



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0154074
(43) 공개일자 2023년11월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C07K 16/22 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7034370
(22) 출원일자(국제) 2022년03월03일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년10월06일
(86) 국제출원번호 PCT/CN2022/079047
(87) 국제공개번호 WO 2022/188689
국제공개일자 2022년09월15일
(30) 우선권주장
202110252231.1 2021년03월08일 중국(CN)

(71) 출원인
난징 진스크립트 바이오테크 컴퍼니 리미티드
중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28
(72) 발명자
왕, 웨이밍
중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28
장, 시안
중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최우성, 김영철, 김 순 영

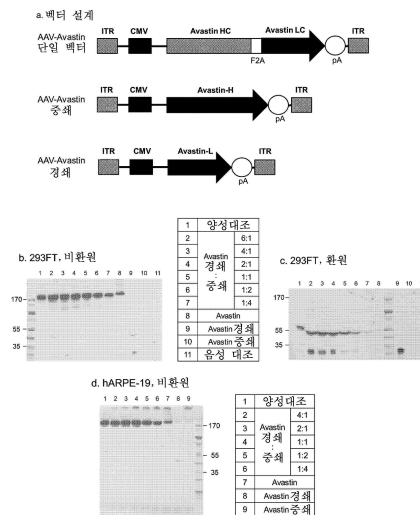
전체 청구항 수 : 총 40 항

(54) 발명의 명칭 이중 바이러스 벡터 시스템을 이용한 항체 전달

(57) 요약

세포에서 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 발현시키되, 제1 바이러스 벡터를 이용하여 제1 사슬을 발현시키고, 제2 바이러스 벡터를 이용하여 제2 사슬을 발현시키며, 제1 사슬 및 제2 사슬이 세포에서 발현된 후 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립될 수 있는 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 제공하고; 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 생산하기 위한 이중 플라스미드 시스템, 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 포함하는 숙주 세포, 약물 조성물 및 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 이용하여 대상체에게 상기 폴리펩티드 분자를 전달하는 용도 및 방법을 더 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 16/22 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/55 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

(72) 발명자

미, 엔링

중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28

리, 종다오

중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28

샤오, 추이잉

중국 211100 장쑤 난징 장닝 사이언스 파크 용시
로드 28

명세서

청구범위

청구항 1

세포에서 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 발현시키기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 있어서,

제1항에 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 발현 카세트를 포함하는 제1 재조합 바이러스 벡터, 및

제2항에 상기 폴리펩티드 분자의 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 발현 카세트를 포함하는 제2 재조합 바이러스 벡터를 포함하되,

상기 제1 사슬 및 상기 제2 사슬은 서로 다르고, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 세포에 도입된 후 각각 상기 제1 사슬 및 제2 사슬을 발현시킬 수 있으며, 상기 제1 사슬 및 제2 사슬은 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립될 수 있는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 HSV 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 및 재조합 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터이거나, 또는 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터이고, 각각 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10의 캡시드, 또는 키메라 AAV캡시드 또는 변형된 캡시드를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서,

상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10의 ITR를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드 분자는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 갖는 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제1 사슬은 상기 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역을 포함하며, 상기 제2 사슬은 상기 항원 결합 부분의 경쇄 가변영역을 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 폴리펩티드 분자는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제1 사슬은 상기 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하며, 상기 제2 사슬은 상기 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 제1 재조합 바이러스 벡터와 상기 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8이고, 바람직하게는 1:1-1:4인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 9

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 제1 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄이며, 상기 제2 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 항원 결합 단편은 Fab단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂단편인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 혈관생성인자에 특이적으로 결합되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 13

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드 분자는 이중 특이적 항체이고, 상기 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제2 항원 결합 부분을 포함하며, 제1 항원 에피토프와 제2 항원 에피토프가 서로 다르고; 상기 제1 항원 결합 부분은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 14

제13항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분은 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 바람직하게는, 상기 항원 결합 단편은 Fab단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂단편인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서,

상기 제2 항원 결합 부분은 단일 사슬 형태의 항체인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 단일 사슬 형태의 항체는 단일 도메인 항체 또는 scFv인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 17

제15항 또는 제16항에 있어서,

상기 제2 항원 결합 부분은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 상기 제2 항원 결합 부분을 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 18

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 항원 결합 부분은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄 및 상기 제2 항원 결합 부분을 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 19

제15항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사슬은 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 제2 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제2 사슬은 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 20

제15항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원 결합 부분 중 적어도 하나는 혈관생성인자에 특이적으로 결합되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 21

제20항에 있어서,

상기 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 22

제20항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분은 VEGF에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 항원 결합 부분은 Ang2에 특이적으로 결합되거나; 또는 상기 제1 항원 결합 부분은 Ang2에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 항원 결합 부분은 VEGF에 특이적으로 결합되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 23

제6항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 폴리펩티드 분자는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 표적 분자에 특이적으로 결합되는 제2 결합 도메인을 포함하고, 상기 제2 표적 분자는 사이토카인이며; 상기 제1 항원 결합 부분은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 24

제23항에 있어서,

상기 제2 결합 도메인은 사이토카인 수용체, 이의 세포 외 도메인 또는 이들의 변이체인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분은 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 바람직하게는, 상기 항원 결합 단편은 Fab단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂단편인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 26

제23항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 결합 도메인은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 상기 제2 결합 도메인을 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 27

제23항 내지 제26 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제2 결합 도메인은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄 및 상기 제2 결합 도메인을 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 28

제23항 내지 제27 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 사슬은 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 제2 결합 도메인을 포함하고, 상기 제2 사슬은 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 29

제20항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분은 PD-1, PD-L1 또는 혈관생성인자에 특이적으로 결합되어 표적화하며, 상기 제2 결합 도메인은 인간 전환성장인자 β (TGF β), Ang2 또는 VEGF에 결합할 수 있는 수용체 또는 이의 단편인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 30

제29항에 있어서,

상기 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택되는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 31

제29항에 있어서,

상기 제1 항원 결합 부분은 PD-L1에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 결합 도메인은 인간 전환성장인자 β 수용체 II(TGF β RII) 또는 이의 단편인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 시스템은 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 조성물인, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 생산하기 위한 이중 플라스미드 시스템에 있어서,

상기 제1 발현 카세트 및 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 생산에 필요한 바이러스 게놈 요소를 포함하는 제1 플라스미드, 및

상기 제2 발현 카세트 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터 생산에 필요한 바이러스 게놈 요소를 포함하는 제2 플라스미드를 포함하는, 이중 플라스미드 시스템.

청구항 34

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템으로 형질도입되는 숙주 세포.

청구항 35

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 제34항에 따른 세포 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물 조성물.

청구항 36

두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 제조하기 위한 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템, 제33항에 따른 이중 플라스미드 시스템 또는 제34항에 따른 세포의 응용.

청구항 37

두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자의 생산 방법에 있어서,

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템으로 숙주 세포에 형질도입하는 단계;

상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬이 발현되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 조립하여 생성하는 조건에서 형질도입된 상기 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 폴리펩티드 분자를 얻는 단계를 포함하는, 폴리펩티드의 생산 방법.

청구항 38

대상체의 체 내에 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 전달하는 약물의 제조에서 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템의 응용.

청구항 39

필요한 대상체에게 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 제34항에 따른 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 대상체의 체 내에 전달하는 방법.

청구항 40

두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 대상체의 체 내에 전달하기 위한 제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 따른 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 제34항에 따른 약물 조성물.

발명의 설명

기술 분야

관련 출원의 상호 참조

본 출원은 출원일이 2021년 3월 8일이고, 출원번호가 제202110252231.1호인 중국 발명 특허 출원의 우선권을 주장하고, 여기서 전체 내용은 참조로서 본 명세서에 포함된다.

[0003] 기술분야

[0004] 본 발명은 유전자 치료 분야에 관한 것으로, 특히 이중 바이러스 벡터 시스템을 이용하여 항체를 발현시키는 시스템 및 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 최근, 재조합 아데노-관련 바이러스(recombinant adeno-associated virus, rAAV)는 다양한 종의 상이한 조직 및 다양한 유형의 세포에 유전자 성분을 전달하는 데 사용될 수 있는 것이 증명되었고, 이러한 새로운 치료 방법은 우수한 전망을 갖는다. 유럽의약품청(EMA)이 2012년에 승인한 rAAV약물 Alipogene tiparvovec(Glybera, uniQure)은 rAAV1벡터 및 인간 리포단백리파제(LPL) 유전자로 구성되고, 리포단백리파제 결핍(lipoprotein lipase deficiency, LPLD)을 치료하는 데 사용된다. 현재까지, FDA 및 EMA에서 승인한 rAAV약물은 두가지가 더 있는데, voretigene neparvovec-rzyl(Luxturna, Spark) 및 Onasemnogene abeparvovec(ZOLGENSMA, AveXis/Novartis)이며, 후자의 경우 조건부 승인을 받았고, 이들은 모두 raav에 의해 매개된 완전한 유전자 대체 요법이다. rAAV벡터를 이용하여 상이한 유전자 성분을 전달하는 일부 임상 유전자 치료 시험은 혈우병을 치료하기 위한 B도메인 결실 인자 VIII유전자 및 DMD를 치료하기 위한 마이크로-디스트로핀과 같은 절단된 유전자; B형 간염을 치료하기 위한 짧은 헤어핀 RNA, 헌팅턴병을 치료하기 위한 microRNA 및 DMD를 치료하기 위한 엑손 스킵핑을 유도하는 소핵 RNA와 같은 작은 RNA; 및 AMD를 치료하기 위한 발현 항체를 비롯한 이미 동물 모델에서 효과적이라고 증명된 작용 메커니즘을 이용하였다.

[0006] 항체 약물은 광범위한 적응증에서 모두 안전하고 효과적인 것으로 증명되었다. rAAV는 항체 유전자 전달에 이상적인 벡터이고, 모노클로날 항체 유전자의 길이는 rAAV의 패키징 용량 이내이다. 현재 rAAV에 기반한 항체 전달 전략은 단일 rAAV벡터가 형질도입된 세포에서 항체 경쇄 및 중쇄를 발현하는 폴리펩티드를 이용하여, 자가 절단 펩티드(예컨대 서로 다른 2A)에 의한 IgG의 자가 조립을 허용하는 것이다. 그러나, 이러한 전략은 항체 발현 효율이 낮고, 항체의 정확하지 못한 조립으로 인해 무기능 항체 또는 항체 단백질 응집체를 초래할 수 있어, 독성 효과를 일으키므로, 이는 이의 임상 적용을 제한한다. 현재까지, 임상 시험이 진행된 rAAV에 기반한 IgG 약물은 AAV8-VRC07 뿐이고, 이는 HIV-1 중화 항체를 발현시켜, 항바이러스 치료에 사용된다. 다른 유형의 전략으로는 Fc단편을 갖지 않는 가용성 항체(RGX-314) 또는 Fc단편과 융합된 재조합 단백질(AAV2-sFLT01 및 ADVM-022)을 발현시키는 것을 포함한다.

[0007] 다른 바이러스 벡터도 유전자 성분을 전달하는 데 사용될 수 있으나, 마찬가지로 항체 발현 효율이 낮고 조립 효율이 낮은 문제가 존재한다. 현재 체 내에서 효율적으로 항체를 발현할 수 있는 통용되는 방법이 여전히 부족하다.

발명의 내용

[0008] 본 발명은 폴리펩티드 분자를 구성하는 두가지 폴리펩티드 사슬의 코딩 핵산 서열이 각각 두개의 발현 카세트에 놓여, 각각 두개의 재조합 바이러스 벡터의 5'와 3' 역반복 서열 사이에 삽입되는 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 체 내에서 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 효율적으로 발현하는 방법을 제공한다. 상기 발현 카세트는 숙주 세포 내에서 각각 상기 폴리펩티드 분자 항체를 구성하는 두개의 폴리펩티드 사슬을 발현시키고, 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립된다.

[0009] 본 발명의 제1 양태는 세포에서 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 발현시키기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 제공하고, 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은

[0010] 계놈에 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 발현 카세트를 포함하는 제1 재조합 바이러스 벡터, 및

[0011] 계놈에 상기 폴리펩티드 분자의 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 발현 카세트를 포함하는 제2 재조합 바이러스 벡터를 포함하되,

[0012] 상기 제1 사슬 및 상기 제2 사슬은 서로 다르고, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 세포에 도입된 후 각각 상기 제1 사슬 및 제2 사슬을 발현시킬 수 있으며, 상기 제1 사슬 및 제2 사슬은 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립될 수 있다.

[0013] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-

관련 바이러스 벡터, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 HSV 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터 및 재조합 레트로바이러스 벡터로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된다.

- [0014] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터이거나, 또는 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0015] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터이고, 각각 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10의 캡시드, 또는 키메라 AAV 캡시드 또는 변형된 캡시드를 포함한다.
- [0016] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10의 ITR를 포함한다.
- [0017] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 갖는 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제1 사슬은 상기 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역을 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 항원 결합 부분의 경쇄 가변영역을 포함한다.
- [0018] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제1 사슬은 상기 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다.
- [0019] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8 이고, 바람직하게는 1:1-1:4이다.
- [0020] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 상기 제1 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄이며, 상기 제2 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄이다.
- [0021] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 모노클로날 항체의 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂ 단편이다.
- [0022] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편은 혈관생성인자에 특이적으로 결합된다.
- [0023] 일부 실시 방안에 있어서, 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택된다.
- [0024] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 이중 특이적 항체이고, 상기 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제2 항원 결합 부분을 포함하며, 제1 항원 에피토프와 제2 항원 에피토프는 다르고; 상기 제1 항원 결합 부분은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함하는, 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템.
- [0025] 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체 중의 제1 항원 결합 부분은 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 바람직하게는, 상기 항원 결합 단편은 Fab 단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂ 단편이다.
- [0026] 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체 중의 제2 항원 결합 부분은 단일 사슬 형태의 항체이다.
- [0027] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 단일 사슬 형태의 항체는 단일 도메인 항체 또는 scFv이다.
- [0028] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제2 항원 결합 부분은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 상기 제2 항원 결합 부분을 포함한다.
- [0029] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제2 항원 결합 부분은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄 및 상기 제2 항원 결합 부분을 포함한다.
- [0030] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 사슬은 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 제2 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 제2 사슬은 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다.
- [0031] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원 결합 부분 중 적어도 하나는 혈관생성인자에

특이적으로 결합된다.

- [0032] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택된다.
- [0033] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분은 VEGF에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 항원 결합 부분은 Ang2에 특이적으로 결합되며; 또는 상기 제1 항원 결합 부분은 Ang2에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 항원 결합 부분은 VEGF에 특이적으로 결합된다.
- [0034] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 표적 분자에 특이적으로 결합되는 제2 결합 도메인을 포함하고, 상기 제2 표적 분자는 사이토카인이며; 상기 제1 항원 결합 부분은 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다.
- [0035] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제2 결합 도메인은 사이토카인 수용체, 이의 세포 외 도메인 또는 이들의 변이체이다.
- [0036] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분은 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 바람직하게는, 상기 항원 결합 단편은 Fab단편, Fab' 단편 또는 (Fab')₂단편이다.
- [0037] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제2 결합 도메인은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄 및 상기 제2 결합 도메인을 포함한다.
- [0038] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제2 결합 도메인은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되고, 상기 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄 및 상기 제2 결합 도메인을 포함한다.
- [0039] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 사슬은 제1 항원 결합 부분의 중쇄와 제2 결합 도메인을 포함하고, 상기 제2 사슬은 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다.
- [0040] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분은 PD-1, PD-L1 또는 혈관생성인자에 특이적으로 결합되어 표적화하며, 상기 제2 결합 도메인은 인간 전환성장인자 β (TGF β), Ang2 또는 VEGF에 결합될 수 있는 수용체 또는 이의 단편이다.
- [0041] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 혈관생성인자는 VEGF, VEGFR, FGF, PDGF, TGF β , Ang1, Ang2, 인테그린, CD31 및 플라스미노겐 활성화제로부터 선택된다.
- [0042] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분은 PD-L1에 특이적으로 결합되고, 상기 제2 결합 도메인은 인간 전환성장인자 β 수용체II(TGF β RII) 또는 이의 단편이다.
- [0043] 일부 실시 방안에 있어서, 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 조성물이다.
- [0044] 본 발명의 제2 양태는 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 생산하기 위한 이중 플라스미드 시스템을 제공하고, 상기 이중 플라스미드 시스템은
- [0045] 상기 제1 발현 카세트 및 상기 제1 재조합 바이러스 벡터 생산에 필요한 바이러스 계놈 요소를 포함하는 제1 플라스미드, 및
- [0046] 상기 제2 발현 카세트 및 상기 제2 재조합 바이러스 벡터 생산에 필요한 바이러스 계놈 요소를 포함하는 제2 플라스미드를 포함한다.
- [0047] 본 발명의 제3 양태는 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템으로 형질도입된 숙주 세포를 제공한다.
- [0048] 본 발명의 제4 양태는 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 전술한 숙주 세포, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약물 조성물을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 제5 양태는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자의 제조에서 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템, 전술한 이중 플라스미드 시스템 또는 전술한 숙주 세포의 응용을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 제6 양태는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자의 생

산 방법을 제공하고, 상기 방법은

- [0051] 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템으로 숙주 세포에 형질도입하는 단계;
- [0052] 상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬이 발현되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 조립하여 생성하는 조건에서 형질도입된 상기 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 폴리펩티드 분자를 얻는 단계를 포함한다.
- [0053] 본 발명의 제7 양태는 대상체에게 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 체 내 전달하는 약물의 제조에서 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템의 응용을 제공한다.
- [0054] 본 발명의 제8 양태는 필요한 대상체에게 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 전술한 약물 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 대상체에게 체 내 전달하는 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 제9 양태는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 대상체 체 내에 전달하기 위한 전술한 임의의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 전술한 약물 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 이하 상세한 설명을 통해 도면에 결부하여 본 발명을 더욱 충분히 이해하도록 하고, 여기서 유사한 요소는 유사하는 형태로 넘버링한다.

