다.

[0119] 본 발명자들은 또한 푸린 및 2A(예를 들어 구제역 바이러스, F2A로부터 유도된 2A 펩티드)를 함유하는 작제물의 증가된 응집이 자가-절단을 허용하는 것을 놀랍게도 관찰하였다. 따라서, 발현 카세트는 바람직하게 자가-절단 펩티드를 포함하지 않으며, 특히 푸린/2A를 포함하지 않는다.

[0120] 본 발명자들은 또한 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 유전자에 대한 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 유전자의 위치가 항체 역가에 영향을 미친다는 것을 관찰하였다. 실제로, 경쇄를 코딩하는 유전자가 중쇄를 코딩하는 유전자가 뒤따르는 발현 카세트의 제1 유전자인 경우, 역배향에 비해 발현된 항체 또는 항체 단편의 역가가 증가한다(예를 들어 중쇄를 코딩하는 유전자가 경쇄를 코딩하는 유전자가 뒤따르는 발현 카세트의 제1 유전자인 경우).

[0121] 추가 양태에서, 본 발명은 항체 또는 항체 단편 역가를 증가시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0122] (i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 또는 자가(예를 들어 푸린-2A) 절단 부위를 추가로 포함한다; 또는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

[0123] (ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

[0124] 이러한 관찰이 자가-절단 부위, 특히 푸린-2A 함유 작제물에 적용되지만, 본원에서 논의된 응집 및 면역원성 문제로 인해 포함되지 않는 것이 바람직하다.

[0125] 일 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다. 따라서, 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포에 비해 항체 역가가 증가한다: 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다. 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된 바와 같이, 발현 카세트는 선택적으로 도 1의 최상단 작제물에서 도식적으로 나타낸 바와 같이 작제물의 3' 말단에서 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이후에 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함한다.

[0126] 또 다른(덜 바람직한) 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 자가(예를 들어 푸린-2A) 절단 부위를 추가로 포함하고 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포에 비해 항체 역가가 증가한다: 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 자가(예를 들어 푸린-2A) 절단 부위를 추가로 포함한다. 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된 바와 같이, 발현 카세트는 선택적으로 도 1의 최상단 작제물에서 도식적으로 나타낸 바와 같이 작제물의 3' 말단에서 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이후에 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함한다.

[0127] 추가의 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터, 그리고 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포에 비해 항체 역가가 증가한다: 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터.

[0128] 예를 들어, 항체 또는 항체 단편 역가가 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90% 증가한다.

[0129] 이론에 얽매이지 않고, 본 발명자들은 또한 푸린-2A와 같은 자가-절단 부위를 이용하지 않는 발현 카세트를 이용하여 생산된 항체가 자가-절단 부위, 예를 들어 푸린-2A를 이용하는 발현 카세트를 이용하여 생산된 항체와 비교하여 감소된 면역원성을 갖는다고 고려한다. 이는 항체에 중화 항체 반응 및/또는 항체에 대한 세포 면역을 촉진하는 것으로 알려진 푸린-2A 펩티드와 같은 자가-절단 부위의 임의의 잔존물이 항체에 없기 때문이다. 결과적으로, 자가-절단 부위(예를 들어 푸린-2A)를 사용하지 않는 발현 카세트를 사용하여 생산된 항체는 원치 않는 면역원성을 감소시키는 것으로 간주된다. 본원에 사용된 용어 "원치 않는 면역원성"은 중화 항체 및/또는 세포 면역의 생산을 유도하는 항체(특히 발현 카세트에 포함된 자가-절단 펩티드의 펩티드 잔류물에 대한 것임)에 대한 동물(예를 들어, 인간)에 의한 면역 반응을 지칭하기 위해 사용되며, 이는 *생체 내*에서 치료 항체의 활성을 감소시킨다. 또한, 상기 원치 않는 면역원성은 *생체 내* 항체 또는 항체 단편 요법과 관련된 부작용의 원인이 될 수 있다.

[0130] 따라서, 추가 양태에서, 본 발명은 원치 않는 항체 또는 항체 단편 면역원성을 감소시키는 방법을 제공하며, 여기서 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0131] (i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다; 또는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

[0132] (ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

[0133] 본 발명의 또 다른 양태는 항체 또는 항체 단편 요법과 관련된 이상 반응(adverse event)을 감소시키는 방법을 제공하며, 이러한 방법은 하기 단계를 포함한다:

[0134] (i) 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함한다; 또는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 세포를 형질전환하는 단계: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터; 및

[0135] (ii) 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계.

[0136] 이러한 양태에 따른 일 실시형태에서, 세포는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환되거나 형질도입된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 내부 리보솜 진입 부위(IRES)를 추가로 포함하고, 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트로 형질전환된 세포에 비해 원치 않는 면역원성이 감소된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 푸린-2A 절단 부위를 추가로 포함한다.

[0137] 예를 들어, 항체 또는 항체 단편 면역원성에서 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%가 감소하고/하거나 항체 또는 항체 단편 요법과 관련된 이상 반응에서 상응하는 감소가 존재한다.

[0138] 비교기의 맥락에서, 당업자는 동일한 세포 및 동일한 조건이 사용될 것임을 이해할 것이다.

[0139] 추가 실시형태에서, 항체 또는 항체 단편은 자가-절단 요소가 없다. 또 다른 실시형태에서, 항체 또는 항체 단

편은 푸린-2A 펩티드 또는 이의 단편이 없다.

[0140] 또 다른 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되는 항체 또는 항체 단편을 제공한다. 본 발명에 따른 방법에 의해 수득되는 항체 또는 항체 단편은 항체 또는 항체 단편의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자 사이에 자가-절단 부위를 포함하는 발현 카세트를 사용하는 방법에 의해 생산된 항체 또는 항체 단편에 비해 대상체에서 원치 않는 면역원성(이는 염증을 포함할 수 있음)을 감소시키는데 사용될 수 있다. 추가의 실시형태에서, 본 발명의 방법에 의해 생산된 항체 또는 항체 단편은 또한 항체 또는 항체 단편의 중쇄와 경쇄를 코딩하는 유전자 사이에 자가-절단 부위를 포함하는 발현 카세트를 사용하는 방법에 의해 생산된 항체와 관련된 임의의 독성을 감소시킬 수 있다.

[0141] 본 발명은 또한 이러한 방법에서 사용될 수 있는 상응하는 발현 카세트를 제공한다. 따라서, 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트가 제공된다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터; 여기서 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 IRES를 추가로 포함한다. 발현 카세트를 세포에 도입하면, 5'에서 3'으로, 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제1 유전자 및 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 IRES를 포함하는 발현 카세트가 동일한 세포 내로 도입되는 경우 생산되는 항체 역가에 비해 더 높은 항체 역가를 생산한다. 본원의 다른 곳에서 더 상세히 기술된 바와 같이, 발현 카세트는 선택적으로 도 1의 최상단 작제물에서 도식적으로 나타낸 바와 같이 작제물의 3' 말단에서 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일 실시형태에서, 발현 카세트는 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자 이후에 WPRE를 제공하거나 코딩하는 서열을 포함한다.

[0142] 유사하게, 본 발명은 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트를 제공한다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터. 발현 카세트의 세포 내로의 도입은, 5'에서 3'으로 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터를 포함하는 발현 카세트가 동일한 세포 내로 도입되는 경우에 생산되는 항체 역가와 비교하여 보다 높은 항체 역가를 생산한다.

[0143] 이러한 발현 카세트는 바람직하게는 푸린/2A 절단 부위와 같은 자가-절단 부위를 포함하지 않으며, 이는 이러한 작제물이 발현된 항체의 더 높은 응집(즉, 더 낮은 품질) 및 또한 증가된 면역원성을 유도하기 때문이다.

[0144] 본 발명은 또한 본원에 기술된 바와 같은 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 혈액 뇌 장벽(BBB) 또는 CNS의 세포를 형질도입 또는 형질감염시키는 벡터에 관한 것이다. 이러한 벡터는 세포를 벡터로 형질전환시키고 항체 또는 항체 단편 생산에 적합한 조건 하에서 형질전환된 세포를 유지하는 단계를 포함하는 항체 또는 항체 단편 생산 방법에 유용하다.

[0145] 본원에 기술된 바와 같은 발현 카세트는 바이러스 벡터를 통한 전달을 염두에 두고 설계되었다. 이러한 벡터에는 포장할 수 있는 유전 물질의 양에 한계가 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 바이러스 벡터, 특히 향신경성 바이러스 벡터 또는 발현 카세트를 포함하는 BBB 또는 CNS의 세포를 형질도입하거나 형질감염시킬 수 있는 바이러스 벡터를 제공한다. 바이러스 벡터는 조작된 AAV2 벡터, 바람직하게는 AAV-BR1 또는 조작된 AAV9 벡터, 예를 들어 AAV-S, AAV-F, AAV-PHP.eB 또는 AAV9-PHP-V1 또는 조작된 AAV1 벡터, 예를 들어 AAV1RX, AAV1R6 또는 AAV1R7을 포함할 수 있다. 바이러스 벡터는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트를 포함할 수 있다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결되고 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 적어도 하나의 프로모터, 그리고 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자의 이후 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자의 이전에 IRES를 추가로 포함한다. 바이러스 벡터는 5'에서 3'으로 하기를 포함하는 발현 카세트를 포함할 수 있다: 항체 또는 항체 단편의 경쇄를 코딩하는 제1 유전자에 작동 가능하게 연결된 제1 프로모터 및 항체 또는 항체 단편의 중쇄를 코딩하는 제2 유전자에 작동 가능하게 연결된 제2 프로모터.

[0146] 이러한 벡터 및 발현 카세트는 본 발명에 따른 임의의 방법에서 사용될 수 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0147] **도 1.** pAAV-유래 항체, 연결된 유도체 및 기타 단백질을 생산하기 위해 조사된 다양한 작제물의 표현. 곡선 화

살표는 발현 카세트에서 경쇄 위치와 중쇄 위치 사이의 교대를 나타낸다. SP: 분비 펩티드, IRES: 내부 리소좀 진입 부위, FSG2A: 푸린/2A 자가-절단가능한 펩티드, WPRE: 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소, pA: 폴리 A. 중쇄 또는 경쇄는 임의의 항체 서열일 수 있다. 프로모터는 바람직하게는 CMV(인간 거대세포바이러스) 또는 기타 프로모터 예를 들어, 비제한적으로 EF1A(인간 진핵 번역 신장 인자 1 알파 1), CAG(닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), CBh(변형된 닭 β-액틴 프로모터에 융합된 CMV 초기 인핸서), SV40(시미안 바이러스 40 인핸서/초기 프로모터), GFAP(인간 신경교 원섬유 산성 단백질 프로모터)일 수 있다 *: 3' 조절 요소는 포함되지 않음.

**도 2a.** pAAV 형질감염 후 MAB1 IgG 및 scFv-Fc의 CHO 세포 상등액 역가. BLI Octet 시스템, 단백질 A-코팅된 바이오센서. 화살표는 중쇄 유전자가 각각의 LC/HC 대응물과 비교하여 작제물(HC/LC)에서 경쇄 앞에 위치할 때 발현의 명확한 감소를 나타낸다. 클론 작제물은 도면에 자세히 설명된 대로 도 1의 선택사항에 따른다.

**도 2b.** pAAV 형질감염 후 MAB1 Fab의 CHO 세포 상등액 역가. BLI Octet 시스템, 항-His-코팅된 바이오센서. 화살표는 각각의 LC/HC 대응물과 비교하여 중쇄 유전자가 작제물(HC/LC)에서 경쇄 앞에 위치할 때 명확한 하향 발현을 다시 나타낸다.

**도 3.** 쿠마시 블루 염색으로 정제된 MAB1 IgG의 SDS-PAGE 분리. 표시된 경우(DTT) 5 mM 디티오트레이톨의 존재 하에 샘플이 환원되었다. 화살표는 더 큰 분자량으로의 이동을 나타낸다.

**도 4.** 쿠마시 블루 염색으로 정제된 MAB1 scFv-Fc의 SDS-PAGE 분리. 표시된 경우(DTT) 5 mM 디티오트레이톨의 존재 하에 샘플이 환원되었다.

**도 5.** TP-62 펩티드에 결합하는 MAB1 IgG. 100 nM 결합제 단백질 후보에서 시작하여 2배 연속 희석에 이어지는 Octet-동역학. 상부 패널은 상이한 프로모터 및 푸린 HC/LC IgG 작제물을 갖는 2개의 프로모터 MAB1 IgG를 포함한다. 하단 패널은 푸린 HC/LC 및 LC/HC MAB1 IgG 작제물, IRES LC/HC 및 HC/LC IgG 작제물 및 scFv-Fc IgG 작제물을 포함한다. 개별 작제물 세부 사항을 도면에서 확인할 수 있다. 각 패널은 500 nM TP-62 펩티드를 사용한 바이오센서 로딩으로 시작한다.

**도 6.** Superdex 200 Increase 10/300GL 컬럼을 사용한 관련 정제된 pAAV-유도된 IgG의 크기 배제 크로마토그래피 분석. 4℃에서 PBS 완충액에서 분리를 수행하였다. 개별 작제물 세부 사항을 도면에서 확인할 수 있다.

**도 7.** 관련 정제된 pAAV-유도된 IgG의 크기 배제 크로마토그램 중첩. 동일한 조건이 도 6에 기술되어 있다.

**도 8.** 남은 푸린/F2A 펩티드를 확인하는 푸린 MAB2 IgG 작제물의 C-말단 부분 분석 및 이로 인해 작제물에서 첫 번째 항체 사슬의 질량 증가. 겔에서 트립신 소화 후 LC/MS.

**도 9.** AAV2, 8, 9 및 10 CHO 형질도입에서 나온 배양물 mL 당 정제된 MAB1 IgG 및 scFv-Fc 및 형질감염과 비교. mL 당 정제된 단백질 양은 상응하는 흡광 계수를 사용하여 OD 280nm로 정량화하였다. 개별 작제물 세부 사항을 도면에서 확인할 수 있다.

**도 10.** 쿠마시 블루 염색으로 정제된 MAB1 IgG의 SDS-PAGE 분리. 표시된 경우(DTT) 5 mM 디티오트레이톨의 존재 하에 샘플이 환원되었다.

**도 11.** AAV2, 8, 9 및 10-벡터화된 항체 작제물로 CHO, 분화된 뉴런 및 BBB 세포의 형질도입 후 IgG 역가 비교. 왼쪽 패널, CHO 형질도입; 중간 패널 분화된 인간 신경모세포종 세포주 형질도입; 오른쪽 패널 분화된 혈액 뇌 장벽(BBB) 세포 형질도입. 개별 작제물 세부 사항을 도면에서 확인할 수 있다.

**도 12.** AAV2, 8, 9 및 10-벡터화된 MAB1 IgG 및 scFv-Fc 작제물을 사용한 래트 뇌 1차 세포의 형질도입 후 IgG 역가 비교. 개별 작제물 세부 사항을 도면에서 확인할 수 있다.

**도 13.** 상이한 WT AAV 혈청형에 의한 형질도입 3일 후 OrganoPlate® 3D BBB 모델의 정단 상등액 내로 hCMEC/D3 세포에 의해 분비된 MAB1(인간 IgG1 이소형)의 검출. MAB1의 발현은 CMV 프로모터에 의해 유도되었다. LC와 HC 사이에 IRES 요소를 사용하여 바이시스트론 항체 생산을 달성하였다. 요약하면, 시험된 작제물은 다음과 같은 배열을 가졌다: 5'-CMV 프로모터-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 경쇄-IRES-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 중쇄-3'. hTDP-43 전장(FL) 단백질에 대한 ELISA 결합에 의해 측정된 항체 존재는 O.D.(광학 밀도)로 표현된다. 대조군 AAV2-eGFP 형질도입에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다. 예상한 바와 같이, 2개의 대조군, mIgG MAB1 및 hIgG MAB2에 대해 항체 결합이 검출되지 않았는데, 이는 항-인간 2차 항체가 검출에 사용되었고 MAB2는 hTDP-43 FL 단백질에 결합할 수 없기 때문이다.

**도 14.** AAV2 작제물에 의한 형질도입 3일 후 OrganoPlate® 3D BBB 모델의 정단 및 기저외측 구획 모두에서 hCMEC/D3 세포에 의해 분비된 MAB1(인간 IgG1 이소형)의 검출. CMV 프로모터에 의해 유도되는 MAB1의 바이시스론 발현은 LC와 HC 사이의 IRES 요소를 사용하여 달성되었다. 요약하면, 시험된 작제물은 다음과 같은 배열을 가졌다: 5'-CMV 프로모터-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 경쇄-IRES-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 중쇄-3'. 항체의 존재를 TDP-43 전장 단백질에 대한 ELISA 결합에 의해 측정하였다. 대조군 AAV2-eGFP 형질도입에 대해서는 결합이 관찰되지 않았다. 데이터는 O.D.로 표현된다.

**도 15.** 상이한 MOI(다중 감염)에서 AAV2 작제물에 의한 형질도입 3일 후 hCMEC/D3 세포에 의해 24-웰 배양 플레이트의 상등액으로 분비된 MAB1(인간 IgG1 이소형)의 검출. CMV 프로모터에 의해 유도되는 MAB1의 바이시스트론 발현은 LC와 HC 사이의 IRES 요소를 사용하여 달성되었다. 요약하면, 시험된 작제물은 다음과 같은 배열을 가졌다: 5'-CMV 프로모터-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 경쇄-IRES-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 중쇄-3'. 항체의 존재는 TDP-43 전장 단백질에 대한 ELISA 결합에 의해 측정하였다. 데이터는 표준 곡선에서 계산된 농도로 표현된다.

**도 16.** AAV2 작제물에 의한 형질도입 3일 후 hCMEC/D3 세포에 의해 트랜스웰 BBB 모델의 정단 및 기저외측 구획 모두로 분비된 MAB1(인간 IgG1 이소형)의 검출. CMV 프로모터에 의해 유도되는 MAB1의 바이시스트론 발현은 LC와 HC 사이의 IRES 요소를 사용하여 달성되었다. 요약하면, 시험된 작제물은 다음과 같은 배열을 가졌다: 5'-CMV 프로모터-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 경쇄-IRES-분비 펩티드를 코딩하는 서열이 있는 유전자를 코딩하는 중쇄-3'. 항체의 존재는 hTDP-43 전장 단백질에 대한 ELISA 결합에 의해 측정하였다. 대조군 AAV2-eGFP 형질도입에 대한 결합은 관찰되지 않았다(데이터는 나타내지 않음). 데이터는 존재하는 항체의 상대적 백분율로 표시된다.

**도 17.** (**a**) b.End3 및 b.End5 마우스 뇌 내피종 세포주 및 (**b**) hCMEC/D3 세포에서 100'000의 MOI에서 AAV2, AAV-BR1 및 AAVrh10 작제물에 의한 형질도입 6일 후 세포 상등액에서 MAB1 hIgG1 및 scFv-Fc의 검출. CMV 프로모터에 의해 유도되는 MAB1의 바이시스트론 발현은 LC와 HC 사이의 IRES 요소를 사용하여 달성되었다. 요약하면, 시험된 작제물은 5'에서 3'으로 다음과 같은 배열을 가졌다: CMV 프로모터 - 분비 펩티드 - 경쇄 - IRES - 분비 펩티드 - 중쇄 - WPRE- polyA. 항체의 존재는 항-hFc 키트(PerkinElmer, Cisbio)를 사용하여 HTRF(균질 시간 분해 형광(Homogeneous Time Resolved Fluorescence))로 측정하였다. 농도로 표현된 데이터는 표준 곡선에서 보간되고 평균±SD가 플로팅된 단일 실험 내에서 3 내지 6개의 생물학적 복제에서 생성된다.

**도 18.** 상업적으로 이용가능한 3D 인간 *시험관 내* BBB 모델(Neuromics)로부터의 1차 인간 뇌 미세혈관 내피 세포에 의해 분비된 MAB1 hIgG1 또는 mIgG2a의 검출. MOI 100'000에서 AAV2 및 AAV-BR1 벡터에 의한 형질도입 7일 후 정단 및 기저외측 구획 모두에서 검출을 수행하였다. CMV 또는 CBh 프로모터에 의해 유도되는 MAB1의 바이시스트론 발현은 LC와 HC 사이의 IRES 요소를 사용하여 달성되었다. 요약하면, 시험된 작제물은 5'에서 3'으로 다음 배열을 가졌다: CMV 또는 CBh 프로모터 - 분비 펩티드 - 경쇄 - IRES - 분비 펩티드 - 중쇄 - WPRE-polyA. 항체 존재는 항-hFc 키트(PerkinElmer, Cisbio)를 사용하여 HTRF로 측정하였다. (**a**) 농도 또는 (**b**) 양으로 표현된 데이터는 각 정단 및 기저외측 구획의 표준 곡선에서 보간된다. 평가된 조건을 직접 비교할 수 있도록 단일 실험 내에서 2 내지 3개의 생물학적 복제를 수행했으며 평균 ± SD를 플로팅하였다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0148] 본 발명은 하기 실시예에서 추가로 기술된다. 실시예는 단지 본 발명을 설명하기 위한 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 의도가 아니다.

[0149] **실시예**

[0150] **실시예 1: 벡터화된 항체 작제물:**

[0151] 1. 벡터화를 위한 최적의 클론 선택

[0152] 1.1. 도입부

[0153] AAV 캡시드에서 단일 가닥 DNA(ssDNA) 벡터화를 사용할 때의 주요 과제 중 하나는 용량(capacity)이다. 발현 카세트 크기는 a) 프로모터, b) 개방형 판독 틀(전형적으로 중쇄 및 경쇄를 비롯하여, 항체 또는 항체 단편을 코딩함), 및 c) 하류 조절 요소를 함유한다. DNA가 단일 가닥으로 변환되고 AAV 캡시드에서 벡터화되면 권장 크기는 5'ITR 및 3'ITR을 포함하여 4.7 kb 이하이다. 더 큰 크기의 작제물은 AAV 바이러스 캡시드 복합체에 거의 들어가지 않아 생산 수율을 낮춘다. 자체 보완 작제물은 5'ITR 및 3'ITR 내에서 훨씬 더 작은 용량, 즉 2.3 kb 이

하이다.

[0154] 일반적으로 사용되는 항체 플라스미드 AAV(pAAV) 설계는 크기가 더 작고 단일 프로모터 예를 들어 a) 항체 단일-사슬 가변 단편(scFv)[44, 55], b) IgG Fc 도메인에 융합된 scFv(scFv-Fc)[56, 57] 또는 c) 단일 도메인 항체, 예를 들어 상어 및/또는 낙타류 항체[58-62]에 의해 유도된 발현 카세트에 맞는 항체 단편으로 이루어진다.

[0155] 전체 항체의 경우, 앞서 언급한 발현 카세트의 크기 제한으로 인해 경쇄 및 중쇄 유전자를 모두 맞추기가 어렵다. 현재까지, 대부분의 학계 및 산업계 연구자들은 자체-처리 단백질 융합으로 번역된 개방형 판독 틀로 이루어진 pAAV 작제물에 의존하고 있다. 대부분의 경우, 각각의 코딩 순서는 1) 항체 중쇄, 2) PACE(쌍을 이룬 염기성 아미노산 절단 효소(Paired basic Amino acid Cleaving Enzyme))[63]로도 알려진 푸린 프로테아제 인식 부위, 3) 푸린 절단을 촉진하고[47-49] 보다 깨끗한 과정, 즉 E2A, F2A, P2A 또는 T2A를 촉진할 것으로 예상되는 자가-절단 2A 펩티드, 및 4) 항체 경쇄로 이루어진다. 연구자들은 높은 발현 역가와 항체 사슬 발현의 등몰 농도로 인해 이 작제물을 상당히 선호한다. 그러나, 대부분의 경우, 단백질은 발현된 단백질에 포함된 푸린 및 2A 융합 펩티드의 잔재로 적절하게 성숙되지 않아[64] 발현된 단백질의 원치 않는 면역원성을 잠재적으로 활용할 수 있다[45]. 서로 다른 2A 펩티드는 자가-절단 효율이 다르며, T2A와 P2A가 가장 높고 F2A가 가장 효율적이지 않다[65]. 따라서, F2A-연결된 단백질의 최대 50%가 융합 단백질로 세포에 남아 기능 획득을 포함하여 예측할 수 없는 결과를 초래할 수 있다[66]. 2A 부위는 약 60%의 시간 동안 리보솜이 폴리뉴클레오티드에서 분리되도록 한다. P2A 및 T2A에 대한 약 10%의 리보솜 판독과 함께, 이것은 하류 펩티드 사슬의 발현을 약 70%까지 감소시킨다[47]. 또한, 2A 펩티드는 바이러스에서 유도된다는 점에 유의하는 것이 중요하다 -즉, F2A는 구제역 바이러스 18에서 유도된다; E2A는 말 비염 A 바이러스에서 유도된다; P2A는 돼지 테스코바이러스-1 2A에서 유도된다; T2A는 토세아 아시그나(*thosea asigna*) 바이러스 2A에서 유도된다. 따라서 중쇄 또는 경쇄에 남아 있는 2A 펩티드 잔기는 포유류 및 인간 면역 체계에 의해 비자기(non-self)로 간주될 수 있다.

[0156] 항체 발현을 위한 푸린/2A 융합체에 대한 덜 일반적인 pAAV 작제물 대안은 1) 각각 중쇄 및 경쇄 항체 사슬을 유도하는 2개의 프로모터 또는 2) 1개의 프로모터 및 내부 리보솜 진입 부위(IRES, 뇌심근염 바이러스로부터 유도된 DNA 서열)를 2개의 항체 유전자 사슬 사이에 배치하는 것을 사용하는 것이다. 첫 번째는 일반적으로 크기가 큰 프로모터로 인해 pAAV 설계의 제한을 증가시켜 중쇄 및 경쇄 항체 유전자를 제어하고 단백질 역가를 크게 증가시킬 수 있는 3'ITR 조절 요소를 제거하기 위해 작은 프로모터를 사용해야 한다. 두 번째, IRES 작제물은 현재까지 단백질 발현이 불량한 것으로 간주되어[56, 67-69] 많은 pAAV 작제물에서 무시된다(여기서 IRES 작제물은 2A 또는 푸린 2A 작제물보다 훨씬 낮은 역가를 나타냄).

[0157] 1.2. 선택 접근법

[0158] 우리는 개방형 판독 틀 구성요소 위치, 프로모터 강도, 분비 펩티드 및 융합 펩티드에 따라 생산되고 발현에 대해 조사된 55개 초과의 pAAV 작제물을 스크리닝하였다. 다양한 유형의 작제물이 도 1에 설명되어 있다. 문헌에 보고된 AAV 벡터를 사용하여 우리가 아는 한 전체 IgG 발현에는 경쇄 앞에 위치한 중쇄를 갖는 푸린/2A 작제물이 있다(도 1, 두 번째 작제물 참조). 우리의 접근법은 이러한 유형의 작제물에 대한 다른 경쇄 및 중쇄 위치와 바이시스트론 작제물(도 1, 4번째 작제물)에 대한 다양한 프로모터 강도를 조사하였다. 또한, 우리는 서로 다른 분비 펩티드를 사용하고 내부(intra) 및 하류 조절 요소를 맞춤화하여 사슬 위치를 교대함으로써 IRES 바이시스트론 작제물에 대해 보고된 낮은 발현에 도전하였다(도 1, 세 번째 작제물). 마지막으로, scFv-Fc, Fab 및 scFv, 즉 MAB1(항-TDP-43 항체) 및 MAB2(항-ErbB2 항체)와 같은 2개의 전체 항체 클론 및 상응하는 항체 단편(도 1, 첫 번째 작제물)을 시험하였다. 또한 우리는 향상된 녹색 형광 단백질(eGFP)을 발현하는 클론을 포함시켰다.

[0159] 본 연구에서, 최고의 pAAV 작제물을 식별하기 위한 선택 기준을 다음과 같이 정의하였다: 1) 높은 단백질 역가, 2) 낮은 응집 수준, 3) 정확한 성숙 및 접힘, 4) 표적에 대한 결합.

[0160] 1.3. 중국 햄스터 난소(CHO: Chinese hamster ovary) 세포 형질감염 및 상등액 역가

[0161] 요약하면, CHO 세포(ExpiCHO-S™(ThermoFisher, cat: A29127))를 제조업체의 권장 사항에 따라 작제물 당 1 μg/mL 플라스미드로 3회 중복으로 형질감염시켰다. 세포를 24시간 동안 37℃에서 최적화된 합성 배지를 사용하여 24개의 딥 웰 마이크로플레이트에서 성장시킨 다음, 온도를 32℃로 이동시킨 후 약 3.5 mL 배지의 최종 부피에서 11일 동안 성장시켰다. 그런 다음 Octet 시스템 및 바이오센서 팁이 a) 전체 길이 항체 및 scFv-Fcs의 경우 단백질 A 또는 b) His-태그가 부착된 단백질, 여기서 Fabs, scFvs 및 EGFP에 결합하는 모노클로날 항체로 코팅

된 Bio-Layer Interferometry(BLI)를 사용하여 각 상등액에서 3회 중복으로 역가를 추정하였다. 모든 측정에 대해, 상응하고 이전에 정제된 단백질을 사용하여 표준 곡선을 수행하였다. 항체 및 scFv-Fcs에 대한 결과가 Fab에 대해 도 2a 및 도 2b에 제시되어 있다.