도 1은 이중 AAV벡터를 이용하여 Avastin을 발현시키는 것을 보여준다. a는 완전한 항체 서열을 발현시키는 벡터(AAV-Avastin단일 벡터), 중쇄만 발현시키는 벡터(AAV-Avastin 중쇄, 즉 AAV-Avastin-H) 및 경쇄만 발현시키는 벡터(및 AAV-Avastin 경쇄, 즉 AAV-Avastin-L)의 개략도이다. b 및 c는 단일 벡터(AAV2-Avastin) 및 이중 벡터(AAV2-Avastin-L 및 AAV2-Avastin-H)로 HEK293FT 세포에 형질도입하여 생성한 Avastin 항체의 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 b도면은 비환원 조건이고, c 도면은 환원 조건이며, 양성 대조는 정제된 항체이고, 음성 대조는 재조합 바이러스 벡터로 형질도입되지 않은 세포 배양 상등액이다. d는 단일 벡터(AAV2-Avastin) 및 이중 벡터(AAV2-Avastin-L 및 AAV2-Avastin-H)로 hARPE-19 세포에 형질도입하여 생성한 Avastin항체의 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 양성 대조는 정제된 항체이다.

도 2는 AAV8캡시드, AAV9캡시드 및 AAV5캡시드(a, b, c)를 갖는 단일 벡터 또는 이중 벡터로 HEK293FT 또는 hARPE-19 세포에 형질도입하여 Avastin 항체를 발현시키는 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 양성 대조는 정제된 항체이다.

도 3은 이중 AAV바이러스 벡터 및 이중 플라스미드 벡터로 HEK293FT 또는 hARPE-19세포에 형질도입 또는 형질감염하여 Avastin 항체를 발현시키는 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 양성 대조는 정제된 항체이다.

도 4는 이중 AAV바이러스 벡터로 hiPSC-RPE에 형질도입하여 Avastin 항체를 발현시키는 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 양성 대조는 정제된 항체이다.

도 5는 이중 AAV벡터를 이용하여 ABTAA를 발현시키는 것을 보여준다. a는 완전한 항체 서열을 발현시키는 전이 플라스미드(pAAV2.CMV.ABTAA) 및 경쇄 또는 중쇄만 발현시키는 전이 플라스미드(pAAV2.CMV.ABTAA-L 및 pAAV2.CMV.ABTAA-H)의 개략도이다. b 및 c는 단일 벡터 또는 이중 AAV바이러스 벡터로 HEK293FT 세포에 형질도입하여 ABTAA항체를 발현시키는 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 b 도면은 비환원 조건이고, c 도면은 환원 조건이며, 양성 대조는 정제된 항체이고, 음성 대조는 재조합 바이러스 벡터로 형질도입하지 않은 세포 배양 상등액이다.

도 6은 이중 AAV벡터를 이용하여 항Ang2 및 항VEGF 이중 특이적 항체를 발현시키는 것을 보여준다. a 및 b는 이중 특이적 항체를 발현시키는 이중 AAV벡터 개략도이고, 그 중 a 도면은 VEGF항체 가변영역이 ABTAA 중쇄에 연결되는 것을 보여주주고, b 도면은 VEGF항체 가변영역이 ABTAA 경쇄에 연결되는 것을 보여준다. c 및 d는 각각 a 및 b에 도시된 바이러스 이중 벡터로 HEK293FT 세포에 형질도입하여 ABTAA- 항VEGF 이중 특이적 항체를 발현시키는 웨스턴 블롯 결과이고, 그 중 양성 대조는 정제된 항체이다.

도 7은 이중 AAV벡터로 Avastin유전자를 마우스 체 내에 전달하여 발현시키는 것을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 본 발명은 항체 성분을 전달하기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 및 이의 응용을 제공하고, 두개의 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 각각 항체 성분의 두가닥의 사슬을 전달하여, 항체 성분의 발현량을 향상시킬 수 있고, 특히 두개의 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 항체 성분의 중쇄 및 경쇄를 각각 전달할 때, 항체 성분의 중쇄 및 경쇄의 유효 조립을 촉진시킬 수 있으며, 중쇄 및 경쇄의 매칭 효율을 향상시키고, 정확하지 못한 매칭을 줄인다.
- [0058] 재조합 AAV벡터를 예로 들면, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 유리한 응용 효과를 보여준다. 기존의 rAAV벡터를 이용하여 항체 전달을 수행하는 설계에서, 중쇄 및 경쇄 ORF는 동일한 rAAV벡터 내에 패키징된다. rAAV의 유전자 패키징의 사이즈 제한으로 인해, rAAV로 rAAV 패키징 용량을 초과하는 항체(예를 들어 이중 특이적 항체)를 전달하기 어렵다. 그 외, 독립적인 경쇄 및 중쇄의 발현을 얻기 위해, 경쇄와 중쇄 사이에 자가 절단 펩티드(예를 들어 P2A) 또는 푸린 절단 부위를 삽입하거나, 또는 두개의 프로모터로 경쇄 및 중쇄의 발현을 각각 구동한다. 그러나, 이러한 단일 벡터의 설계는 항체가 세포에서 낮은 수준으로 발현되고 대량의 미스매치 산물이 생성될 수 있는 것을 발견하였다. 낮은 수준의 발현은 실제 응용에서 높은 용량의 rAAV를 투여해야 하는 것을 의미하며, 유효한 항체 농도를 얻고, 미스매치 산물은 원치 않는 응집물을 형성하기 쉽다. 약물 분야에서, 이러한 두가지 문제는 안전성 및 독성에 관련이 있어 높은 관심을 받고 있다.
- [0059] 본 발명은 이중 rAAV벡터에 의해 매개되는 유전자 전달을 통해 체 내에서 항체를 효과적으로 발현시키는 전략을 제공하고, 그 중 하나의 rAAV벡터는 완전한 항체 경쇄 코딩 서열을 갖는 발현 카세트를 포함하고, 다른 하나의 rAAV벡터는 완전한 항체 중쇄 코딩 서열을 갖는 발현 카세트를 포함하며, 두개의 벡터로 동시에 세포에 형질도입할 때, 형질도입 세포에서 발현된 경쇄와 중쇄는 매칭 조립되어 전장의 기능성 항체를 형성하고, 증강된 항체 발현 수준을 갖는다. 경쇄 벡터(LC벡터)와 중쇄 벡터(HC벡터)의 비율을 조절하는 것을 통해, 항체 발현 수준을 더욱 향상시키고, 더욱 효과적인 항체 조립을 구현하며, 더욱 높은 중쇄와 경쇄의 매칭 정확도를 가질 수 있다. 본 발명의 이중 rAAV벡터 시스템을 이용하여 항체를 발현시키고, 특히 이중 특이적 항체 심지어 다중 특이적 항체를 발현시킬 때, 항체를 효과적으로 발현시킬 수 있고, 숙주 세포 내에 안정적으로 존재할 수 있으며, 지속적으로 항체를 발현시키고, 세포 전환 효율이 높으며, 높은 항체 발현 수준 및/또는 높은 항체 중쇄와 경쇄 조립의 정확도의 우수한 효과를 갖는다. 본 발명의 이중 rAAV벡터 시스템은 대상체의 체 내에 항체를 전달하는 데 특히 적용되어, 유전자 치료 목적을 구현할 수 있고, 이는 체 내(예컨대 대상체 체내의 세포 내, 조직 내 및 장기 내를 포함하는 대상체 체내)에서 효과적으로 항체를 발현시킬 수 있으며, 체 내에서 안정적으로 존재할 수 있고, 항체를 지속적으로 발현시키며, 항체의 코딩 서열을 대상체 체내 세포의 게놈에 통합할 필요 없으며, 높은 안전성을 갖는다. 본 발명의 이중 rAAV벡터 시스템은 비분열기 세포에 항체를 전달하는 데 특히 적용되고, 예를 들어, 항체를 간, 눈, 근육, 뇌척수액에 전달하여, 이러한 조직 또는 체액의 세포에서 기능을 갖는 항체를 효과적으로 발현시킨다.
- [0060] 유사하게, 재조합 아데노바이러스 벡터, 재조합 단순 포진 바이러스 벡터, 재조합 렌티바이러스 벡터, 재조합 레트로바이러스 벡터 등과 같은 재조합 바이러스 벡터를 이용하여, 두개의 재조합 바이러스 벡터로 각각 항체 성분의 두가닥의 사슬을 전달할 때, 마찬가지로 세포 전환 효율이 높고, 높은 항체 발현 수준 및/또는 높은 항체 중쇄와 경쇄 조립 정확도의 우수한 효과를 갖는다.
- [0061] 달리 명시하지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 용어는 당업계에서 일반적으로 이해되는 의미를 가지고, 당업자에게 알려진 표준 교과서, 참고서 및 문헌을 참조하여 이해할 수 있다. 본 명세서에서 제공하는 정의 및 해석은 본 발명의 범위 내에서 이들의 특정 용도를 명확히 하기 위한 것이다. 본 발명에 참조된 참고 문헌은 모두 전부 내용은 참조로서 본 명세서에 포함한다.
- [0062] 특정 이론의 구속되지 않고, 본 발명에서 관련 이론 또는 메커니즘의 해석은 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명에 의해 보호되는 기술적 방안을 한정하는 것으로 간주해서는 아니된다.
- [0063] 본 발명에서 사용되는 용어 “포함하다” 또는 유사한 의미를 갖는 다른 용어 “포괄하다” 또는 “함유하다” 등은 열거된 요소를 포함하나 다른 요소의 존재를 배제하는 것으로 이해해야 하고; 이러한 용어는 열거된 요소로만 구성되는 상황도 포함한다. 용어 “……로 구성”은 열거된 요소로만 구성되는 것을 의미한다. 용어 “실질적으로 ……로 구성”은 관련된 기술적 방안에 유의미한 영향을 미치지 않는 요소를 배제하지 않는 것을 나타낸다.
- [0064] 달리 특별히 설명하지 않는 한, 본 명세서 중의 “a”, “an” 또는 “the”는 단수 형태 및 복수 형태를 포함

한다. 용어 “적어도 하나” 또는 “적어도 한 가지” 또는 다른 유사한 표현의 의미는 “하나 이상” 또는 “한 가지 이상”의 의미와 동등하다.

[0065] 본 명세서에 기재된 수치 범위, 예를 들어 온도 범위, 시간 범위, 조성 또는 농도 범위, 또는 기타 수치 범위 등은 상기 범위 내의 끝값, 모든 중간 범위, 서브 범위(예를 들어 어느 중간값과 어느 끝값 사이의 범위) 및 모든 단일 수치, 특히 정수 수치를 끝값으로 하는 중간 범위, 서브 범위 및 단일 정수 범위를 포함한다. 또한, 상기 수치 범위에 설명되는 어느 중간 범위, 서브 범위 및 모든 단일 수치는 상기 수치 범위에서 배제될 수 있다.

[0066] 본 명세서에 기재된 “약”, “대략”의 의미는 상기 수치의 $\pm 20\%$, $\pm 18\%$, $\pm 15\%$, $\pm 12\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$, $\pm 1\%$ 또는 $\pm 0.5\%$ 의 범위이고, 상기 범위는 상기 범위의 끝점 및 상기 범위 내의 임의의 수치를 포함한다.

[0067] 본 명세서에 기재된 용어 “및/또는”은 상기 용어에 연결된 복수의 요소 중의 어느 한 요소 또는 임의의 여러 요소의 조합으로 이해해야 한다.

[0068] 본 발명에서, 용어 “핵산 서열” 및 “뉴클레오타이드 서열”은 상호 교환하여 사용될 수 있고, 염기, 당 및 인산 백본으로 연결되어 이루어진 서열을 의미한다. 본 발명의 핵산 서열은 디옥시리보핵산 서열(DNA) 또는 리보핵산 서열(RNA)일 수 있고, 천연 염기 또는 비천연 염기를 포함할 수 있으며, 단일 사슬 또는 이중 사슬일 수 있으며, 코딩 서열 또는 비코딩 서열일 수 있다.

[0069] 본 발명에서, 달리 설명하지 않는 한, 핵산 서열의 설명은 일반적으로 5' 말단에서 3' 말단까지이고, 아미노산 서열의 설명은 일반적으로 N말단에서 C말단까지이다.

[0070] 본 발명에서 두개의 재조합 바이러스 벡터를 이용하여 폴리펩티드 분자를 구성하는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬을 발현시키고, 상기 폴리펩티드 분자는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되며 항원 결합 활성을 가지고, 상기 두가지 서로 다른 펩티드 사슬은 세포에서 발현된 후 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립될 수 있다. 따라서, 본 발명은 상기 폴리펩티드 분자를 발현시키기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템, 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 생산하기 위한 이중 플라스미드 시스템, 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 포함하는 숙주 세포, 약물 조성물 및 상기 폴리펩티드 분자를 전달하기 위한 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템의 용도 및 방법을 제공한다.

[0071] 폴리펩티드 분자

[0072] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 발현시키는 데 적용된다.

[0073] 용어 “항원 결합 활성”은 상기 폴리펩티드 분자가 이에포함된 항원 결합 부위(예를 들어 중쇄 가변영역 VH 및/또는 경쇄 가변영역 VL)를 통해 항원 에피토프에 특이적으로 결합되어 면역 반응을 일으킬 수 있는 것을 의미한다. 본 발명에서 언급한 “두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되고 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자”는 항체 또는 항체 및 제2 결합 도메인을 포함한 항체 융합 단백질일 수 있다. 상기 폴리펩티드 분자를 구성하는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬은 서로 다른 아미노산 서열을 갖고, 본 발명에서 각각 제1 사슬 및 제2 사슬로 지칭한다. 상기 폴리펩티드 분자가 두개의 서로 다른 펩티드 사슬로 구성되는 것은 상기 폴리펩티드 분자는 한가닥 또는 그 이상의 제1 사슬 및 한가닥 또는 그 이상의 제2 사슬로 구성되는 것을 의미하고, 예를 들어 상기 폴리펩티드 분자는 한가닥의 제1 사슬 및 한가닥의 제2 사슬로 구성될 수 있고, 두가닥의 제1 사슬 및 두가닥의 제2 사슬로 구성된 사량체일 수도 있으며, 상기 제1 사슬은 하나의 재조합 바이러스 벡터를 통해 발현되고, 상기 제2 사슬은 다른 하나의 재조합 벡터를 통해 발현되며, 제1 사슬 및 제2 사슬은 세포에서 발현된 후 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자로 조립될 수 있다. 상기 “조립”은 제1 사슬 및 제2 사슬이 상호 작용하여 항원 결합 활성을 갖는 폴리펩티드 분자를 형성하는 것을 포함하고, 상기 상호 작용은 두개의 중쇄 불변 영역의 CH1, CH2 및/또는 CH3 사이의 이황화 결합과 같은 공유 결합(예를 들어 이황화 결합)을 통한 상호 연결; 및/또는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역 사이의 매칭과 같은 비공유 결합(예를 들어 수소 결합, 반데르발스 힘, 전하 작용 또는 소수성 작용)을 통한 상호 작용을 포함한다.

[0074] 본 발명에서, “제1 사슬” 및 “제2 사슬”을 사용하는 것은 상기 폴리펩티드 분자를 구성하는 두개의 서로 다른 펩티드 사슬을 구분하기 위한 것에 불과하고, 제1 사슬 또는 제2 사슬이 특정된 아미노산 서열 또는 특정 의미를 갖는 것을 의미하는 것이 아니다. 본 발명에서, 구체적인 실시 방안의 설명에 있어서, 명백하게 하기 위해, 제1 사슬은 제1 서열을 갖는 것으로 설명하고, 제2 사슬은 제2 서열을 갖는 것으로 설명하나, 당업자는 둘은 서로 교환하여 사용할 수 있고, 다시 말해서 제1 사슬이 제2 서열을 포함하고, 제2 사슬이 제1 서열을 포

함할 수 있는 것을 이해해야 한다.

[0075] 용어 “항체”는 본 발명에서 “항원 결합 부분”으로도 칭할 수 있고, 항원 결합 부위를 포함하며 항원 에피토프에 특이적으로 결합되어 이와 면역 반응을 일으킬 수 있는 폴리펩티드를 의미한다. 용어 “항체”는 중쇄 가변영역(VH) 및 경쇄 가변영역(VL)을 갖는 폴리펩티드를 포함하고, 중쇄 항체 또는 단일 도메인 항체(sdAb)와 같은 중쇄 가변영역 VH만 갖는 폴리펩티드를 더 포함한다. 용어 “항체”는 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편(예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂단편 등) 및 단일 사슬 형태의 항체(예컨대 scFv 또는 단일 도메인 항체sdAb 등)를 포함하나 이에 한정되지 않고, 키메라 항체, 인간화 항체 등을 더 포함한다. 용어 “항체”는 단일 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 항체, 다중 특이적 항체 즉 단일 특이성 항체 및 복수의 서로 다른 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 항체(예를 들어 이중 특이적, 삼중 특이적 항체 등)를 포함한다. 일부 실시 방법에 있어서, 본 발명의 “항체”는 두가지 서로 다른 사슬로 구성되고, 상기 두가지 사슬이 서로 연결되어 항원 결합 활성을 갖는 항체로 조립된다. 용어 “단일 사슬 형태의 항체”는 한가닥의 사슬로 구성된 항체를 의미하고, 단일 사슬 형태의 항체에 포함된 한가닥의 사슬에 적어도 scFv와 같이 IgG면역글로불린에서 유래된 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함할 수 있고, 단일 도메인 항체, 또는 중쇄 항체(즉 중쇄 가변영역 및 중쇄 불변 영역 포함)와 같은 적어도 중쇄 가변영역을 포함할 수도 있다. 본 발명에서, 용어 “특이적 결합” 또는 “표적화”는 항원 결합 폴리펩티드가 항원의 특정 에피토프에 대한 선택적 인식을 의미하고, 즉 서로 다른 항원 또는 동일 항원의 다른 에피토프에 비해, 항체 또는 항원 결합 부분이 큰 친화력 또는 더욱 긴 지속 시간으로 상기 항원 또는 상기 특정 에피토프에 결합되는 것을 의미한다. 항체와 항원 에피토프의 결합 능력은 예를 들어 방사성 면역 측정(RIA)을 통해 해리 상수를 측정하여 얻을 수 있다.

[0076] 용어 “항원”은 당업자가 통상적으로 이해하는 의미를 가지고, 폴리펩티드, 다당, 당단백질, 폴리 뉴클레오티드 등을 포함한다. 용어 “항원 에피토프”는 “항원 결정자”로도 칭하고, 항원 표면에서 항원 특이성을 결정하는 화학 작용기를 의미한다. 항원 에피토프는 항체 중의 항원 결합 부위에 의해 인식되고 결합될 수 있다.

[0077] 용어 “모노클로날 항체”는 어느 특정 항원 에피토프에 대한 균일한 항체를 의미한다. 전형적인 서로 다른 항원 결정자(에피토프)에 대한 서로 다른 항체를 포함하는 일반 폴리클로날 항체 제제에 비해, 각각의 모노클로날 항체는 항원의 단일 항체 결정자에 대한 것이다. 모노클로날 항체는 하이브리도마 배양을 통해 얻을 수 있으나, 본 발명에서 수식어 “모노클로날”은 항체의 균일한 특징을 나타내고, 어느 특정 방법으로만 제조할 수 있는 항체로 이해해서는 아니된다. 본 발명의 모노클로날 항체는 DNA 재조합 방법을 통해 생성되거나 또는 다른 스크리닝 방법을 통해 얻을 수 있다.

[0078] 본 발명에서 언급한 “모노클로날 항체”는 전장 항체 또는 완전 항체로도 칭할 수 있고, 즉 네가닥의 폴리펩티드 사슬로 구성된 면역글로불린 분자(예컨대 IgG) 또는 이의 다량체(예컨대 IgA 또는 IgM)를 의미한다. 상기 네가닥의 폴리펩티드 사슬은 두가닥의 서로 같은 중쇄(H) 및 두가닥의 서로 같은 경쇄(L)를 포함하고, 이들은 이항화 결합을 통해 서로 연결되어 사량체를 형성한다. 각 중쇄는 중쇄 가변영역(“HCVR” 또는 “VH”) 및 중쇄 불변 영역(도메인 CH1, CH2 및 CH3으로 구성)으로 구성된다. 각 경쇄는 경쇄 가변영역(“LCVR 또는 “VL”) 및 경쇄 불변 영역(CL)으로 구성된다. VH 및 VL 영역은 상보적 결정 영역(CDR)으로 불리는 추가변 영역으로 더 세분화될 수 있고, 그 사이에 프레임 영역(FR)으로 불리는 더 보수적인 영역이 삽입된다. 각 VH 및 VL은 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성되고, FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4의 순서로 아미노 말단으로부터 수산기 말단까지 배열된다. 중쇄 불변 영역의 아미노산 서열에 따라, 면역글로불린 분자는 서로 다른 클래스로 나누고, IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM의 5가지 주요 유형의 전장 항체가 있으며, 이들 중의 일부를 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2와 같은 서브 클래스로 더 나눌 수 있다. 본 발명의 모노클로날 항체는 임의의 전술한 클래스 또는 서브 클래스의 면역글로불린 분자를 포함한다.

[0079] 본 발명에서 언급한 “항원 결합 단편”은 완전 항체의 하나 또는 복수의 부분을 의미하고, 상기 부분은 항원 에피토프와 특이적 상호 작용하는 능력을 보유한다. 항원 결합 단편의 구현예로는, (1) Fab단편: 완전 항체가 파파인 소화에 의해 생성된 항원 결합 단편이고, 전장 항체의 완전 경쇄(VL도메인 및 CL도메인 포함) 및 전장 항체의 중쇄 가변영역 VH 및 중쇄 불변 영역 도메인 CH1으로 구성되며, 힌지 영역을 포함하지 않는 단편; (2)F(ab')₂단편: 완전 항체가 펩신 소화에 의해 생성된 항원 결합 단편이고, 두개의 전장 항체의 완전 경쇄(VL도메인 및 CL도메인 포함) 및 두개의 전장 항체의 중쇄 가변영역 VH 및 중쇄 불변 영역도메인 CH1 및 힌지 영역을 포함하며, 그 사이에 이항화 결합을 갖는 두개의 Fab' 단편이 매칭되어 이루어진 것으로 볼 수 있는 단편; (3) Fab' 단편; (4) VH도메인 및 CH1도메인으로 구성된 Fd 단편; (5) 항체 싱글암의 VL도메인 및 VH도메인으로 구성된 Fv 단편; (6) VHH도메인으로 구성된 단일 도메인 항체sdAb를 포함한다. 그 외, 본 발명의 용어 “항원

결합 단편”은 scFv(VL도메인 및 VH도메인이 링커를 통해 연결되어 형성된 단일 사슬 Fv), dsFv(scFv의 VH 및 VL 사이에 사슬간 이황화 결합을 도입하여 형성된 단일 사슬 항체)와 같은 단일 사슬 형태의 항체를 더 포함한다. “항원 결합 단편”은 일반적으로 적어도 완전 항체의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역 중의 하나 또는 둘 모두를 포함하고, 완전 항체의 경쇄 불변 영역 및/또는 중쇄 불변 영역의 일부를 더 포함할 수 있고, 예를 들어 CL도메인, CH1도메인, CH2도메인, CH3도메인 중 하나 또는 둘 또는 그 이상을 포함할 수 있다.

[0080] 본 발명에서 언급한 “단일 도메인 항체(sdAb)”는 3개의 상보적 결정 영역(CDR)을 갖는 단일 항원 결합 폴리펩티드를 의미한다. 이러한 단일 도메인 항체는 상응한 CDR를 포함하는 폴리펩티드에 매칭될 필요 없이 단독적으로 항원에 결합할 수 있다. 낙타과 sdAb(*e.g.*, Hamers-Casterman *et al.*, Nature 363:446-8(1993); Greenberg *et al.*, Nature 374:168-73(1995); Hassanzadeh-Ghassabeh *et al.*, Nanomedicine(Lond), 8:1013-26(2013) 참조)와 같은 일반적인 단일 도메인 항체는 중쇄를 포함하나 통상적으로 항체에서 관찰되는 경쇄가 부족하다. 단일 도메인 항체는 낙타의 중쇄 항체에서 인위적으로 조작하여 얻을 수 있고, VHH로 불리며, VHH는 N말단에서 C말단까지 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4의 구조를 갖는다.

[0081] 본 발명에서 언급한 “단일 사슬 항체(scFv)”는 펩티드 링커를 통해 연결된 면역글로불린 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 융합 단백질을 의미한다. 펩티드 링커를 통해 중쇄 가변영역의 N말단과 경쇄 가변영역의 C말단을 연결하거나, 또는 펩티드 링커를 통해 경쇄 가변영역의 N말단과 중쇄 가변영역의 C말단을 연결할 수 있다.

[0082] 본 발명에서 언급한 “다중 특이적 항체”는 복수의 항원 에피토프에 특이적으로 결합될 수 있는 항체를 의미한다. 상기 복수의 항원 에피토프는 동일 항원 상의 서로 다른 에피토프일 수 있고, 서로 다른 항원 상의 서로 다른 에피토프일 수도 있다. 다중 특이적 항체는 복수의 항원 결합 부분을 포함하고, 각 항원 결합 부분은 하나의 항원 에피토프를 표적화하되 상기 복수의 항원 결합 부분이 표적화하는 항원 에피토프는 서로 다르다. 각 항원 결합 부분은 모노클로날 항체(예컨대 IgG면역글로불린), Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편, Fv단편, Fd단편, scFv, dsFv 및 단일 도메인 항체 등으로부터 독립적으로 선택될 수 있다. 다중 특이적 항체 구조의 상이함에 따라, 이의 제1 사슬 및 제2 사슬은 각각 하나 또는 둘 또는 그 이상의 서로 다른 항원 에피토프를 표적화하는 중쇄 가변영역 및/또는 경쇄 가변영역을 포함할 수 있다.

[0083] 일부 바람직한 실시 방법에 있어서, 상기 다중 특이적 항체는 이중 특이적 항체이고, 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제2 항원 결합 부분을 포함하되, 제1 항원 에피토프와 제2 항원 에피토프가 서로 다르다. 이중 특이적 항체는 여러 형태를 가지고, Fc영역을 포함하거나 또는 Fc영역을 포함하지 않을 수 있으며, Fc영역을 포함하는 이중 특이적 항체에 있어서, 그 구조는 대칭되거나 또는 대칭되지 않을 수 있다. 일부 바람직한 실시 방법에 있어서, 본 발명의 이중 특이적 항체는 Fc영역을 포함한다. 일부 바람직한 실시 방법에 있어서, 본 발명의 이중 특이적 항체는 대칭되고, 두가닥의 동일한 제1 사슬 및 두가닥의 동일한 제2 사슬로 구성된다. 일부 실시 방법에 있어서, 본 발명의 이중 특이적 항체는 한가닥의 제1 사슬 및 한가닥의 제2 사슬로 구성될 수도 있다. 이중 특이적 항체 구조의 상이함에 따라, 이중 특이적 항체의 제1 사슬 및 제2 사슬은 각각 하나의 항원 에피토프 또는 두개의 서로 다른 항원 에피토프를 표적화하는 중쇄 가변영역 및/또는 경쇄 가변영역을 각각 포함할 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 본 발명의 이중 특이적 항체는 대칭되고, 이의 제1 사슬은 제1 항원 에피토프를 표적화하는 중쇄를 포함하며, 이의 제2 사슬은 제2 항원 에피토프를 표적화하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 이중 특이적 항체는 항VEGF 및 Ang2의 이중 특이적 항체일 수 있다.

[0084] 본 발명에서 언급한 “항체 융합 단백질”은 항체(항체 융합 단백질에서 제1 항원 결합 부분으로 칭할 수 있음)를 다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드(제2 결합 도메인)와 융합하여 얻은 여러 생물학적 기능을 갖는 융합 단백질을 의미한다. 본 발명에서 언급한 “다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드”는 상기 항체의 중쇄 가변영역 VH, 경쇄 가변영역 VL, 중쇄 불변 영역CH1, CH2, CH3, 및/또는 경쇄 불변 영역CL에 연결될 수 있다. 본 발명에서 언급한 “다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드”는 서로 다른 항원 에피토프를 표적화하는 다른 하나의 항체, 독소, 효소, 사이토카인, 수용체 또는 이의 단편 등일 수 있다. 상기 항체가 서로 다른 항원 에피토프를 표적화하는 다른 하나의 항체와 융합될 때, 상기 항체 융합 단백질은 다중 특이적 항체(예컨대 이중 특이적 항체)이다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 제2 결합 도메인은 리간드에 특이적으로 결합되는 수용체 또는 이의 단편(예를 들어 이의 세포 외 도메인) 또는 이들의 변이체일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 수용체의 리간드는 제1 항원 결합 부분이 표적화하는 항원과 서로 다른 단백질이다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 리간드는 사이토카인 또는 이의 변이체이고, 상기 사이토카인은 예를 들어 전환 성장 인자 β (TGF β), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGF) 또는 안지오텐신 2(Ang2)일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 제2 결합 도

메인은 이러한 사이토카인 또는 이의 변이체에 특이적으로 결합되는 수용체, 예를 들어 전환 성장 인자 β (TGF β) 수용체(예를 들어 TGF- β RII), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGF) 수용체 또는 안지오텐신 2(Ang2) 수용체 일 수 있고, 상기 수용체의 단편, 예를 들어 사이토카인에 결합될 수 있는 단편, 예를 들어 상기 수용체의 세포 외 도메인 또는 이의 변이체일 수도 있다. 상기 사이토카인 및 사이토카인 수용체는 인간화된 것일 수 있다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 기타 폴리펩티드는 TGF β RII의 세포 외 영역 또는 이의 변이체이고, 예를 들어 TGF β RII의 세포 외 영역(예를 들어 특허 출원 W02018/205985의 SEQ ID NO:13 참조), TGF β RII의 가용성 세포 외 영역(예를 들어 특허 출원 W02018/129331의 SEQ ID NO:10 참조)TGF- β RII의 세포 외 영역의 N말단 절단 형태(예를 들어 특허 출원 W02018/205985의 SEQ ID NO:14 또는 SEQ ID NO:15 참조)이다. 항체 및 사이토카인 수용체 또는 이의 단편이 융합되어 형성한 항체 융합 단백질은 항체에서 치료 작용(예를 들어 항암 작용)을 하는 동시에 사이토카인 수용체와 사이토카인 사이의 상호 작용을 차단함으로써, 협동 치료 효과를 얻는다. 예를 들어 TGF β RII 또는 이의 세포 외 영역과 같은 TGF β 의 수용체는 종양 미세 환경에서 TGF β 의 중화 작용을 차단할 수 있고, 항체와 협동 항종양의 효과를 얻을 수 있으며, VEGF 또는 Ang2의 수용체 또는 세포 외 영역은 VEGF 또는 Ang2와 환경 중 수용체의 결합을 차단함으로써, 혈관 신생을 차단하여, 항체와 협동 항종양의 효과를 얻을 수 있다. 바람직한 실시 방안에 있어서, 상기 제1 항원 결합 부분은 항PD-1항체, 항PD-L1항체, 항VEGF항체 또는 항Ang2항체이다.