[0162] *관찰.* MAB1 IgG의 경우, 각 2개의 프로모터 작제물은 약 30 내지 100 μg/mL 범위의 유의한 역가를 생산하였다. 놀랍게도, 150 내지 350 μg/mL 범위의 약 2 내지 10배 더 높은 역가가 푸린 및 IRES 작제물에서 얻어졌지만, 놀랍게도 2개의 프로모터 IgG 작제물과 비교하여, 경쇄 유전자가 작제물(LC/HC)에서 중쇄 유전자 앞에 위치할 때만 가능하였다. IRES IgG 작제물 LC/HC에서 높은 단백질 수준은 푸린 IgG 작제물과 유사하였다. 이것은 예상치 못한 일이었고, 우리가 아는 한, 최신 기술이 그 반대를 언급함에 따라[56, 67-69] 처음으로 보고되었다. 유사한 관찰이 도 2b의 MAB1 Fab 작제물에 대해 이루어졌으며, 이는 푸린 및 2 프로모터 작제물에 대한 유사한 역가를 나타낸다. 또한, IRES Fab 작제물에서 중쇄 앞의 경쇄 위치(LC/HC)는 HC/LC 작제물 대응물보다 유의하게 더 높은 발현 역가를 갖는다. 수집된 데이터는 푸린 및 IRES를 사용하는 IgG 또는 Fab 작제물에서, 중쇄 앞에 위치한 경쇄가 역가를 증가시킨다는 것을 나타낸다. 역가는 HC/LC 대응물보다 유의하게 더 높다. 마지막으로, 중간 강도의 프로모터 SV40이 2개의 프로모터 IgG 작제물에서 2개의 프로모터 중 하나로 포함될 때 발현이 낮아지는 것으로 보인다.

[0163] 1.4. 단백질 정제 및 SDS-PAGE 상에서의 분석

[0164] 이 실험 후, 세포를 수확하고, 상등액 3개 복제물을 클론 당 분리하고 합쳤다. 전장 항체 및 scFv-Fc 클론의 경우, 상업적으로 이용가능한 단백질 A 수지를 사용하여 단백질을 포획하고 100 mM NaCl이 보충된 100 mM 글리신 pH 2.8 완충액으로 용출시켰다. 그런 다음 단백질을 해당 흡광 계수를 사용하여 분광 광도계 OD 280 nm로 정량화하였다. Fabs 및 scFvs 작제물의 경우, His-태그가 부착된 단백질에 대해 상업적으로 이용가능한 친화도 컬럼을 사용하였다.

[0165] 그런 다음 단백질을 SDS-PAGE 12 내지 4%로 분리하고 쿠마시 블루로 염색하였다. 단백질 농도와는 별개로, 샘플당 13 μL를 겔 웰당 로딩하여 a) 정제된 역가를 두 번째로 추정하고 b) 임의의 가능한 분해 산물을 확인하였다. 또한, 150 kDa에서 사슬간 이황화 결합 형성 및 적절한 복합체의 확인을 디티오트레이톨(DTT)의 부재 하에서 수행하였고 디티오트레이톨의 존재 하에서 경쇄 및 중쇄의 방출을 수행하였다. 정제된 MAB1 IgG pAAV 클론에 대한 결과 겔이 도 3에 나와있다.

[0166] *관찰.* 모든 샘플은 적절한 이황화 결합 구성을 가지며 항체는 150 kDa의 해당 분자량에서 이동하였다. 환원되었을 때, 2개의 프로모터 및 IRES IgG의 두 작제물은 각각 약 25 및 약 50 kDa의 예상된 경쇄 및 중쇄 분자량에서 분리되었다. 그러나, 푸린/2A IgG 작제물의 첫 번째 사슬은 분자량이 더 큰 것으로 나타났다. 즉, HC/LC 작제물 구성의 중쇄와 LC/HC 구성의 경쇄이다. 각 푸린/2A IgG 사슬 작제물의 크기는 펩티드 정확도에 대해 LC/MS에 의해 추가로 조사되었다. 이를 통해 LC/HC 작제물의 경우 경쇄 또는 HC/LC 작제물의 경우 중쇄의 C-말단에 푸린/2A 펩티드의 전체 또는 일부가 추가되었음을 확인하였다(도 3, 7 및 8 참조). 대조적으로, 두 번째 항체 작제물 사슬은 적절하게 처리되었고, N-말단에서 LC/MS에 의해 펩티드 잔류물이 관찰되지 않았다. 전반적으로, 모든 클론은 적용된 세포 배양 조건 하에서 낮은 수준의 분해를 나타냈다. 2개의 프로모터 및 IRES 단백질은 가장 정확한 성숙 품질을 갖는 것으로 보인다. 마지막으로, 상이한 IgG 항체인 클론 MAB2에 대해서도 동일한 관찰이 이루어졌다. 다시, 푸린/2A 작제물은 첫 번째 작제물 사슬에 대해 더 큰 분자량을 가졌고 푸린/2A 펩티드의 첨가는 LC/MS에 의해 확인된 반면, 2개의 프로모터 및 IRES IgG는 가장 정확한 성숙도를 가졌다. 정제된 MAB1 scFv-Fc 샘플도 동일한 SDS-PAGE 조건에서 분리되었다. 결과는 도 4에 나와있다.

[0167] *관찰.* 정제된 MAB1 샘플에 따라, scFv-Fc는 적절한 사슬간 이황화 결합 형성을 가지며 단백질은 약 100 kDa의 예상 분자량으로 이동한다. 샘플이 5 mM DTT로 환원되면 단일 사슬이 방출되고 예상 분자량 50 kDa에서 이동한다. 전반적으로, 모든 클론은 사용된 세포 배양 조건에서 낮은 수준의 분해를 나타냈다.

[0168] 1.5. BLI에 의한 형질감염-유도된 단백질의 결합 친화도 분석

[0169] pAAV 시스템-생성된 단백질이 기능적임을 입증하기 위해, Octet 시스템을 사용하여 BLI로 TAR DNA-결합 단백질 43(TDP-43) C-말단 펩티드에 대한 결합 친화도를 측정하였다. 간단히 말해서, 스트렙타비딘 바이오센서 팁을 TP-62라고 하는 500 nM TDP-43 C-말단 펩티드로 코팅하였다. 측정은 0.1% 소 혈청 알부민과 0.02% Tween이 보충된 PBS로 이루어진 반응 완충액을 사용하여 수행하였다. 반응을 30℃에서 수행하였다. 그런 다음 샘플을 100 nM 농도에서 시작하여 2배 연속 희석액으로 분석하였다. 단백질 몰농도를 OD 280 nm에서 상응하는 흡광 계수를 사용하여 계산하였다. TP-62 펩티드에 대한 샘플 회합을 반응 완충액에서 900초 동안 하였고, 이어서 동일한 완

충액에서 600초 동안 해리되게 하였다. Biosensor를 10 mM 글리신 pH 2.0에서 재생시켰고 각 샘플 측정 전에 반응 완충액에서 중화하였다. 수집된 데이터는 관련 정제 샘플에 대해 도 5에 나와있다.

[0170] *관찰.* 전반적으로, 모든 MAB1 클론은 기능적이며 약 1 내지 6 nM 범위의 유사한 $K_D$로 TDP-43 C-말단 펩티드에 결합한다. 2개의 프로모터 및 IRES 작제물은 약 2.5 내지 3 nm 범위의 유사한 Rmax를 가졌다. 중요하게는, 2개의 프로모터 작제물 $K_D$ 친화도는 각각 프로모터 또는 분비 펩티드의 함수로서 변하지 않았다(CMV/CMV, CMV/SV40 또는 SV40/CMV 프로모터 작제물 및 Igk 또는 GH1 분비 펩티드). 대조적으로, 푸린 IgG HC/LC 작제물은 각각 약 5 내지 6 nm 대 약 2.5 내지 3 nm로 2개의 프로모터 및 IRES 작제물보다 Rmax가 약 2배인 단백질을 생성하였다. 또한, 푸린 IgG LC/HC 작제물은 2개의 프로모터 및 IRES 대응물보다 각각 약 3.5 nm 대 약 2.5 내지 3 nm보다 덜 두드러지지만 더 큰 Rmax를 갖는다. BLI 시스템에 따르면, 데이터는 분석 조건에서 푸린 IgG HC/LC 단백질과 같은 2개의 프로모터 및 IRES 대응물과 비교하여 등몰 농도에서 푸린/2A 작제물에 대한 더 큰 분자량 단백질을 나타낸다. 이러한 관찰은 크기 배제 크로마토그래피 분리를 사용하여 다음 분석 단계에서 확인하였다(1.6 참조). 마지막으로, 데이터는 기능적 IgG 및 scFv 단백질이 pAAV 발현 시스템으로 얻을 수 있음을 입증한다. 추가 Octet 분석은 아래에 설명되어 있다(1.6 참조).

[0171] 1.6. 크기 배제 크로마토그래피 및 LC/MS에 의한 단백질 분석

[0172] 분해의 존재를 모니터링하기 위해 크기 배제 크로마토그래피로 분리된 정제된 단백질, 응집체 및 적절한 단백질 폴딩은 단량체로서 150 kDa의 분자량에서 분리된다. 이를 위해 PBS 완충액을 사용하여 4℃에서 G&E Healthcare의 Superdex 200 Increase 10/300GL 컬럼에서 100 µL의 정제된 샘플을 분리하였다. 결과의 분리가 도 6에 나와있다.

[0173] *관찰.* 모든 작제물에 대해, 예상대로 약 11.7 mL의 용리 부피에서 IgG 단량체가 분리되었다. 대조적으로, 푸린 IgG 작제물은 높은 수준의 응집체를 가졌다; LC/HC 작제물의 경우 26% 및 HC/LC 작제물의 경우 38%. 또한, 푸린 작제물의 단량체 피크는 IRES 및 2개의 프로모터 IgG 작제물에 정렬되지 않으며(중첩된 도 7 참조), 이전에 용출되는 분리에서 약간 더 큰 분자량을 갖는다. 0.25 mL를 더 일찍 용출하는 푸린 IgG LC/HC 작제물의 경우가 분명하다. 푸린/2A 작제물(도 6, 7 및 8)에서 더 큰 응집체 수준은 이러한 유형의 단백질[66]의 보고된 예상치 못한 결과 및 독성을 반영할 수 있다. 이들 데이터는 더 큰 분자량의 푸린/2A-유도된 IgG를 나타내는 상기 BLI 측정을 확인시켜준다. 반대로, IRES IgG 작제물 단백질은 2%의 매우 낮은 응집 수준과 98%의 풍부한 단량체 단백질을 나타내어 더 높은 품질을 입증하였다. 2개의 프로모터 IgG 단백질은 또한 13%의 낮은 응집체 수준을 가졌다(그러나, IRES 구축물보다 높음). 이러한 결과는 IgG IRES LC/HC 및 2개의 프로모터 LC/HC가 보다 우수한 품질, 발현 수율, 안정성 및 잠재적으로 덜 원치 않는 면역원성 및/또는 독성을 갖는 작제물로서 확인하였다.

[0174] 2. MAB1 및 MAB2 리드 후보의 벡터화

[0175] 2.1. 세포 형질도입을 위한 AAV 캡시드 선택

[0176] 위에서 논의한 바와 같이, 최고 품질의 단백질을 제공하는 MAB1 및 MAB2 최상의 작제물, 즉 a) MAB1 IgG IRES LC/HC 및 2개의 프로모터 IgG LC/HC 작제물, b) MAB2 2개의 프로모터 IgG LC/HC 및 c) MAB1 scFv-Fc를 벡터화를 위해 선택하였다. 형질도입된 유전자 전달을 위해 상이한 관심 세포 패널, 즉 중국 난소 햄스터 세포(CHO), 뉴런에서 분화된 인간 신경모세포종 세포주 및 뇌 내피 세포주(hCMEC/D3)를 선택하였다. 이를 위해, 위의 최상의 pAAV 작제물을 AAV2, AAV8, AAV9 및 AAV10 캡시드에서 벡터화하였다. 낮은 내독소를 갖는 생성된 초-정제된 캡시드를 세포를 형질도입하는데 사용하였다.

[0177] 2.2. 형질감염된 동일 클론에 대한 CHO 세포 형질도입, 단백질 정제 및 역가 비교

[0178] 요약하면, 벡터화된 리드 작제물을 사용하여 100K gc(게놈 카피)/CHO 세포에서 3회 중복으로 CHO 세포 배양물을 형질감염시킨 다음, 37℃에서 24시간 동안 24개의 딥 웰 마이크로플레이트에서 위와 같이 최적화된 합성 배지에서 성장시킨 다음, 온도를 32℃로 이동한 다음 웰 당 3.5 mL의 최종 부피에서 11일 동안 성장시켰다. 세포 성장은 AAV 존재에 의해 영향을 받지 않았다. 그 후, 세포를 수확하고, 상등액 3회 중복물을 클론 별로 분리하고 합쳤다. 전장 항체 및 scFv-Fc 클론을 단백질 A 수지를 사용하여 위와 같이 포획하고 100 mM NaCl이 보충된 100 mM 글리신 pH 2.8 완충액으로 용리시켰다. 그런 다음 단백질을 상응하는 흡광 계수를 사용하여 분광광도계 OD 280 nm로 정량화하였다. 결과 역가가 도 9에 나와있다.

[0179] *관찰.* 모든 형질도입된 리드 유전자 작제물을 각각의 시험된 AAV 캡시드를 사용하여 발현시켰다. 발현 수준은 벡터화에 사용된 캡시드의 기능에 따라 다르지만 전체적으로 정제된 플라스미드로 형질감염된 동일한 작제물과

유사하다.

[0180] 2.3. MAB1 항원 ELISA를 사용한 래트 일차 뇌 세포 형질도입 및 항체 역가

[0181] 요약하면, 래트 1차 세포를 래트 새끼 뇌에서 해부하여 수득하였고 웰 당 50K 일차 세포를 함유하는, 96웰 마이크로플레이트에서 B27™(ThermoFisher, cat: 17504044)로 보충된 100 μL의 신경기저 배지에서 37℃에서 성장시켰다. 벡터화된 리드 작제물을 사용하여 래트 1차 뇌 세포를 래트 1차 세포 당 100K gc로 3회 중복으로 형질도입한 다음, B27이 보충된 신경기저 배지에서 7일 동안 37℃에서 성장시켰다. 현미경 형태학 평가는 세포가 AAV 존재에 의해 영향을 받지 않음을 나타낸다. 그런 다음 ELISA에 의해 hTDP-43 전장 단백질에 대한 항체 역가를 정량화하기 위해 3회 중복 형질도입 세포 상등액을 수집하였다. 요약하면, 96웰 마이크로플레이트를 4℃에서 PBS 완충액에서 밤새 1 μg/ml 인간 전장 TDP-43으로 코팅하였다. 그런 다음 플레이트를 0.05% Tween이 보충된 PBS로 3회 세척한 다음 PBS, 1% 소 혈청 알부민을 함유한 0.05% Tween 보충물로 37℃에서 1시간 동안 차단하였다. 수집된 항체-함유 상등액을 차단 완충액에 20, 40 및 80배로 희석하고 50 μL 샘플을 마이크로플레이트에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 플레이트를 위와 같이 세척하고 차단 완충액에 1/10000 희석으로 희석된 염소 항-인간 IgG Fc-HRP(abcam, #ab98624)와 함께 1시간 동안 37℃에서 인큐베이션하였다. 플레이트를 위와 같이 세척하고 웰을 100 μL TMB 기질로 보충하고, 실온에서 몇 분 동안 인큐베이션하였다. 그 후 HRP 반응을 50 μL의 $H_2SO_4$ 0.16M으로 차단하였다. 최종적으로, 생성된 용액은 마이크로플레이트 판독기(BioTek)로 450 nm에서 적색이었다. 해당 항체 역가는 도 12에 나와있다. 데이터는 AAV2에서 벡터화된 MAB1 IgG 및 scFv-Fc 클론이 세포 상등액의 5 내지 50 ng/mL 범위에서 유의하게 더 낮은 발현 역가를 가짐을 나타낸다. 대조적으로, 다른 AAV8, 9 및 10-벡터화된 후보는, 역가가 약 180 ng/mL인 2개의 CMV 프로모터 하에서 발현되는, AAV9에서 벡터화된 MAB1을 제외하고, 발현-유도 시스템(IRES 또는 2 프로모터)에 관계없이 약 500 내지 2000 ng/mL 세포 상등액 범위의 훨씬 더 큰 IgG 및 scFv-Fc 역가를 갖는다.

[0182] *관찰.* 모든 형질도입된 리드 유전자 작제물을 각각의 시험된 AAV 캡시드를 사용하여 발현시켰다. 위와 같이, 발현 수준은 벡터화에 사용된 캡시드의 기능에 따라 다르지만 전체적으로 정제된 플라스미드로 형질감염된 동일한 작제물과 유사하다.

[0183] 2.4. SDS-PAGE로 분석하여 단백질 성숙 확인

[0184] 정제된 리드 단백질을 SDS-PAGE 12 내지 4%로 분리하고 쿠마시 블루로 염색하였다. 위에서와 같이, 단백질 샘플은 OD 280 nm로 측정된 양을 확인하기 위해 로딩된 양을 조화시키지 않고 동일한 부피(13 μL/샘플)로 로딩하였다. 결과 분리는 MAB1 pAAV 클론에 대하여 도 10에 나와있다.

[0185] *관찰.* 모든 샘플은 적절한 이황화 결합 구성을 가졌고 항체는 도 10에 표시된 바와 같이 150 kDa의 상응하는 분자량으로 이동하였다. 환원되었을 때, 2개의 프로모터 및 IRES IgG의 두 작제물은 각각 약 25 및 약 50 kDa의 예상되는 경쇄 및 중쇄 분자량에서 분리되었다. scFv-Fc는 적절한 사슬간 이황화 결합 형성을 가지며 단백질은 약 100 kDa의 예상 분자량에서 이동한다. 샘플이 5 mM DTT로 환원되면 단일 사슬이 방출되고 예상 분자량 50 kDa에서 이동한다. 전반적으로 그리고 이전 스크리닝 실험에서 예상한 바와 같이, 모든 클론은 채택된 세포 배양 조건에서 낮은 수준의 분해를 나타냈다.

[0186] 2.5. BLI에 의한 형질감염-, 형질도입- 유도된 단백질의 결합 친화도 분석

[0187] pAAV 시스템을 사용하여 생성된 단백질이 기능적임을 입증하기 위해, 위에서 설명한 것과 동일한 조건에서 Octet 시스템을 사용하여 BLI에 의해 TAR DNA-결합 단백질 43(TDP-43) C-말단 펩티드에 대한 결합 친화도를 측정하였다. 간단히 말해서, 스트렙타비딘 바이오센서 팁을 TP-62라고 하는 500 nM TDP-43 C-말단 펩티드로 코팅하였다. 측정은 0.1% 소 혈청 알부민과 0.02% Tween이 보충된 PBS로 구성된 반응 완충액을 사용하여 수행하였다. 반응을 30℃에서 수행하였다. 그런 다음 샘플을 100 nM 농도에서 시작하여 2배 연속 희석액으로 분석하였다. 수집된 데이터는 아래 표 1에 나와있다:

*표 1*

[0188]

| MAB1 항체 | $K_D$ (nM) |
|---|---|
| IgG 표준 | 5.7 |
| IgG IRES pAAV 형질감염 | 4.7 |
| IgG IRES pAAV 벡터화 | 5.7 |
| IgG 2 프로모터 pAAV 형질감염 | 4.7 |

| | |
|---|---|
| IgG 2 프로모터 pAAV 벡터화 | 4.3 |
| scFv-Fc 표준 | 12.3 |
| scFv-Fc pAAV 형질감염 | 4.0 |
| scFv-Fc pAAV 벡터화 | 21.25 |

[0189] *관찰.* 데이터는 IRES 또는 2개의 프로모터 pAAV 작제물로부터의 IgG 클론이 사용된 표준에 유사한 $K_D$를 가짐을 나타낸다(표 1). 또한, $K_D$는 약 4 내지 6 nM 범위에서 형질감염되거나 벡터화된 작제물 유형 간에 비교할 수 있으므로 벡터화가 표적화된 TDP-43 항원에 대한 예상된 결합 친화도를 가진 고품질 단백질을 생성하였음을 입증한다. scFv-Fc 단백질에 관해서도 약간의 차이가 있을 수 있지만 마찬가지이다.

[0190] 2.6. 인간 신경모세포종 세포주 및 BBB 세포 형질도입 및 세포 상등액에서의 단백질 역가

[0191] 다음 단계는 음성 대조군 MAB2 IgG 2 프로모터 LC/HC 뿐만 아니라 AAV2, 8, 9 및 10-벡터화된 MAB1 IgG 및 scFv-Fc 작제물을 사용하여 CHO 이외의 다른 세포 유형이 효율적으로 형질도입될 수 있는지 확인하는 것이었다. 이를 위해, 우리는 37℃, 5% CO2에서 10 μM 레티노산과 2% 태아 소 혈청이 보충된 강화 합성 배지를 사용하여 뉴런으로 분화된 인간 신경모세포종 세포를 형질도입하였다. 약 200K 세포를 3회 중복으로 형질도입하고 웰 당 500 μL 배지로 24 웰 마이크로플레이트에서 인큐베이션하였다. 약 100K 게놈 복사/세포를 추가하여 형질도입을 수행하였다. 벡터화된 MAB1 IgG 및 scFv-FC 역가 모두 ELISA에 의해 결정하였다. 혈액 뇌 장벽 미세혈관에서 분화된 hCMEC/D3 세포로 유사한 실험을 수행하였다(다음 실시예의 절차 참조). 여기에서, 혈액 뇌 장벽 세포는 웰 당 50K 또는 100K로, 37℃, 5% CO2에서 성장시키고 AAV-벡터화된 MAB1 IgG IRES LC/HC 작제물의 세포 당 50K 게놈 복사(gc)로 형질도입하였다. 두 세포 유형의 경우 모두, 배지를 3일 마다 교체하였다. 요약하면, 96 웰 마이크로플레이트를 전장 TDP-43 단백질로 코팅한 다음 1% 혈청 소 알부민 및 0.05% Tween이 보충된 PBS 완충액으로 포화시켰다. 그런 다음 샘플을 마이크로플레이트 웰에 첨가하고 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 병행하여, 상응하는 샘플 표준을 2 μg/mL 농도에서 시작하여 첨가한 다음 샘플과 동일한 완충액(1% 혈청 소 알부민 및 0.05% Tween이 보충된 PBS 완충액)을 사용하여 2배 연속 방식으로 희석하였다. 플레이트를 0.05% Tween이 보충된 PBS 완충액으로 세척하였다. 그 후, 양고추냉이 퍼옥시다제로 표지된 항-인간 IgG Fc 항체를 1% 혈청 소 알부민 및 0.05% Tween이 보충된 PBS 완충액 중의 플레이트에 첨가하고, 37℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 상기와 같이 세척하고 양고추냉이 퍼옥시다제 기질(3,3',5,5' - 테트라메틸벤지딘, TMB로 지칭됨)을 웰에 첨가하고, 실온에서 약 5 내지 10분 동안 인큐베이션하고, 반응을 0.5 M H2SO4를 사용하여 중단시켰다. 그런 다음 샘플을 마이크로플레이트 판독기에서 OD 450 nm에서 개별적으로 판독하였다. 수집된 것을 도 11에 제시하였으며 MAB1 리드 작제물로 동일한 벡터화된 CHO 형질도입으로 얻은 위의 정제된 역가와 비교하였다.

[0192] *관찰.* 상업적으로 이용가능한 세포 유형인, 인간 신경모세포종 세포주로부터 분화된 뉴런, 및 뇌 내피 세포주(hCMECD/3) 모두 형질도입하여 전장 TDP-43 단백질에 결합할 수 있는 기능적 MAB1 IgG 및 scFv-Fc를 생산하였다(도 11). 전반적으로, 항체 및 유도체는 시간이 지남에 따라 대량으로 생산되었다(분화된 인간 신경모세포종 세포주에 대한 중간 패널, 18일 참조). 이는 약 0.5 내지 4 pg/세포/일을 발현하는 더 높은 세포 밀도(약 천만/mL)에서 성장시킨 CHO 세포에 대해 보고된 것과 유사하게, 강력한 세포 발현인 약 0.2 내지 1 pg 항체/세포/일의 평균을 나타낸다. 이들 실험에서, 수득된 역가는 AAV2-벡터화된 MAB1 IgG 및 scFv-Fc에 대해 더 높다. 또한, scFv-Fc 역가는 벡터화된 IgG 대응물과 비교하여 각 AAV8, 9 및 10 벡터화에서 더 높다. IRES 작제물의 분화된 인간 신경모세포종 세포주 역가는 벡터화에 사용된 캡시드의 함수로서 2개의 프로모터 작제물 대응물보다 더 높았다. 마지막으로, 벡터화된 MAB2 IgG 2 프로모터 LC/HC는 TDP-43 이외의 다른 특정 항원에 결합하는 특성으로 인해 검출되지 않았다(가운데 패널 참조). 결론적으로, 수집된 데이터를 통해 LC/HC 구성을 사용하여 IgG IRES 작제물이 2개의 프로모터보다 더 높은 발현 역가에 도달한다는 것을 나타내는 초기 관찰을 확인하였다.