[0085] 일부 실시 방안에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 분자는 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 갖는 항체 또는 항원 결합 부분을 포함하고, 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역은 각각 두가닥의 펩티드 사슬에 위치하며, 이때, 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬은 각각 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 포함하고, 예를 들어, 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬은 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역을 포함하고, 제2 사슬은 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 경쇄 가변영역을 포함한다. 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 정확한 매칭을 촉진하여, 활성을 갖는 항원 결합 부분을 형성할 수 있다. 이러한 항체 또는 항원 결합 부분의 구현으로는 모노클로날 항체 또는 이의 Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편 또는 Fv단편 등을 포함한다. 나아가, 상기 중쇄 가변영역을 포함하는 제1 사슬 및/또는 상기 경쇄 가변영역을 포함하는 제2 사슬에 추가로 다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드를 융합하여, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 이용하여 발현 시 여전히 상기 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역의 정확한 매칭을 촉진하여 활성을 갖는 항원 결합 부분을 형성하는 동시에 생물학적 활성을 갖는 기타 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 폴리펩티드 분자는 각각 두가닥의 펩티드 사슬에 위치한 중쇄 가변영역 및 경쇄 가변영역을 갖는 항체 또는 항원 결합 부분, 또는 이러한 항체 또는 항원 결합 부분과 기타 항체 또는 항원 결합 부분으로 구성된 다중 특이적 항체, 또는 이러한 항체 또는 항원 결합 부분과 다른 생물학적 기능을 갖는 단백질을 구성한 항체 융합 단백질일 수 있다.

[0086] 나아가, 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬에는 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역이 포함되는 외에, 중쇄 불변 영역CH의 전장 또는 이의 부분이 더 포함될 수 있고, 예를 들어 CH1도메인 CH2도메인 및 CH3도메인 중 어느 하나 또는 어느 둘 또는 또는 그 전부를 포함할 수 있으며, 제2 사슬에는 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 경쇄 가변영역 포함되는 외에, 경쇄 불변 영역CL이 더 포함되어, 제1 사슬 및 제2 사슬이 세포에서 발현된 후 상기 중쇄 가변영역, 중쇄 불변 영역, 경쇄 가변영역 및 경쇄 불변 영역으로 활성을 갖는 항원 결합 부분을 형성하도록 할 수도 있다. 따라서, 바람직한 실시 방안에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 분자는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 항원 결합 부분을 포함하고, 이때, 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬은 각각 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄를 포함하며, 예를 들어, 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬에는 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 중쇄가 포함되고, 제2 사슬에는 상기 항체 또는 항원 결합 부분의 경쇄가 포함된다. 이러한 항체 또는 항원 결합 부분의 구현으로는 모노클로날 항체 또는 이의 중쇄 및 경쇄를 포함하는 항원 결합 단편, 에컨대 Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편 등을 포함한다. 본 발명자는 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 이용하여 각각 항체의 중쇄 및 경쇄를 발현시켜, 항체의 발현량이 더욱 높고, 중쇄 및 경쇄의 조립 효율이 더욱 높으며, 발현된 경쇄가 더욱 많이 차지할 경우, 항체 발현량과 중쇄 및 경쇄 조립 효율도 향상될 수 있는 것을 발견하였다.

[0087] 일부 실시 방안에 있어서, 본 발명의 폴리펩티드 분자에 포함된 항체 또는 항원 결합 부분은 VEGF에 특이적으로 결합되는 항체 또는 Ang2에 특이적으로 결합되는 항체이다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 VEGF에 특이적으로 결합되는 항체는 Avastin이다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 VEGF에 특이적으로 결합되는 항체의 중쇄는 SEQ ID NO:2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 VEGF

에 특이적으로 결합되는 항체의 경쇄는 SEQ ID NO:5로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 Ang2 에 특이적으로 결합되는 항체는 ABTAA이다. 상기 ABTAA 에 특이적으로 결합되는 항체의 중쇄는 SEQ ID NO:7로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 방안에 있어서, 상기 ABTAA 에 특이적으로 결합되는 항체의 경쇄는 SEQ ID NO:10으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다.

[0088] 본 발명에서, 용어 “중쇄”는 전장 항체 또는 적어도 두가닥의 사슬을 포함하는 이의 항원 결합 단편에 중쇄 가변영역을 포함하는 사슬을 의미하고, 용어 “경쇄”는 전장 항체 또는 적어도 두가닥의 사슬을 포함하는 이의 항원 결합 단편에 경쇄 가변영역을 포함하는 사슬을 의미한다. 따라서, 본 발명에서 언급한 “중쇄”는 중쇄 가변영역 VH 및 전부 3개의 중쇄 불변 영역 CH1, CH2 및 CH3을 포함하는 사슬, 또는 중쇄 가변영역 VH 및 일부 중쇄 불변 영역(예를 들어 CH1, CH2 및 CH3 중 어느 하나 또는 두개)을 포함하는 사슬과 같은 을 중쇄 가변영역 및 적어도 일부 중쇄 불변 영역을 포함하는 사슬을 의미한다. 본 발명에서 언급한 “경쇄”는 경쇄 가변영역 VL 및 경쇄 불변 영역CL을 포함하는 사슬과 같은 경쇄 가변영역 및 적어도 일부 경쇄 불변 영역을 포함하는 사슬을 의미한다.

[0089] 나아가, 상기 중쇄를 포함하는 제1 사슬 및/또는 상기 경쇄를 포함하는 제2 사슬에 다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드(즉 제2 결합 도메인)를 추가로 융합하여, 여전히 높은 발현량 및 높은 중쇄 및 경쇄 조립 효율을 가지는 동시에, 생물학적 활성을 갖는 기타 폴리펩티드를 생성할 수 있다. 따라서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 폴리펩티드 분자는 중쇄 및 경쇄를 갖는 항체 또는 항원 결합 부분으로 구성되거나, 또는 이러한 항체 또는 항원 결합 부분 및 기타 항체 또는 항원 결합 부분으로 구성된 다중 특이적 항체이거나, 또는 이러한 항체 또는 항원 결합 부분 및 다른 생물학적 기능을 갖는 단백질로 구성된 항체 융합 단백질 일 수 있다.

[0090] 일부 바람직한 실시 방안에 있어서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 항체 중쇄를 포함한 제1 사슬과 항체 경쇄를 포함한 제2 사슬의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다. 제1 사슬과 제2 사슬의 비율은 제1 사슬 및 제2 사슬의 코딩 서열을 포함하는 재조합 바이러스 벡터의 바이러스 게놈의 양, 및 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터에 포함된 제1 사슬 및 제2 사슬의 코딩 서열의 복제수에 따라 확인할 수 있다. 일부 실시 방안에 있어서, 제1 재조합 바이러스 벡터 시스템에서 제1 사슬의 코딩 서열은 단일 복제이다. 일부 실시 방안에 있어서, 제2 재조합 바이러스 벡터 시스템에서 제2 사슬의 코딩 서열은 단일 복제이다. 일부 실시 방안에 있어서, 제1 사슬 및 제2 사슬의 코딩 서열에 포함된 기능성 단백질 도메인(예를 들어 항체의 중쇄 가변영역, 경쇄 가변영역, 중쇄, 경쇄 및/또는 다른 생물학적 기능을 갖는 폴리펩티드 등)의 코딩 서열도 단일 복제이다. 일부 실시 방안에 있어서, 제1 사슬과 제2 사슬의 비율은 제1 재조합 바이러스 벡터와 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율을 통해 나타낼 수 있다. 일부 실시 방안에 있어서, 항체 중쇄를 포함하는 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 재조합 바이러스 벡터와 항체 경쇄를 포함하는 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다. 재조합 바이러스 벡터의 비율은 바이러스 게놈 역가와 같은 바이러스 게놈의 양에 따라 계산할 수 있다. 바이러스 게놈의 양 또는 바이러스 게놈 역가의 측정은 액적 디지털 PCR(ddPCR)과 같은 PCR을 통해 측정하는 것과 같이 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0091] 일부 바람직한 실시 방안에 있어서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 폴리펩티드 분자는 모노클로날 항체 또는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 이의 항원 결합 단편이고, 에컨대 Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편 등이다. 제1 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 항원 결합 단편의 중쇄를 포함하고, 제2 사슬은 상기 모노클로날 항체 또는 항원 결합 단편의 경쇄를 포함한다. 더욱 바람직하게는, 제1 사슬 및 제2 사슬의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다. 일부 실시 방안에 있어서, 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 재조합 바이러스 벡터와 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다.

[0092] 다른 일부 바람직한 실시 방안에 있어서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 폴리펩티드 분자는 이중 특이적 항체이고, 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 항원

에피토프에 특이적으로 결합되는 제2 항원 결합 부분을 포함하되, 제1 항원 에피토프와 제2 항원 에피토프가 서로 다르다. 여기서, 상기 제1 항원 결합 부분은 항체 중쇄 및 항체 경쇄를 포함하고, 예를 들어 전장 항체(에컨대 IgG면역글로불린) 또는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 이의 항원 결합 단편이며, 에컨대 Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편 등이다. 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다. 이 기초 상에 형성된 상이한 구조를 갖는 이중 특이적 항체 형태는 모두 본 발명에 응용될 수 있고, 예를 들어, 제2 항원 결합 부분은 임의의 단일 사슬 형태 또는 이중 사슬 형태일 수 있으며, 예를 들어 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편, Fv단편, scFv 또는 단일 도메인 항체 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 제2 항원 결합 부분이 단일 사슬 형태의 항체인 경우, 제2 항원 결합 부분은 제1 항원 결합 부분의 중쇄의 N말단, 중쇄의 C말단, 경쇄의 N말단 또는 경쇄의 C말단에 연결될 수 있거나, 또는 제1 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역 VH와 중쇄 불변 영역 CH1 사이에 연결될 수도 있다. 제2 항원 결합 부분이 이중 사슬 형태의 항체인 경우, 제2 항원 부분의 두가닥의 사슬은 각각 제1 항원 결합 부분의 두가닥의 사슬의 N말단 또는 C말단에 연결될 수 있다. 제2 항원 결합 부분이 Fab인 경우, 제2 항원 결합 부분 중의 “경쇄 가변영역-경쇄 불변 영역(VL-CL)”은 제1 항원 결합 부분의 중쇄 N말단에 연결될 수 있고, 제2 항원 결합 부분 중의 “중쇄 가변영역 - 중쇄 불변 영역CH1(VH-CH1)”은 제1 항원 결합 부분의 경쇄 N말단에 연결될 수 있다. 제2 항원 결합 부분이 Fv단편인 경우, 제2 항원 결합 부분의 중쇄 가변영역은 제1 항원 결합 부분의 중쇄 N말단에 연결될 수 있고, 제2 항원 결합 부분의 경쇄 가변영역은 제1 항원 결합 부분의 경쇄 N말단에 연결될 수 있다.

[0093] 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 두개의 동일한 scFv로 구성되고, 두개의 scFv는 각각 Fab단편의 중쇄 및 경쇄의 N말단에 연결된다. 상기 실시 방안에 있어서, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 중쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 경쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv를 포함한다.

[0094] 다른 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편으로 구성되고, Fab단편의 중쇄는 IgG모노클로날 항체의 경쇄 N말단에 연결되며, Fab단편의 경쇄는 IgG모노클로날 항체의 중쇄 N말단에 연결된다. 상기 실시 방안에 있어서, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 경쇄를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 경쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 중쇄를 포함한다.

[0095] 다른 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 단일 도메인 항체로 구성되고, 여기서 단일 도메인 항체는 IgG모노클로날 항체의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되거나, 또는 IgG모노클로날 항체의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되며, 바람직하게는, 단일 도메인 항체는 IgG모노클로날 항체의 중쇄(예를 들어 중쇄의 N말단 또는 C말단)에 연결된다. 상기 실시 방안에 있어서, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 단일 도메인 항체를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 경쇄를 포함하거나; 또는, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 경쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 단일 도메인 항체를 포함한다.

[0096] 다른 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv로 구성되고, 여기서 scFv는 IgG모노클로날 항체의 경쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되거나, 또는 IgG모노클로날 항체의 중쇄의 N말단 또는 C말단에 연결되며, 바람직하게는, scFv가 IgG모노클로날 항체의 중쇄의 C말단에 연결된다. 상기 실시 방안에 있어서, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 경쇄를 포함하며; 또는, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄를 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 경쇄 및 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv를 포함한다.

[0097] 다른 일부 실시 방안에 있어서, 이중 특이적 항체는 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편, 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv 및 Fc단편으로 구성되고, 여기서 scFv의 N말단은 Fab단편의 중쇄 C말

단과 서로 연결되며, scFv의 C말단은 Fc단편의 N말단과 서로 연결되고, 이러한 유형의 이중 특이적 항체는 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv를 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 IgG모노클로날 항체의 중쇄 불변 영역CH1 및 CH2 사이에 삽입하여 획득한 것으로 간주될 수도 있다. 상기 실시 방안에서, 제1 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 중쇄, 제2 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 scFv 및 Fc단편을 포함하고, 제2 사슬은 제1 항원 에피토프에 특이적으로 결합되는 Fab단편의 경쇄를 포함한다.

[0098] 더욱 바람직하게는, 이중 특이적 항체를 발현시키기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 있어서, 제1 사슬 및 제2 사슬의 비율4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다. 일부 실시 방안에서, 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 재조합 바이러스 벡터와 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다.

[0099] 다른 일부 바람직한 실시 방안에서, 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 폴리펩티드 분자는 제1 표적 분자에 특이적으로 결합되는 제1 항원 결합 부분 및 제2 표적 분자에 특이적으로 결합되는 제2 결합 도메인을 포함하는 항체 융합 단백질일 수도 있다. 여기서 상기 제1 표적 분자는 항원 또는 항원 에피토프이고, 제1 항원 결합 부분은 전장 항체(예컨대 IgG면역글로불린) 또는 중쇄 및 경쇄를 포함하는 이의 항원 결합 단편, 예컨대 Fab단편, Fab' 단편, F(ab')₂단편 등이다. 제1 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 중쇄를 포함하고, 제2 사슬은 상기 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다. 상기 제2 표적 분자는 사이토카인 또는 이의 변이체이고, 상기 제2 결합 도메인은 사이토카인 수용체 또는 이의 세포 외 결합 도메인, 또는 이의 절단 형태 또는 변이체이다. 상기 제2 표적 분자와 상기 제1 표적 분자는 서로 다르다. 상기 제2 결합 도메인은 제1 항원 결합 부분의 중쇄(예를 들어 이의 N말단 및/또는 C말단) 및/또는 경쇄(예를 들어 이의 N말단 및/또는 C말단)에 연결될 수 있다.

[0100] 용어 "변이체"는 모 핵산(또는 폴리펩티드)의 서열과 유사성을 갖고 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드)의 활성을 유지할 수 있는 폴리뉴클레오티드(또는 폴리펩티드)를 의미한다. 예를 들어, 핵산 변이체는 모 핵산에 비해, 5' 말단, 3' 말단 및/또는 하나 또는 복수의 내부 부위에서 하나 또는 복수의 뉴클레오티드의 삽입, 치환 및/또는 결실을 가질 수 있다. 변이체는 모 핵산과 적어도 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 가질 수도 있다. 폴리펩티드의 변이체는 모 폴리펩티드에 비해, 5' 말단, 3' 말단 및/또는 하나 또는 복수의 내부 부위에서 하나 또는 복수의 아미노산의 삽입, 치환 및/또는 결실을 가질 수 있다. 변이체는 모 폴리펩티드와 적어도 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 91%, 약 92%, 약 93%, 약 94%, 약 95%, 약 96%, 약 97%, 약 98%, 약 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 가질 수도 있다. 서열 동일성은 당업자에게 알려진 서열 정렬 프로세스에 의해 확인할 수 있고, 상기 서열 정렬 프로그램은 BLAST, FASTA 또는 Needleman 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0101] 일부 바람직한 실시 방안에서, 상기 제2 표적 분자는 사이토카인이고, 예를 들어 전환 성장 인자 β , 혈관 내피 성장 인자(VEGF) 또는 안지오텐신(Ang2)이다. 일부 실시 방안에서, 상기 제2 결합 도메인은 사이토카인 수용체이고, 예를 들어 전환 성장 인자 β (TGF β) 수용체(예를 들어 TGF- β RII), 혈관 내피 성장 인자 수용체(VEGF) 수용체 또는 안지오텐신(Ang2) 수용체 등 또는 이의 단편(예를 들어 세포 외 도메인 ECD) 또는 이들의 변이체이다. 상기 사이토카인 및 사이토카인 수용체는 인간화된 것일 수 있다. 일부 실시 방안에서, 제2 결합 도메인은 TGF β RII의 세포 외 영역 또는 이의 변이체이고, 예를 들어 TGF β RII의 세포 외 영역(예를 들어 특허 출원 WO2018/205985의 SEQ ID NO:13 참조), TGF β RII의 가용성 세포 외 영역(예를 들어 특허 출원 WO2018/129331의 SEQ ID NO:10 참조)TGF- β RII의 세포 외 영역의 N말단 절단 형태(예를 들어 특허 출원 WO2018/205985의 SEQ ID NO:14 또는 SEQ ID NO:15 참조)이다. 바람직한 실시 방안에서, 상기 제1 항원 결합 부분은 항PD-1항체, 항PD-L1항체, 항VEGF항체 또는 항Ang2항체이다.

[0102] 더욱 바람직하게는, 상기 항체 융합 단백질을 발현시키기 위한 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 있어서, 제1 사슬과 제2 사슬의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다. 일부 실시 방안에서, 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 재조합 바이러스 벡터와 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 재조합 바이러스 벡터의 비율은 4:1-1:8일 수 있고, 예를 들어 4:1-1:6, 2:1-1:6, 2:1-1:4, 1:1-1:4 또는 1:2-1:4일 수 있으며, 예를 들어 1:1, 1:2, 1:3 또는 1:4일 수 있고, 가장 바람직하게는 1:2-1:4이다.

[0103] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에 의해 발현된 항체 또는 항원 결합 부분(예를 들어 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편, 이중 특이적 항체 중의 제1 항원 결합 부분 및/또는 제2 항원 결합 부분, 및 항체 융합 단백질 중의 제1 항원 결합 부분)은 임의의 항원에 특이적으로 결합되는 항체 또는 항원 결합 부분일 수 있고, 상기 항원은 미생물 항원, 종양 특이적 항원, 사이토카인, 혈관 신생 관련 타겟 및 면역 관문 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 특별히 바람직한 실시 방법에 있어서, 항체 또는 항원 결합 부분은 혈관 신생 관련 타겟에 특이적으로 결합된다. 상기 혈관 신생 관련 타겟은 혈관생성인자, 즉 혈관 생성, 내피 세포 성장 및/또는 혈관 안정성을 촉진하는 것과 같은 혈관 발육을 자극하는 인자를 의미한다. 상기 혈관생성인자는 예를 들어 혈관 신생에 관련된 질병의 치료 타겟으로 할 수 있고, 이러한 혈관생성인자에 대한 억제제(예를 들어 항체)를 이용하여 치료한다. 상기 혈관생성인자는 혈관 내피 성장 인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 혈관 내피 성장 인자 수용체(Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor, FGF), 혈소판 유래 성장 인자(Platelet derived growth factor, PDGF), 전환 성장 인자(Transforming growth factor beta, TGF β), 안지오텐신 1(Angiotensin 1, Ang1), 안지오텐신 2(Angiotensin 2, Ang2), 인테그린(Integrin), CD31 및 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activators)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 방법에 있어서, 본 발명의 항체 또는 항원 결합 부분은 항혈관생성인자의 항체이고, 상기 혈관생성인자는 혈관 내피 성장 인자(Vascular endothelial growth factor, VEGF), 혈관 내피 성장 인자 수용체(Vascular endothelial growth factor receptor, VEGFR), 섬유아세포 성장 인자(Fibroblast growth factor, FGF), 혈소판 유래 성장 인자(Platelet derived growth factor, PDGF), 전환 성장 인자(Transforming growth factor beta, TGF β), 안지오텐신 1(Angiotensin 1, Ang1), 안지오텐신 2(Angiotensin 2, Ang2), 인테그린(Integrin), CD31 및 플라스미노겐 활성화제(plasminogen activators)로부터 선택되는 하나, 둘 또는 그 이상이다. 당업자가 알고 있는 바와 같이, 항체 또는 항원 결합 부분이 특정 항원에 특이적으로 결합된다고 언급되는 경우, 상기 항체 또는 항원 결합 부분이 상기 항원 상의 임의의 에피토프에 특이적으로 결합되는 것을 의미한다.

[0104] 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항체 또는 항원 결합 부분은 항혈관 내피 성장 인자(VEGF) 및/또는 항안지오텐신 2(Ang2)의 항체일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 Avastin이다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:19(예를 들어 SEQ ID NO:2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있는)로 표시되는 중쇄 서열에 포함된 3개의 중쇄 CDR 서열과 동일한 중쇄 CDR서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:19(예를 들어 SEQ ID NO:2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있음)로 표시되는 중쇄 서열에 포함된 중쇄 가변영역 서열과 동일한 중쇄 가변영역 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:19(예를 들어 SEQ ID NO:2로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있음)로 표시되는 중쇄 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:20(예를 들어 SEQ ID NO:5로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있음)으로 표시되는 경쇄 서열에 포함된 3개의 경쇄 CDR서열과 동일한 경쇄 CDR서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:20(예를 들어 SEQ ID NO:5로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있음)으로 표시되는 경쇄 서열에 포함된 경쇄 가변영역 서열과 동일한 경쇄 가변영역 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항VEGF항체는 SEQ ID NO:20(예를 들어 SEQ ID NO:5로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩할 수 있음)으로 표시되는 경쇄 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체는 ABTAA이다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체는 SEQ ID NO:21로 표시되는 중쇄 가변영역 서열에 포함된 3개의 중쇄 CDR서열과 동일한 중쇄 CDR서열을 갖거나, 또는 SEQ ID NO:7로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 중쇄 서열에 포함된 3개의 중쇄 CDR서열과 동일한 중쇄 CDR서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체는 SEQ ID NO:21로 표시되는 중쇄 가변영역 서열을 갖거나, 또는 SEQ ID NO:7로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 중쇄 서열에 포함된 중쇄 가변영역 서열과 동일한 중쇄 가변영역 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체는 SEQ ID NO:22로 표시되는 경쇄 가변영역 서열에 포함된 3개의 경쇄 CDR서열과 동일한 경쇄 CDR서열을 갖거나, 또는 SEQ ID NO:10으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 경쇄 서열에 포함된 3개의 경쇄 CDR 서열과 동일한 경쇄 CDR서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체는 SEQ ID NO:22로 표시되는 경쇄 가변영역 서열을 갖거나, 또는 SEQ ID NO:10으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 경쇄 서열에 포함된 경쇄 가변영역 서열과 동일한 경쇄 가변영역 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체의 중쇄는 SEQ ID NO:7로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 항Ang2항체의 경쇄는 SEQ ID NO:10으로 표시되는 뉴클레오타이드 서열로 코딩된 아미노산 서열을 갖는다.

[0105] 본 발명에서, 어느 아미노산 서열이 다른 아미노산 서열의 N말단에 연결된다고 언급되는 경우, 전자의 C말단과 후자의 N말단이 서로 연결된 것을 의미하고, 어느 아미노산 서열이 다른 아미노산 서열의 C말단에 연결된다고

언급되는 경우, 전자의 N말단과 후자의 C말단이 서로 연결된 것을 의미한다는 것을 이해해야 한다. 본 발명에서, 두개의 펩티드 사슬 또는 두개의 아미노산 서열이 연결 또는 서로 연결된다고 언급되는 경우, 이들은 직접 서로 연결될 수 있고, 펩티드 링커(또는 연결 펩티드로 칭함)를 통해 서로 연결될 수도 있다. 펩티드 링커는 유연성이 풍부한 글리신 및 용해성을 갖는 세린 또는 트레오닌을 포함하거나 또는 이들로 구성된다. 펩티드 링커는 예를 들어 GS링커일 수 있고, 그 길이는 예를 들어 5개 내지 약 25개의 아미노산일 수 있다. “GS링커”는 글리신(G) 및 세린(S)의 GS조합이고, 복수의 단백질을 함께 연결하여 융합 단백질을 형성하는 데 사용된다. 일반적으로 사용되는 GS조합은 (GGGS)_n이고, n의 크기를 변경하여 링커 서열의 길이를 변경하며, 예를 들어 (GGGS)₃(즉 GGGSGGGSGGGGS, SEQ ID NO:16)을 이용할 수 있고, 상기 링커는 예를 들어 SEQ ID NO:11로 표시되는 서열로 코딩될 수 있으며; 글리신 및 세린은 다른 조합을 통해 GGGSGGGGS(SEQ ID NO:17)와 같은 다른 링커 서열을 생성할 수 있다. 펩티드 링커는 ESKYGPPSP(SEQ ID NO:23)와 같은 다른 서열일 수도 있고, 상기 펩티드 링커는 예를 들어 SEQ ID NO:14로 표시되는 핵산 서열로 코딩될 수 있다. 적합한 펩티드 링커는 당업자가 확정할 수 있다.

[0106] 당업자는 상기 제1 사슬 및/또는 상기 제2 사슬은 또한 코딩이 허용되는 폴리펩티드가 분비한 리더 서열(즉 신호 펩티드)을 포함하여, 제1 사슬 및/또는 제2 사슬이 재조합 바이러스 벡터를 통해 형질도입된 세포에서 분비의 형식으로 생산될 수 있는 것을 이해해야 한다. 신호 펩티드는 제1 사슬 및/또는 제2 사슬의 N말단에 놓일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편이고, 제2 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 중쇄를 포함하고, 제1 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 모노클로날 항체 또는 이의 항원 결합 단편의 경쇄를 포함한다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 이중 특이적 항체이고, 제2 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 제1 항원 결합 부분의 중쇄, 연결 펩티드, 단일 사슬 형태의 제2 항원 부분을 포함하고, 제1 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 폴리펩티드 분자는 항체 융합 단백질이고, 제2 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 제1 항원 결합 부분의 중쇄, 연결 펩티드, 제2 결합 도메인을 포함하고, 제1 사슬에서 N말단으로부터 C말단까지 순차적으로 리더 서열, 제1 항원 결합 부분의 경쇄를 포함한다. 일부 실시 방법에 있어서, 리더 서열은 MGWSCIILFLVATATGVHS(SEQ ID NO:18)일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 상기 리더 서열의 코딩 뉴클레오타이드 서열은 SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:6 또는 SEQ ID NO:9이다.

[0107] 재조합 바이러스 벡터

[0108] 본 발명에서 언급한 용어 “벡터”는 핵산, 플라스미드 또는 바이러스 등과 같은 그 중에 포함된 이중 핵산을 숙주 세포 내로 운반(유리 형태로 존재하거나 숙주 세포 계놈에 통합)할 수 있는 분자를 의미한다.

[0109] 본 발명에서 언급한 “재조합”은 벡터에 비벡터 천연 서열의 이중 서열을 포함하는 것을 의미하고, 상기 이중 서열은 본 발명의 폴리펩티드 분자와 같은 목적 단백질을 발현시키기 위한 관심 핵산일 수 있다.

[0110] 본 발명에서 언급한 “이중 핵산”, “이중 서열” 또는 “관심 핵산”은 서로 교환하여 사용할 수 있고, 이들을 포함한 벡터, 숙주 세포의 핵산 서열에 비자연적으로 존재하는 것을 의미한다. 이중 핵산은 본 발명의 폴리펩티드 분자를 코딩하는 것과 같이 목적 단백질을 코딩하는 핵산 서열일 수 있다.

[0111] 본 발명에 사용되는 용어 “재조합 바이러스 벡터”, “재조합 바이러스” 또는 “재조합 바이러스 입자”는 서로 교환하여 사용할 수 있고, 관심 핵산(예를 들어 본 발명의 폴리펩티드 분자에 포함된 제1 사슬 및 제2 사슬의 코딩 핵산 서열)이 세포로 전이되도록 매개하여 폴리펩티드 산물의 발현을 허용할 수 있는 재조합 바이러스 또는 재조합 바이러스 입자를 의미하며, 통상적으로 바이러스 입자에 패키징되는 재조합 바이러스 계놈을 포함하고(예를 들어 바이러스 캡시드에 패키징되고, 일부 바이러스는 피막 당당백질도 포함), 상기 재조합 바이러스 계놈에는 관심 핵산이 포함된다. 본 발명의 폴리펩티드 분자를 발현시키는 데 사용될 수 있는 재조합 바이러스 벡터는 여러 유형의 바이러스에서 유래한 바이러스 벡터일 수 있고, 아데노-관련 바이러스(AAV)벡터, 아데노 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스(HSV)벡터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0112] 재조합 바이러스 벡터의 생산 방법은 이용되는 바이러스 벡터의 종류에 따라 다를 수 있으나, 모두 당업자가 숙지하는 방법이고, 일반적으로, 재조합 바이러스 계놈(통상적으로 적어도 말단 반복 서열, 패키징 신호 서열 등 이중 핵산 및 바이러스 생산에 필요한 시스 핵산 요소 포함)을 포함하는 발현 플라스미드와 패키징 플라스미드 및 임의의 기타 보조 플라스미드를 이용하여 패키징 세포주를 공동 형질감염하여 얻을 수 있다. 적합한 조건하

에서 공동 형질감염된 패키징 세포주를 배양하고, 세포 용해물 및/또는 배양 상등액에서 바이러스 입자를 수집할 수 있다. 패키징 세포주에 패키징 플라스미드에 포함된 바이러스 핵산 요소가 이미 포함된 경우, 패키징 플라스미드를 이용하지 않을 수도 있고, 발현 플라스미드만 이용하여 상기 패키징 세포주를 형질감염하기만 하면 된다. 재조합 바이러스 벡터를 생산하기 위한 배지는 당업자에게 알려진 것이고, 상업적으로 구매하거나 맞춤형 배지를 사용하거나, 또는 본 기술 분야에 알려진 하나 또는 복수의 세포 배양 성분을 추가로 보충 첨가할 수 있고, 배양물 중 재조합 바이러스 입자의 역할을 추가 생산하도록 포도당, 비타민, 아미노산 및/또는 성장 인자를 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 재조합 바이러스 벡터 생산 배양물은 사용된 특정 숙주 세포(즉 패키징세포)에 적합한 조건 하에서 성장할 수 있다. 재조합 바이러스 벡터를 생산한 후, 필요한 경우, 다양한 통상적인 방법을 이용하여 세포 용해물 또는 바이러스 상등액에서 바이러스 입자를 정제할 수 있고, 이러한 방법은 칼럼 크로마토 그래피, CsCl 구배법 등을 포함한다. 예를 들어, 음이온 교환 칼럼, 친화성 칼럼 및/또는 양이온 교환 칼럼 등 복수의 칼럼 정제 단계를 사용하여 정제할 수 있다.

[0113] 본 발명에서 언급한 “형질감염”은 핵산 분자, 플라스미드 등과 같은 폴리뉴클레오티드를 세포 외에서 세포 내로 전이시켜 상기 폴리뉴클레오티드가 상기 세포에서 기능을 갖게 하는 것을 의미한다. 형질감염 방법은 당업자에게 잘 알려진 방법이고, 예를 들어 인산칼슘 또는 리보솜에 의해 매개되는 형질감염이다.

[0114] 여러 유형의 세포를 패키징 세포주로 사용할 수 있다. 예를 들어, 사용할 수 있는 패키징 세포주는 포유동물(인간 포함)세포, 곤충 세포, 식물 세포, HEK293시리즈의 세포(예컨대 HEK293A, HEK293T 또는 HEK293FT), HeLa세포, A549세포, Vero세포, hARPE-19세포와 같은 미생물 또는 효모, 및 SF-9와 같은 곤충 유래 세포주를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 재조합 바이러스 벡터의 여러 종류에 따라 적합한 패키징 세포주를 선택할 수 있다.

[0115] 본 발명의 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 같거나 다른 종류의 바이러스에서 유래한 바이러스 벡터일 수 있고, 예를 들어 둘 모두 아데노-관련 바이러스(AAV)벡터, 아데노 바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스(HSV)벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터일 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터에 포함된 바이러스 요소(핵산 요소, 캡시드, 및 임의의 피막 당단백질 등을 포함)는 모두 같고, 포함된 이중 핵산에서만 다소 다를 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 동일 유형의 바이러스에서 유래되지만, 포함된 바이러스 요소는 같거나 다를 수 있으며, 예를 들어 각각 동일 유형 바이러스의 다른 혈청형에서 유래할 수 있다.

[0116] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템에서, 본 발명의 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 조성물의 형태로 제공될 수 있고, 예를 들어, 서로 혼합되거나 또는 각각 단독 형태로 제공되며, 다시 말해서 둘은 서로 혼합되지 않는다.

[0117] 본 발명에서 언급한 “재조합 바이러스 벡터 게놈(vg)” 또는 “재조합 바이러스 게놈(vg)”은 서로 교환하여 사용할 수 있는 것은 바이러스 캡시드 중에 패키징된 폴리뉴클레오티드 서열은 관심 핵산을 포함한 발현 카세트 및 바이러스 생산에 필요한 시스 핵산 요소를 적어도 포함하고, 또한 기타 바이러스 핵산 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다. 재조합 바이러스 벡터의 상이한 종류에 따라, 재조합 바이러스 벡터 게놈은 단일 사슬 DNA, 이중 사슬 DNA 또는 단일 사슬 RNA 또는 이중 사슬 RNA를 포함할 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 재조합 바이러스 벡터 게놈의 양 또는 역가는 vg/mL로 측정할 수 있다.