[0193] [표 2]

[0194] **벡터화된 항체 작제물에서 사용된 핵산 서열:**

| 서열 설명 | 핵산 서열 |
|---|---|
| 내부 리보솜 진입 부위(IRES) 서열 | GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACT<br>GGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG<br>CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC<br>CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACC<br>TGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGG<br>GTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGT<br>CTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCT<br>GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAG<br>CGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACC<br>TGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA<br>CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCAC<br>AACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTT<br>GTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCG<br>TATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAA<br>GGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGG<br>CCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTC<br>GAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAAC<br>CACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACG<br>ATGATAATATGGCCACAACC<br>(SEQ ID NO: 1) |
| 마우스 MAB2, 프로모터-LC-IRES-HC-WPRE | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG<br>GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC<br>GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC<br>TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT<br>GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT<br>TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC<br>CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCAT<br>GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG<br>CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGACA<br>TCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAG<br>CACCAGCGTGGGCGACAGAGTGTCCATCACA<br>TGCAAGGCCAGCCAGGACGTGAACACAGCCG |

[0195]

[0196]

| | |
|---|---|
| | TGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCATTC |
| | TCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCA |
| | GATACACCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGG |
| | CAACAGAAGCGGCACCGACTTCACCTTCACC |
| | ATCAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGCCG |
| | TGTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACCT |
| | CCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAA |
| | TCAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTC |
| | TATCTTCCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACAT |
| | CTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCCTGAA |
| | CAACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGT |
| | GGAAGATCGACGGCAGCGAGAGACAGAACG |
| | GCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAG |
| | CAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGCACC |
| | CTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAGAGAC |
| | ACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAA |
| | GACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTC |
| | AACAGAAACGAGTGCTGAACCCAGCTTTCTTG |
| | TACAAAGTGGGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCC |
| | CTAACGTTACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAA |
| | GGCCGGTGTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTC |
| | CACCATATTGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGG |
| | CCCGGAAACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAG |
| | CATTCCTAGGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAG |
| | GAATGCAAGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAA |
| | GCAGTTCCTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAAC |
| | AACGTCTGTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGG |
| | AACCCCCCACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCG |
| | GCCAAAAGCCACGTGTATAAGATACACCTGCA |
| | AAGGCGGCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGA |
| | GTTGGATAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTC |
| | TCCTCAAGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGG |
| | ATGCCCAGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCT |
| | GATCTGGGGCCTCGGTGCACATGCTTTACAT |
| | GTGTTTAGTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGC |
| | CCCCCGAACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTT |
| | GAAAAACACGATGATAATATGGCCACAACCAT |
| | GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG |
| | CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCCAGG |
| | TTCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGT |
| | TAAGCCTGGCGCCTCTCTGAAGCTGAGCTGT |
| | ACCGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTA |
| | CATCCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGAGCAG |
| | GGACTCGAGTGGATCGGCAGAATCTACCCCA |
| | CCAACGGCTACACCAGATACGACCCCAAGTT |
| | CCAGGACAAGGCCACCATCACAGCCGACACC |
| | AGCAGCAACACAGCCTATCTCCAGGTGTCCA |
| | GGCTGACCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTA |
| | CTGCTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTAC |
| | GCCATGGATTATTGGGGACAGGGCGCCAGCG |
| | TGACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACAGCCCC |
| | TAGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGC |
| | GACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGCT |
| | GTCTGGTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGT |
| | GACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCT |
| | AGCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGC |

[0197]

| | |
|---|---|
| | AGAGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGCGT<br>GACCGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCCAG<br>AGCATCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCA<br>GCAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGCC<br>TAGAGGCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCAT<br>GCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGG<br>CCCAAGCGTGTTCATCTTCCCACCTAAGATCA<br>AGGACGTGCTGATGATCTCTCTGAGCCCCAT<br>CGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTGAG<br>GACGACCCTGACGTGCAGATCAGTTGGTTCG<br>TGAACAACGTGGAAGTGCACACAGCCCAGAC<br>ACAGACCCACAGAGAGGACTACAACAGCACC<br>CTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCAGC<br>ACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAATTCAA<br>GTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCTGCT<br>CCTATCGAGAGAACCATCAGCAAGCCCAAGG<br>GCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCT<br>GCCACCTCCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAA<br>CAAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCGACTT<br>CATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACC<br>AACAACGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGA<br>ACACCGAGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAG<br>CTACTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAG<br>AAGAAGAACTGGGTCGAGAGAAACAGCTACA<br>GCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGACTGCACAA<br>CCACCACACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACC<br>CCTGGCAAGTGACAACTTTATTATACATAGTT<br>GGAATTCCGATAATCAACCTCTGGATTACAAA<br>ATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTAT<br>GTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGC<br>TTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGCTTCCCG<br>TATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATC<br>CTGGTTGCTGTCTCTTTATGAGGAGTTGTGGC<br>CCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCAC<br>TGTGTTTGCTGACGCAACCCCCACTGGTTGG<br>GGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCG<br>GGACTTTCGCTTTCCCCCTCCCTATTGCCACG<br>GCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCT<br>GCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGA<br>CAATTCCGTGGTGTTGTCGGGGAAGCTGACG<br>TCCTTTCCATGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCAC<br>CTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTCTGCTAC<br>GTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTC<br>CTTCCCGCGGCCTGCTGCCGGCTCTGCGGCC<br>TCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGA<br>GTCGGATCTCCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCA<br>TCGGGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCT<br>CGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTT<br>GTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCT<br>GGAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAAT<br>AAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGT<br>AGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGG<br>GGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG<br>AGAATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCA<br>GGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCC<br>TCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG |

| | |
|---|---|
| | GGCGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCT<br>TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG<br>CGCGCAGCTGCCTGCAGG<br>(SEQ ID NO: 2) |
| 마우스 MAB2 - 2개 프로모터 IgG,<br>프로모터 1(CMV)-LC-polyA-프로모터 2(CMV)-<br>HC-WPRE-polyA로 구성 | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG<br>GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC<br>GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC<br>TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT<br>GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT<br>TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC<br>CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCAT<br>GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG<br>CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGACA<br>TCGTGATGACCCAGAGCCACAAGTTCATGAG<br>CACCAGCGTGGGCGACAGAGTGTCCATCACA<br>TGCAAGGCCAGCCAGGACGTGAACACAGCCG<br>TGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCATTC<br>TCCTAAGCTGCTGATCTACAGCGCCAGCTTCA<br>GATACACCGGCGTGCCCGATAGATTCACCGG<br>CAACAGAAGCGGCACCGACTTCACCTTCACC<br>ATCAGCTCTGTGCAGGCCGAGGATCTGGCCG<br>TGTACTACTGTCAGCAGCACTACACCACACCT<br>CCAACCTTCGGCGGAGGCACCAAGGTGGAAA<br>TCAAGAGAGCTGACGCCGCTCCTACCGTGTC<br>TATCTTCCCACCTAGCAGCGAGCAGCTGACAT<br>CTGGCGGAGCCTCTGTCGTGTGCTTCCTGAA<br>CAACTTCTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGT<br>GGAAGATCGACGGCAGCGAGAGACAGAACG<br>GCGTGCTGAACTCTTGGACCGACCAGGACAG<br>CAAGGACTCCACCTACAGCATGAGCAGCACC<br>CTGACACTGACCAAGGACGAGTACGAGAGAC<br>ACAACAGCTACACATGCGAGGCTACCCACAA<br>GACCAGCACAAGCCCCATCGTGAAGTCCTTC<br>AACAGAAACGAGTGCTGACAGACATGATAAGA<br>TACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAACTAG<br>AATGCAGTGAAAAAAATGCTTTATTTGTGAAAT<br>TTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTAT<br>AAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACAATT |

[0198]

[0199]

| | |
|---|---|
| | GCATTCATTTTATGTTTCAGGTTCAGGGGGAG<br>GTGTGGGAGGTTTTTTAAAGCAAGTAAAACCT<br>CTACAAATGTGGTATAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT<br>TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATCA<br>CCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCACCATG<br>GAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTGC<br>TCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCCAGGT<br>TCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTT<br>AAGCCTGGCGCCTCTCTGAAGCTGAGCTGTA<br>CCGCTTCCGGCTTCAACATCAAGGACACCTAC<br>ATCCACTGGGTCAAGCAGAGGCCTGAGCAGG<br>GACTCGAGTGGATCGGCAGAATCTACCCCAC<br>CAACGGCTACACCAGATACGACCCCAAGTTC<br>CAGGACAAGGCCACCATCACAGCCGACACCA<br>GCAGCAACACAGCCTATCTCCAGGTGTCCAG<br>GCTGACCAGCGAGGACACAGCCGTGTACTAC<br>TGCTCTAGATGGGGAGGCGACGGCTTCTACG<br>CCATGGATTATTGGGGACAGGGCGCCAGCGT<br>GACAGTGTCTAGTGCCAAGACAACAGCCCCT<br>AGCGTGTACCCTCTGGCTCCTGTGTGTGGCG<br>ACACAACAGGCAGCTCTGTGACACTGGGCTG<br>TCTGGTCAAGGGCTACTTCCCCGAACCAGTG<br>ACACTGACCTGGAACAGCGGCTCTCTGTCTA<br>GCGGCGTGCACACATTTCCAGCCGTGCTGCA<br>GAGCGACCTGTACACACTGTCCTCTAGCGTG<br>ACCGTGACCAGCTCTACATGGCCCAGCCAGA<br>GCATCACCTGTAACGTGGCCCATCCTGCCAG<br>CAGCACCAAGGTGGACAAGAAGATCGAGCCT<br>AGAGGCCCTACCATCAAGCCCTGTCCTCCAT<br>GCAAGTGCCCCGCTCCTAATCTGCTCGGAGG<br>CCCAAGCGTGTTCATCTTCCCACCTAAGATCA<br>AGGACGTGCTGATGATCTCTCTGAGCCCCAT<br>CGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGTGTCTGAG<br>GACGACCCTGACGTGCAGATCAGTTGGTTCG<br>TGAACAACGTGGAAGTGCACACAGCCCAGAC<br>ACAGACCCACAGAGAGGACTACAACAGCACC<br>CTGAGAGTGGTGTCTGCCCTGCCTATCCAGC<br>ACCAGGATTGGATGAGCGGCAAAGAATTCAA<br>GTGCAAAGTGAACAACAAGGACCTGCCTGCT |

| | |
|---|---|
| | CCTATCGAGAGAACCATCAGCAAGCCCAAGG<br>GCTCTGTCAGGGCTCCTCAGGTGTACGTTCT<br>GCCACCTCCTGAGGAAGAGATGACCAAGAAA<br>CAAGTGACCCTCACCTGTATGGTCACCGACTT<br>CATGCCCGAGGACATCTACGTGGAATGGACC<br>AACAACGGCAAGACCGAGCTGAACTACAAGA<br>ACACCGAGCCTGTGCTGGACAGCGACGGCAG<br>CTACTTCATGTACAGCAAGCTGCGCGTCGAG<br>AAGAAGAACTGGGTCGAGAGAAACAGCTACA<br>GCTGCTCCGTGGTGCACGAGGGACTGCACAA<br>CCACCACACCACCAAGAGCTTCAGCAGAACC<br>CCTGGCAAGTGACAACTTTATTATACATAGTT<br>GGAATTCCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGA<br>CTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTT<br>TGCCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGG<br>AAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAA<br>AATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAG<br>GTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGG<br>CAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAG<br>AATAGCAGGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGG<br>AACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT<br>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGG<br>CGACCAAAGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTG<br>CCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGC<br>GCAGCTGCCTGCAGG<br>(SEQ ID NO: 3) |
| 마우스 MAB1, 프로모터-LC-짧은 IRES-HC<br>-WPRE | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG<br>GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC<br>GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC<br>TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT<br>GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT<br>TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC<br>CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCAT<br>GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG<br>CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGACG<br>TGGTCATGACACAGACCCCTCTGACACTGAG<br>CGTGACCATCGGACAGCCTGCCAGCATCAGC<br>TGCAAGAGCAGTCAGAGCCTGCTGCACAGCG |

[0200]

[0201]

| | |
|---|---|
| | ACGGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTGCA |
| | AAGACCCGGCCAGTCTCCTAAGAGGCTGATC |
| | TACCTGGTGTCCAAGCTGGACAGCAGAATCC |
| | CCGACAGATTCACAGGCAGCGGCTCTGGCAC |
| | AGACTTCACCCTGAAGATCAGCAGAGTGGAA |
| | GCCGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGTTGGC |
| | AGGGCACACACTTCCCTCACACATTCGGCGC |
| | TGGCACAAAGCTGGAACTGAAGAGAGCTGAC |
| | GCCGCTCCTACCGTGTCTATCTTCCCACCTAG |
| | CAGCGAGCAGCTGACATCTGGCGGAGCCTCT |
| | GTCGTGTGCTTCCTGAACAACTTCTACCCCAA |
| | GGACATCAACGTGAAGTGGAAGATCGACGGC |
| | AGCGAGAGACAGAACGGCGTGCTGAACTCTT |
| | GGACCGACCAGGACAGCAAGGACTCCACCTA |
| | CAGCATGAGCAGCACCCTGACACTGACCAAG |
| | GACGAGTACGAGAGACACAACAGCTACACAT |
| | GCGAGGCTACCCACAAGACCAGCACAAGCCC |
| | CATCGTGAAGTCCTTCAACAGAAACGAGTGCT |
| | GAGCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTT |
| | ACTGGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGT |
| | GTGCGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATAT |
| | TGCCGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAA |
| | ACCTGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTA |
| | GGGGTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCA |
| | AGGTCTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTC |
| | CTCTGGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCT |
| | GTAGCGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCC |
| | CACCTGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAA |
| | GCCACGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCG |
| | GCACAACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGA |
| | TAGTTGTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCA |
| | AGCGTATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCC |
| | AGAAGGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTG |
| | GGGCCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTA |
| | GTCGAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCG |
| | AACCACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAAC |
| | ACGATGATAATATGGAGACAGATACACTGCTG |
| | CTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCAGGAT |
| | CTACAGGCGAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGG |
| | ACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTCCGTG |
| | AAGATCAGCTGCAAGACAAGCGGCTTCACCTT |
| | CACCGAGTACAGCATGCACTGGGTCAAGCAG |
| | AGCCACGGCAAGAGCCTGGAATGGATCGGCG |
| | GCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCAGCTA |
| | CAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCCACACTG |
| | ACCGTGGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACA |
| | TGGAACTGAGAAGCCTGACCAGCGAGGACAG |
| | CGCCGTGTACTACTGTGCCAGAGAGTCTTGG |
| | GGCCAGGGCACAACCCTGACAGTCTCTTCTG |
| | CCAAGACAACAGCCCCTAGCGTGTACCCTCT |
| | GGCTCCTGTGTGTGGCGACACAACAGGCAGC |
| | TCTGTGACACTGGGCTGTCTGGTCAAGGGCT |
| | ACTTCCCCGAACCAGTGACACTGACCTGGAA |
| | CAGCGGCTCTCTGTCTAGCGGCGTGCACACA |
| | TTTCCAGCCGTGCTGCAGAGCGACCTGTACA |
| | CACTGTCCTCTAGCGTGACCGTGACCAGCTC |

[0202]

| | |
|---|---|
| | TACATGGCCCAGCCAGAGCATCACCTGTAAC |
| | GTGGCCCATCCTGCCAGCAGCACCAAGGTGG |
| | ACAAGAAGATCGAGCCTAGAGGCCCTACCAT |
| | CAAGCCCTGTCCTCCATGCAAGTGCCCCGCT |
| | CCTAATCTGCTCGGAGGCCCAAGCGTGTTCA |
| | TCTTCCCACCTAAGATCAAGGACGTGCTGATG |
| | ATCTCTCTGAGCCCCATCGTGACCTGCGTGG |
| | TGGTGGATGTGTCTGAGGACGACCCTGACGT |
| | GCAGATCAGTTGGTTCGTGAACAACGTGGAA |
| | GTGCACACAGCCCAGACACAGACCCACAGAG |
| | AGGACTACAACAGCACCCTGAGAGTGGTGTC |
| | TGCCCTGCCTATCCAGCACCAGGATTGGATG |
| | AGCGGCAAAGAATTCAAGTGCAAAGTGAACAA |
| | CAAGGACCTGCCTGCTCCTATCGAGAGAACC |
| | ATCAGCAAGCCCAAGGGCTCTGTCAGGGCTC |
| | CTCAGGTGTACGTTCTGCCACCTCCTGAGGA |
| | AGAGATGACCAAGAAACAAGTGACCCTCACCT |
| | GTATGGTCACCGACTTCATGCCCGAGGACAT |
| | CTACGTGGAATGGACCAACAACGGCAAGACC |
| | GAGCTGAACTACAAGAACACCGAGCCTGTGC |
| | TGGACAGCGACGGCAGCTACTTCATGTACAG |
| | CAAGCTGCGCGTCGAGAAGAAGAACTGGGTC |
| | GAGAGAAACAGCTACAGCTGCTCCGTGGTGC |
| | ACGAGGGACTGCACAACCACCACACCACCAA |
| | GAGCTTCAGCAGAACCCCTGGCAAGTGAACC |
| | CAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGAATTCCGATA |
| | ATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGAT |
| | TGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTA |
| | CGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTG |
| | TATCATGCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATT |
| | TTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCT |
| | CTTTATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGC |
| | AACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGA |
| | CGCAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACC |
| | ACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTT |
| | CCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATC |
| | GCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGG |
| | GCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGG |
| | TGTTGTCGGGGAAGCTGACGTCCTTTCCATG |
| | GCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTG |
| | CGCGGGACGTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGG |
| | CCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGG |
| | CCTGCTGCCGGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGT |
| | CTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCT |
| | CCCTTTGGGCCGCCTCCCCGCATCGGGAATT |
| | CCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGC |
| | CTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCC |
| | TCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTG |
| | CCACTCCCACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAG |
| | GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCA |
| | TTCTATTCTGGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC |
| | AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCA |
| | GGCATGCTGGGGAGGGCCGCAGGAACCCCT |
| | AGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGC |
| | GCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA |
| | AGGTCGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGG |

| | |
|---|---|
| | CGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCT<br>GCCTGCAGG<br>(SEQ ID NO: 4) |
| MAB1 프로모터-LC-IRES-HC-WPRE-polyA | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG<br>GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC<br>GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC<br>TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT<br>GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT<br>TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC<br>CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCAT<br>GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG<br>CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGACG<br>TGGTCATGACACAGACCCCTCTGACACTGTCC<br>GTGACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTCCT<br>GCAAGTCCTCTCAGTCCCTGCTGCACTCTGAC<br>GGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTGCAGA<br>GGCCTGGCCAGAGTCCTAAGAGACTGATCTA<br>CCTGGTGTCCAAGCTGGACTCTCGGATCCCT<br>GACAGATTCACCGGCTCTGGCTCTGGCACCG<br>ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGC<br>CGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGTTGGCAG<br>GGCACCCACTTTCCACACACCTTTGGCGCTG<br>GCACAAAGCTGGAACTGAAGCGGACAGTGGC<br>CGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCG<br>ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGT<br>CGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGG<br>GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATG<br>CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGT<br>GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC<br>AGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGG<br>CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTG<br>CGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCT<br>GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTT<br>GAACCCAGCTTTCTTGTACAAAGTGGGCCCCT<br>CTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACTGGCCG<br>AAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTGCGTTT<br>GTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGCCGTCT<br>TTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACCTGGCC |

[0203]

[0204]

| | |
|---|---|
| | CTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGGGTCTT |
| | TCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGTCTGTT |
| | GAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCTGGAA |
| | GCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAGCGAC |
| | CCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACCTGGC |
| | GACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCACGTG |
| | TATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCACAACC |
| | CCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTTGTG |
| | GAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCGTATT |
| | CAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAAGGTA |
| | CCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGGCCTC |
| | GGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTCGAGG |
| | TTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAACCACG |
| | GGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACGATGA |
| | TAATATGGCCACAACCATGGAGACAGATACAC |
| | TGCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCC |
| | AGGATCTACAGGCGAGGTTCAGCTGCAGCAG |
| | TCTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCT |
| | CCGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTCTGGCTTC |
| | ACCTTCACCGAGTACTCCATGCACTGGGTCAA |
| | GCAGTCCCACGGCAAGTCCCTGGAATGGATC |
| | GGCGGCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCT |
| | CCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTAC |
| | CCTGACCGTGGACAAGTCCTCCTCCACCGCC |
| | TACATGGAACTGCGGTCCCTGACCTCTGAGG |
| | ACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAGTC |
| | TTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTCTCT |
| | TCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCC |
| | CTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGC |
| | GGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG |
| | ACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGG |
| | AACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACA |
| | CCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCT |
| | GTACTCTCTGTCCTCCGTCGTGACCGTGCCTT |
| | CTAGCTCTCTGGGCACACAGACCTACATCTGC |
| | AATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGT |
| | GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGAC |
| | AAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC |
| | AGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTG |
| | TTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT |
| | CTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG |
| | GTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGA |
| | AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT |
| | GCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAA |
| | CAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGT |
| | GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAAC |
| | GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA |
| | AGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCAT |
| | CTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC |
| | CAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGAAGA |
| | GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT |
| | CTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCG |
| | CCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGA |
| | GAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTG |
| | GACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAA |
| | GCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAG |

[0205]

| | |
|---|---|
| | GGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACG<br>AGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTC<br>CCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGTAGCAACTTT<br>ATTATACATAGTTGGAATTCCGATAATCAACCT<br>CTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG<br>TATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATG<br>TGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATG<br>CTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCT<br>CCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATG<br>AGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGG<br>CGTGGTGTGCACTGTGTTTGCTGACGCAACC<br>CCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTC<br>AGCTCCTTTCCGGGACTTTCGCTTTCCCCCTC<br>CCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCT<br>GCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCT<br>GTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTTGTCG<br>GGGAAGCTGACGTCCTTTCCATGGCTGCTCG<br>CCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGAC<br>GTCCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATC<br>CAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCC<br>GGCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTT<br>CGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTTGGG<br>CCGCCTCCCCGCATCGGGAATTCCTAGAGCT<br>CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTG<br>CCAGCCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTG<br>CCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA<br>CTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCAT<br>CGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG<br>GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGG<br>GAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTG<br>GGGAGGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGA<br>GTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCG<br>CTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCC<br>GACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG<br>TGAGCGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG<br>(SEQ ID NO: 5) |
| MBA1 - 2개 프로모터 IgG,<br>프로모터 1(CMV)-LC-polyA-프로모터 2(CMV)-HC-WPRE-polyA로 구성 | CCTGCAGGCAGCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCG<br>GGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGC<br>GAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAAC<br>TCCATCACTAGGGGTTCCTTCTAGACAACTTT<br>GTATAGAAAAGTTGTAGTTATTAATAGTAATCA<br>ATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATAT<br>GGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATG<br>GCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCC<br>GCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCC<br>ATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACG<br>TCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCC<br>ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCA<br>AGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAA<br>ATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATG<br>ACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACAT<br>CTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGA<br>TGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGG<br>ATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTC<br>TCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTT |

[0206]

| | |
|---|---|
| | TGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATG<br>TCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGG<br>GCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATAT<br>AAGCAGAGCTGGTTTAGTGAACCGTCAGATC<br>CAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGCCACCAT<br>GGAGACAGATACACTGCTGCTGTGGGTGCTG<br>CTCCTCTGGGTGCCAGGATCTACAGGCGACG<br>TGGTCATGACACAGACCCCTCTGACACTGTCC<br>GTGACCATCGGACAGCCTGCCTCCATCTCCT<br>GCAAGTCCTCTCAGTCCCTGCTGCACTCTGAC<br>GGCAAGACCTACCTGAACTGGCTGCTGCAGA<br>GGCCTGGCCAGAGTCCTAAGAGACTGATCTA<br>CCTGGTGTCCAAGCTGGACTCTCGGATCCCT<br>GACAGATTCACCGGCTCTGGCTCTGGCACCG<br>ACTTCACCCTGAAGATCTCCAGAGTGGAAGC<br>CGAGGACCTGGGCGTGTACTACTGTTGGCAG<br>GGCACCCACTTTCCACACACCTTTGGCGCTG<br>GCACAAAGCTGGAACTGAAGCGGACAGTGGC<br>CGCTCCTTCCGTGTTCATCTTCCCACCTTCCG<br>ACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACAGCTTCTGT<br>CGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCTCGG<br>GAAGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAATG<br>CCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCTGT<br>GACCGAGCAGGACTCCAAGGACAGCACCTAC<br>AGCCTGTCCTCCACACTGACCCTGTCCAAGG<br>CCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTG<br>CGAAGTGACCCATCAGGGCCTGTCTAGCCCT<br>GTGACCAAGTCTTTCAACCGGGGCGAGTGTT<br>GACAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTG<br>GACAAACCACAACTAGAATGCAGTGAAAAAAA<br>TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCT<br>TTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAA<br>GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTT<br>CAGGTTCAGGGGGAGGTGTGGGAGGTTTTTT<br>AAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTATA<br>GTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAG<br>TTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACA<br>TAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGAC<br>CGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAAT<br>AATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAG<br>GGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTAT<br>TTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA<br>AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTG<br>ACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCA<br>TTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC<br>CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATC<br>GCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA<br>CATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCA<br>CGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGT<br>CAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC<br>GGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCC<br>CCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC<br>GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTTT<br>AGTGAACCGTCAGATCACCCAGCTTTCTTGTA<br>CAAAGTGGGCCACCATGGAGACAGATACACT<br>GCTGCTGTGGGTGCTGCTCCTCTGGGTGCCA |

[0207]

| | |
|---|---|
| | GGATCTACAGGCGAGGTTCAGCTGCAGCAGT<br>CTGGACCTGAGCTGGTTAAGCCTGGCGCCTC<br>CGTGAAGATCTCCTGCAAGACCTCTGGCTTCA<br>CCTTCACCGAGTACTCCATGCACTGGGTCAA<br>GCAGTCCCACGGCAAGTCCCTGGAATGGATC<br>GGCGGCATCAACCCTAACAACGGCGGCACCT<br>CCTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAAGCTAC<br>CCTGACCGTGGACAAGTCCTCCTCCACCGCC<br>TACATGGAACTGCGGTCCCTGACCTCTGAGG<br>ACTCCGCCGTGTACTACTGCGCTAGAGAGTC<br>TTGGGGCCAGGGCACCACACTGACAGTCTCT<br>TCTGCTTCTACCAAGGGACCCAGCGTGTTCC<br>CTCTGGCTCCTTCCAGCAAGTCTACCTCTGGC<br>GGAACAGCTGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG<br>ACTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTTGG<br>AACTCTGGCGCTCTGACATCCGGCGTGCACA<br>CCTTTCCAGCTGTGCTGCAATCCAGCGGCCT<br>GTACTCTCTGTCCTCCGTCGTGACCGTGCCTT<br>CTAGCTCTCTGGGCACACAGACCTACATCTGC<br>AATGTGAACCACAAGCCTTCCAACACCAAGGT<br>GGACAAGAAGGTGGAACCCAAGTCCTGCGAC<br>AAGACCCACACCTGTCCTCCATGTCCTGCTCC<br>AGAACTGCTCGGCGGACCTTCCGTGTTCCTG<br>TTTCCTCCAAAGCCTAAGGACACCCTGATGAT<br>CTCTCGGACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTG<br>GTGGATGTGTCTCACGAGGATCCCGAAGTGA<br>AGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAAGT<br>GCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAA<br>CAGTACAACTCCACCTACAGAGTGGTGTCCGT<br>GCTGACCGTGCTGCACCAGGATTGGCTGAAC<br>GGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACA<br>AGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAAAAGACCAT<br>CTCCAAGGCCAAGGGCCAGCCTAGGGAACCC<br>CAGGTTTACACCTTGCCTCCATCTCGGGAAGA<br>GATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGT<br>CTCGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGATATCG<br>CCGTGGAATGGGAGTCTAATGGCCAGCCTGA<br>GAACAACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTG<br>GACTCCGACGGCTCATTCTTCCTGTACTCCAA<br>GCTGACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAG<br>GGCAACGTGTTCTCCTGCTCCGTGATGCACG<br>AGGCCCTGCACAATCACTACACCCAGAAGTC<br>CCTGTCTCTGAGCCCCGGCAAGTAGCAACTTT<br>ATTATACATAGTTGGAATTCCTAGAGCTCGCT<br>GATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAG<br>CCATCTGTTGTTTGCCCCTCCCCCGTGCCTTC<br>CTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC<br>CTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCA<br>TTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGG<br>GTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGG<br>ATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGGGA<br>GGGCCGCAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG<br>CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC<br>TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCGACG<br>CCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAG<br>CGAGCGAGCGCGCAGCTGCCTGCAGG |

[0208]

| | (SEQ ID NO: 6) |
|---|---|
| MAB1, 프로모터-scFv-Fc-WPRE | cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccggg<br>caaagcccgggcgtcgggcgaccttggtcgcccggcctcagtga<br>gcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactag<br>gggttccttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagta<br>atcaattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtt<br>acataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgac<br>ccccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgcc<br>aatagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaa<br>ctgcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccc<br>cctattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgccca<br>gtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtatta<br>gtcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatggg<br>cgtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccatt<br>gacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttcc<br>aaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtag<br>gcgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaac<br>cgtcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggag<br>acagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatc<br>tacaggcgaggttcagctgcagcagtctggacctgagctggttaag<br>cctggcgcctccgtgaagatctcctgcaagacctctggcttcaccttc<br>accgagtactccatgcactgggtcaagcagtcccacggcaagtcc<br>ctggaatggatcggcggcatcaacccctaacaacggcggcacctc<br>ctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgtggaca<br>agtcctcctccaccgcctacatggaactgcggtccctgacctctgag<br>gactccgccgtgtactactgcgctagagagtcttggggccagggc<br>accacactgacagtctcttctggaggcggaggatctggcggaggt<br>ggaagtggcggaggcggatctgacgtggtcatgacacagacccc<br>tctgacactgtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgca<br>agtcctctcagtccctgctgcactctgacggcaagacctacctgaa<br>ctggctgctgcagaggcctggccagagtcctaagagactgatcta<br>cctggtgtccaagctggactctcggatccctgacagattcaccggct<br>ctggctctggcaccgacttcaccctgaagatctccagagtggaagc<br>cgaggacctgggcgtgtactactgttggcagggcacccactttcca<br>cacacctttggcgctggcacaaagctggaactgaagggaggcgg<br>aggatctgacaagacccacacctgtcctccatgtcctgctccagaa<br>ctgctcggcggaccttccgtgttcctgtttcctccaaagcctaaggac<br>accctgatgatctctcggacccctgaagtgacctgcgtggtggtgg<br>atgtgtctcacgaggatcccgaagtgaagttcaattggtacgtggac<br>ggcgtggaagtgcacaacgccaagaccaagcctagagaggaa<br>cagtacaactccacctacagagtggtgtccgtgctgaccgtgctgc<br>accaggattggctgaacggcaaagagtacaagtgcaaggtgtcc<br>aacaaggccctgcctgctcctatcgaaaagaccatctccaaggcc<br>aagggccagcctagggaaccccaggtttacaccttgcctccatctc<br>gggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctcgtga<br>agggcttctacccctccgatatcgccgtggaatgggagtctaatgg<br>ccagcctgagaacaactacaagacaaccccctcctgtgctggactc<br>cgacggctcattcttcctgtactccaagctgacagtggacaagtcca<br>gatggcagcagggcaacgtgttctcctgctccgtgatgcacgagg<br>ccctgcacaatcactacacccagaagtccctgtctctgagccccgg<br>caagtagacccagctttcttgtacaaagtgggaattccgataatcaa<br>cctctggattacaaaatttgtgaaagattgactggtattcttaactatgt<br>tgctccttttacgctatgtggatacgctgctttaatgcctttgtatcatgct<br>attgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgtataaatcctggttgct<br>gtctctttatgaggagttgtggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggt<br>gtgcactgtgtttgctgacgcaacccccactggttggggcattgcca |

| | |
|---|---|
| | ccacctgtcagctcctttccgggactttcgctttcccctccctattgcc<br>acggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacaggg<br>gctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgttgtcggggaagct<br>gacgtccttccatggctgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgc<br>gggacgtccttctgctacgtcccttcggccctcaatccagcggacctt<br>ccttcccgcggcctgctgccggctctgcggcctcttccgcgtcttcgc<br>cttcgccctcagacgagtcggatctccctttgggccgcctccccgca<br>tcgggaattcctagagctcgctgatcagcctcgactgtgccttctagtt<br>gccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctgga<br>aggtgccactcccactgtcctttcctaataaaatgaggaaattgcat<br>cgcattgtctgagtaggtgtcattctattctgggggggtggggtggggc<br>aggacagcaagggggaggattgggaagagaatagcaggcatg<br>ctggggagggccgcaggaaccctagtgatggagttggccactc<br>cctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaagg<br>tcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgag<br>cgagcgcgcagctgcctgcagg<br>(SEQ ID NO: 7) |
| 내부 리보솜 진입 부위 짧은 서열<br>(짧은 IRES) | GCCCCTCTCCCTCCCCCCCCCCTAACGTTACT<br>GGCCGAAGCCGCTTGGAATAAGGCCGGTGTG<br>CGTTTGTCTATATGTTATTTTCCACCATATTGC<br>CGTCTTTTGGCAATGTGAGGGCCCGGAAACC<br>TGGCCCTGTCTTCTTGACGAGCATTCCTAGGG<br>GTCTTTCCCCTCTCGCCAAAGGAATGCAAGGT<br>CTGTTGAATGTCGTGAAGGAAGCAGTTCCTCT<br>GGAAGCTTCTTGAAGACAAACAACGTCTGTAG<br>CGACCCTTTGCAGGCAGCGGAACCCCCCACC<br>TGGCGACAGGTGCCTCTGCGGCCAAAAGCCA<br>CGTGTATAAGATACACCTGCAAAGGCGGCAC<br>AACCCCAGTGCCACGTTGTGAGTTGGATAGTT<br>GTGGAAAGAGTCAAATGGCTCTCCTCAAGCG<br>TATTCAACAAGGGGCTGAAGGATGCCCAGAA<br>GGTACCCCATTGTATGGGATCTGATCTGGGG<br>CCTCGGTGCACATGCTTTACATGTGTTTAGTC<br>GAGGTTAAAAAAACGTCTAGGCCCCCCGAAC<br>CACGGGGACGTGGTTTTCCTTTGAAAAACACG<br>ATGATAAT<br>(SEQ ID NO: 8) |
| MAB1 FAB 프로모터-LC-IRES-HC-WPRE-PolyA | cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggc<br>aaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagc<br>gagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggt<br>tccttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaat<br>caattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta<br>cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgaccc<br>ccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaa<br>tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaact<br>gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccc<br>tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagt<br>acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattag<br>tcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggc<br>gtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccatt<br>gacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttcc |

[0209]

[0210]

| | |
|---|---|
| | aaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtagg<br>cgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccg<br>tcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggagaca<br>gatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctaca<br>ggcgacgtggtcatgacacagacccctctgacactgtccgtgaccat<br>cggacagcctgcctccatctcctgcaagtcctctcagtccctgctgca<br>ctctgacggcaagacctacctgaactggctgctgcagaggcctggc<br>cagagtcctaagagactgatctacctggtgtccaagctggactctcg<br>gatccctgacagattcaccggctctggctctggcaccgacttcaccct<br>gaagatctccagagtggaagccgaggacctgggcgtgtactactgt<br>tggcagggcacccactttccacacacctttggcgctggcacaaagct<br>ggaactgaagcggacagtggccgctccttccgtgttcatcttcccac<br>cttccgacgagcagctgaagtccggcacagcttctgtcgtgtgcctg<br>ctgaacaacttctaccctcgggaagccaaggtgcagtggaaggtgg<br>acaatgccctgcagtccggcaactcccaagagtctgtgaccgagca<br>ggactccaaggacagcacctacagcctgtcctccacactgaccctgt<br>ccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaagtga<br>cccatcagggcctgtctagccctgtgaccaagtctttcaaccggggc<br>gagtgttgaacccagctttcttgtacaaagtgggcccctctccctccc<br>ccccccctaacgttactggccgaagccgcttggaataaggccggtgt<br>gcgtttgtctatatgttattttccaccatattgccgtcttttggcaatgt<br>gagggcccggaaacctggccctgtcttcttgacgagcattcctaggg<br>gtctttcccctctcgccaaaggaatgcaaggtctgttgaatgtcgtga<br>aggaagcagttcctctggaagcttcttgaagacaaacaacgtctgt<br>agcgacccttgcaggcagcggaacccccacctggcgacaggtgc<br>ctctgcggccaaaagccacgtgtataagatacacctgcaaaggcgg<br>cacaacccagtgccacgttgtgagttggatagttgtggaaagagtc<br>aaatggctctcctcaagcgtattcaacaaggggctgaaggatgccc<br>agaaggtaccccattgtatgggatctgatctggggcctcggtgcaca<br>tgctttacatgtgtttagtcgaggttaaaaaaacgtctaggcccccg<br>aaccacggggacgtggttttcctttgaaaaacacgatgataatatgg<br>ccacaaccatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctc<br>tgggtgccaggatctacaggcgaggttcagctgcagcagtctggac<br>ctgagctggttaagcctggcgcctccgtgaagatctcctgcaagacc<br>tctggcttcaccttcaccgagtactccatgcactgggtcaagcagtcc<br>cacggcaagtccctggaatggatcggcggcatcaaccctaacaacg<br>gcggcacctcctacaaccagaagttcaagggcaaagctaccctgac<br>cgtggacaagtcctcctccaccgcctacatggaactgcggtccctga<br>cctctgaggactccgccgtgtactactgcgctagagagtcttggggc<br>cagggcaccacactgacagtctcttctgcttctaccaagggacccag<br>cgtgttccctctggctccttccagcaagtctacctctggcggaacagc |

[0211]

| | |
|---|---|
| | tgctctgggctgcctggtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgt<br>gtcttggaactctggcgctctgacatccggcgtgcacacctttccagc<br>tgtgctgcaatccagcggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgt<br>gccttctagctctctgggcacacagacctacatctgcaatgtgaacc<br>acaagccttccaacaccaaggtggacaagaaggtggaacccaagt<br>cctgcggctcccaccaccatcaccatcattagcaactttattatacat<br>agttggaattccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaag<br>attgactggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatac<br>gctgctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcat<br>tttctcctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgt<br>ggcccgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgac<br>gcaacccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttcc<br>gggactttcgctttcccctcccctattgccacggcggaactcatcgcc<br>gcctgccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactga<br>caattccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgct<br>cgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgt<br>cccttcggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgcc<br>ggctctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcg<br>gatctccctttgggccgcctccccgcatcgggaattcctagagctcgc<br>tgatcagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcc<br>cctccccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtcc<br>tttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtc<br>attctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggagg<br>attgggaagagaatagcaggcatgctggggagggccgcaggaacc<br>cctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcac<br>tgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgg<br>gcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg<br>(SEQ ID NO: 9) |
| MAB1 Fab - 2개 프로모터 IgG,<br>프로모터 1(CMV)-HC-polyA-프로모터 2(CMV)-LC-WPRE-polyA로 구성 | cctgcaggcagctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgcccgggc<br>aaagcccgggcgtcgggcgacctttggtcgcccggcctcagtgagc<br>gagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactaggggt<br>tccttctagacaactttgtatagaaaagttgtagttattaatagtaat<br>caattacggggtcattagttcatagcccatatatggagttccgcgtta<br>cataacttacggtaaatggcccgcctggctgaccgcccaacgaccc<br>ccgcccattgacgtcaataatgacgtatgttcccatagtaacgccaa<br>tagggactttccattgacgtcaatgggtggagtatttacggtaaact<br>gcccacttggcagtacatcaagtgtatcatatgccaagtacgccccc<br>tattgacgtcaatgacggtaaatggcccgcctggcattatgcccagt<br>acatgaccttatgggactttcctacttggcagtacatctacgtattag<br>tcatcgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggc<br>gtggatagcggtttgactcacggggatttccaagtctccaccccatt<br>gacgtcaatgggagtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttcc<br>aaaatgtcgtaacaactccgccccattgacgcaaatgggcggtagg<br>cgtgtacggtgggaggtctatataagcagagctggtttagtgaaccg |

[0212]

tcagatccaagtttgtacaaaaaagcaggctgccaccatggagaca
gatacactgctgctgtgggtgctgctcctctgggtgccaggatctaca
ggcgaggttcagctgcagcagtctggacctgagctggttaagcctg
gcgcctccgtgaagatctcctgcaagacctctggcttcaccttcaccg
agtactccatgcactgggtcaagcagtcccacggcaagtccctgga
atggatcggcggcatcaaccctaacaacggcggcacctcctacaac
cagaagttcaagggcaaagctaccctgaccgtggacaagtcctcct
ccaccgcctacatggaactgcggtccctgacctctgaggactccgcc
gtgtactactgcgctagagagtcttggggccagggcaccacactga
cagtctcttctgcttctaccaagggacccagcgtgttccctctggctc
cttccagcaagtctacctctggcggaacagctgctctgggctgcctg
gtcaaggactactttcctgagcctgtgaccgtgtcttggaactctggc
gctctgacatccggcgtgcacacctttccagctgtgctgcaatccag
cggcctgtactctctgtcctccgtcgtgaccgtgccttctagctctctg
ggcacacagacctacatctgcaatgtgaaccacaagccttccaaca
ccaaggtggacaagaaggtggaacccaagtcctgcggctcccacc
accatcaccatcattagcagacatgataagatacattgatgagtttg
gacaaaccacaactagaatgcagtgaaaaaaatgctttatttgtga
aatttgtgatgctattgctttatttgtaaccattataagctgcaataaa
caagttaacaacaacaattgcattcattttatgtttcaggttcagggg
gaggtgtgggaggttttttaaagcaagtaaaacctctacaaatgtgg
tatagttattaatagtaatcaattacggggtcattagttcatagccca
tatatggagttccgcgttacataacttacggtaaatggcccgcctgg
ctgaccgcccaacgacccccgcccattgacgtcaataatgacgtat
gttcccatagtaacgccaatagggactttccattgacgtcaatgggt
ggagtatttacggtaaactgcccacttggcagtacatcaagtgtatc
atatgccaagtacgcccccctattgacgtcaatgacggtaaatggccc
gcctggcattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttgg
cagtacatctacgtattagtcatcgctattaccatggtgatgcggtttt
ggcagtacatcaatgggcgtggatagcggtttgactcacggggattt
ccaagtctccaccccattgacgtcaatgggagtttgttttggcaccaa
aatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccattgac
gcaaatgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtctatataagcaga
gctggtttagtgaaccgtcagatcacccagctttcttgtacaaagtgg
gccaccatggagacagatacactgctgctgtgggtgctgctcctctg
ggtgccaggatctacaggcgacgtggtcatgacacagaccctctg
acactgtccgtgaccatcggacagcctgcctccatctcctgcaagtc
ctctcagtccctgctgcactctgacggcaagacctacctgaactggc
tgctgcagaggcctggccagagtcctaagagactgatctacctggt
gtccaagctggactctcggatccctgacagattcaccggctctggct
ctggcaccgacttcaccctgaagatctccagagtggaagccgagga
cctgggcgtgtactactgttggcagggcacccactttccacacacctt
tggcgctggcacaaagctggaactgaagcggacagtggccgctcct
tccgtgttcatcttcccaccttccgacgagcagctgaagtccggcac
agcttctgtcgtgtgcctgctgaacaacttctaccctcgggaagcca
aggtgcagtggaaggtggacaatgccctgcagtccggcaactccca
agagtctgtgaccgagcaggactccaaggacagcacctacagcct
gtcctccacactgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaag

[0213]

gtgtacgcctgcgaagtgacccatcagggcctgtctagccctgtgac
caagtctttcaaccggggcgagtgttgacaactttattatacatagtt
ggaattccgataatcaacctctggattacaaaatttgtgaaagattg
actggtattcttaactatgttgctccttttacgctatgtggatacgctg
ctttaatgcctttgtatcatgctattgcttcccgtatggctttcattttct
cctccttgtataaatcctggttgctgtctctttatgaggagttgtggcc
cgttgtcaggcaacgtggcgtggtgtgcactgtgtttgctgacgcaa
cccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccggga
ctttcgctttcccccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcct
gccttgcccgctgctggacaggggctcggctgttgggcactgacaat
tccgtggtgttgtcggggaagctgacgtcctttccatggctgctcgcc
tgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtccctt
cggccctcaatccagcggaccttccttcccgcggcctgctgccggct
ctgcggcctcttccgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatc
tccctttgggccgcctccccgcatcgggaattcctagagctcgctgat
cagcctcgactgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctc
ccccgtgccttccttgaccctggaaggtgccactcccactgtccttтc
ctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcatt
ctattctgggggggtggggtggggcaggacagcaagggggaggattt
gggaagagaatagcaggcatgctggggagggccgcaggaaccccct
agtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactga
ggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggc
ggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg
(SEQ ID NO: 10)

[0214] **실시예 2. 세포 배양**

[0215] 인간 대뇌 미세혈관 내피 hCMEC/D3 세포를 키트에 포함된 모든 인자, 및 1 ng/mL bFGF(Merck, GF003)로 보충된 EndoGRO-MV 성장 배지(Merck, SCME004)에서 100 μg/mL 래트 꼬리 콜라겐 I형(08-115, Merck)으로 미리 코팅된

75 $cm^2$ 플라스크에서 5% $CO_2$로 가습 대기에서 37℃에서 유지시켰다.

[0216] B.End3 및 b.End5 마우스 뇌 내피종 세포주를 Pen/strep 및 10% FBS(성장 배지)가 보충된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포를 TC-처리된 75 $cm^2$ 플라스크에서 배양하고 계대배양을 위해 1:10 비율로 계대배양을 위해 트립신-EDTA 용액으로 분리하였다. 세포를 5% $CO_2$가 포함된 가습 대기에서 37℃에서 인큐베이션하였다.

[0217] **실시예 3. OrganoPlate® 3-레인 *시험관 내* BBB 모델**

[0218] 3D *시험관 내* BBB 모델링에 사용되는 OrganoPlate® 3-레인 시스템은 표준 384-웰 마이크로타이터 플레이트 형식에 포함된 40개의 미세유체 세포 배양 구조를 포함한다. 각 조직 칩은 미세유체 배양에 접근하기 위한 입구 및 출구로서 기능하는 미세역가 플레이트의 해당 웰에 연결된 3개의 레인으로 구성된다. 먼저, 1M HEPES, 37 g/L $NaHCO_3$, 및 5 mg/mL 콜라겐-I을 혼합하여 4mg/mL 콜라겐-I(래트 꼬리, Merck)의 세포 외 매트릭스(ECM: extracellular matrix) 겔을 제조하고, 중앙 레인에 도입하였다. 위상 가이드는 메니스커스 피닝에 의해 중앙 레인에서 ECM 겔을 선택적으로 패턴화하는데 사용하였다. ECM 겔화(37℃, 5% $CO_2$에서 밤새 또는 주말 동안) 후, hCMEC/D3 세포를 1 ng/mL bFGF가 보충된 EndoGRO-MV 성장 배지에 상단 레인에서 칩 당 40000개 세포의 밀도로 시딩하였다. 일단 세포가 부착되면, 플레이트를 저장소 사이의 역평준화에 의해 흐름을 유도하는 간격 로커에 수평으로 놓고, 세관의 형성을 허용하기 위해 적어도 3일 동안 37℃, 5% $CO_2$에서 인큐베이션하였다. 최적의 장벽 무결성을 유지하기 위해 약 3일 마다 배지 교체를 수행하였으며, 투과성 분석에 의해 모든 형질도입 또는 트랜스사이토시스 실험 전에 제어하였다. 장벽 기능은 배양 배지에서 0.5 mg/mL FITC-덱스트란(Sigma 46946, 평균 150 kDa; FD20S, 평균 20 kDa, 및 Sigma FD10S, 평균 10 kDa)을 튜브 루멘을 통해 관류한 후 루멘에서의 형광에 대해 정규화된, 기저 겔 영역에서 형광 수준을 측정하여 평가하였다. Incucyte 라이브 셀 판독기를 사용하여 1시간 동안 5분 마다 형광 측정을 수행하였다.

[0219] **실시예 4. 트랜스웰 *시험관 내* BBB 모델**

[0220] 트랜스웰-기반 *시험관 내* BBB 모델의 경우, 기공 크기가 0.4 μm(배양 면적 0.33 cm2, Sigma)인 Corning 트랜스웰 멤브레인이 함유된 24-웰 플레이트의 정단측을 먼저 래트 꼬리 콜라겐-I(Merck)으로 가습 인큐베이터에서 1시간 동안 코팅하였다. 그런 다음 hCMEC/D3 세포를 100000개 세포/cm2의 밀도로 1 ng/mL bFGF가 보충된 EndoGRO-MV 성장 배지에 시딩하였다. 배지 교체를 약 2 내지 3일 마다 수행하였으며 항상 100 μL의 정단 부피와 기저외측에서 600 μL를 유지하였다. 투과성 및 경내피 전기 저항(TEER: Transendothelial electrical resistance) 측정을 내피 세포 시딩 후 4일차부터 수행하였으며, 세포 단층은 시딩 후 15일차까지 적합한 장벽 특성을 유지하는 것으로 밝혀졌다. 투과성 측정을 위해, 내피 세포 배지를 기저외측 구획에서 600 μL의 신선한 배지로 교체하였다. 그런 다음, 배양 배지에 있는 0.25 mg/mL FITC(Sigma 46946, 평균 150kDa; FD20S, 평균 20 kDa 및 Sigma FD10S, 평균 10 kDa) 100 μL를 상단 구획에 첨가하고 세포를 가습 인큐베이터에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 그런 다음 100 μL 분획을 기저외측 구획에서 수집하고 Tecan Spark 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 형광 측정을 위해 Greiner 블랙 96-웰 플레이트로 옮겼다. 겉보기 투과성을 공식 $Papp=(\Delta Q/\Delta t)\times(1/AC0)$에 따라 계산하였으며, 여기서 Papp는 겉보기 투과성 계수(cm/분)이고, $\Delta Q/\Delta t$는 내피 세포층을 가로지르는 덱스트란의 투과 속도(μg/분)이고, A는 세포층의 표면적(cm2)이며 C0는 정단 세포 표면에 적용되는 초기 덱스트란 농도(μg/ml)이다. TEER 측정을 위해, 내피 세포 배지는 하부 구획에서 1050 μL의 신선한 배지로 교체하고, 상부 구획에서 325 μL로 교체하였다. TEER을 측정하기 위해 EVOM-3 상피 볼트옴미터(WPI)를 사용하였다.

[0221] **실시예 5. hBMEC/hBMEC의 AAV 형질도입 및 표적 결합에 의한 항체 검출 - OrganoPlate® BBB 모델을 사용한 hCMEC/D3 세포에 의한 항체 분비**

[0222] 확립된 OrganoPlate® hCMEC/D3 *시험관 내* BBB 모델을 사용하여 AVV WT 캡시드의 벡터화된 항체가 hCMEC에 의해 효율적으로 분비될 수 있는지 여부를 평가하였다. MAB1(인간 IgG1 이소형) 항체를 AAV2, AAV8; AAV9 및 AAVrh10 캡시드 내로 벡터화하고 MOI 50'000에서 OrganoPlate® 3-레인에 시딩한 후 24시간 후에 hCMEC/D3 단층으로 형질도입하였다. 상단 레인(정단부) 및 하단 레인(기저외측) 둘 모두의 상등액을 형질도입 3일 후 수집하고, 정단 및 기저외측 구획의 항체 농도를 간접 ELISA를 사용하여 인간 전장(FL) TDP-43에 결합하여 결정하였다. 요약하면, 1 μg/ml 인간 FL TDP-43을 사용한 ELISA 플레이트 코팅을 4℃의 탄산염 완충액에서 밤새 수행하였다. 플레이트를 0.05% Tween-20/PBS로 세척한 다음 0.05% Tween-20/PBS 중 1% 소 혈청 알부민(BSA)으로 1시간 동안 37℃에서 차단하였다. 수집된 항체-함유 상등액을 플레이트에 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 인큐베이

션한 후 플레이트를 세척하였다. AP-접합된 항-마우스 IgG 2차 항체(Jackson, 115-055-206)를 0.05% Tween-20/PBS에 1/1000으로 희석하여 37℃에서 1시간 동안 첨가하였다. 최종 세척 후, 플레이트를 pNPP 용액과 함께 인큐베이션하고 플레이트 판독기(BioTek)를 사용하여 1시간 후 405 nm에서 판독하였다. MAB1(인간 IgG1 이소형)은 평가된 모든 WT AAV 캡시드에 의해 형질도입된 hCMEC/D3 단층의 정단 상등액에서 검출하였고 도 13에 설명된 바와 같이 TDP-43에 대한 결합을 유지하였다. 정단 구획의 MAB1 역가는 AAV2의 경우 약 40 ng/mL, 및 AAV8; AAV9; 및 AAVrh10 혈청형의 경우 약 4 ng/mL로 추정되었다. 관련 음성 대조군(AAV2-eGFP)은 TDP-43 ELISA 분석에서 어떠한 신호도 유도하지 않았다. AAV2에 의해 형질도입된 MAB1(인간 IgG1 이소형)은 또한 OrganoPlate®의 조밀한 ECM 층에 걸쳐 관찰된 제한된 확산에 따라, 정단측(도 14)에 비해 20배 더 낮은 수준으로 기저외측 구획에서 검출되었다(데이터는 도시되지 않음). MAB1(인간 IgG1 이소형) AAV2 작제물은 도 15에 예시된 바와 같이 MOI 5'000 내지 160'000에서 hCMEC/D3 세포에 형질도입되었을 때 용량-의존적인 방식으로 항체 역가를 생성하였다. 트랜스웰 *시험관 내* BBB 모델은 또한 벡터화된 항체의 전달을 추가로 검증하는데 사용된다. hCMEC/D3 단층을 MAB1 AAV2 작제물을 사용하여 24-웰 트랜스웰 인서트로 시딩한 후 24시간 후에 형질도입하였다. 형질도입 3일 후 정단 및 기저외측 상등액을 수집하고, 정단측 및 기저외측 구획의 항체 농도를 이전에 기술된 바와 같이 간접 ELISA를 사용하여 인간 FL TDP-43에 결합시켜 결정하였다. 이러한 예비 평가는 도 16에 도시된 바와 같이 정단측 및 기저외측 모두를 향한 항체의 상대적으로 고른 분비 및 따라서 벡터화된 MAB1 항체의 비분극 분비를 시사하였다.

[0223] **실시예 6. 마우스 및 인간 뇌 미세혈관 내피 세포주에 의한 항체 분비**

[0224] 불멸화된 hCMEC/D3, b.End3 및 b.End5 세포주를 사용하여 뇌 내피 세포가 고품질 항체를 생산할 수 있는지 여부를 평가하였다. AAV2, AAV-BR1 및 AAVrh10과 같은 상이한 AAV 벡터를 인간 및 마우스 세포주에 MAB1 항체 트랜스진을 전달하는 능력에 대해 평가하였다. 모든 항체(예를 들어 hIgG1 및 scFv-Fc)의 발현을 CMV 프로모터에 의해 유도하였다; 바이시스트론 항체 생성을 달성하기 위해 hIgG1의 LC 및 HC를 코딩하는 유전자 사이에 IRES 요소를 사용하였다. 세포를 96-웰 배양 플레이트에 100'000개 세포/$cm^2$로 플레이팅하였다. 이어서 내피 세포주를 성장 배지에서 100'000의 MOI로 플레이팅한 후 4시간 내지 16시간 후에 형질도입하였다. 세포를 37℃, 5% $CO_2$에서 밤새 인큐베이션하고 배지를 다음날 교체하여 AAV 입자를 제거하였다. 형질도입 후 7일 후에 세포 배양 상등액을 수집하고 분비된 항체 역가를 제조업체의 지침에 따라 hFc 키트(PerkinElmer, Cisbio, 62HFCPEH)를 사용하여 HTRF(균질한 시간 분해 형광)로 측정하였다. 이러한 정량화 방법은 분비되고 올바르게 폴딩된 항체의 검출을 가능케 하였다. 정제된 재조합 MAB1 hIgG1을 배양 배지에서 항체 정량을 위한 표준으로 사용하였다. Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 형광 신호를 판독하였다(Em:317 nm; Ex:620 nm 및 665 nm; 75번 깜빡임; 400 μs 통합 시간; 100 μs 지연 시간). 보간된 분비된 항체 역가가 도 17에 도시되어 있다. AAV2에 의해 전달된 MAB1 hIgG1은 (a) b.End3 및 b.End5 마우스 내피종 세포주 상등액에서 20ng/mL로 정량화되었고 (b) hCMEC/D3 세포 상등액에서 200 ng/mL로 정량화되었다. MAB1 scFv-Fc 작제물을 생산하고 b.End3/b.End5 및 hCMEC/D3에 대해 각각 상등액에서 50/100 ng/mL 및 2500 ng/mL로 정량화하였다. 10 ng/mL 미만의 MAB1 hIgG1을 세 세포주 모두에서 AAVrh10 및 AAV-BR1 혈청형으로 수득하였다. 수득된 항체 수준은 뇌 내피 세포가 사용된 AAV 캡시드 또는 항체의 형식과 관계 없이 올바르게 폴딩된 항체를 생성함을 보여준다. 발현 역가는 평가된 조건에 의존적이었고 두 마우스 세포주와 비교하여 인간 hCMEC/D3 세포주에서 더 높은 역가가 관찰되었다(도 17 a 및 b). 또한, 각각이 AAV2에 의해 전달될 때 전체 MAB1 IgG1 대응물과 비교하여 MAB1 scFv-Fc에 대해 더 높은 항체 역가가 항상 관찰되었다. 이 실험에서, AAV2는 AAV-BR1과 비교하여 트랜스진을 전달하는데 더 강력하였다.

[0225] **실시예 7. 3D 인간 BBB 모델에서 인간 일차 뇌 미세혈관 내피 세포에 의한 항체 분비**

[0226] BBB 세포에 의한 항체 생산을 Neuromics(3D45002)에서 구입한 인간 일차 뇌 내피 미세혈관 세포, 성상세포 및 주피세포로 구성된 상업적으로 이용가능한 트랜스웰-기반 모델을 사용하여 평가하였다. 모델을 제조업체의 지침에 따라 배양하였다. 요약하면, 24-웰 플레이트를 0일에 해동하고 동결 배지를 따뜻한 성장 배지(배지 1)로 교체하였다. 가습 인큐베이터에서 3시간 인큐베이션한 후, 배지 1을 제거하고 두 번째 유지 배지(배지 2)로 교체하였다. 더 이상의 배지 교체를 수행하지 않았고, 세포를 해동 후 11일차까지 배양물에 보관하였다. AAV2 및 AAV-BR1 벡터는 인간(hIgG1) 및 마우스(mIgG2a) 버전의 MAB1 항체 트랜스진을 전달하는 것으로 평가되었다. 항체의 발현은 CMV 또는 CBh 프로모터에 의해 유도되었고; LC와 HC 사이에 IRES 요소를 사용하여 바이시스트론 항체 생산을 달성하였다. 세포 배양 삽입물에 존재하는 내피 세포를 해동 후 4일차에 AAV 작제물로 이전에 기술된 바와 같이 성장 배지에서 100'000의 MOI로 형질도입하였다. 형질도입 후 7일 후에 정단 및 기저외측 구획 둘 모두로부터의 상등액을 수집하고 분비된 항체 역가를 제조업체의 지침에 따라 인간 Fc 및 마우스 Fc 키트(PerkinElmer Cisbio, 62HFCPEH 및 6FMIGPEH)를 사용하여 HTRF에 의해 결정하였다. hIgG1 또는 mIgG2a 형식으

로서 정제된 재조합 MAB1을 각각 항체 정량화를 위한 표준으로서 사용하였고 모델 유지에 사용한 동일한 배양 배지에서 적정하였다. Tecan Spark® 마이크로플레이트 판독기를 사용하여 형광 신호를 판독하였다(Em:317 nm; Ex:620 nm 및 665 nm; 75번 깜빡임; 400 μs 통합 시간; 100 μs 지연 시간). 보간된 분비된 항체 역가가 도 18에 도시되어 있다. 유사한 MAB1 hIgG1 역가를 AAV2 및 AAV-BR1 혈청형에 대해 수득하였으며, 정단 구획(세포 배양 삽입물)에서 약 50 ng/mL 및 기저외측에서 10 내지 20 ng/mL이었다. CMV 또는 CBh 프로모터 하에서 발현된 MAB1 mIgG2a 이소형의 AAV-BR1 전달은 hIgG1 대응물과 비교하여 2 내지 3배 더 낮은 역가를 나타냈다. 일차 인간 뇌 미세혈관 내피 세포로부터의 데이터와 비교할 때 hCMEC/D3 세포주(도 17a, 검출가능한 MAB1 hIgG1 발현 없음)에서 AAV-BR1로 향성의 차이가 관찰되었다(도 18a 및 b). 시험관 내 세포주 데이터가 *생체 내* 효과를 예측하는 반면, 일차 세포 데이터는 *생체 내* AAV 향성을 예측하는데 선호된다. 도 18b는 각각의 AAV 벡터에 대한 정단(200 μL) 및 기저외측(500 μL) 구획에서 결정된 항체의 상대적인 양을 묘사한다. 항체 재분배는 내피 세포층으로부터 항체의 양측 분비를 시사한다.

[0227] 요약하면, 수득된 항체 역가는 일차 뇌 내피 세포가 사용된 AAV 캡시드와 독립적으로 그리고 항체의 형식에 관계없이 올바르게 폴딩된 항체를 생성함을 보여주었다. 중요한 점으로, 항체는 정단측 및 기저외측 모두에서 검출되었으며, 후자의 관찰은 뇌 실질을 모방하였다. 생성된 데이터는 본원에 설명된 혁신적인 방법을 검증하고 이 새로운 전달 전략으로 고품질 IgG 역가가 달성되었음을 확인시켜준다.

[0228] 본 명세서의 설명 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단어 "포함하다(comprise)" 및 "함유하다(contain)" 및 이들의 변형어는 "포함하지만 이에 제한되지 않음(including but not limited to)"을 의미하며, 이들은 다른 모이어티, 첨가제, 성분, 정수 또는 단계를 배제하려는 의도가 아니다(그리고 배제하지 않는다).