[0118] 용어 “발현 카세트”는 발현 조절 서열과 조작 가능하게 연결된 관심 핵산을 포함하는 선형 핵산을 의미한다. 상기 관심 핵산은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬과 같은 산물을 코딩 발현시킨다. 상기 발현 조절 서열은 관심 핵산으로부터 목적 폴리펩티드를 발현시키는 과정에서 조절 제어 작용을 갖는 서열을 의미하고, 프로모터, 인핸서, 터미네이터, 선택 표지 유전자, 전사 후 조절 요소, 내부리보솜유입점(IRES) 및/또는 폴리아데닐화 신호 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서, 제1 사슬을 발현시키기 위한 제1 발현 카세트 및 제2 사슬을 발현시키기 위한 제2 발현 카세트에는 같거나 다른 발현 조절 서열이 포함될 수 있고, 예를 들어 같거나 다른 프로모터, 같거나 다른 인핸서, 같거나 다른 터미네이터, 같거나 다른 선택 표지 유전자, 같거나 다른 전사 후 조절 요소, 같거나 다른 내부리보솜유입점(IRES) 및/또는 같거나 다른 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0119] 본 발명에 사용할 수 있는 프로모터는 바이러스, 포유동물(사람 포함), 박테리아, 효모 또는 식물 유래 프로모터 등을 포함할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 프로모터는 구성적, 유도적 또는 세포 또는 조직 특이적일 수 있다. 바이러스 프로모터의 예시로는 거대 세포 바이러스(CMV) 즉시 초기 프로모터, RSV프로모터, 닭 베타-액틴(CBA) 프로모터, CMV조기 인핸서/닭 β -액틴(CAG) 프로모터, 유인원 바이러스 40(SV40) 프로모터, 칼리플라워 모

자이크 바이러스(CaMV)의 35SRNA 및 19SRNA프로모터, 담배 모자이크 바이러스(TMV)의 외피 단백질 프로모터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 식물 프로모터의 예시로는 열 충격 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 포유동물 프로모터의 예시로는 인간 연장 인자 1a(EF1a) 프로모터, 인간 유비퀴틴(UCB) 프로모터, 마우스 포스포글리세르산 키나제(PGK) 프로모터, RNA중합효소III형 프로모터(에컨대 U6 및 H1) 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 구성적 프로모터의 예시로는 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR프로모터, 거대세포 바이러스(CMV) 프로모터, SV40프로모터, 디히드로엽산 환원효소 프로모터, β -액틴 프로모터 및 포스포글리세르산 키나제(PGK) 프로모터 및 EF1a프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 유도형 프로모터의 예시로는 아연 유도 양 메탈로티오네인(MT) 프로모터, 텍사메타손(Dex) 유도 마우스 유방암 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 중합효소 프로모터 시스템 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 세포 또는 조직 특이적 프로모터는 특정 조직 또는 세포 유형에서 유전자를 발현하도록 구동시킬 수 있기에, 본 발명의 폴리펩티드 분자를 특정 세포, 조직 또는 기관에 전달하는 데 사용될 수 있고, 그 예시로는 관심있는 핵산이 간상 및 원추 감광 세포 및 망막 세포 주에서 발현하도록 구동되는 로돕신 키나제(RK) 프로모터, 간 특이적 TTR 프로모터, 인간 α 1-항트립신(hAAT) 프로모터 및 TBG 프로모터, 성숙 뉴런 특이적 hSyn 프로모터, 투사 뉴런 특이적 CaMKIIa 프로모터, 성상 교세포 특이적GfaABC1D 프로모터, 심근 특이적 cTNT 프로모터를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 이용하여 폴리펩티드 분자를 전달하여 유전자 치료를 진행할 때, 상기 폴리펩티드 분자가 대상체 체내의 세포에서 발현되는 것을 기대하므로, 바이러스, 포유동물(사람 포함)에서 유래한 프로모터가 바람직하다. 숙주 세포를 사용하여 본 발명의 폴리펩티드 분자를 생산할 때, 숙주 세포에서 프로모터 활성을 갖는 임의의 유래의 프로모터를 사용할 수 있다.

[0120] 전사 후 조절 요소는 숙주 세포에서의 관심 폴리펩티드의 발현 수준을 증가시킬 수 있다. 본 발명에 사용할 수 있는 전사 후 조절 요소는 예를 들어 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE), B형 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(HBVPRE) 또는 RNA 수송 요소(RTE) 등과 같은 바이러스 전사 후 조절 요소일 수 있다.

[0121] 발현 카세트는 약물 내성 선택 표지와 같은 세포(예를 들어 재조합 바이러스 벡터를 생산하기 위한 패키징 세포주, 또는 재조합 바이러스 벡터로 형질도입된 세포)에서 유효한 선택 표지된 유전자를 더 포함할 수 있다. 이런 선택 표지 유전자는 선택 배지에서 성장하는 세포의 생존 또는 성장에 필요한 인자를 코딩할 수 있다. 선택 유전자를 포함하는 벡터로 형질전환되지 않은 숙주 세포는 배지에서 생존하지 못한다. 항생제 또는 기타 독소에 대한 내성을 부여하거나, 영양 결핍성 결함을 보충하거나, 배지에서 압류된 주요 영양소를 공급하는 단백질을 선택 표지로 선택할 수 있고, 항생제 또는 기타 독소의 예시로는 암피실린, 하이그로마이신, 네오마이신, 메토틱세이트, 카나마이신, 젠타마이신, 제오신 또는 테트라사이클린을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0122] 폴리아데닐화 신호 서열은 3' 비번역 영역과 같은 전사 종결 영역에 위치할 수 있고, 그 예시로는 소 성장 호르몬(BGH)poly(A), SV40 후기 poly(A), 티미딘 키나제(TK)poly(A)서열 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0123] 본 발명은 제1 재조합 바이러스 벡터를 생산하기 위한 제1 플라스미드 및 제2 재조합 바이러스 벡터를 생산하기 위한 제2 플라스미드를 각각 포함하는 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 생산하기 위한 이중 플라스미드 시스템을 더 제공한다. 제1 플라스미드는 제1 발현 카세트를 함유하는 재조합 바이러스 계놈을 포함하고, 제2 플라스미드는 제2 발현 카세트를 함유하는 재조합 바이러스 계놈을 포함한다. 제1 플라스미드 및 제2 플라스미드는 각각 임의의 패키징 플라스미드 및 임의의 기타 보조 플라스미드와 패키징 세포주를 공동 형질감염하여 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터를 얻는다. 상이한 유형의 재조합 바이러스 벡터에 대해, 당업자는 재조합 바이러스 계놈을 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 생산하기 위한 플라스미드, 패키징 플라스미드 및 기타 보조 플라스미드의 구축 방법을 잘 알고, 패키징 세포주의 선택 및 이러한 플라스미드로 패키징 세포주를 공동 형질감염하여 재조합 바이러스 벡터를 얻는 방법도 잘 알고 있다.

[0124] 재조합 AAV벡터(rAAV벡터)

[0125] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어 제1 재조합 바이러스 벡터 및/또는 제2 재조합 바이러스 벡터)는 재조합 아데노-관련 바이러스 벡터일 수 있다. 아데노-관련 바이러스(AAV)는 무피막 천연 복제 결함형 DNA바이러스이고, 파르보바이러스에 속하며, 이의 단일 사슬 DNA계놈 길이가 약 4.7 kb이고, 복제 단백질(Rep) 및 바이러스 캡시드(Cap)를 코딩하는 유전자 및 유전자 양측에 위치한 두개의 145 bp의 역말단 반복 서열(ITR)을 포함한다. ITR은 AAV 복제 및 패키징에 필수적인 최소 자체 서열이고, 또한 AAV 통합, 복제 및 패키징에 필수적인 시스템 작용 요소이므로, AAV 바이러스 계놈의 나머지 부분을 관심 핵산을 포함하는 발현 카세트로 대체하는 동시에 Rep 및 Cap을 코딩하는 유전자를 다른 플라스미드에 트랜스 제공하여 재조합 AAV벡터를 생산할 수 있다. 바이러스 계놈에 rep 및 cap 유전자가 없는 경우, AAV벡터는 형질도입된 세포의 계놈에 통합되지 않고 형질도입된 세

포의 세포핵에 에피솜(episome) 형태로 존재할 수 있다. 자연 시스템에서 AAV의 감염은 헬퍼바이러스(예를 들어 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스)의 참여를 필요로 하고, 헬퍼바이러스는 감염된 세포에서 AAV의 복제를 허용하여 생성된 E1A, E1B, E2A, E4, VA 등과 같은 유전자를 제공한다. 재조합 AAV백터의 생산에 헬퍼바이러스를 사용하지 않고, 헬퍼바이러스에 포함된 필수 유전자를 포함하는 플라스미드를 사용하여 해당 보조 기능을 제공할 수 있다.

[0126] 본 발명에서 언급한 “재조합 AAV백터”는 AAV에서 유래한 구조 및/또는 기능성 핵산 요소를 포함하고, 바이러스 게놈에 포함된 관심 핵산을 세포로 전이할 수 있는 AAV 입자를 의미하며, 통상적으로 AAV 캡시드와 캡시드에 패키징된 재조합 바이러스 게놈을 포함하며, 상기 재조합 바이러스 게놈은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬의 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함한다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 상기 바이러스 게놈은 발현 카세트 양측에 위치한 AAV역말단 반복 서열(ITR)을 더 포함한다.

[0127] AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 및 AAV Rh10 등을 포함하는 상이한 혈청형을 가진다. 각 혈청형의 AAV의 캡시드 단백질은 다른 수용체에 결합할 수 있고, 예를 들어 AAV2는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPG)에 결합하고, AAV1, AAV5 및 AAV6은 N-연결 시알산에 결합하며, AAV3은 아세틸헤파린에 결합하고, AAV9는 N-말단 갈락토오스 잔기에 결합하여, 이로써, 상이한 혈청형의 AAV가 상이한 세포, 조직 또는 기관 등에 대해 상이한 표적성을 갖도록 한다. 예를 들어 AAV1-9는 색소 상피 및 광수용체 세포와 같은 망막의 다양한 유형의 세포를 표적화할 수 있고, AAV8은 마우스에서 간세포 친화성을 가지며, AAV8 및 AAV9는 전신의 다양한 근육 유형을 표적화할 수 있으며, AAV9는 근육에 대한 친화성이 더욱 강하고, AAV9는 마우스에서 뇌혈액 장벽(BBB)을 통과할 수 있다. 당업자는 상이한 AAV혈청형 및 상이한 AAV캡시드를 갖는 AAV백터가 상이한 세포, 조직 및 기관에 대한 친화성을 이해할 수 있다.

[0128] 본 발명의 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터는 다양한 혈청형의 AAV 유래 핵산 요소를 사용하여 재조합 AAV백터를 구축할 수 있고, 특히 표적화하려는 세포, 조직 및/또는 기관에 따라 캡시드의 혈청형을 선택할 수 있다. 특히, 본 발명의 제1 재조합 AAV백터 및 제2 재조합 AAV백터는 각각 독립적으로 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10의 캡시드, 키메라 AAV캡시드 또는 변형된 AAV캡시드를 사용할 수 있다. 바람직한 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및 제2 재조합 AAV백터는 동일한 항성을 갖는 캡시드를 포함하고, 예를 들어 동일한 세포, 조직 및/또는 기관을 표적화할 수 있는 캡시드를 포함하며, 바람직하게는 동일한 AAV 혈청형 유래 캡시드를 포함한다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터는 AAV2, AAV5, AAV8 또는 AAV9에서 유래한 캡시드를 포함한다.

[0129] 키메라 AAV캡시드 및 변형된 AAV캡시드는 AAV백터의 항성을 변경하고, 특정 세포, 조직 및/또는 기관에 대한 AAV백터의 표적성을 변경하거나 증가시키는 데 사용될 수 있다. 용어 “항성”은 특정 세포, 조직 및/또는 기관에 대한 재조합 바이러스 백터의 표적성을 의미한다. 용어 “키메라 AAV캡시드”는 AAV캡시드 단백질이 두가지 이상의 상이한 AAV혈청형에서 유래한 아미노산 서열(예를 들어 도메인)을 포함하고 AAV캡시드를 형성할 수 있는 것을 의미하며, 그 예시로는 AAV DJ의 캡시드를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 용어 “변형된 AAV캡시드”는 AAV 캡시드 단백질이 하나 이상의 아미노산의 삽입, 치환 또는 결실을 포함하거나 다른 결합 도메인에서 유래한 폴리펩티드에 의해 형성된 AAV 캡시드를 삽입하는 것을 의미하고, 그 예시로는 AAV2-7m8을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13 또는 AAV Rh10에서 유래한 ITR을 포함한다. 제1 재조합 AAV백터 및 제2 재조합 AAV백터에 포함된 ITR은 동일한 AAV혈청형 또는 상이한 AAV혈청형에서 유래한 ITR일 수 있다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터의 ITR은 AAV2, AAV5, AAV8 또는 AAV9에서 유래한다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및 제2 재조합 AAV백터의 ITR은 동일한 AAV혈청형에서 유래하고, 예를 들어 모두 AAV2, AAV5, AAV8 또는 AAV9에서 유래한다.

[0130] 본 발명의 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터에서, 캡시드 및 ITR는 같거나 상이한 AAV 혈청형에서 유래할 수 있다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터에서, ITR 및 캡시드는 상이한 AAV혈청형에서 유래할 수 있고, 예를 들어, AAV2 ITR 및 비AAV2의 캡시드를 선택할 수 있으며, 예를 들어 AAV5, AAV8 또는 AAV9의 캡시드를 함께 사용할 수 있다. 일부 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및/또는 제2 재조합 AAV백터에서, ITR 및 캡시드는 동일한 AAV혈청형에서 유래할 수 있고, 예를 들어 모두 AAV2, AAV5, AAV8 또는 AAV9에서 유래한다. 바람직한 실시 방안에서, 제1 재조합 AAV백터 및 제2 재조합 AAV백터의 ITR은 동일한 혈청형, 예를 들어 AAV2에서 유래하고, 둘의 캡시드도 동일한 AAV혈청형, 예를 들어 AAV2, AAV5, AAV8 또는 AAV9에서 유래한다.

[0131] 재조합 AAV백터의 생산 방법은 당업자에게 알려져있고, 예를 들어 패키징 세포주에 재조합 AAV게놈을 포함한 핵산 분자, AAV rep 및 cap단백질을 코딩하는 뉴클레오티드를 포함하는 핵산 분자 및 헬퍼바이러스(에컨대 아데노 바이러스 또는 단순 포진 바이러스)유전자를 포함하는 핵산 분자를 제공함으로써, 재조합 AAV를 생산할 수 있다. AAV의 cap유전자 및 rep유전자를 패키징 세포에 통합할 수도 있고, 이렇게 생산 시 재조합 AAV게놈을 포함한 핵산 분자 및 헬퍼바이러스 유전자를 포함한 핵산 분자만으로 패키징 세포주를 형질감염하기만 하면 된다. 상기 핵산 분자는 예를 들어 플라스미드를 통해 제공할 수 있다. 이용 가능한 재조합 AAV생산 방법으로 재조합 AAV게놈을 포함한 전이 플라스미드, AAV의 rep유전자 및 cap유전자를 포함한 pRC플라스미드 및 보조 유전자(예를 들어 E2A, E4 및 VA RNA유전자)를 포함한 pHelper플라스미드를 패키징 세포에 공동 형질감염하고, 적합한 조건하에서 세포를 배양한 후, 세포 용해물 및/또는 배양물 상등액에서 재조합 AAV백터를 정제하는 3-플라스미드 공동 형질감염법을 포함한다. 여기서 재조합 AAV발현 백터를 생산하기 위한 전이 플라스미드는 발현 카세트 및 발현 카세트 양측에 위치한 AAV역말단 반복 서열을 포함할 수 있다.