[0229] 본 명세서의 설명 및 청구범위 전반에 걸쳐, 단수형은 문맥에서 달리 요구하지 않는 한 복수형을 포함한다. 특히, 부정 관사가 사용되는 경우, 본 명세서는 문맥상 달리 요구하지 않는 한, 복수형 및 단수형을 고려하는 것으로 이해되어야 한다.

[0230] 달리 정의되지 않는 한, 여기에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 통상의 기술자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 구체적으로 언급된 모든 간행물 및 특허는 본 발명과 관련된 모든 목적을 위해 그 전체 내용이 인용되어 포함된다.

[0231] 본 발명은 본원에 기술된 특정 실시형태에 의해 범위가 제한되지 않는다. 실제로, 본원에 기술된 것에 외에 본 발명의 다양한 변형이 전술한 설명 및 수반되는 도면으로부터 당업자에게 명백해질 것이다. 그러한 수정은 첨부된 청구범위 내에 있는 것으로 의도된다. 또한, 본원에 기술된 본 발명의 모든 양태 및 실시형태는 적절하게 본 발명의 다른 양태(독립된 것을 포함하여)로부터 취해진 것을 포함하여 임의의 및 모든 다른 일관된 실시형태와 광범위하게 적용가능하고 결합가능한 것으로 간주된다.

[0232] **참고문헌:**


1. Villabona-Rueda, A., et al., *The Evolving Concept of the Blood Brain Barrier (BBB): From a Single Static Barrier to a Heterogeneous and Dynamic Relay Center.* Front Cell Neurosci, 2019. **13**: p. 405.
2. Daneman, R. and A. Prat, *The blood-brain barrier.* Cold Spring Harb Perspect Biol, 2015. **7**(1): p. a020412.
3. Pachter, J.S., H.E. de Vries, and Z. Fabry, *The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system.* J Neuropathol Exp Neurol, 2003. **62**(6): p. 593-604.
4. Sweeney, M.D., et al., *The role of brain vasculature in neurodegenerative disorders.* Nat Neurosci, 2018. **21**(10): p. 1318-1331.
5. St-Amour, I., et al., *Brain bioavailability of human intravenous immunoglobulin and its transport through the murine blood-brain barrier.* J Cereb Blood Flow Metab, 2013. **33**(12): p. 1983-92.
6. Pardridge, W.M., *Blood-Brain Barrier and Delivery of Protein and Gene Therapeutics to Brain.* Front Aging Neurosci, 2019. **11**: p. 373.
7. Thom, G., et al., *Isolation of blood-brain barrier-crossing antibodies from a phage display library by competitive elution and their ability to penetrate the central nervous system.* MAbs, 2018. **10**(2): p. 304-314.
8. Zhang, W., et al., *Differential expression of receptors mediating receptor-mediated transcytosis (RMT) in brain microvessels, brain parenchyma and peripheral tissues of the mouse and the human.* Fluids Barriers CNS, 2020. **17**(1): p. 47.
9. Gao, H., *Progress and perspectives on targeting nanoparticles for brain drug delivery.* Acta Pharm Sin B, 2016. **6**(4): p. 268-86.
10. Teleanu, D.M., et al., *Blood-Brain Delivery Methods Using Nanotechnology.* Pharmaceutics, 2018. **10**(4).
11. Chen, H., et al., *Focused ultrasound-enhanced intranasal brain delivery of brain-derived neurotrophic factor.* Sci Rep, 2016. **6**: p. 28599.
12. Ahmad, E., et al., *Evidence of nose-to-brain delivery of nanoemulsions: cargoes but not vehicles.* Nanoscale, 2017. **9**(3): p. 1174-1183.
13. Henchcliffe, C. and M. Parmar, *Repairing the Brain: Cell Replacement Using Stem Cell-Based Technologies.* J Parkinsons Dis, 2018. **8**(s1): p. S131-S137.
14. Heller, L., et al., *Secretion of proteins and antibody fragments from transiently transfected endothelial progenitor cells.* Journal of cellular and molecular medicine, 2020. **24**(15): p. 8772-8778.
15. Desai, N., *Challenges in development of nanoparticle-based therapeutics.* AAPS J, 2012. **14**(2): p. 282-95.
16. Kariolis, M.S., et al., *Brain delivery of therapeutic proteins using an Fc fragment blood-brain barrier transport vehicle in mice and monkeys.* Sci Transl Med, 2020. **12**(545).
17. Ullman, J.C., et al., *Brain delivery and activity of a lysosomal enzyme using a blood-brain barrier transport vehicle in mice.* Sci Transl Med, 2020. **12**(545).
18. Pothin, E., D. Lesuisse, and P. Lafaye, *Brain Delivery of Single-Domain Antibodies: A Focus on VHH and VNAR.* Pharmaceutics, 2020. **12**(10).


[0233]

19. Guo, X.-b., X. Deng, and Y. Wei, *Homing of Cultured Endothelial Progenitor Cells and Their Effect on Traumatic Brain Injury in Rat Model.* Scientific Reports, 2017. **7**(1): p. 4164.
20. Guzman, R., M. Janowski, and P. Walczak, *Intra-Arterial Delivery of Cell Therapies for Stroke.* Stroke, 2018. **49**(5): p. 1075-1082.
21. Tervo, D.G., et al., *A Designer AAV Variant Permits Efficient Retrograde Access to Projection Neurons.* Neuron, 2016. **92**(2): p. 372-382.
22. Olanow, C.W., et al., *Trophic factors for Parkinson's disease: To live or let die.* Mov Disord, 2015. **30**(13): p. 1715-24.
23. Tuszynski, M.H., et al., *Nerve Growth Factor Gene Therapy: Activation of Neuronal Responses in Alzheimer Disease.* JAMA Neurol, 2015. **72**(10): p. 1139-47.
24. Merkel, S.F., et al., *Trafficking of adeno-associated virus vectors across a model of the blood-brain barrier; a comparative study of transcytosis and transduction using primary human brain endothelial cells.* J Neurochem, 2017. **140**(2): p. 216-230.
25. Foust, K.D., et al., *Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes.* Nat Biotechnol, 2009. **27**(1): p. 59-65.
26. Hanlon, K.S., et al., *Selection of an Efficient AAV Vector for Robust CNS Transgene Expression.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2019. **15**: p. 320-332.
27. Mathiesen, S.N., et al., *CNS Transduction Benefits of AAV-PHP.eB over AAV9 Are Dependent on Administration Route and Mouse Strain.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2020. **19**: p. 447-458.
28. Huang, Q., et al., *Delivering genes across the blood-brain barrier: LY6A, a novel cellular receptor for AAV-PHP.B capsids.* PLoS One, 2019. **14**(11): p. e0225206.
29. Chan, K.Y., et al., *Engineered AAVs for efficient noninvasive gene delivery to the central and peripheral nervous systems.* Nat Neurosci, 2017. **20**(8): p. 1172-1179.
30. Korbelin, J., et al., *A brain microvasculature endothelial cell-specific viral vector with the potential to treat neurovascular and neurological diseases.* EMBO Mol Med, 2016. **8**(6): p. 609-25.
31. Ravindra Kumar, S., et al., *Multiplexed Cre-dependent selection yields systemic AAVs for targeting distinct brain cell types.* Nat Methods, 2020. **17**(5): p. 541-550.
32. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to Aß reduces progression of murine Alzheimer's disease.* PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
33. Sudol, K.L., et al., *Generating differentially targeted amyloid-beta specific intrabodies as a passive vaccination strategy for Alzheimer's disease.* Mol Ther, 2009. **17**(12): p. 2031-40.
34. Ryan, D.A., et al., *Abeta-directed single-chain antibody delivery via a serotype-1 AAV vector improves learning behavior and pathology in Alzheimer's disease mice.* Mol Ther, 2010. **18**(8): p. 1471-81.
35. Levites, Y., et al., *Intracranial adeno-associated virus-mediated delivery of anti-pan amyloid beta, amyloid beta40, and amyloid beta42 single-chain variable fragments attenuates plaque pathology in amyloid precursor protein mice.* J Neurosci, 2006. **26**(46): p. 11923-8.
36. Kou, J., et al., *Anti-Amyloid-ß Single-Chain Antibody Brain Delivery Via AAV Reduces Amyloid Load But May Increase Cerebral Hemorrhages in an Alzheimer's Disease Mouse Model.* J Alzheimers Dis, 2011. **27**(1): p. 23-38.
37. Liu, W., et al., *Vectored Intracerebral Immunization with the Anti-Tau Monoclonal Antibody PHF1 Markedly Reduces Tau Pathology in Mutant Tau Transgenic Mice.* J Neurosci, 2016. **36**(49): p. 12425-12435.
38. Vitale, F., et al., *Intramuscular injection of vectorized-scFvMC1 reduces pathological tau in two different tau transgenic models.* Acta Neuropathol Commun, 2020. **8**(1): p. 126.
39. Vitale, F., et al., *Anti-tau conformational scFv MC1 antibody efficiently reduces pathological tau species in adult JNPL3 mice.* Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 82.

[0234]

40. Bell, R.D. and M.D. Ehlers, *Breaching the blood-brain barrier for drug delivery.* Neuron, 2014. **81**(1): p. 1-3.
41. Sacramento, C.B., et al., *Anti-Phospho-Tau Gene Therapy for Chronic Traumatic Encephalopathy.* Hum Gene Ther, 2020. **31**(1-2): p. 57-69.
42. Goodwin, M.S., et al., *Utilizing minimally purified secreted rAAV for rapid and cost-effective manipulation of gene expression in the CNS.* Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 15.
43. Goodwin, M.S., et al., *Anti-tau scFvs Targeted to the Cytoplasm or Secretory Pathway Variably Modify Pathology and Neurodegenerative Phenotypes.* Mol Ther, 2020.
44. Pozzi, S., et al., *Virus-mediated delivery of antibody targeting TAR DNA-binding protein-43 mitigates associated neuropathology.* J Clin Invest, 2019. **129**(4): p. 1581-1595.
45. Saunders, K.O., et al., *Broadly Neutralizing Human Immunodeficiency Virus Type 1 Antibody Gene Transfer Protects Nonhuman Primates from Mucosal Simian-Human Immunodeficiency Virus Infection.* J Virol, 2015. **89**(16): p. 8334-45.
46. Ho, S.C., et al., *IRES-mediated Tricistronic vectors for enhancing generation of high monoclonal antibody expressing CHO cell lines.* J Biotechnol, 2012. **157**(1): p. 130-9.
47. Liu, Z., et al., *Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector.* Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 2193.
48. Yang, S., et al., *Development of optimal bicistronic lentiviral vectors facilitates high-level TCR gene expression and robust tumor cell recognition.* Gene Ther, 2008. **15**(21): p. 1411-23.
49. Sharma, P., et al., *2A peptides provide distinct solutions to driving stop-carry on translational recoding.* Nucleic Acids Res, 2012. **40**(7): p. 3143-51.
50. Zhang, Y. and W.M. Pardridge, *Mediated efflux of IgG molecules from brain to blood across the blood-brain barrier.* J Neuroimmunol, 2001. **114**(1-2): p. 168-72.
51. Boado, R.J., et al., *Fusion antibody for Alzheimer's disease with bidirectional transport across the blood-brain barrier and abeta fibril disaggregation.* Bioconjug Chem, 2007. **18**(2): p. 447-55.
52. Deane, R., et al., *IgG-assisted age-dependent clearance of Alzheimer's amyloid beta peptide by the blood-brain barrier neonatal Fc receptor.* J Neurosci, 2005. **25**(50): p. 11495-503.
53. Albright, B.H., et al., *Mapping the Structural Determinants Required for AAVrh.10 Transport across the Blood-Brain Barrier.* Mol Ther, 2018. **26**(2): p. 510-523.
54. Albright, B.H., et al., *Modulation of Sialic Acid Dependence Influences the Central Nervous System Transduction Profile of Adeno-associated Viruses.* J Virol, 2019. **93**(11).
55. Fukuchi, K., et al., *Anti-Abeta single-chain antibody delivery via adeno-associated virus for treatment of Alzheimer's disease.* Neurobiol Dis, 2006. **23**(3): p. 502-11.
56. Elmer, B.M., et al., *Gene delivery of a modified antibody to Abeta reduces progression of murine Alzheimer's disease.* PLoS One, 2019. **14**(12): p. e0226245.
57. Hay, C.E., et al., 2019.
58. Johnson, P.R., et al., *Vector-mediated gene transfer engenders long-lived neutralizing activity and protection against SIV infection in monkeys.* Nat Med, 2009. **15**(8): p. 901-6.
59. Fuchs, S.P. and R.C. Desrosiers, *Promise and problems associated with the use of recombinant AAV for the delivery of anti-HIV antibodies.* Mol Ther Methods Clin Dev, 2016. **3**: p. 16068.
60. Fuchs, S.P., et al., *AAV-Delivered Antibody Mediates Significant Protective Effects against SIVmac239 Challenge in the Absence of Neutralizing Activity.* PLoS Pathog, 2015. **11**(8): p. e1005090.
61. Martinez-Navio, J.M., et al., *Long-Term Delivery of an Anti-SIV Monoclonal Antibody With AAV.* Front Immunol, 2020. **11**: p. 449.
62. Martinez-Navio, J.M., et al., *Adeno-Associated Virus Delivery of Anti-HIV Monoclonal Antibodies Can Drive Long-Term Virologic Suppression.* Immunity, 2019. **50**(3): p. 567-575 e5.

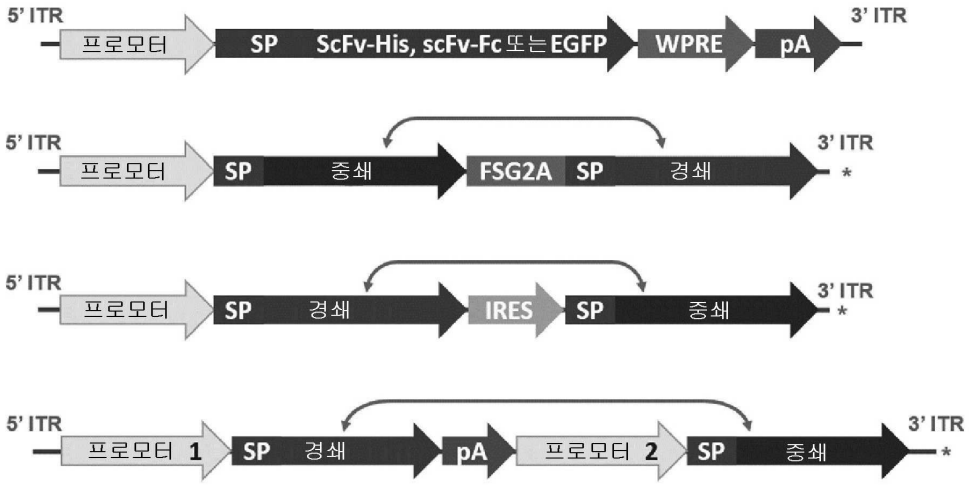

[0235]


63. Thomas, G., *Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease.* Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(10): p. 753-66.
64. Chng, J., et al., *Cleavage efficient 2A peptides for high level monoclonal antibody expression in CHO cells.* MAbs, 2015. **7**(2): p. 403-12.
65. Kim, J.H., et al., *High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice.* PLoS One, 2011. **6**(4): p. e18556.
66. Velychko, S., et al., *Fusion of Reprogramming Factors Alters the Trajectory of Somatic Lineage Conversion.* Cell Rep, 2019. **27**(1): p. 30-39 e4.
67. Fang, J., et al., *Stable antibody expression at therapeutic levels using the 2A peptide.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(5): p. 584-90.
68. Mizuguchi, H., et al., *IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector.* Mol Ther, 2000. **1**(4): p. 376-82.
69. Fuchs, S.P., et al., *Recombinant AAV Vectors for Enhanced Expression of Authentic IgG.* PLoS One, 2016. **11**(6): p. e0158009.

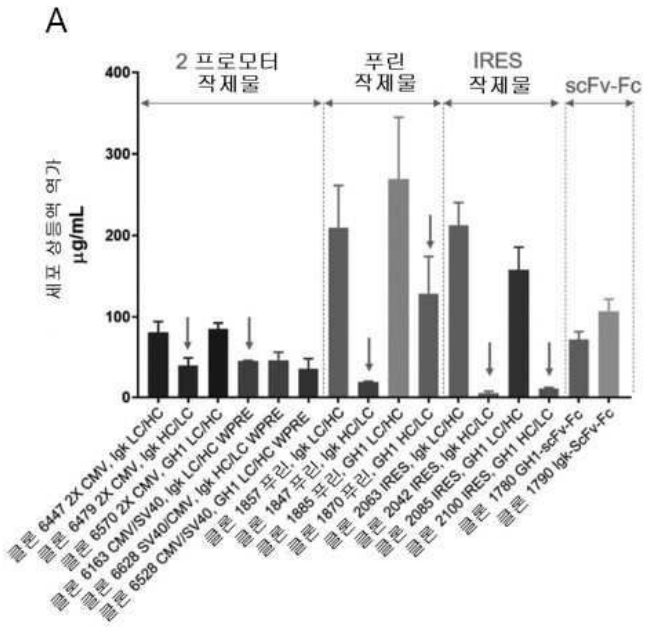

[0236]

## 도면

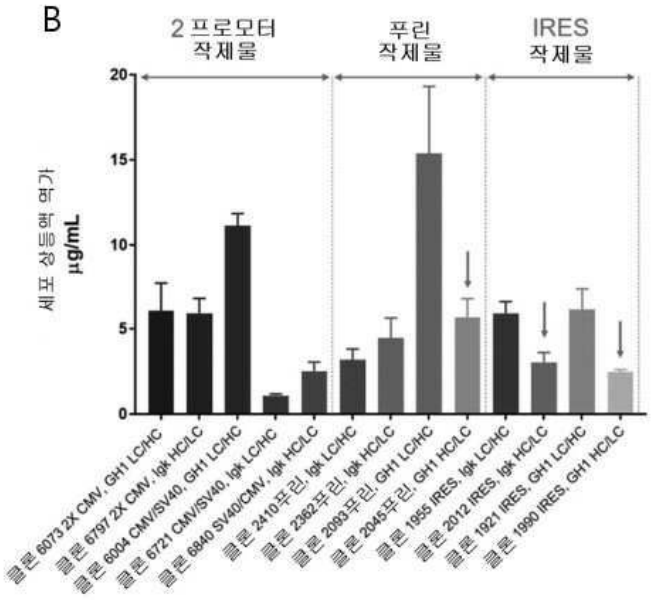
### 도면1


5' ITR
프로모터
SP
ScFv-His, scFv-Fc 또는 EGFP
WPRE
pA
3' ITR
5' ITR
프로모터
SP
중쇄
FSG2A
SP
경쇄
3' ITR
*
5' ITR
프로모터
SP
경쇄
IRES
SP
중쇄
3' ITR
*
5' ITR
프로모터 1
SP
경쇄
pA
프로모터 2
SP
중쇄
3' ITR
*

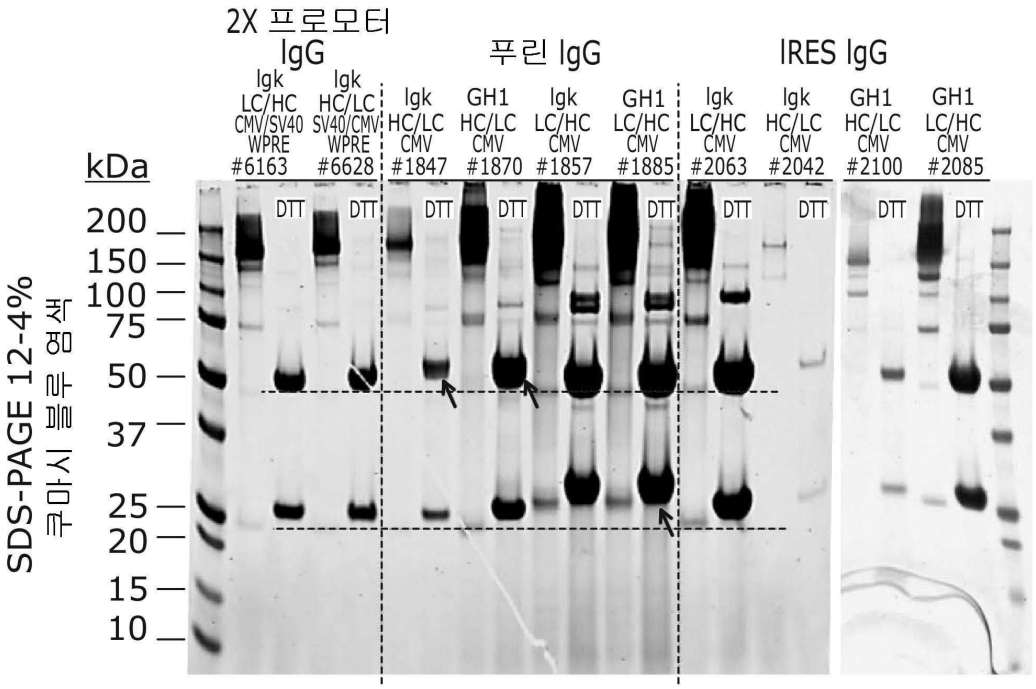
### 도면2a


A
2 프로모터 작제물
푸린 작제물
IRES 작제물
scFv-Fc
세포 상등액 역가 µg/mL
400
300
200
100
0
클론 6447 2X CMV, Igk LC/HC
클론 6479 2X CMV, Igk HC/LC
클론 6570 2X CMV, GH1 LC/HC
클론 6163 CMV/SV40, Igk LC/HC WPRE
클론 6628 SV40/CMV, Igk HC/LC WPRE
클론 6528 CMV/SV40, GH1 LC/HC WPRE
클론 1857 푸린, Igk LC/HC
클론 1847 푸린, Igk HC/LC
클론 1885 푸린, GH1 LC/HC
클론 1870 푸린, GH1 HC/LC
클론 2063 IRES, Igk LC/HC
클론 2042 IRES, Igk HC/LC
클론 2085 IRES, GH1 LC/HC
클론 2100 IRES, GH1 HC/LC
클론 1780 GH1-scFv-Fc
클론 1790 Igk-ScFv-Fc

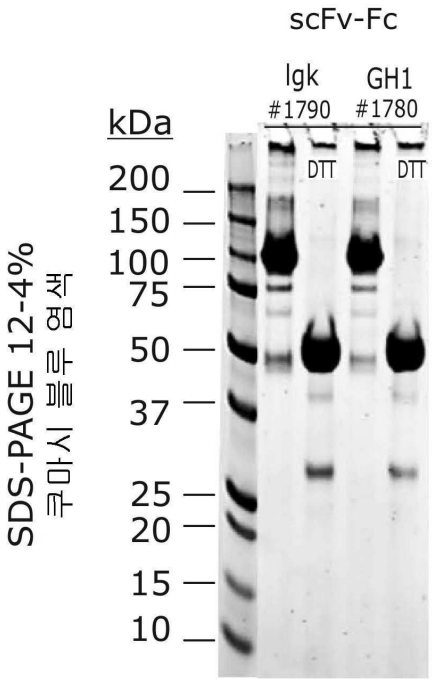
도면2b


B
2 프로모터 작제물
푸린 작제물
IRES 작제물
세포 상등액 역가 µg/mL
20
15
10
5
0
클론 6073 2X CMV, GH1 LC/HC
클론 6797 2X CMV, Igk HC/LC
클론 6004 CMV/SV40, GH1 LC/HC
클론 6721 CMV/SV40, Igk LC/HC
클론 6840 SV40/CMV, Igk HC/LC
클론 2410푸린, Igk LC/HC
클론 2362푸린, Igk HC/LC
클론 2093푸린, GH1 LC/HC
클론 2045푸린, GH1 HC/LC
클론 1955 IRES, Igk LC/HC
클론 2012 IRES, Igk HC/LC
클론 1921 IRES, GH1 LC/HC
클론 1990 IRES, GH1 HC/LC

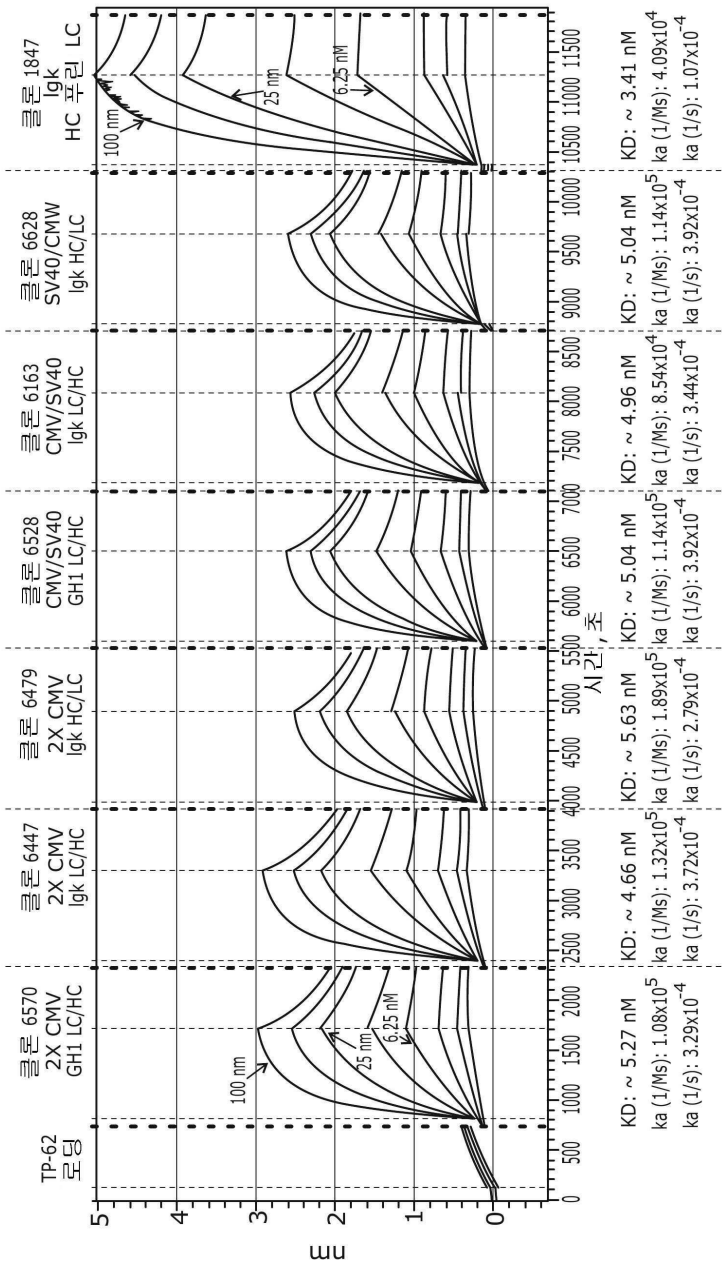
도면3


2X 프로모터 IgG
푸린 IgG
IRES IgG
Igk LC/HC CMV/SV40 WPRE #6163
Igk HC/LC SV40/CMV WPRE #6628
Igk HC/LC CMV #1847
GH1 HC/LC CMV #1870
Igk LC/HC CMV #1857
GH1 LC/HC CMV #1885
Igk LC/HC CMV #2063
Igk HC/LC CMV #2042
GH1 HC/LC CMV #2100
GH1 LC/HC CMV #2085
DTT
kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS-PAGE 12-4% 쿠마시 블루 염색

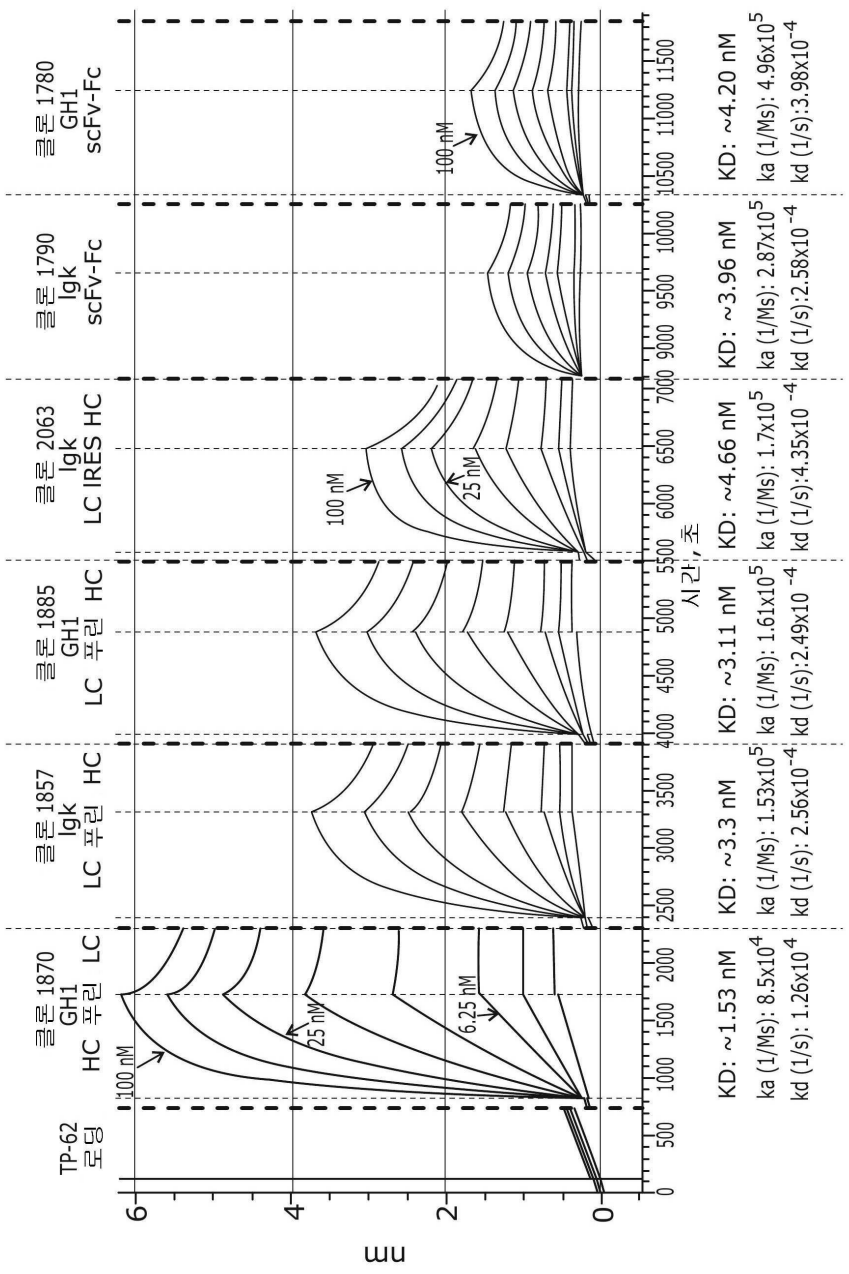
도면4


scFv-Fc
lgk
#1790
GH1
#1780
DTT
DTT
kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
SDS-PAGE 12-4%
쿠마시 블루 염색