[0132] 재조합 아데노바이러스 백터

[0133] 본 발명의 재조합 바이러스 백터(예를 들어 제1 재조합 바이러스 백터 및/또는 제2 재조합 바이러스 백터)는 재조합 아데노바이러스 백터일 수 있다. 아데노 바이러스는 무피막 이중 사슬 선형 DNA바이러스이고, 게놈은 대략 36 kb이다. 아데노 바이러스 게놈은 양단에 위치한 역말단 반복 서열(ITR), 패키징 신호 서열, 초기 유전자(코딩 조절 유전자 E1, E2, E3 및 E4) 및 후기 유전자(코딩 구조 유전자 L1-L5)를 포함한다. 아데노 바이러스는 50 개를 초과하는 혈청형을 포함하고, 6개의 상이한 서브 그룹 A-F로 나뉜다. 본 발명의 재조합 바이러스 백터는 아데노 바이러스의 임의의 혈청형에서 유래할 수 있고, 바람직하게는 Ad2, Ad5 및 Ad55와 같은 서브 그룹 C 아데노 바이러스 또는 이의 변이체에서 유래한다. E3은 바이러스 복제 비필수적인 영역이고, E3영역의 결실은 재조합 아데노바이러스 백터의 생산에 영향을 미치지 않는다. E1A 및/또는 E1B의 결실로 인해 재조합 바이러스의 복제가 불가능하여, 복제 결함형 아데노 바이러스 백터를 생성할 수 있다. 본 발명의 아데노 바이러스 백터는 E1A 및/또는 E1B가 결실된 복제 결함형 아데노 바이러스 백터와 같은 결함형 아데노 바이러스 백터일 수 있다. 재조합 아데노바이러스 백터의 생산에 있어서, 후기 유전자, E1, E2, E3 및/또는 E4는 다른 핵산 분자(에컨대 플라스미드)를 통해 트랜스 제공될 수 있고, 따라서 렌티바이러스 게놈 중의 이러한 유전자의 전부 또는 일부가 결실되며, 관심 핵산을 포함한 발현 카세트로 대체하는 동시에, 다른 하나 이상의 핵산 분자(에컨대 플라스미드)에 후기 유전자, E1, E2, E3 및/또는 E4를 트랜스 제공하여, 재조합 렌티바이러스 백터를 생산한다. 일부 실시 방법에 있어서, E3을 제공하지 않을 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 재조합 아데노바이러스 백터는 복제 결함형이고, E1의 적어도 일부가 결실되며, 이때 다른 핵산 분자(에컨대 플라스미드)에 E2 및 E4를 트랜스 제공하고, E1은 패키징 세포주에서 제공할 수 있으며, 예를 들어 HEK293의 세포주 및 PER.C6세포주에서 유래할 수 있고, 이는 아데노 바이러스의 E1영역을 포함한다.

[0134] 본 발명에서 언급한 “재조합 아데노바이러스 백터”는 아데노 바이러스에서 유래한 구조 및/또는 기능성 핵산 요소를 포함하고, 바이러스 게놈에 포함된 관심 핵산을 세포 중에 전이할 수 있는 아데노 바이러스 입자를 의미하고, 통상적으로 아데노 바이러스 캡시드 및 캡시드에 패키징된 재조합 아데노바이러스 게놈을 포함한다. 상기 재조합 아데노 바이러스 게놈은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬을 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함한다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 재조합 아데노바이러스 게놈은 적어도 게놈 양단에 위치한 역말단 반복 서열(5' ITR 및 3' ITR) 및 Ψ 패키징 신호 서열을 더 포함한다. 본 발명의 재조합 아데노바이러스 백터는 Ad2, Ad5 및 Ad55에서 유래할 수 있다.

[0135] 관심 핵산을 포함하는 재조합 아데노 바이러스 백터는 당업자에게 알려진 임의의 기술을 통해 제조할 수 있고, 예를 들어 본 기술 분야에 알려진 AdEasy법 또는 AdMAX법을 통해 제조할 수 있다. 예를 들어, 관심 핵산을 포함한 셔틀 플라스미드(Shuttle plasmid), 및 아데노 바이러스 일부 유전자를 포함한 아데노 바이러스 백본 플라스미드를 이용하여 패키징 세포주를 형질감염하여, 재조합 아데노바이러스 백터를 얻을 수 있다. 상기 셔틀 플라스미드는 발현 카세트(여기서 본 발명의 제1 발현 카세트 또는 제2 발현 카세트와 같은 관심 핵산 포함) 및 역말단 반복 서열 등 패키징 신호 서열과 같은 재조합 아데노바이러스 생산에 필수적인 시스템 핵산 요소 등을 포함하는 재조합 아데노바이러스 게놈을 포함한다. 상기 아데노 바이러스 백본 플라스미드는 후기 유전자, E1, E2, E3 및/또는 E4를 포함하고, 패키징 신호 서열을 포함하지 않을 수 있다. 셔틀 플라스미드 및 아데노 바이러스 백본 플라스미드를 이용하여 패키징 세포주를 형질감염하고, 이들의 세포에서 상동 재조합 또는 부위 특이적 재조합이 발생하도록 함으로써, 재조합 아데노바이러스를 생산한다. 상기 부위 특이적 재조합은 예를 들어 Cre/loxP재조합 효소 시스템을 이용할 수 있다.

[0136] 본 발명에서, 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터는 같거나 다른 종류의 아데노 바이러스에

서 유래할 수 있고, 둘이 같은 종류의 아테노 바이러스에서 유래하는 경우, 같거나 다른 바이러스 요소를 포함할 수 있고, 예를 들어 같거나 다른 5' ITR, 3' ITR, Ψ 패키징 신호 서열, 후기 유전자, E1, E2, E3 및/또는 E4를 포함할 수 있다.

[0137] 재조합 레트로바이러스 벡터

[0138] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어 제1 재조합 바이러스 벡터 및/또는 제2 재조합 바이러스 벡터)는 재조합 레트로 벡터일 수 있다. 레트로바이러스는 RNA바이러스이고, 바이러스 게놈은 RNA이다. 숙주 세포가 레트로 바이러스에 감염되면, 바이러스 게놈RNA는 DNA중간체로 역전사되고, 감염된 세포의 염색체 DNA에 통합된다. 레트로바이러스 게놈 및 프로바이러스 DNA는 gag, pol 및 env의 3개의 유전자를 갖고, 양측은 두개의 긴 말단 반복(LTR)서열이며, 5' LTR과 gag유전자 사이에 Ψ 패키징 신호 서열이 존재한다. 상기 gag유전자는 내부 구조(기질, 캡시드 및 뉴클레오캡시드) 단백질을 코딩하고, 상기 env유전자는 바이러스 피막 당단백질을 코딩한다. 상기 pol유전자는 바이러스 RNA를 이중 사슬 DNA로 역전사하는 RNA-지도 DNA중합 효소 역전사효소, 역전사 효소로 생성된 DNA를 숙주 염색체 DNA에 통합하는 인테그라제, 및 gag 및 pol유전자를 코딩, 가공하는 프로테아제를 포함하는 복수의 효소를 코딩한다. 5' 및 3' LTR은 비리온 RNA의 전사 및 폴리아데닐화를 촉진한다. 재조합 레트로바이러스 벡터의 생산에 있어서, gag, pol 및 env유전자는 다른 핵산 분자(예컨대 플라스미드)를 통해 트랜스 제공될 수 있고, 따라서 레트로바이러스 게놈 중의 이러한 유전자를 결실하며, 관심 핵산을 포함한 발현 카세트로 대체하는 동시에 다른 하나 이상의 핵산 분자(예컨대 플라스미드)에 gag, pol 및 env유전자를 트랜스 제공하여, 재조합 레트로바이러스 벡터를 생산할 수 있다.

[0139] 본 발명에서 언급한 “재조합 레트로바이러스 벡터”는 레트로바이러스에서 유래한 구조 및/또는 기능성 핵산 요소를 포함하고, 바이러스 게놈에 포함된 관심 핵산을 세포에 전이할 수 있는 레트로바이러스 입자를 의미하며, 통상적으로 레트로바이러스 캡시드, 캡시드에 패키징되는 재조합 레트로바이러스 게놈 및 바이러스 피막 당단백질을 포함하며, 상기 재조합 레트로바이러스 게놈은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬의 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함한다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 재조합 레트로바이러스 게놈은 적어도 게놈 양단에 위치한 긴 말단 반복 서열(5' LTR 및 3' LTR) 및 Ψ 패키징 신호 서열을 더 포함하고, 임의로 폴리퓨린 트랙PPT를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 재조합 레트로바이러스 벡터는 예를 들어 물로니 뮤린 백혈병 바이러스(MMLV) 또는 뮤린 줄기세포 바이러스(MSCV)에서 유래할 수 있다. 재조합 레트로바이러스 벡터는 복제 능력이 있거나 복제 결함된 것일 수 있다. 전형적으로, 레트로바이러스 벡터는 복제 결함된 것이고, 여기서 바이러스 입자 복제 및 패키징에 필수적인 유전자 코딩 영역이 결실되거나 또는 다른 유전자로 대체된다. 따라서, 일단 초기 표적 세포가 감염되면, 상기 바이러스는 전형적인 세포 용해 경로를 계속할 수 없다. 이러한 레트로바이러스 벡터 및 이러한 바이러스 생산에 필수적인 물질(예를 들어 패키징 세포주)은 상업적으로 구입할 수 있다(예를 들어 Clontech에서 구입할 수 있음).

[0140] 재조합 레트로바이러스 벡터는 이중 피막 당단백질(예를 들어 다른 바이러스 유래 피막 당단백질)을 사용할 수 있고, 즉 재조합 레트로바이러스 벡터의 생산에서 이중 env유전자(예를 들어 다른 바이러스 유래 env유전자)를 사용하여, 그 향성을 변경할 수 있다. 예를 들어 VSV-G피막 당단백질 또는 신더비스 바이러스 E2 당단백질을 사용할 수 있다. 이중 피막 당단백질 패키징을 사용하는 재조합 레트로바이러스 벡터는 위형화된 재조합 레트로바이러스 벡터로 칭할 수도 있다.

[0141] 재조합 레트로바이러스 벡터의 생산 방법은 당업자에게 알려져 있다. 예를 들어 패키징 세포주에 재조합 레트로 바이러스 게놈을 포함한 핵산 분자, gag, pol 및 env유전자를 포함한 하나 이상의(예를 들어 두개의) 핵산 분자를 제공함으로써, 재조합 레트로바이러스 벡터를 생산할 수 있다. 상기 핵산 분자는 플라스미드일 수 있다. 두 개의 단독적인 플라스미드를 이용하여 gag, pol 및 env유전자를 제공하고, 하나의 플라스미드에 단독적으로 gag 및 pol유전자를 포함하며, 다른 하나의 플라스미드에 env유전자를 포함하여, 플라스미드 사이에 재조합이 발생하지 않도록 한다. 여기서 재조합 레트로바이러스 게놈은 발현 카세트(여기서 관심 핵산, 예를 들어 본 발명의 제1 발현 카세트 또는 제2 발현 카세트 포함) 및 말단 반복 서열(5' LTR 및 3' LTR) 및 Ψ 패키징 신호 서열 등과 같은 재조합 레트로바이러스 생산에 필수적인 시스템 핵산 요소를 포함한다.

[0142] 본 발명에서, 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 같거나 다른 종류의 레트로바이러스에서 유래할 수 있고, 둘이 같은 종류의 레트로바이러스에서 유래하는 경우, 같거나 다른 바이러스 요소를 포함할 수 있고, 예를 들어 같거나 다른 5' LTR, 3' LTR, Ψ 패키징 신호 서열, gag, pol 및/또는 env유전자를 포함할 수 있다.

[0143] 재조합 렌티바이러스 벡터

- [0144] 본 발명의 재조합 바이러스 벡터(예를 들어 제1 재조합 바이러스 벡터 및/또는 제2 재조합 바이러스 벡터)는 재조합 렌티바이러스 벡터일 수 있다. 렌티바이러스는 레트로바이러스에 속하나, 다른 레트로바이러스와 달리, 렌티바이러스는 비분열 세포의 게놈에 통합될 수 있으며, 대표적인 렌티바이러스로는 인간면역결핍바이러스(HIV), 유인원면역결핍바이러스(SIV) 및 고양이면역결핍바이러스(FIV)를 포함한다. 다른 레트로바이러스와 유사하게, 렌티바이러스 게놈 양측은 두개의 긴 말단 반복 (LTR)서열이고, gag, pol 및 env유전자를 포함하며, 바이러스 단백질을 코딩하는 주요 유전자이고, 5' LTR과 gag유전자 사이에 Ψ 패키징 신호 서열을 갖는다. 그 외, 렌티바이러스에는 tat, rev, nef, vif, vpr 및 vpu를 포함하는 합성 조절, 바이러스 RNA 가공 및 다른 복제 기능에 관여하는 다른 보조 유전자를 더 포함한다. 재조합 렌티바이러스 벡터의 생산에 있어서, nef, vif, vpr 및 vpu는 비필수적이고, tat유전자는 5' LTR을 개조하여 더는 필요하지 않을 수 있으며, gag, pol, env 및 rev유전자는 다른 핵산 분자(예컨대 플라스미드)를 통해 트랜스 제공될 수 있고, 따라서 렌티바이러스 게놈 중의 이러한 유전자를 결실할 수 있고, 관심 핵산을 포함한 발현 카세트로 대체하는 동시에 다른 하나 이상의 핵산 분자(예컨대 플라스미드)에서 gag, pol, env 및 rev유전자를 트랜스 제공하여, 재조합 렌티바이러스 벡터를 생산한다.
- [0145] 본 발명에서 언급한 “재조합 렌티바이러스 벡터”는 렌티바이러스에서 유래한 구조 및/또는 기능성 핵산 요소를 포함하고 바이러스 게놈에 포함된 관심 핵산을 세포 중에 전이할 수 있는 렌티바이러스 입자를 의미하며, 통상적으로 렌티바이러스 캡시드, 캡시드에 패키징된 재조합 렌티바이러스 게놈 및 바이러스 피막 당단백질을 포함하며, 상기 재조합 렌티바이러스 게놈은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬을 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함한다. 당업자에게 잘 알려진 바와 같이, 재조합 렌티바이러스 게놈에 적어도 게놈 양단에 위치한 긴 말단 반복 서열(5' LTR 및 3' LTR) 및 Ψ 패키징 신호 서열을 더 포함하고, 임의로 Rev-응답 요소(RRE) 및/또는 DNA flap 요소(cPPT/CTS) 등을 포함할 수도 있다. 본 발명의 재조합 렌티바이러스 벡터는 HIV-1, HIV-2, SIV 또는 FIV에서 유래할 수 있다. 재조합 렌티바이러스 벡터는 복제 능력이 있거나 또는 복제 결함된 것일 수 있다. 전형적으로, 재조합 렌티바이러스 벡터는 복제 결함된 것이고, 여기서 바이러스 입자 복제 및 패키징에 필수적인 유전자 코딩 영역이 결실되거나 또는 다른 유전자로 대체된다. 따라서, 일단 초기 표적 세포가 감염되면, 상기 바이러스는 전형적인 세포 용해 경로를 계속할 수 없다.
- [0146] 본 발명의 재조합 렌티바이러스 벡터 중의 3' LTR은 자가 불활성화될 수 있고(SIN 3' LTR), 예를 들어 렌티바이러스 벡터가 자가 복제가 불가능하도록 U3영역을 결실한다. 본 발명의 재조합 렌티바이러스 벡터 중의 5' LTR의 U3영역은 Tat에 의존하지 않는 이중 프로모터로 대체될 수 있고, 예를 들어 RSV프로모터와 같은 다른 바이러스에서 유래하는 프로모터로 대체되어, U3전사 시 Tat 단백질에 대한 의존을 제거할 수 있고, 재조합 렌티바이러스 벡터 생산 시 Tat서열을 제거할 수 있다.
- [0147] 재조합 렌티바이러스 벡터는 이중 피막 당단백질(예를 들어 다른 바이러스에서 유래한 피막 당단백질)을 이용할 수 있고, 즉 재조합 렌티바이러스 벡터의 생산에서 이중 env유전자(예를 들어 다른 바이러스에서 유래한 env유전자)를 사용하여, 그 향성을 변경할 수 있다. 예를 들어 VSV-G피막 당단백질 또는 신더비스 바이러스 E2 당단백질을 사용할 수 있다. 이중 피막 당단백질을 이용하여 패키징된 재조합 렌티바이러스 벡터는 위험화된 재조합 렌티바이러스 벡터로 칭할 수도 있다.
- [0148] 재조합 렌티바이러스 벡터의 생산은 당업자에게 잘 알려져 있고, 예를 들어 패키징 세포주에 재조합 렌티바이러스 게놈을 포함한 핵산 분자, gag, pol, rev유전자를 포함하는 하나 이상의(예를 들어 두개의) 핵산 분자, 및 env유전자 유전자를 포함하는 핵산 분자를 제공함으로써, 재조합 렌티바이러스 벡터를 생산할 수 있다. 3-플라스미드 또는 4-플라스미드 시스템을 이용하여 재조합 렌티바이러스 벡터를 생산할 수 있다. 4-플라스미드 시스템에서, 첫 번째 플라스미드는 보조 단백질(예를 들어 tat, vif, vpu, vpr 및 nef)을 결실하고, gag 및 pol유전자를 포함하며, 두 번째 플라스미드는 rev유전자를 포함하고, 세 번째 플라스미드는 헤르페스 구내염 바이러스 피막 단백질(VSV-G)의 env유전자를 포함하며, 네 번째 플라스미드는 재조합 렌티바이러스 게놈을 포함한다. 재조합 렌티바이러스 벡터 및 바이러스의 생산 시스템은 상업적으로 구입할 수 있다(예를 들어 Cell Biolabs, Inc.에서 구입). 그 중 재조합 렌티바이러스 게놈은 발현 카세트(여기서 본 발명의 제1 발현 카세트 또는 제2 발현 카세트와 같은 관심 핵산을 포함) 및 긴 말단 반복 서열(5' LTR 및 3' LTR) 및 Ψ 패키징 신호 서열과 같은 재조합 렌티바이러스 생산에 필수적인 시스템 핵산 요소를 포함하고, 임의로 Rev-응답 요소(RRE) 및/또는 DNA flap 요소(cPPT/CTS) 등을 포함할 수도 있다.
- [0149] 본 발명에서, 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 같거나 다른 종류의 렌티바이러스에서 유래할 수 있고, 둘이 같은 종류의 렌티바이러스에서 유래하는 경우, 같거나 다른 5' LTR, 3' LTR, Ψ 패키징 신호 서열, gag, pol, rev 및/또는 env유전자와 같은 같거나 다른 바이러스 요소를 포함할 수 있다.