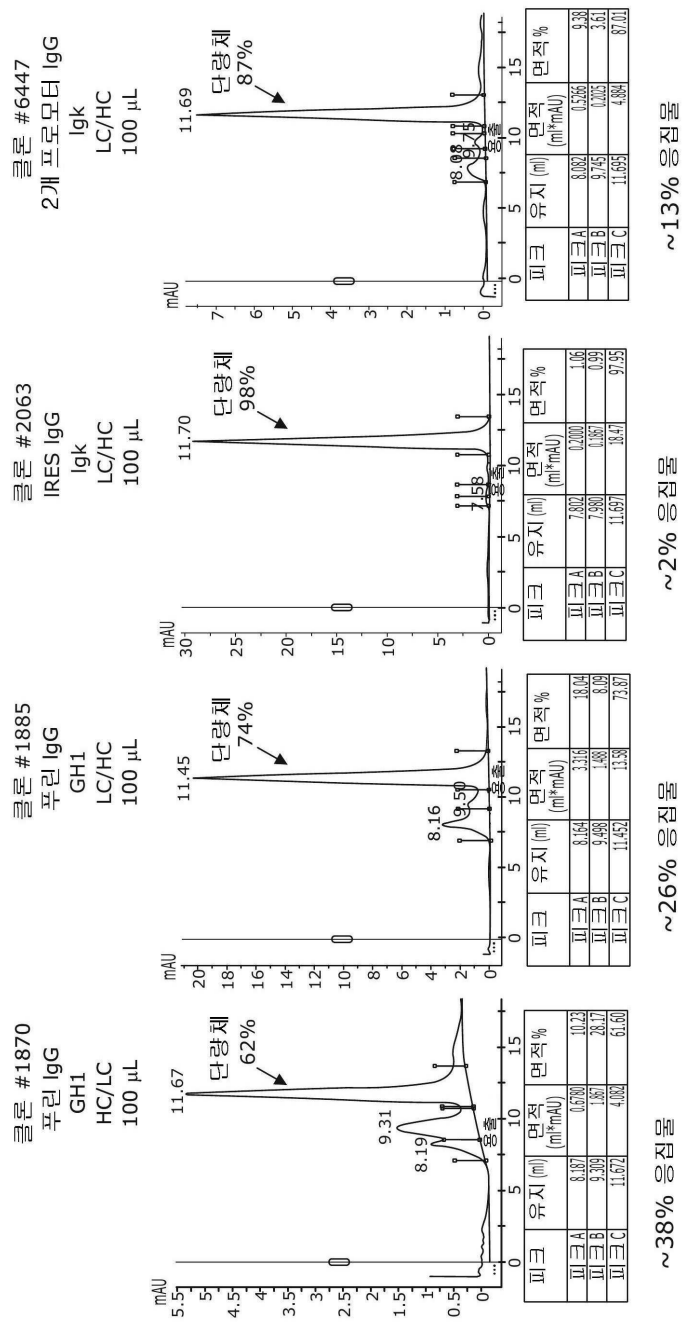
도면5a


nm
시간, 초
TP-62 로딩
클론 6570 2X CMV GH1 LC/HC
클론 6447 2X CMV lgk LC/HC
클론 6479 2X CMV lgk HC/LC
클론 6528 CMV/SV40 GH1 LC/HC
클론 6163 CMV/SV40 lgk LC/HC
클론 6628 SV40/CMW lgk HC/LC
클론 1847 lgk HC 푸린 LC
100 nM
25 nM
6.25 nM
KD: ~ 5.27 nM
ka (1/Ms): 1.08x10^5
ka (1/s): 3.29x10^-4
KD: ~ 4.66 nM
ka (1/Ms): 1.32x10^5
ka (1/s): 3.72x10^-4
KD: ~ 5.63 nM
ka (1/Ms): 1.89x10^5
ka (1/s): 2.79x10^-4
KD: ~ 5.04 nM
ka (1/Ms): 1.14x10^5
ka (1/s): 3.92x10^-4
KD: ~ 4.96 nM
ka (1/Ms): 8.54x10^4
ka (1/s): 3.44x10^-4
KD: ~ 5.04 nM
ka (1/Ms): 1.14x10^5
ka (1/s): 3.92x10^-4
KD: ~ 3.41 nM
ka (1/Ms): 4.09x10^4
ka (1/s): 1.07x10^-4

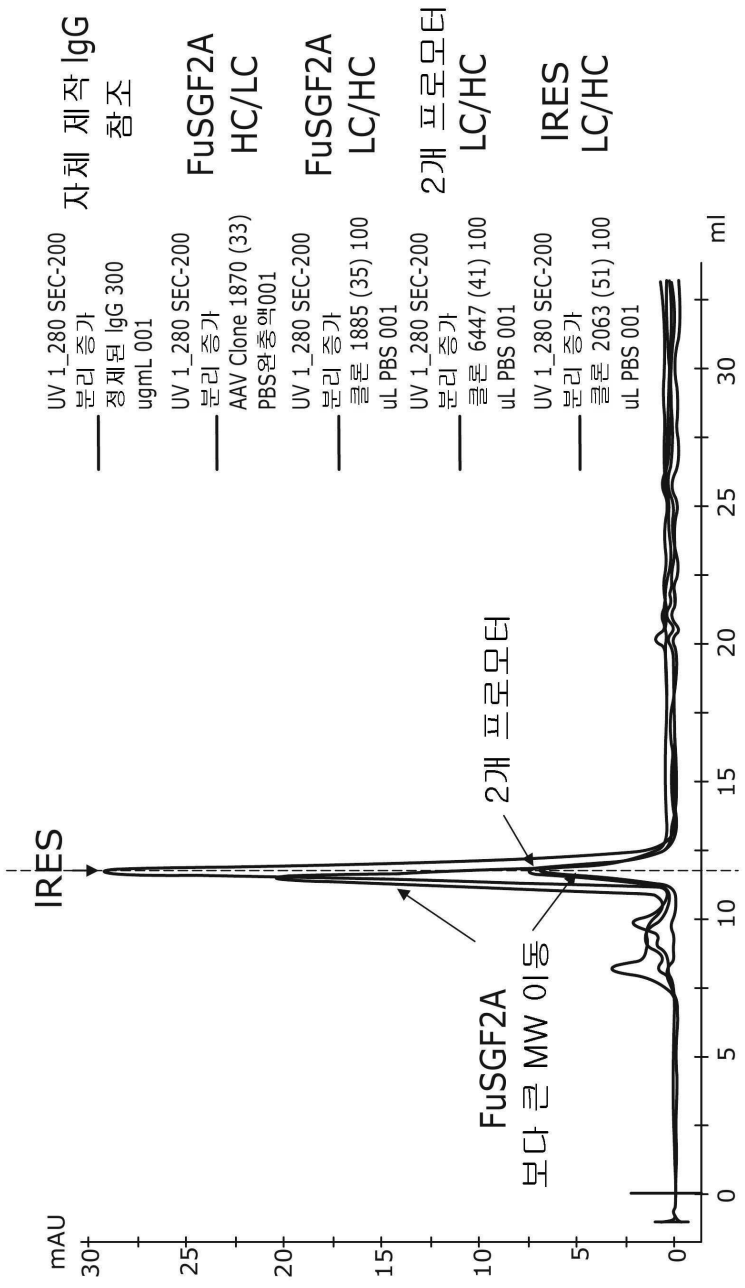
도면5b


TP-62
로딩
클론 1870
GH1
HC 푸린 LC
100 nM
25 nM
6.25 nM
KD: ~1.53 nM
ka (1/Ms): 8.5x10^4
kd (1/s): 1.26x10^-4
클론 1857
Igk
LC 푸린 HC
KD: ~3.3 nM
ka (1/Ms): 1.53x10^5
kd (1/s): 2.56x10^-4
클론 1885
GH1
LC 푸린 HC
KD: ~3.11 nM
ka (1/Ms): 1.61x10^5
kd (1/s):2.49x10^-4
클론 2063
Igk
LC IRES HC
100 nM
25 nM
KD: ~4.66 nM
ka (1/Ms): 1.7x10^5
kd (1/s):4.35x10^-4
클론 1790
Igk
scFv-Fc
KD: ~3.96 nM
ka (1/Ms): 2.87x10^5
kd (1/s):2.58x10^-4
클론 1780
GH1
scFv-Fc
100 nM
KD: ~4.20 nM
ka (1/Ms): 4.96x10^5
kd (1/s):3.98x10^-4
nm
시간, 초

도면6


클론 #1870
푸린 IgG
GH1
HC/LC
100 µL
단량체
62%
~38% 응집물
클론 #1885
푸린 IgG
GH1
LC/HC
100 µL
단량체
74%
~26% 응집물
클론 #2063
IRES IgG
lgk
LC/HC
100 µL
단량체
98%
~2% 응집물
클론 #6447
2개 프로모터 IgG
lgk
LC/HC
100 µL
단량체
87%
~13% 응집물
mAU
min

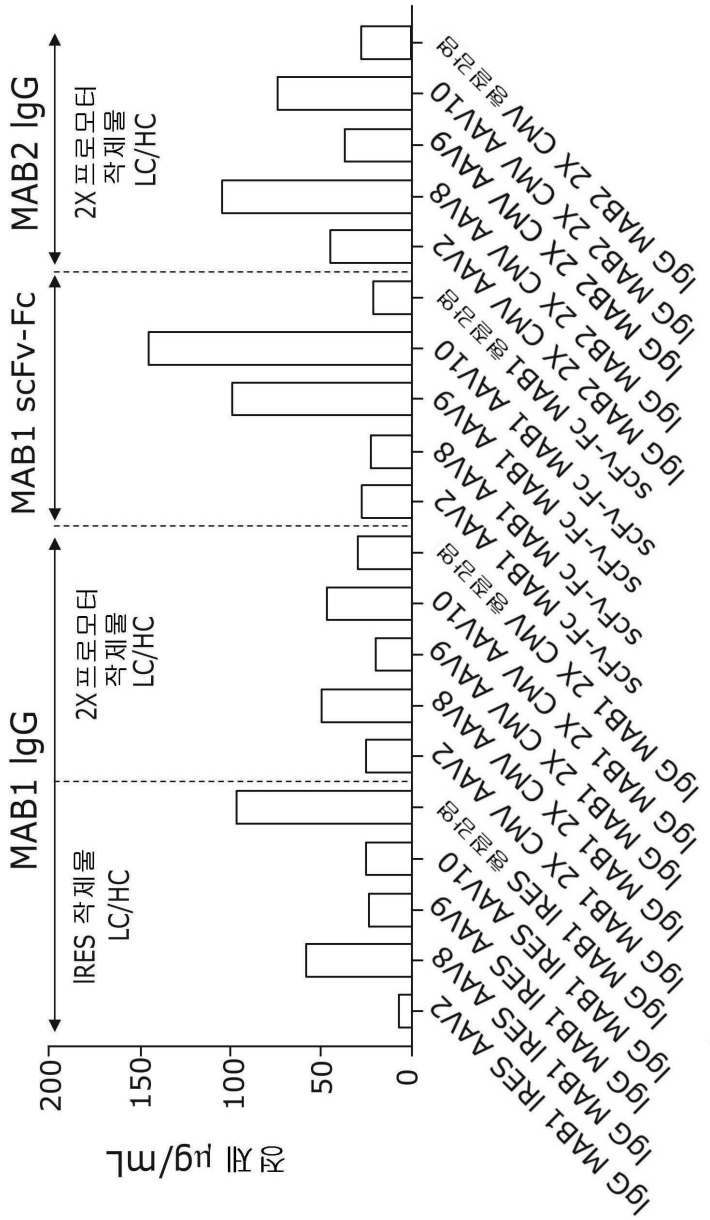
도면7


IRES
2개 프로모터
FuSGF2A
보다 큰 MW 이동
mAU
ml
UV 1_280 SEC-200
분리 증가
정제된 IgG 300
ugmL 001
자체 제작 IgG
참조
UV 1_280 SEC-200
분리 증가
AAV Clone 1870 (33)
PBS완충액001
FuSGF2A
HC/LC
UV 1_280 SEC-200
분리 증가
클론 1885 (35) 100
uL PBS 001
FuSGF2A
LC/HC
UV 1_280 SEC-200
분리 증가
클론 6447 (41) 100
uL PBS 001
2개 프로모터
LC/HC
UV 1_280 SEC-200
분리 증가
클론 2063 (51) 100
uL PBS 001
IRES
LC/HC

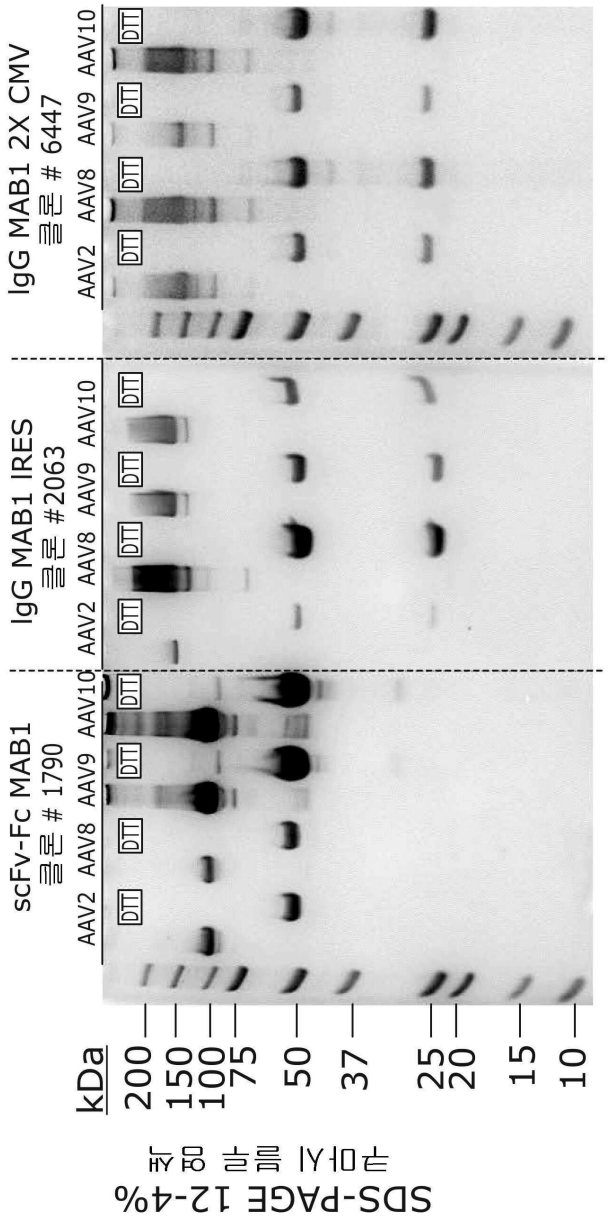
도면8


1. 클론 IgG MAB2 LC- 푸린 -HC
예상 LC C-말단 서열
SEQ ID NO: 11 VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEC
분석 LC C-말단 서열
SEQ ID NO: 12 VYACEVTHQG LSSPVTKSFN RGEOR K RRSG SGAPVKQTLN FDLLKLAGDV ESNPGPMETD TLLL
깨끗이 절단
HC 전달 펩티드가
남아있지 않음/HC 전달
펩티드가 미량 남아있음
비절단 푸린-SGSG-F2A 펩티드
HC 전달
펩티드
2. 클론 IgG MAB2 HC- 푸린 -LC
예상 HC C-말단 서열
SEQ ID NO: 13 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK
분석 HC C-말단 서열
SEQ ID NO: 14 MHEALHNHYT QKSLSLSPGK R KR RSGSGAP VKQTLNFDLL KLAGDVESNP GPMETDTLL
깨끗이 절단
LC 전달 펩티드가
남아있지 않음/LC 전달
펩티드가 미량 남아있음
비절단 푸린-SGSG-F2A 펩티드
LC 전달
펩티드

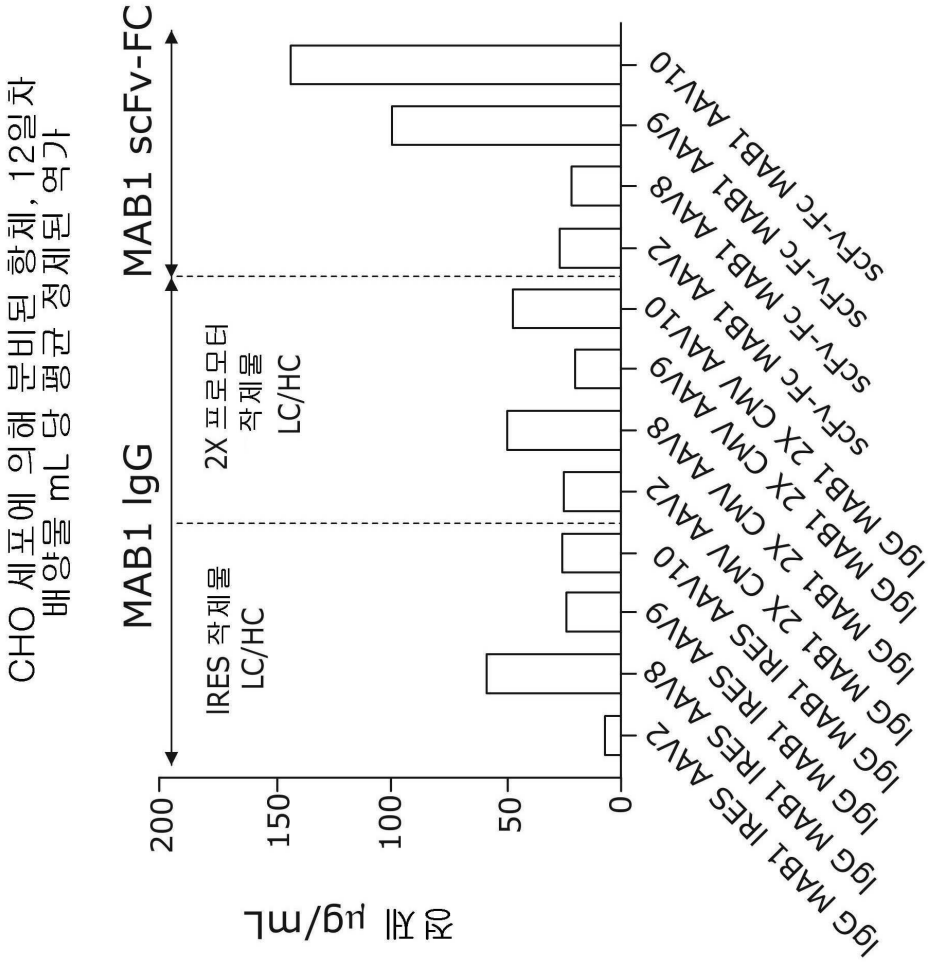
도면9


MAB1 IgG
MAB1 scFv-Fc
MAB2 IgG
IRES 작제물 LC/HC
2X 프로모터 작제물 LC/HC
2X 프로모터 작제물 LC/HC
항체 μg/mL
200
150
100
50
0
IgG MAB1 IRES AAV2
IgG MAB1 IRES AAV8
IgG MAB1 IRES AAV9
IgG MAB1 IRES AAV10
IgG MAB1 IRES 음성대조
IgG MAB1 2X CMV AAV2
IgG MAB1 2X CMV AAV8
IgG MAB1 2X CMV AAV9
IgG MAB1 2X CMV AAV10
IgG MAB1 2X 음성대조
scFv-Fc MAB1 AAV2
scFv-Fc MAB1 AAV8
scFv-Fc MAB1 AAV9
scFv-Fc MAB1 AAV10
scFv-Fc MAB1 음성대조
IgG MAB2 2X CMV AAV2
IgG MAB2 2X CMV AAV8
IgG MAB2 2X CMV AAV9
IgG MAB2 2X CMV AAV10
IgG MAB2 2X 음성대조

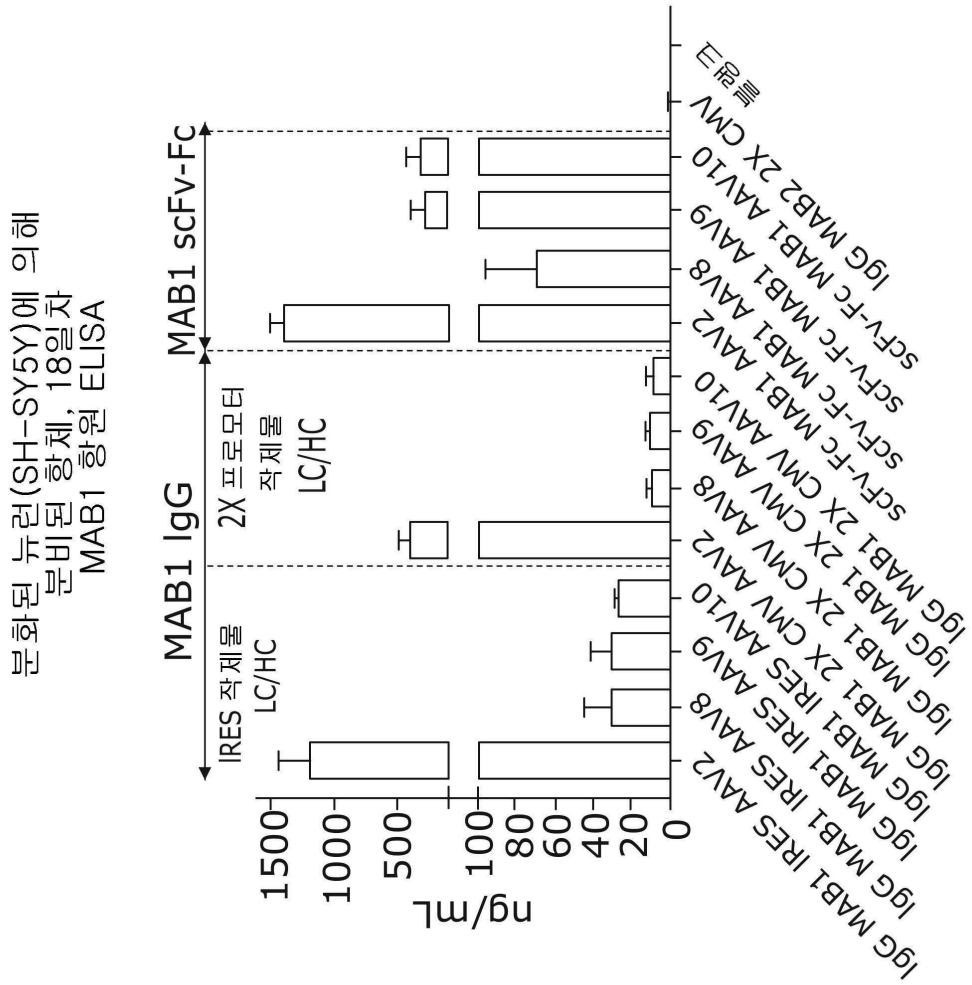
도면10


SDS-PAGE 12-4%
겔아시 블루 염색
kDa
200
150
100
75
50
37
25
20
15
10
scFv-Fc MAB1
클론 # 1790
IgG MAB1 IRES
클론 #2063
IgG MAB1 2X CMV
클론 # 6447
AAV2
AAV8
AAV9
AAV10
DTT

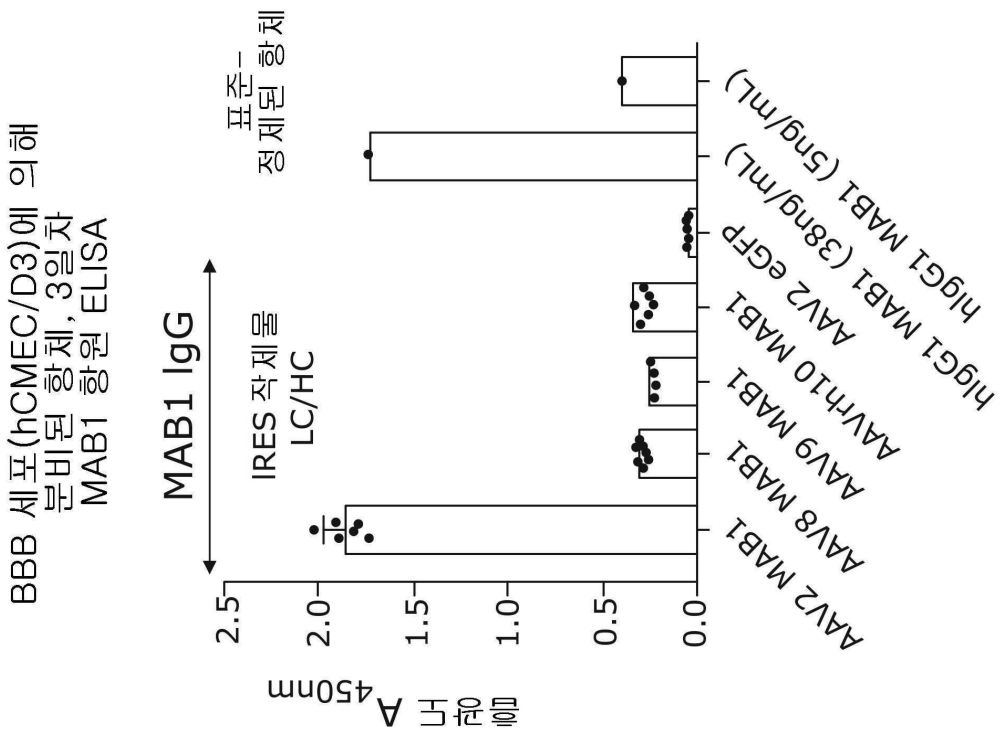
도면11a


CHO 세포에 의해 분비된 항체, 12일차
배양물 mL 당 평균 정제된 역가
MAB1 IgG
MAB1 scFv-FC
IRES 작제물
LC/HC
2X 프로모터
작제물
LC/HC
0
50
100
150
200
역가 μg/mL
IgG MAb1 IRES AAV2
IgG MAb1 IRES AAV8
IgG MAb1 IRES AAV9
IgG MAb1 IRES AAV10
IgG MAb1 2X CMV AAV2
IgG MAb1 2X CMV AAV8
IgG MAb1 2X CMV AAV9
IgG MAb1 2X CMV AAV10
scFv-FC MAb1 AAV2
scFv-FC MAb1 AAV8
scFv-FC MAb1 AAV9
scFv-FC MAb1 AAV10

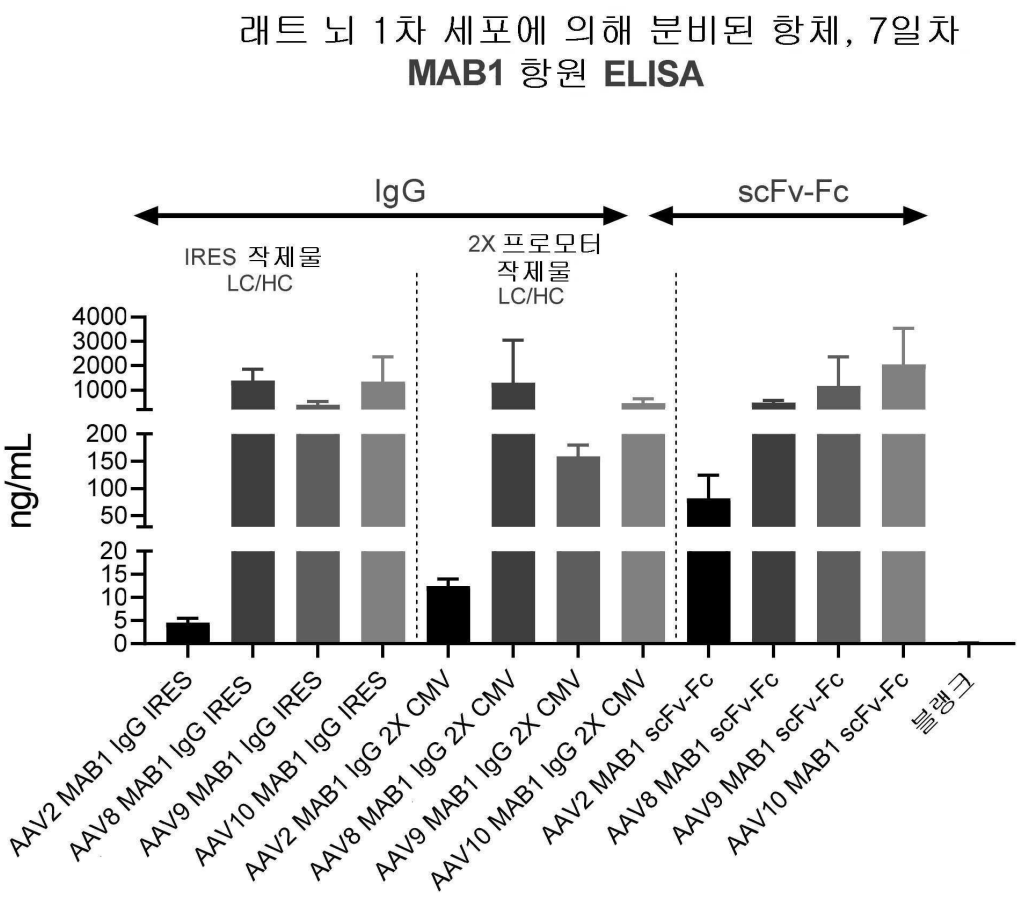
도면11b


분화된 뉴런(SH-SY5Y)에 의해
분비된 항체, 18일차
MAB1 항원 ELISA
MAB1 IgG
MAB1 scFv-Fc
IRES 작제물
LC/HC
2X 프로모터
작제물
LC/HC
ng/mL
1500
1000
500
100
80
60
40
20
0
IgG MAB1 IRES AAV2
IgG MAB1 IRES AAV8
IgG MAB1 IRES AAV9
IgG MAB1 IRES AAV10
IgG MAB1 2X CMV AAV2
IgG MAB1 2X CMV AAV8
IgG MAB1 2X CMV AAV9
IgG MAB1 2X CMV AAV10
scFv-Fc MAB1 AAV2
scFv-Fc MAB1 AAV8
scFv-Fc MAB1 AAV9
scFv-Fc MAB1 AAV10
IgG MAB2 2X CMV
드원들

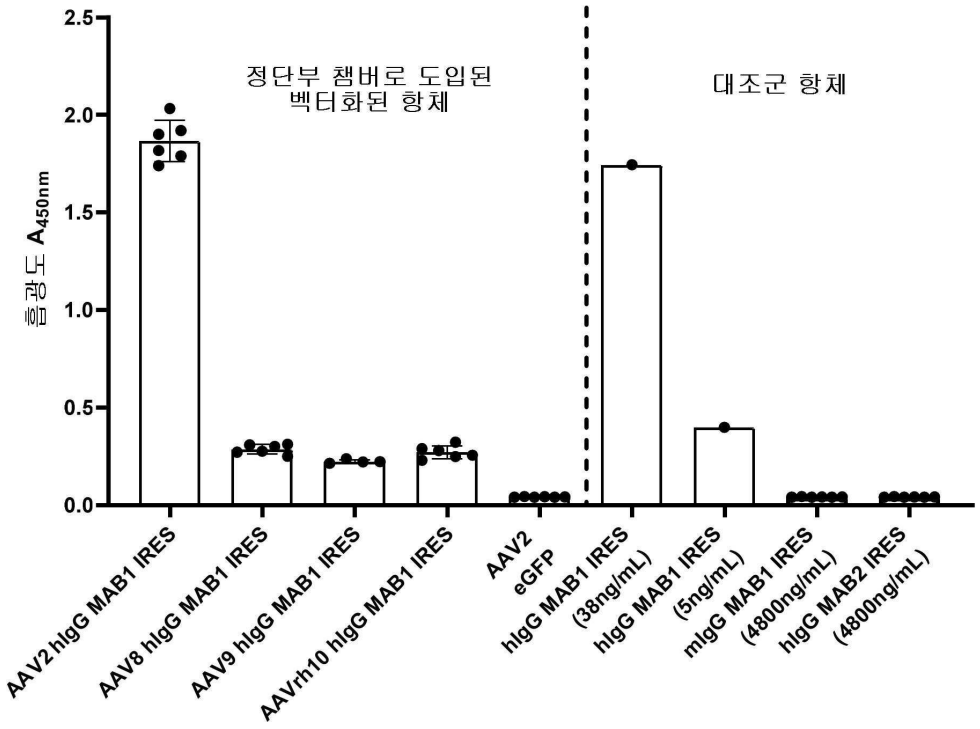
도면11c


BBB 세포(hCMEC/D3)에 의해
분비된 항체, 3일차
MAB1 항원 ELISA
MAB1 IgG
IRES 작제물
LC/HC
표준 –
정제된 항체
흡광도 A450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV2 MAB1
AAV8 MAB1
AAV9 MAB1
AAVrh10 MAB1
AAV2 eGFP
hIgG1 MAB1 (38ng/mL)
hIgG1 MAB1 (5ng/mL)

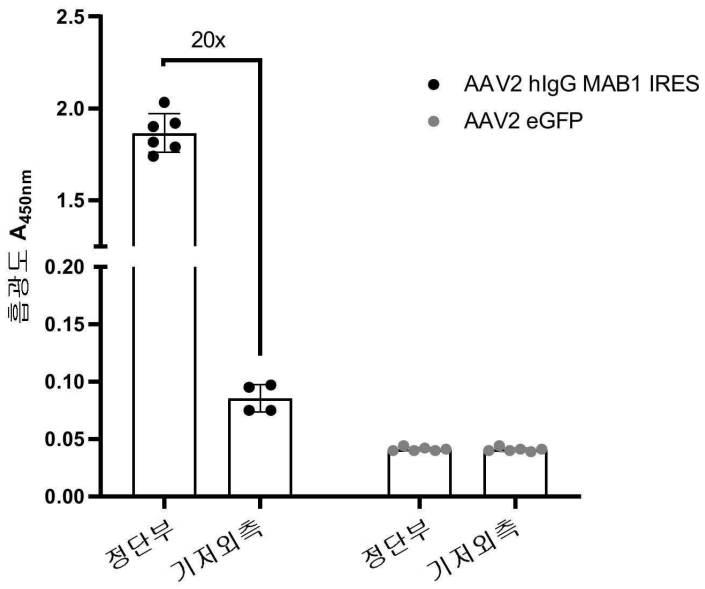
도면12


래트 뇌 1차 세포에 의해 분비된 항체, 7일차
MAB1 항원 ELISA
IgG
scFv-Fc
IRES 작제물
LC/HC
2X 프로모터
작제물
LC/HC
ng/mL
4000
3000
2000
1000
200
150
100
50
20
15
10
5
0
AAV2 MAB1 IgG IRES
AAV8 MAB1 IgG IRES
AAV9 MAB1 IgG IRES
AAV10 MAB1 IgG IRES
AAV2 MAB1 IgG 2X CMV
AAV8 MAB1 IgG 2X CMV
AAV9 MAB1 IgG 2X CMV
AAV10 MAB1 IgG 2X CMV
AAV2 MAB1 scFv-Fc
AAV8 MAB1 scFv-Fc
AAV9 MAB1 scFv-Fc
AAV10 MAB1 scFv-Fc
블랭크

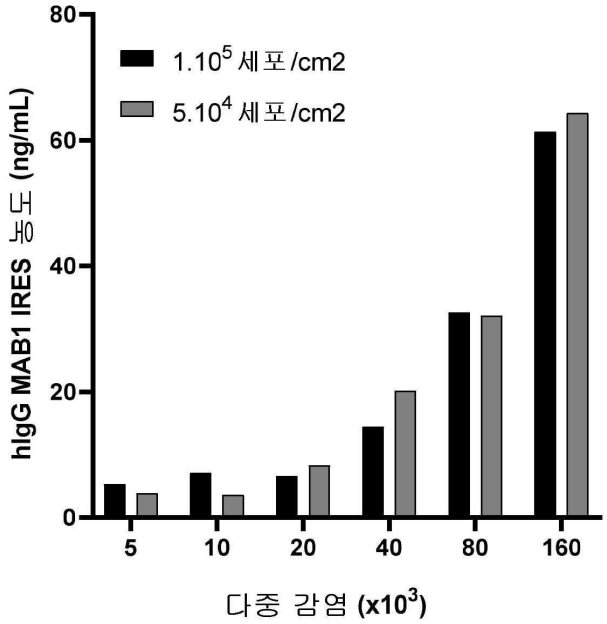
도면13


정단부 챔버로 도입된
벡터화된 항체
대조군 항체
흡광도 A450nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
AAV2 hIgG MAB1 IRES
AAV8 hIgG MAB1 IRES
AAV9 hIgG MAB1 IRES
AAVrh10 hIgG MAB1 IRES
AAV2 eGFP
hIgG MAB1 IRES (38ng/mL)
hIgG MAB1 IRES (5ng/mL)
mIgG MAB1 IRES (4800ng/mL)
hIgG MAB2 IRES (4800ng/mL)

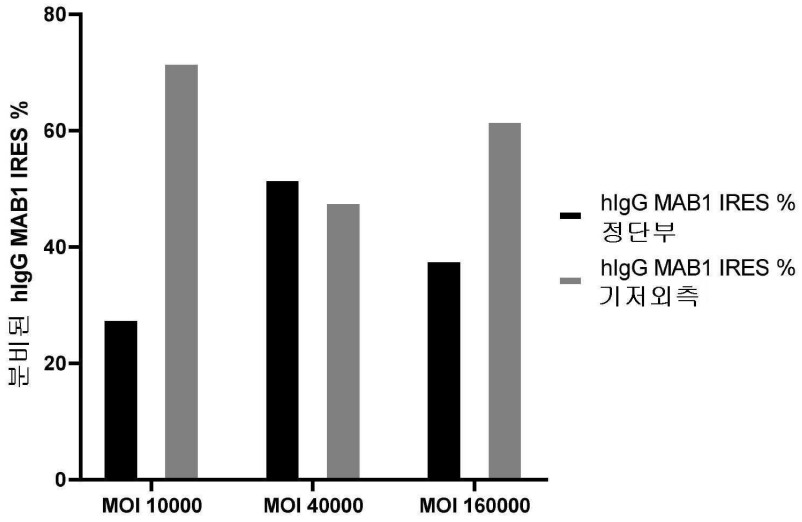
도면14


20x
AAV2 hIgG MAB1 IRES
AAV2 eGFP
흡광도 A450nm
2.5
2.0
1.5
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
정단부
기저외측
정단부
기저외측

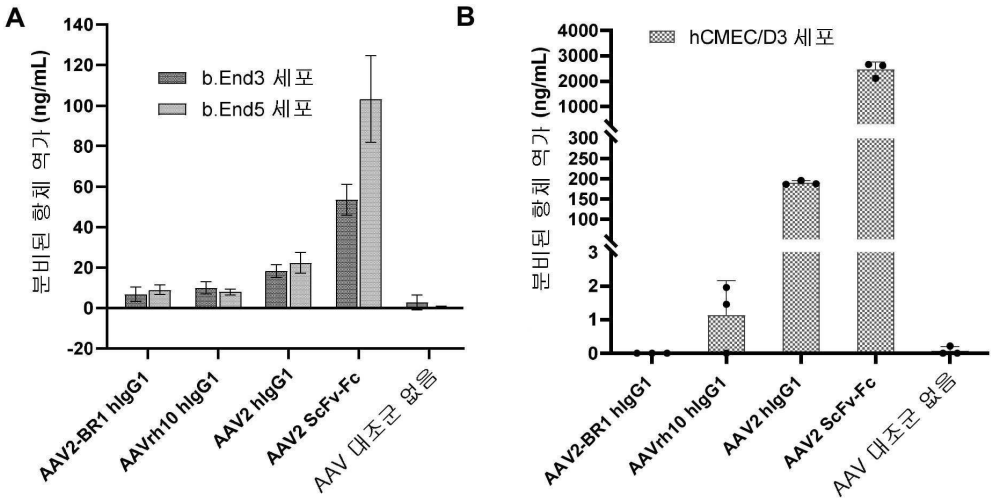
도면15


80
60
40
20
0
1.10^5 세포/cm2
5.10^4 세포/cm2
hIgG MAB1 IRES 농도 (ng/mL)
5
10
20
40
80
160
다중 감염 (x10^3)

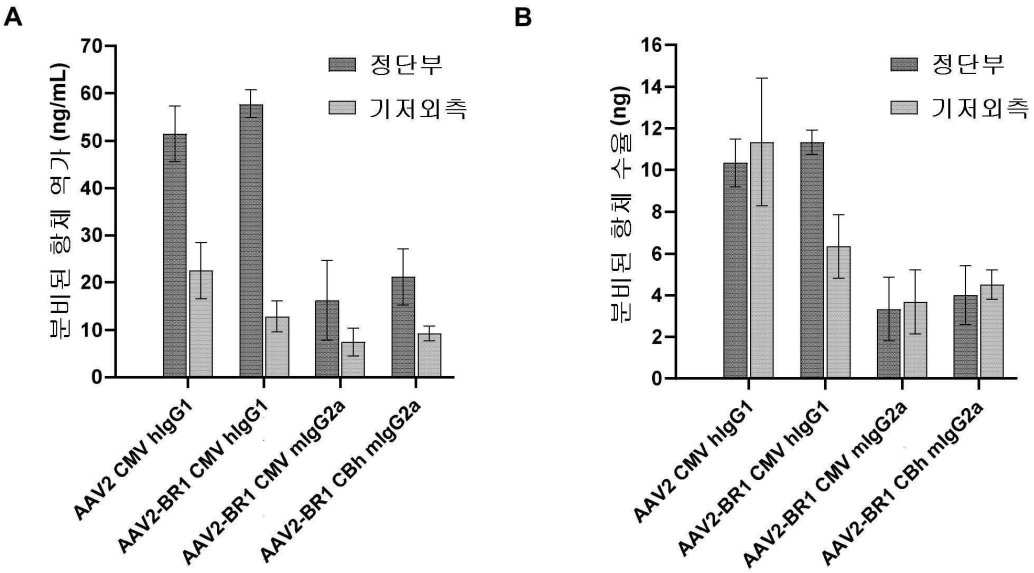
도면16


80
60
40
20
0
분비된 hIgG MAB1 IRES %
MOI 10000
MOI 40000
MOI 160000
hIgG MAB1 IRES % 정단부
hIgG MAB1 IRES % 기저외측

도면17




도면18




서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> AC Immune SA

<120> ANTIBODY DELIVERY

<130> P218778WO00

<150> EP 20215823.4

<151> 2020-12-18

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 588

<212> DNA

<213> Encephalomyocarditis virus

<400> 1

gcccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt 60

gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc 120

ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttccct ctcgccaaag 180

gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240

aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300

tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc 360

acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420

aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480

gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540

gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataatatgg ccacaacc 588

<210> 2

<211> 4528

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse MAB2, promoter-LC-IRES-HC-WPRE

<400> 2

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgac atcgtgatga cccagagcca caagttcatg agcaccagcg tgggcgacag 900

agtgtccatc acatgcaagg ccagccagga cgtgaacaca gccgtggctt ggtatcagca 960

gaagcccggc cattctccta agctgctgat ctacagcgcc agcttcagat acaccggcgt 1020

gcccgataga ttcaccggca acagaagcgg caccgacttc accttcacca tcagctctgt 1080

gcaggccgag gatctggccg tgtactactg tcagcagcac tacaccacac ctccaacctt 1140

cggcggaggc accaaggtgg aaatcaagag agctgacgcc gctcctaccg tgtctatctt 1200

cccacctagc agcgagcagc tgacatctgg cggagcctct gtcgtgtgct tcctgaacaa 1260

cttctacccc aaggacatca acgtgaagtg gaagatcgac ggcagcgaga gacagaacgg 1320

cgtgctgaac tcttggaccg accaggacag caaggactcc acctacagca tgagcagcac 1380

cctgacactg accaaggacg agtacgagag acacaacagc tacacatgcg aggctaccca 1440

caagaccagc acaagcccca tcgtgaagtc cttcaacaga aacgagtgct gaacccagct 1500

ttcttgtaca aagtgggccc ctctccctcc ccccccccta acgttactgg ccgaagccgc 1560

ttggaataag gccggtgtgc gtttgtctat atgttatttt ccaccatatt gccgtctttt 1620

ggcaatgtga gggcccggaa acctggccct gtcttcttga cgagcattcc taggggtctt 1680

tcccctctcg ccaaaggaat gcaaggtctg ttgaatgtcg tgaaggaagc agttcctctg 1740

gaagcttctt gaagacaaac aacgtctgta gcgacccttt gcaggcagcg gaaccccca 1800

cctggcgaca ggtgcctctg cggccaaaag ccacgtgtat aagatacacc tgcaaaggcg 1860

gcacaacccc agtgccacgt tgtgagttgg atagttgtgg aaagagtcaa atggctctcc 1920

tcaagcgtat tcaacaaggg gctgaaggat gcccagaagg taccccattg tatgggatct 1980

gatctggggc ctcggtgcac atgctttaca tgtgtttagt cgaggttaaa aaaacgtcta 2040

ggcccccga accacgggga cgtggttttc ctttgaaaaa cacgatgata tatggccac 2100

aaccatggag acagatacac tgctgctgtg ggtgctgctc ctctgggtgc caggatctac 2160

aggccaggtt cagctgcagc agtctggacc tgagctggtt aagcctggcg cctctctgaa 2220

gctgagctgt accgcttccg gcttcaacat caaggacacc tacatccact gggtcaagca 2280

gaggcctgag cagggactcg agtggatcgg cagaatctac cccaccaacg gctacaccag 2340

atacgacccc aagttccagg acaaggccac catcacagcc gacaccagca gcaacacagc 2400

ctatctccag gtgtccaggc tgaccagcga ggacacagcc gtgtactact gctctagatg 2460

gggaggcgac ggcttctacg ccatggatta ttggggacag ggcgccagcg tgacagtgtc 2520
tagtgccaag acaacagccc ctagcgtgta ccctctggct cctgtgtgtg gcgacacaac 2580
aggcagctct gtgacactgg gctgtctggt caagggctac ttccccgaac cagtgacact 2640
gacctggaac agcggctctc tgtctagcgg cgtgcacaca tttccagccg tgctgcagag 2700
cgacctgtac acactgtcct ctagcgtgac cgtgaccagc tctacatggc ccagccagag 2760
catcacctgt aacgtggccc atcctgccag cagcaccaag gtggacaaga agatcgagcc 2820
tagaggccct accatcaagc cctgtcctcc atgcaagtgc cccgctccta atctgctcgg 2880

aggcccaagc gtgttcatct tcccacctaa gatcaaggac gtgctgatga tctctctgag 2940
ccccatcgtg acctgcgtgg tggtggatgt gtctgaggac gaccctgacg tgcagatcag 3000
ttggttcgtg aacaacgtgg aagtgcacac agcccagaca cagacccaca gagaggacta 3060
caacagcacc ctgagagtgg tgtctgccct gcctatccag caccaggatt ggatgagcgg 3120
caaagaattc aagtgcaaag tgaacaacaa ggacctgcct gctcctatcg agagaaccat 3180
cagcaagccc aagggctctg tcagggctcc tcaggtgtac gttctgccac ctcctgagga 3240
agagatgacc aagaaacaag tgaccctcac ctgtatggtc accgacttca tgcccgagga 3300

catctacgtg gaatggacca acaacggcaa gaccgagctg aactacaaga acaccgagcc 3360
tgtgctggac agcgacggca gctacttcat gtacagcaag ctgcgcgtcg agaagaagaa 3420
ctgggtcgag agaaacagct acagctgctc cgtggtgcac gagggactgc acaaccacca 3480
caccaccaag agcttcagca gaacccctgg caagtgacaa ctttattata catagttgga 3540
attccgataa tcaacctctg gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact 3600
atgttgctcc ttttacgcta tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg 3660
cttcccgtat ggctttcatt ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg 3720

aggagttgtg gcccgttgtc aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa 3780
cccccactgg ttggggcatt gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc 3840
ccctccctat tgccacggcg gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg 3900
ctcggctgtt gggcactgac aattccgtgg tgttgtcggg gaagctgacg tcctttccat 3960
ggctgctcgc ctgtgttgcc acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt 4020
cggccctcaa tccagcggac cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc 4080
cgcgtcttcg ccttcgccct cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcatc 4140

gggaattcct agagctcgct gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt 4200

tgtttgcccc tcccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc 4260

ctaataaaat gaggaaattg catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg 4320

tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagag aatagcaggc atgctgggga 4380

gggccgcagg aacccctagt gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc 4440

actgaggccg ggcgaccaaa ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg 4500

agcgagcgag cgcgcagctg cctgcagg 4528

<210> 3

<211> 4153

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> mouse MAB2 - 2 promoters IgG, consisting of promoter 1 (CMV)-LC-polyA-promoter 2 (CMV)-HC-WPRE-poly A

<400> 3

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgac atcgtgatga cccagagcca caagttcatg agcaccagcg tgggcgacag 900

agtgtccatc acatgcaagg ccagccagga cgtgaacaca gccgtggctt ggtatcagca 960

gaagcccggc cattctccta agctgctgat ctacagcgcc agcttcagat acaccggcgt 1020

gcccgataga ttcaccggca acagaagcgg caccgacttc accttcacca tcagctctgt 1080

gcaggccgag gatctggccg tgtactactg tcagcagcac tacaccacac ctccaacctt 1140

cggcggaggc accaaggtgg aaatcaagag agctgacgcc gctcctaccg tgtctatctt 1200
cccacctagc agcgagcagc tgacatctgg cggagcctct gtcgtgtgct tcctgaacaa 1260
cttctacccc aaggacatca acgtgaagtg gaagatcgac ggcagcgaga gacagaacgg 1320
cgtgctgaac tcttggaccg accaggacag caaggactcc acctacagca tgagcagcac 1380
cctgacactg accaaggacg agtacgagag acacaacagc tacacatgcg aggctaccca 1440
caagaccagc acaagcccca tcgtgaagtc cttcaacaga aacgagtgct gacagacatg 1500
ataagataca ttgatgagtt tggacaaacc acaactagaa tgcagtgaaa aaaatgcttt 1560

atttgtgaaa tttgtgatgc tattgcttta tttgtaacca ttataagctg caataaacaa 1620
gttaacaaca acaattgcat tcattttatg tttcaggttc agggggaggt gtgggaggtt 1680
ttttaaagca agtaaaacct ctacaaatgt ggtatagtta ttaatagtaa tcaattacgg 1740
ggtcattagt tcatagccca tatatggagt tccgcgttac ataacttacg gtaaatggcc 1800
cgcctggctg accgcccaac gacccccgcc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 1860
tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaactg 1920
cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gccccctatt gacgtcaatg 1980

acggtaaatg gcccgcctgg cattatgccc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 2040
ggcagtacat ctacgtatta gtcatcgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 2100
tcaatgggcg tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 2160
tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 2220
ccgccccatt gacgcaaatg ggcggtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 2280
ctggtttagt gaaccgtcag atcacccagc tttcttgtac aaagtgggcc accatggaga 2340
cagatacact gctgctgtgg gtgctgctcc tctgggtgcc aggatctaca ggccaggttc 2400

agctgcagca gtctggacct gagctggtta agcctggcgc ctctctgaag ctgagctgta 2460
ccgcttccgg cttcaacatc aaggacacct acatccactg ggtcaagcag aggcctgagc 2520
agggactcga gtggatcggc agaatctacc ccaccaacgg ctacaccaga tacgacccca 2580
agttccagga caaggccacc atcacagccg acaccagcag caacacagcc tatctccagg 2640
tgtccaggct gaccagcgag gacacagccg tgtactactg ctctagatgg ggaggcgacg 2700
gcttctacgc catggattat tggggacagg gcgccagcgt gacagtgtct agtgccaaga 2760
caacagcccc tagcgtgtac cctctggctc ctgtgtgtgg cgacacaaca ggcagctctg 2820

tgacactggg ctgtctggtc aagggctact tccccgaacc agtgacactg acctggaaca 2880

gcggctctct gtctagcggc gtgcacacat ttccagccgt gctgcagagc gacctgtaca 2940

cactgtcctc tagcgtgacc gtgaccagct ctacatggcc cagccagagc atcacctgta 3000

acgtggccca tcctgccagc agcaccaagg tggacaagaa gatcgagcct agaggcccta 3060

ccatcaagcc ctgtcctcca tgcaagtgcc ccgctcctaa tctgctcgga ggcccaagcg 3120

tgttcatctt cccacctaag atcaaggacg tgctgatgat ctctctgagc cccatcgtga 3180

cctgcgtggt ggtggatgtg tctgaggacg accctgacgt gcagatcagt tggttcgtga 3240

acaacgtgga agtgcacaca gcccagacac agacccacag agaggactac aacagcaccc 3300

tgagagtggt gtctgccctg cctatccagc accaggattg gatgagcggc aaagaattca 3360

agtgcaaagt gaacaacaag gacctgcctg ctcctatcga gagaaccatc agcaagccca 3420

agggctctgt cagggctcct caggtgtacg ttctgccacc tcctgaggaa gagatgacca 3480

agaaacaagt gaccctcacc tgtatggtca ccgacttcat gcccgaggac atctacgtgg 3540

aatggaccaa caacggcaag accgagctga actacaagaa caccgagcct gtgctggaca 3600

gcgacggcag ctacttcatg tacagcaagc tgcgcgtcga gaagaagaac tgggtcgaga 3660

gaaacagcta cagctgctcc gtggtgcacg agggactgca caaccaccac accaccaaga 3720

gcttcagcag aacccctggc aagtgacaac tttattatac atagttggaa ttcctagagc 3780

tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc 3840

cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga 3900

aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga 3960

cagcaagggg gaggattggg aagagaatag caggcatgct ggggagggcc gcaggaaccc 4020

ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga 4080

ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 4140

agctgcctgc agg 4153

<210> 4

<211> 4483

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Mouse MAB1, promoter-LC-IRES shorter-HC-WPRE

<400> 4

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240
tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300
gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360
tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420
tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480
ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540
gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660
atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720
ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780
tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840
tacaggcgac gtggtcatga cacagacccc tctgacactg agcgtgacca tcggacagcc 900
tgccagcatc agctgcaaga gcagtcagag cctgctgcac agcgacggca agacctacct 960
gaactggctg ctgcaaagac ccggccagtc tcctaagagg ctgatctacc tggtgtccaa 1020

gctggacagc agaatccccg acagattcac aggcagcggc tctggcacag acttcaccct 1080
gaagatcagc agagtggaag ccgaggacct gggcgtgtac tactgttggc agggcacaca 1140
cttccctcac acattcggcg ctggcacaaa gctggaactg aagagagctg acgccgctcc 1200
taccgtgtct atcttcccac ctagcagcga gcagctgaca tctggcggag cctctgtcgt 1260
gtgcttcctg aacaacttct accccaagga catcaacgtg aagtggaaga tcgacggcag 1320
cgagagacag aacggcgtgc tgaactcttg gaccgaccag gacagcaagg actccaccta 1380
cagcatgagc agcaccctga cactgaccaa ggacgagtac gagagacaca acagctacac 1440

atgcgaggct acccacaaga ccagcacaag ccccatcgtg aagtccttca acagaaacga 1500
gtgctgagcc cctctccctc ccccccccct aacgttactg gccgaagccg cttggaataa 1560
ggccggtgtg cgtttgtcta tatgttattt tccaccatat tgccgtcttt tggcaatgtg 1620
agggcccgga aacctggccc tgtcttcttg acgagcattc ctaggggtct ttcccctctc 1680
gccaaaggaa tgcaaggtct gttgaatgtc gtgaaggaag cagttcctct ggaagcttct 1740
tgaagacaaa caacgtctgt agcgaccctt tgcaggcagc ggaacccccc acctggcgac 1800
aggtgcctct gcggccaaaa gccacgtgta taagatacac ctgcaaaggc ggcacaaccc 1860

cagtgccacg ttgtgagttg gatagttgtg gaaagagtca aatggctctc ctcaagcgta 1920

ttcaacaagg ggctgaagga tgcccagaag gtaccccatt gtatgggatc tgatctgggg 1980

cctcggtgca catgctttac atgtgtttag tcgaggttaa aaaaacgtct aggccccccg 2040

aaccacgggg acgtggtttt cctttgaaaa acacgatgat aatatggaga cagatacact 2100

gctgctgtgg gtgctgctcc tctgggtgcc aggatctaca ggcgaggttc agctgcagca 2160

gtctggacct gagctggtta agcctggcgc ctccgtgaag atcagctgca agacaagcgg 2220

cttcaccttc accgagtaca gcatgcactg ggtcaagcag agccacggca agagcctgga 2280

atggatcggc ggcatcaacc ctaacaacgg cggcaccagc tacaaccaga agttcaaggg 2340

caaagccaca ctgaccgtgg acaagagcag cagcaccgcc tacatggaac tgagaagcct 2400

gaccagcgag gacagcgccg tgtactactg tgccagagag tcttggggcc agggcacaac 2460

cctgacagtc tcttctgcca agacaacagc ccctagcgtg taccctctgg ctcctgtgtg 2520

tggcgacaca acaggcagct ctgtgacact gggctgtctg gtcaagggct acttccccga 2580

accagtgaca ctgacctgga acagcggctc tctgtctagc ggcgtgcaca catttccagc 2640

cgtgctgcag agcgacctgt acacactgtc ctctagcgtg accgtgacca gctctacatg 2700

gcccagccag agcatcacct gtaacgtggc ccatcctgcc agcagcacca aggtggacaa 2760

gaagatcgag cctagaggcc ctaccatcaa gccctgtcct ccatgcaagt gccccgctcc 2820

taatctgctc ggaggcccaa gcgtgttcat cttcccacct aagatcaagg acgtgctgat 2880

gatctctctg agccccatcg tgacctgcgt ggtggtggat gtgtctgagg acgaccctga 2940

cgtgcagatc agttggttcg tgaacaacgt ggaagtgcac acagcccaga cacagaccca 3000

cagagaggac tacaacagca ccctgagagt ggtgtctgcc ctgcctatcc agcaccagga 3060

ttggatgagc ggcaaagaat tcaagtgcaa agtgaacaac aaggacctgc ctgctcctat 3120

cgagagaacc atcagcaagc ccaagggctc tgtcagggct cctcaggtgt acgttctgcc 3180

acctcctgag gaagagatga ccaagaaaca agtgaccctc acctgtatgg tcaccgactt 3240

catgcccgag gacatctacg tggaatggac caacaacggc aagaccgagc tgaactacaa 3300

gaacaccgag cctgtgctgg acagcgacgg cagctacttc atgtacagca agctgcgcgt 3360

cgagaagaag aactgggtcg agagaaacag ctacagctgc tccgtggtgc acgagggact 3420

gcacaaccac cacaccacca agagcttcag cagaacccct ggcaagtgaa cccagctttc 3480

ttgtacaaag tgggaattcc gataatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga 3540

ctggtattct taactatgtt gctcctttta cgctatgtgg atacgctgct ttaatgcctt 3600

tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt 3660

tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcactg 3720

tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctcctttccg 3780

ggactttcgc tttccccctc cctattgcca cggcggaact catcgccgcc tgccttgccc 3840

gctgctggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaagc 3900

tgacgtcctt tccatggctg ctcgcctgtg ttgccacctg gattctgcgc gggacgtcct 3960

tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccttcc ttcccgcggc ctgctgccgg 4020

ctctgcggcc tcttccgcgt cttcgccttc gccctcagac gagtcggatc tccctttggg 4080

ccgcctcccc gcatcgggaa ttcctagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 4140

ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc ttgaccctgg aaggtgccac 4200

tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 4260

ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagagaatag 4320

caggcatgct ggggagggcc gcaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg 4380

cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc 4440

cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc agg 4483

<210> 5

<211> 4516

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB1 promoter-LC-IRES-HC-WPRE-PolyA

<400> 5

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgac gtggtcatga cacagacccc tctgacactg tccgtgacca tcggacagcc 900

tgcctccatc tcctgcaagt cctctcagtc cctgctgcac tctgacggca agacctacct 960

gaactggctg ctgcagaggc ctggccagag tcctaagaga ctgatctacc tggtgtccaa 1020

gctggactct cggatccctg acagattcac cggctctggc tctggcaccg acttcaccct 1080

gaagatctcc agagtggaag ccgaggacct gggcgtgtac tactgttggc agggcaccca 1140

ctttccacac acctttggcg ctggcacaaa gctggaactg aagcggacag tggccgctcc 1200

ttccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag tccggcacag cttctgtcgt 1260

gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc 1320

cctgcagtcc ggcaactccc aagagtctgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta 1380

cagcctgtcc tccacactga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc 1440

ctgcgaagtg acccatcagg gcctgtctag ccctgtgacc aagtctttca accggggcga 1500

gtgttgaacc cagctttctt gtacaaagtg ggcccctctc cctcccccccc ccctaacgtt 1560

actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc 1620

atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc 1680

attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag 1740

gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg 1800

cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat 1860

acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga 1920

gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc 1980

cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg 2040

ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga 2100

tgataatatg gccacaacca tggagacaga tacactgctg ctgtgggtgc tgctcctctg 2160

ggtgccagga tctacaggcg aggttcagct gcagcagtct ggacctgagc tggttaagcc 2220

tggcgcctcc gtgaagatct cctgcaagac ctctggcttc accttcaccg agtactccat 2280

gcactgggtc aagcagtccc acggcaagtc cctggaatgg atcggcggca tcaaccctaa 2340

caacggcggc acctcctaca accagaagtt caagggcaaa gctaccctga ccgtggacaa 2400

gtcctcctcc accgcctaca tggaactgcg gtccctgacc tctgaggact ccgccgtgta 2460

ctactgcgct agagagtctt ggggccaggg caccacactg acagtctctt ctgcttctac 2520

caagggaccc agcgtgttcc ctctggctcc ttccagcaag tctacctctg gcggaacagc 2580

tgctctgggc tgcctggtca aggactactt tcctgagcct gtgaccgtgt cttggaactc 2640

tggcgctctg acatccggcg tgcacacctt tccagctgtg ctgcaatcca gcggcctgta 2700

ctctctgtcc tccgtcgtga ccgtgccttc tagctctctg ggcacacaga cctacatctg 2760

caatgtgaac cacaagcctt ccaacaccaa ggtggacaag aaggtggaac ccaagtcctg 2820

cgacaagacc cacacctgtc ctccatgtcc tgctccagaa ctgctcggcg gaccttccgt 2880

gttcctgttt cctccaaagc ctaaggacac cctgatgatc tctcggaccc ctgaagtgac 2940

ctgcgtggtg gtggatgtgt ctcacgagga tcccgaagtg aagttcaatt ggtacgtgga 3000

cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag gaacagtaca actccaccta 3060

cagagtggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg ctgaacggca aagagtacaa 3120

gtgcaaggtg tccaacaagg ccctgcctgc tcctatcgaa aagaccatct ccaaggccaa 3180

gggccagcct agggaacccc aggtttacac cttgcctcca tctcgggaag agatgaccaa 3240

gaaccaggtg tccctgacct gtctcgtgaa gggcttctac ccctccgata tcgccgtgga 3300

atgggagtct aatggccagc ctgagaacaa ctacaagaca acccctcctg tgctggactc 3360

cgacggctca ttcttcctgt actccaagct gacagtggac aagtccagat ggcagcaggg 3420

caacgtgttc tcctgctccg tgatgcacga ggccctgcac aatcactaca cccagaagtc 3480

cctgtctctg agccccggca agtagcaact ttattataca tagttggaat tccgataatc 3540

aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat tgactggtat tcttaactat gttgctcctt 3600

ttacgctatg tggatacgct gctttaatgc ctttgtatca tgctattgct tcccgtatgg 3660

ctttcatttt ctcctccttg tataaatcct ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc 3720

ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt 3780

ggggcattgc caccacctgt cagctccttt ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg 3840

ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg cccgctgctg gacaggggct cggctgttgg 3900

gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga agctgacgtc ctttccatgg ctgctcgcct 3960

gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgt ccttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc 4020

cagcggacct tccttcccgc ggcctgctgc cggctctgcg gcctcttccg cgtcttcgcc 4080

ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt gggccgcctc cccgcatcgg gaattcctag 4140

agctcgctga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc 4200

ccccgtgcct tccttgaccc tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga 4260

ggaaattgca tcgcattgtc tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca 4320

ggacagcaag ggggaggatt gggaagagaa tagcaggcat gctggggagg gccgcaggaa 4380

ccctagtga tggagttggc cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccggg 4440

cgaccaaagg tcgcccgacg cccgggcttt gcccgggcgg cctcagtgag cgagcgagcg 4500

cgcagctgcc tgcagg 4516

<210> 6

<211> 4141

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB1 - 2 promoters IgG, consisting of promoter 1 (CMV)-LC-polyA-promoter 2 (CMV)-HC-WPRE-poly A

<400> 6

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgac gtggtcatga cacagacccc tctgacactg tccgtgacca tcggacagcc 900

tgcctccatc tcctgcaagt cctctcagtc cctgctgcac tctgacggca agacctacct 960

gaactggctg ctgcagaggc ctggccagag tcctaagaga ctgatctacc tggtgtccaa 1020

gctggactct cggatccctg acagattcac cggctctggc tctggcaccg acttcaccct 1080

gaagatctcc agagtggaag ccgaggacct gggcgtgtac tactgttggc agggcaccca 1140

ctttccacac acctttggcg ctggcacaaa gctggaactg aagcggacag tggccgctcc 1200

ttccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag tccggcacag cttctgtcgt 1260

gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc 1320

cctgcagtcc ggcaactccc aagagtctgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta 1380

cagcctgtcc tccacactga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc 1440

ctgcgaagtg acccatcagg gcctgtctag ccctgtgacc aagtctttca accggggcga 1500

gtgttgacag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 1560

tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 1620

agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg 1680

gaggtgtggg aggtttttta aagcaagtaa aacctctaca aatgtggtat agttattaat 1740

agtaatcaat tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac 1800

ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa 1860

tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt 1920

atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc 1980

ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat 2040

gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtgatgc 2100

ggttttggca gtacatcaat gggcgtggat agcggtttga ctcacgggga tttccaagtc 2160

tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt tttggcacca aaatcaacgg gactttccaa 2220

aatgtcgtaa caactccgcc ccattgacgc aaatgggcgg taggcgtgta cggtgggagg 2280

tctatataag cagagctggt ttagtgaacc gtcagatcac ccagctttct tgtacaaagt 2340

gggccaccat ggagacagat acactgctgc tgtgggtgct gctcctctgg gtgccaggat 2400

ctacaggcga ggttcagctg cagcagtctg gacctgagct ggttaagcct ggcgcctccg 2460

tgaagatctc ctgcaagacc tctggcttca ccttcaccga gtactccatg cactgggtca 2520

agcagtccca cggcaagtcc ctggaatgga tcggcggcat caaccctaac aacggcggca 2580

cctcctacaa ccagaagttc aagggcaaag ctaccctgac cgtggacaag tcctcctcca 2640

ccgcctacat ggaactgcgg tccctgacct ctgaggactc cgccgtgtac tactgcgcta 2700

gagagtcttg gggccagggc accacactga cagtctcttc tgcttctacc aagggaccca 2760

gcgtgttccc tctggctcct tccagcaagt ctacctctgg cggaacagct gctctgggct 2820

gcctggtcaa ggactacttt cctgagcctg tgaccgtgtc ttggaactct ggcgctctga 2880

catccggcgt gcacaccttt ccagctgtgc tgcaatccag cggcctgtac tctctgtcct 2940

ccgtcgtgac cgtgccttct agctctctgg gcacacagac ctacatctgc aatgtgaacc 3000

acaagccttc caacaccaag gtggacaaga aggtggaacc caagtcctgc gacaagaccc 3060

acacctgtcc tccatgtcct gctccagaac tgctcggcgg accttccgtg ttcctgtttc 3120
ctccaaagcc taaggacacc ctgatgatct ctcggacccc tgaagtgacc tgcgtggtgg 3180
tggatgtgtc tcacgaggat cccgaagtga agttcaattg gtacgtggac ggcgtggaag 3240
tgcacaacgc caagaccaag cctagagagg aacagtacaa ctccacctac agagtggtgt 3300
ccgtgctgac cgtgctgcac caggattggc tgaacggcaa agagtacaag tgcaaggtgt 3360
ccaacaaggc cctgcctgct cctatcgaaa agaccatctc caaggccaag ggccagccta 3420
gggaacccca ggtttacacc ttgcctccat ctcgggaaga gatgaccaag aaccaggtgt 3480

ccctgacctg tctcgtgaag ggcttctacc cctccgatat cgccgtggaa tgggagtcta 3540
atggccagcc tgagaacaac tacaagacaa cccctcctgt gctggactcc gacggctcat 3600
tcttcctgta ctccaagctg acagtggaca agtccagatg gcagcagggc aacgtgttct 3660
cctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca atcactacac ccagaagtcc ctgtctctga 3720
gccccggcaa gtagcaactt tattatacat agttggaatt cctagagctc gctgatcagc 3780
ctcgactgtg ccttctagtt gccagccatc tgttgtttgc ccctcccccg tgccttcctt 3840
gaccctggaa ggtgccactc ccactgtcct ttcctaataa aatgaggaaa ttgcatcgca 3900

ttgtctgagt aggtgtcatt ctattctggg gggtggggtg gggcaggaca gcaaggggga 3960
ggattgggaa gagaatagca ggcatgctgg ggagggccgc aggaacccct agtgatggag 4020
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 4080
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag ctgcctgcag 4140
g 4141

<210> 7
<211> 3274
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> MAB1, promoter-scFv-Fc-WPRE
<400> 7

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
actccatcac tagggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180
gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240
tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgag gttcagctgc agcagtctgg acctgagctg gttaagcctg gcgcctccgt 900

gaagatctcc tgcaagacct ctggcttcac cttcaccgag tactccatgc actgggtcaa 960

gcagtcccac ggcaagtccc tggaatggat cggcggcatc aaccctaaca acggcggcac 1020

ctcctacaac cagaagttca agggcaaagc taccctgacc gtggacaagt cctcctccac 1080

cgcctacatg gaactgcggt ccctgacctc tgaggactcc gccgtgtact actgcgctag 1140

agagtcttgg ggccagggca ccacactgac agtctcttct ggaggcggag gatctggcgg 1200

aggtggaagt ggcggaggcg gatctgacgt ggtcatgaca cagacccctc tgacactgtc 1260

cgtgaccatc ggacagcctg cctccatctc ctgcaagtcc tctcagtccc tgctgcactc 1320

tgacggcaag acctacctga actggctgct gcagaggcct ggccagagtc ctaagagact 1380

gatctacctg gtgtccaagc tggactctcg gatccctgac agattcaccg gctctggctc 1440

tggcaccgac ttcaccctga agatctccag agtggaagcc gaggacctgg gcgtgtacta 1500

ctgttggcag ggcacccact ttccacacac ctttggcgct ggcacaaagc tggaactgaa 1560

gggaggcgga ggatctgaca agacccacac ctgtcctcca tgtcctgctc cagaactgct 1620

cggcggacct tccgtgttcc tgtttcctcc aaagcctaag gacaccctga tgatctctcg 1680

gacccctgaa gtgacctgcg tggtggtgga tgtgtctcac gaggatcccg aagtgaagtt 1740

caattggtac gtggacggcg tggaagtgca caacgccaag accaagccta gagaggaaca 1800

gtacaactcc acctacagag tggtgtccgt gctgaccgtg ctgcaccagg attggctgaa 1860

cggcaaagag tacaagtgca aggtgtccaa caaggccctg cctgctccta tcgaaaagac 1920

catctccaag gccaagggcc agcctaggga accccaggtt tacaccttgc ctccatctcg 1980

ggaagagatg accaagaacc aggtgtccct gacctgtctc gtgaagggct tctacccctc 2040

cgatatcgcc gtggaatggg agtctaatgg ccagcctgag aacaactaca agacaacccc 2100

tcctgtgctg gactccgacg gctcattctt cctgtactcc aagctgacag tggacaagtc 2160

cagatggcag cagggcaacg tgttctcctg ctccgtgatg cacgaggccc tgcacaatca 2220
ctacacccag aagtccctgt ctctgagccc cggcaagtag acccagcttt cttgtacaaa 2280
gtgggaattc cgataatcaa cctctggatt acaaaatttg tgaaagattg actggtattc 2340
ttaactatgt tgctcctttt acgctatgtg gatacgctgc tttaatgcct ttgtatcatg 2400
ctattgcttc ccgtatggct ttcattttct cctccttgta taaatcctgg ttgctgtctc 2460
tttatgagga gttgtggccc gttgtcaggc aacgtggcgt ggtgtgcact gtgtttgctg 2520
acgcaacccc cactggttgg ggcattgcca ccacctgtca gctcctttcc gggactttcg 2580

ctttcccct ccctattgcc acggcggaac tcatcgccgc ctgccttgcc cgctgctgga 2640
caggggctcg gctgttgggc actgacaatt ccgtggtgtt gtcggggaag ctgacgtcct 2700
ttccatggct gctcgcctgt gttgccacct ggattctgcg cgggacgtcc ttctgctacg 2760
tcccttcggc cctcaatcca gcggaccttc cttcccgcgg cctgctgccg gctctgcggc 2820
ctcttccgcg tcttcgcctt cgccctcaga cgagtcggat ctccctttgg gccgcctccc 2880
cgcatcggga attcctagag ctcgctgatc agcctcgact gtgccttcta gttgccagcc 2940
atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgaccctg gaaggtgcca ctcccactgt 3000

cctttcctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc attctattct 3060
ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagagaata gcaggcatgc 3120
tggggagggc cgcaggaacc cctagtgatg gagttggcca ctccctctct gcgcgctcgc 3180
tcgctcactg aggccgggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc 3240
tcagtgagcg agcgagcgcg cagctgcctg cagg 3274

<210> 8
<211> 576
<212> DNA
<213> Encephalomyocarditis virus
<400> 8

gcccctctcc ctccccccc cctaacgtta ctggccgaag ccgcttggaa taaggccggt 60

gtgcgtttgt ctatatgtta ttttccacca tattgccgtc ttttggcaat gtgagggccc 120
ggaaacctgg ccctgtcttc ttgacgagca ttcctagggg tctttccct ctcgccaaag 180
gaatgcaagg tctgttgaat gtcgtgaagg aagcagttcc tctggaagct tcttgaagac 240
aaacaacgtc tgtagcgacc ctttgcaggc agcggaaccc cccacctggc gacaggtgcc 300
tctgcggcca aaagccacgt gtataagata cacctgcaaa ggcggcacaa ccccagtgcc 360

acgttgtgag ttggatagtt gtggaaagag tcaaatggct ctcctcaagc gtattcaaca 420

aggggctgaa ggatgcccag aaggtacccc attgtatggg atctgatctg gggcctcggt 480

gcacatgctt tacatgtgtt tagtcgaggt taaaaaaacg tctaggcccc ccgaaccacg 540

gggacgtggt tttcctttga aaaacacgat gataat 576

<210> 9

<211> 3859

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB1 FAB promoter-LC-IRES-HC-WPRE-PolyA

<400> 9

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120

actccatcac taggggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180

gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240

tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360

tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420

tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480

ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540

gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgac gtggtcatga cacagacccc tctgacactg tccgtgacca tcggacagcc 900

tgcctccatc tcctgcaagt cctctcagtc cctgctgcac tctgacggca agacctacct 960

gaactggctg ctgcagaggc ctggccagag tcctaagaga ctgatctacc tggtgtccaa 1020

gctggactct cggatccctg acagattcac cggctctggc tctggcaccg acttcaccct 1080

gaagatctcc agagtggaag ccgaggacct gggcgtgtac tactgttggc agggcaccca 1140

ctttccacac acctttggcg ctggcacaaa gctggaactg aagcggacag tggccgctcc 1200

ttccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag tccggcacag cttctgtcgt 1260

gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg cagtggaagg tggacaatgc 1320

cctgcagtcc ggcaactccc aagagtctgt gaccgagcag gactccaagg acagcaccta 1380

cagcctgtcc tccacactga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca aggtgtacgc 1440

ctgcgaagtg acccatcagg gcctgtctag ccctgtgacc aagtctttca accggggcga 1500

gtgttgaacc cagctttctt gtacaaagtg ggcccctctc cctccccccc ccctaacgtt 1560

actggccgaa gccgcttgga ataaggccgg tgtgcgtttg tctatatgtt attttccacc 1620

atattgccgt cttttggcaa tgtgagggcc cggaaacctg gccctgtctt cttgacgagc 1680

attcctaggg gtctttcccc tctcgccaaa ggaatgcaag gtctgttgaa tgtcgtgaag 1740

gaagcagttc ctctggaagc ttcttgaaga caaacaacgt ctgtagcgac cctttgcagg 1800

cagcggaacc ccccacctgg cgacaggtgc ctctgcggcc aaaagccacg tgtataagat 1860

acacctgcaa aggcggcaca accccagtgc cacgttgtga gttggatagt tgtggaaaga 1920

gtcaaatggc tctcctcaag cgtattcaac aaggggctga aggatgccca gaaggtaccc 1980

cattgtatgg gatctgatct ggggcctcgg tgcacatgct ttacatgtgt ttagtcgagg 2040

ttaaaaaaac gtctaggccc cccgaaccac ggggacgtgg ttttcctttg aaaaacacga 2100

tgataatatg gccacaacca tggagacaga tacactgctg ctgtgggtgc tgctcctctg 2160

ggtgccagga tctacaggcg aggttcagct gcagcagtct ggacctgagc tggttaagcc 2220

tggcgcctcc gtgaagatct cctgcaagac ctctggcttc accttcaccg agtactccat 2280

gcactgggtc aagcagtccc acggcaagtc cctggaatgg atcggcggca tcaaccctaa 2340

caacggcggc acctcctaca accagaagtt caagggcaaa gctaccctga ccgtggacaa 2400

gtcctcctcc accgcctaca tggaactgcg gtccctgacc tctgaggact ccgccgtgta 2460

ctactgcgct agagagtctt ggggccaggg caccacactg acagtctctt ctgcttctac 2520

caagggaccc agcgtgttcc ctctggctcc ttccagcaag tctacctctg gcggaacagc 2580

tgctctgggc tgcctggtca aggactactt tcctgagcct gtgaccgtgt cttggaactc 2640

tggcgctctg acatccggcg tgcacacctt tccagctgtg ctgcaatcca gcggcctgta 2700

ctctctgtcc tccgtcgtga ccgtgccttc tagctctctg ggcacacaga cctacatctg 2760

caatgtgaac cacaagcctt ccaacaccaa ggtggacaag aaggtggaac ccaagtcctg 2820

cggctcccac caccatcacc atcattagca actttattat acatagttgg aattccgata 2880

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 2940

cttttacgct atgtggatac gctgctttaa tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgta 3000

tggctttcat tttctcctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagttgt 3060

ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtggtgt gcactgtgtt tgctgacgca acccccactg 3120

gttggggcat tgccaccacc tgtcagctcc tttccgggac tttcgctttc cccctcccta 3180
ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggctgt 3240
tgggcactga caattccgtg gtgttgtcgg ggaagctgac gtcctttcca tggctgctcg 3300
cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca 3360
atccagcgga ccttccttcc cgcggcctgc tgccggctct gcggcctctt ccgcgtcttc 3420
gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc tttgggccgc ctccccgcat cgggaattcc 3480
tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc 3540

ctcccccgtg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa 3600
tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg 3660
gcaggacagc aagggggagg attgggaaga gaatagcagg catgctgggg agggccgcag 3720
gaacccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct cactgaggcc 3780
gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga 3840
gcgcgcagct gcctgcagg 3859

<210> 10
<211> 4088
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> MAB1 Fab - 2 promoters IgG, consisting of promoter 1 (CMV)-HC-polyA-promoter 2 (CMV)-LC-WPRE-poly A

<400> 10

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60
gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca 120
actccatcac tagggttcc ttctagacaa ctttgtatag aaaagttgta gttattaata 180
gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg ttacataact 240
tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga cgtcaataat 300

gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat gggtggagta 360
tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa gtacgccccc 420
tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca tgaccttatg 480
ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca tggtgatgcg 540
gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat ttccaagtct 600

ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg actttccaaa 660

atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac ggtgggaggt 720

ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatccaa gtttgtacaa aaaagcaggc 780

tgccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg tgccaggatc 840

tacaggcgag gttcagctgc agcagtctgg acctgagctg gttaagcctg gcgcctccgt 900

gaagatctcc tgcaagacct ctggcttcac cttcaccgag tactccatgc actgggtcaa 960

gcagtcccac ggcaagtccc tggaatggat cggcggcatc aaccctaaca acggcggcac 1020

ctcctacaac cagaagttca agggcaaagc taccctgacc gtggacaagt cctcctccac 1080

cgcctacatg gaactgcggt ccctgacctc tgaggactcc gccgtgtact actgcgctag 1140

agagtcttgg ggccagggca ccacactgac agtctcttct gcttctacca agggacccag 1200

cgtgttccct ctggctcctt ccagcaagtc tacctctggc ggaacagctg ctctgggctg 1260

cctggtcaag gactactttc ctgagcctgt gaccgtgtct tggaactctg gcgctctgac 1320

atccggcgtg cacacctttc cagctgtgct gcaatccagc ggcctgtact ctctgtcctc 1380

cgtcgtgacc gtgccttcta gctctctggg cacacagacc tacatctgca atgtgaacca 1440

caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggaaccc aagtcctgcg gctcccacca 1500

ccatcaccat cattagcaga catgataaga tacattgatg agtttggaca aaccacaact 1560

agaatgcagt gaaaaaaatg ctttatttgt gaaatttgtg atgctattgc tttatttgta 1620

accattataa gctgcaataa acaagttaac aacaacaatt gcattcattt tatgtttcag 1680

gttcaggggg aggtgtggga ggtttttttaa agcaagtaaa acctctacaa atgtggtata 1740

gttattaata gtaatcaatt acggggtcat tagttcatag cccatatatg gagttccgcg 1800

ttacataact tacggtaaat ggcccgcctg gctgaccgcc caacgacccc cgcccattga 1860

cgtcaataat gacgtatgtt cccatagtaa cgccaatagg gactttccat tgacgtcaat 1920

gggtggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat catatgccaa 1980

gtacgccccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattat gcccagtaca 2040

tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcatc gctattacca 2100

tggtgatgcg gttttggcag tacatcaatg ggcgtggata gcggtttgac tcacggggat 2160

ttccaagtct ccaccccatt gacgtcaatg ggagtttgtt ttggcaccaa aatcaacggg 2220

actttccaaa atgtcgtaac aactccgccc cattgacgca aatgggcggt aggcgtgtac 2280

ggtgggaggt ctatataagc agagctggtt tagtgaaccg tcagatcacc cagctttctt 2340

gtacaaagtg ggccaccatg gagacagata cactgctgct gtgggtgctg ctcctctggg 2400

tgccaggatc tacaggcgac gtggtcatga cacagacccc tctgacactg tccgtgacca 2460
tcggacagcc tgcctccatc tcctgcaagt cctctcagtc cctgctgcac tctgacggca 2520
agacctacct gaactggctg ctgcagaggc ctggccagag tcctaagaga ctgatctacc 2580
tggtgtccaa gctggactct cggatccctg acagattcac cggctctggc tctggcaccg 2640
acttcaccct gaagatctcc agagtggaag ccgaggacct gggcgtgtac tactgttggc 2700
agggcaccca ctttccacac acctttggcg ctggcacaaa gctggaactg aagcggacag 2760
tggccgctcc ttccgtgttc atcttcccac cttccgacga gcagctgaag tccggcacag 2820

cttctgtcgt gtgcctgctg aacaacttct accctcggga agccaaggtg cagtggaagg 2880
tggacaatgc cctgcagtcc ggcaactccc aagagtctgt gaccgagcag gactccaagg 2940
acagcaccta cagcctgtcc tccacactga ccctgtccaa ggccgactac gagaagcaca 3000
aggtgtacgc ctgcgaagtg acccatcagg gcctgtctag ccctgtgacc aagtctttca 3060
accggggcga gtgttgacaa ctttattata catagttgga attccgataa tcaacctctg 3120
gattacaaaa tttgtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc ttttacgcta 3180
tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt 3240

ttctcctcct tgtataaatc ctggttgctg tctctttatg aggagttgtg gcccgttgtc 3300
aggcaacgtg gcgtggtgtg cactgtgttt gctgacgcaa cccccactgg ttggggcatt 3360
gccaccacct gtcagctcct ttccgggact ttcgctttcc ccctccctat tgccacggcg 3420
gaactcatcg ccgcctgcct tgcccgctgc tggacagggg ctcggctgtt gggcactgac 3480
aattccgtgg tgttgtcggg gaagctgacg tcctttccat ggctgctcgc ctgtgttgcc 3540
acctggattc tgcgcgggac gtccttctgc tacgtccctt cggccctcaa tccagcggac 3600
cttccttccc gcggcctgct gccggctctg cggcctcttc cgcgtcttcg ccttcgccct 3660

cagacgagtc ggatctccct ttgggccgcc tccccgcatc gggaattcct agagctcgct 3720
gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tcccccgtgc 3780
cttccttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 3840
catcgcattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 3900
agggggagga ttgggaagag aatagcaggc atgctgggga gggccgcagg aacccctagt 3960
gatggagttg gccactccct ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg ggcgaccaaa 4020
ggtcgcccga cgcccgggct ttgcccgggc ggcctcagtg agcgagcgag cgcgcagctg 4080

cctgcagg 4088

<210> 11

<211> 24

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Expected LC C-terminal sequence

<400> 11

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
1 5 10 15

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
20

<210> 12

<211> 64

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analyzed LC C-terminal sequence

<400> 12

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
1 5 10 15

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly
20 25 30

Ala Pro Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly
35 40 45

Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu
50 55 60

<210> 13

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Expected HC C-terminal sequence

<400> 13

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
1 5 10 15

Ser Pro Gly Lys

20

<210> 14

<211> 59

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Analyzed HC C-terminal sequence

<400> 14

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu

1 5 10 15

Ser Pro Gly Lys Arg Lys Arg Arg Ser Gly Ser Gly Ala Pro Val Lys

20 25 30

Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

35 40 45

Asn Pro Gly Pro Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu

50 55

<210> 15

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> BBB targeting peptide

<400> 15

Asn Arg Gly Thr Glu Trp Asp

1 5

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> core sequence motif of self-cleavage peptides is the 2A peptide family

<220><221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (4)..(4)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 16

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro

1 5