[0150] 재조합 HSV백터

[0151] 본 발명의 재조합 바이러스 백터(예를 들어 제1 재조합 바이러스 백터 및/또는 제2 재조합 바이러스 백터)는 재조합 HSV백터일 수 있다. 단순 포진 바이러스(HSV)는 피막, 캡시드를 갖는 이중 사슬 DNA바이러스이고, 그 게놈은 즉시 초기 유전자, 초기 유전자 및 후기 유전자를 포함한다. HSV는 HSV-1 및 HSV-2의 두가지 혈청형이 존재한다. 숙주 세포에서의 HSV 바이러스의 복제는 용해성 감염이고, 이는 숙주 세포의 사멸을 유발할 수 있기에, 재조합 HSV는 바이러스가 복제 결함을 생성하도록 통상적으로 일부 즉시 초기 유전자(예컨대 ICP4 및/또는 ICP27)가 녹아아웃되며, 세포가 ICP4 및/또는 ICP27을 충분히 보충한 후에만 바이러스의 복제 능력을 회복한다. 따라서, 재조합 HSV백터는 복제 결함형일 수 있다.

[0152] 본 발명에서 언급한 “재조합 HSV백터”는 HSV에서 유래한 구조 및/또는 기능성 핵산 요소를 포함하고, 바이러스 게놈에 포함된 관심 핵산을 세포에 전이할 수 있는 HSV입자를 의미하며, 통상적으로 HSV캡시드, 캡시드에 패키징된 재조합 HSV게놈 및 바이러스 피막 당단백질을 포함하며, 상기 재조합 HSV바이러스 게놈은 본 발명의 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 또는 제2 사슬을 발현시키기 위한 발현 카세트를 포함한다.

[0153] 재조합 HSV 백터는 HSV 백본 플라스미드를 통해 관심 핵산을 포함하는 플라스미드 사이의 상동 재조합에 의해 제조될 수 있다. 예를 들어, 통상적으로, HSV백본 플라스미드는 HSV의 주요 기능 유전자를 포함하나, 예컨대 결실 부위 즉시 초기 유전자(ICP4 및/또는 ICP27)는 HSV백본 플라스미드 및 관심 핵산(예를 들어 관심 핵산을 포함한 발현 카세트, 예를 들어 본 발명의 제1 발현 카세트 또는 제2 발현 카세트)을 포함하는 플라스미드를 ICP4 및/또는 ICP27을 발현하는 생산 세포주에 공동 형질감염한 후 상동 재조합을 일으킨다. 생산 세포주의 예시로는 Vero세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0154] 본 발명에서, 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터는 같거나 다른 종류의 HSV바이러스에서 유래할 수 있고, 둘이 같은 종류의 HSV바이러스에서 유래하는 경우, 같거나 다른 바이러스 요소를 포함할 수 있다.

[0155] 폴리펩티드 분자의 생산

[0156] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 백터 시스템은 시험관 내에서 상기 폴리펩티드 분자를 생산하는 데 사용될 수 있고, 예를 들어 본 발명의 이중 재조합 바이러스 백터 시스템에 포함된 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터로 숙주 세포에 형질도입하고, 적합한 조건 하에서 숙주 세포를 배양함으로써, 상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드 분자를 발현시킬 수 있다. 상기 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터를 조성물의 형태로 제공하는 경우, 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터를 포함하는 조성물을 이용하여 상기 숙주 세포에 형질도입할 수 있다. 상기 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터를 각각 제공하는 경우, 먼저 하나의 재조합 바이러스 백터로 상기 숙주 세포에 형질도입한 후, 다시 다른 하나의 재조합 바이러스 백터로 상기 숙주 세포에 형질도입하고, 형질도입된 선후 순서는 임의적일 수 있으며, 제1 재조합 바이러스 백터가 먼저이거나, 또는 제2 재조합 바이러스 백터가 먼저일 수 있다. 상기 적합한 조건은 당업자가 얻을 수 있고, 통상적으로는 상기 숙주 세포 성장에 적합한 조건이다. 제1 재조합 바이러스 백터 및 제2 재조합 바이러스 백터가 상기 숙주 세포에서 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬을 발현시키고, 상기 제1 사슬 및 제2 사슬은 상기 폴리펩티드 분자로 자가 조립될 수 있다. 상기 숙주 세포는 시험관 내이다. 상기 숙주 세포 배양물에서 상기 폴리펩티드 분자를 수집하고 정제하여 추가로 응용하거나, 또는 상기 폴리펩티드 분자를 발현한 숙주 세포를 추가로 응용할 수 있으며, 예를 들어 대상체 체 내에 주입하여 치료 목적을 구현한다.

[0157] 생산된 폴리펩티드 분자는 세포 외로 분비될 수 있고, 숙주 세포 배양 상등액에서 분비된 폴리펩티드 분자를 수집할 수 있으며, 필요한 경우, 본 기술 분야에 잘 알려진 방법을 통해 상기 폴리펩티드 분자를 정제할 수 있다.

[0158] 본 발명에 사용되는 용어 “형질도입”은 바이러스 입자가 세포를 감염하여 세포 내에서 기능을 구비하는 것을 의미한다.

[0159] 본 발명에서 언급한 “숙주 세포”는 관심 핵산을 포함하고 코딩되는 폴리펩티드를 발현시키는 세포를 의미하며, 외인성 핵산(예를 들어 본 발명의 재조합 바이러스 백터)에 도입된 세포 및 그 자손을 포함한다. 숙주 세포는 분리된 것이거나 시험관 내의 것일 수 있다. 숙주 세포의 구현예로는 박테리아, 효모, 포유동물 세포 등을 포함한다. 적합한 숙주 세포는 열대거세미나방(*Spodoptera frugiperda*) 세포와 같은 곤충 세포; 세균, 사카로마이세스 세레비시아에 또는 피치아 파스토리스(*Pichia pastoris*)와 같은 효모 세포, 트리코데르마 레세이(*Trichoderma reesei*), 아스페르길루스(*Aspergillus*), 오레오바시디움 및 페니실리움 종과 같은 진균을 포함하

는 미생물; 및 중국 햄스터 난소(CHO) 세포, 베이비 햄스터 신장(BHK) 세포, COS 세포, 아프리카 녹색 원숭이 신장 세포(Vero 세포), 개 신장 세포(예: MDCK 세포), 래트 뇌하수체 세포(GH1 세포), 인간 배아 신장 세포(예: HEK 293, HEK293A, HEK293T, HEK293FT 등), HeLa 세포 또는 hARPE-19 세포 등을 포함한 인간 세포주와 같은 포유동물 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0160] 당업자는 사용된 재조합 바이러스 벡터의 종류에 따라 적합한 숙주 세포를 선택하는 방법을 알고 있다.

[0161] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 체 내에서 상기 폴리펩티드 분자를 생산하는 데 사용될 수도 있고, 예를 들어 대상체 체내에서 상기 폴리펩티드 분자를 생산하고, 즉 대상체에게 체 내에 상기 폴리펩티드 분자를 전달할 수 있다. 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터가 대상체 체내에 전달된 후, 조직 및/또는 기관의 세포와 같은 대상체 체내 세포에 형질도입함으로써, 상기 세포, 조직 및/또는 기관에서 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬을 발현시킬 수 있다. 상기 폴리펩티드 분자의 제1 사슬 및 제2 사슬은 발현 후 상기 폴리펩티드 분자로 자가 조립됨으로써, 대상체에 대해 치료 효과와 같은 기대하는 효과를 생성할 수 있다.

[0162] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 재조합 바이러스 벡터의 항성 및/또는 조직 특이적 프로모터 등을 통해, 특정 세포, 조직 및/또는 기관에서 특이적으로 발현되어, 타겟 치료 효과를 구현한다. 생산된 폴리펩티드 분자는 세포 외에 분비될 수 있고, 예를 들어 혈청에서 검출될 수 있다.

[0163] 본 발명의 재조합 바이러스는 대상체의 혈청에서 적어도 약 9 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 10 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 50 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 100 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 200 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 300 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 400 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 500 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 600 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 700 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 800 $\mu\text{g/ml}$, 적어도 약 900 $\mu\text{g/ml}$, 또는 적어도 약 1000 $\mu\text{g/ml}$ 의 양으로 목표 항체를 발현시킬 수 있다.

[0164] 본 발명에서 언급한 “대상체”는 질병이 완화, 예방 및/또는 치료되는 동물(사람 포함)을 의미한다. 일부 실시 방법에 있어서, “대상체”는 포유동물을 의미하고, 인간, 마우스, 래트, 토끼, 기니피그, 소, 말, 고양이, 개, 설치류동물 또는 영장류동물을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 일부 실시 방법에 있어서, 대상체는 인간이다. 일부 실시 방법에 있어서, 대상체는 비인간 포유동물이다.

[0165] 약물 조성물

[0166] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 중의 제1 재조합 바이러스 벡터 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 각각 제공되거나 또는 조성물의 형태로 제공될 수 있다. 제1 재조합 바이러스 벡터 및/또는 제2 재조합 바이러스 벡터는 약물 조성물의 형태로 제공될 수 있고, 상기 약물 조성물은 유효량의 제1 재조합 바이러스 벡터 및/또는 제2 재조합 바이러스 벡터 및 임의의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 본 기술 분야에서 잘 알려진 바와 같이, “약학적으로 허용 가능한 담체”는 상대적 불활성 물질로, 활성 성분의 투여를 촉진하고 약물 조성물을 액체 용액, 부유물, 에멀전, 또는 사용 전에 액체에 용해되거나 또는 현탁되기에 적합한 고체 형태와 같은 다양한 제형으로 제공할 수 있다.

[0167] “약학적으로 허용 가능한 담체”는 희석제, 충전제, 항산화제, 방부제, 안정제, 삼투압 조절제, 완충제 및/또는 유화제 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 투여 경로에 따라, 약학적으로 허용 가능한 담체는 당류, 전분, 셀룰로오스 및 그 유도체, 말토오스, 젤라틴, 활석, 황산칼슘, 식물성 기름, 합성유, 폴리올, 알긴산, 인산염 완충액, 유화제, 등장성 염류용액(isotonic saline) 및/또는 무염원수 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명에서 제공하는 약물 조성물은 캡슐제, 정제, 타블렛, 좌제, 연고제, 세제, 페이스트, 에어로졸, 스프레이, 겔제, 패치, 주사제 등 임상적으로 허용 가능한 제형으로 제조될 수 있다.

[0168] 전달

[0169] 임의의 적합한 경로를 사용하여 대상체에게 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 약물 조성물을 전달할 수 있고, 예를 들어 경구, 직장, 점막 투과, 비내, 흡입, 질, 경막 내, 뇌실 내, 안내, 위장 외(예를 들어 정맥 내, 피하, 피내, 근육 내, 복막 내) 등 투여와 같은 경로로 전신 전달 또는 국부 전달할 수 있다.

[0170] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 약물 조성물은 임의의 종류의 세포에 전달될 수 있고, 신경 세포(뉴런 세포 및 수지상 세포와 같은 말초 및 중추 신경계의 세포 포함), 폐 세포, 눈 세포(망막 세포, 망막 색소 상피 및 각막 세포 포함), 상피 세포(예를 들어 장 및 호흡기 상피 세포), 근세포(예를 들어 골격근 세포, 심근 세포, 평활근 세포 및 횡격막 세포 포함), 간 세포, 신장 세포, 암 세포 및 종양 세포 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

- [0171] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 또는 약물 조성물은 임의의 조직 또는 기관에 전달될 수 있고, 혈관, 폐, 피부, 심장, 눈(유리체 및 망막, 특히 망막 색소 상피 RPE 포함), 근육(골격근, 심근, 평활근 및 횡격막 포함), 중추신경계(척수, 뇌실질 및 뇌척수액 포함) 및 간을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 종양(종양 또는 림프절 포함)에도 전달될 수 있다.
- [0172] 임의의 주어진 상황에서, 가장 적합한 경로는 치료하는 질병의 특성 및 심각성 및 사용된 구체적 바이러스 벡터의 성질에 따라 결정된다. 주사의 경우, 예를 들어 주사기, 니들, 캐놀라 또는 카테터와 같은 적절한 장치를 사용하거나 입제 주사하여 재조합 바이러스 벡터를 뇌로 전달할 수 있다.
- [0173] 대상체에 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 1회 이상 투여하여(예를 들어 2, 3, 4회 이상 투여), 필요 수준의 폴리펩티드 분자의 발현을 구현할 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 해마다 1회씩 대상체에 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터를 투여할 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 적어도 5년마다 1회씩 대상체에 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터를 투여할 수 있다. 일부 실시 방법에 있어서, 적어도 10년마다 1회씩 대상체에 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터를 투여할 수 있다.
- [0174] 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터의 용량은 당업자가 질병 상황, 대량체 및 치료 일정에 따라 조절할 수 있다. 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터는 통상적으로 “치료 유효량”으로 투여되고, 본 발명에서 언급한 “치료”는 적어도 하나의 질병 상태에 관련된 증상을 예방 또는 완화(예를 들어, 저하, 경감 또는 치유)하는 것을 의미한다. 본 발명에서 언급한 “치료 유효량”은 적어도 하나의 질병 상태에 관련된 증상을 예방 또는 완화(예를 들어, 저하, 경감 또는 치유)하기에 충분한 양이다. 대상체에게 제공되는 제1 및 제2 재조합 바이러스 벡터의 총 용량 및 분할 용량은 투여 방식, 치료하고자 하는 질병, 개별 대상체의 병증 상황, 구체적인 바이러스 벡터 및 전달하고자 하는 폴리펩티드 분자에 따라 결정되고, 통상적인 방법으로 확인할 수 있다. 용량의 단위는 예를 들어 vg/kg 체중일 수 있다.
- [0175] **치료하는 질병**
- [0176] 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템 및 방법은 시험관 내에서 상기 폴리펩티드 분자를 생산하고 생산한 폴리펩티드 분자를 질병의 치료에 응용하거나, 또는 상기 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템을 대상체 체내에 전달함으로써, 대상체 체내의 세포, 조직, 기관에서 상기 폴리펩티드 분자를 발현시킴으로써, 대상체의 하나 이상의 질병을 예방하거나 치료하는 데 사용될 수 있다.
- [0177] 예방 또는 치료되는 질병은 발현되는 구체적 폴리펩티드 분자 및 전달되는 구체적 부위에 따라 결정된다. 상기 질병은 바이러스 감염, 종양 및 혈관 신생에 관련된 질병 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 바이러스 감염된 예시로는, 코로나바이러스, 필로바이러스, 플라비바이러스, 노윅바이러스, 오르토믹소바이러스, 파라믹소바이러스, 메르스바이러스속, 홍역바이러스, 파르보바이러스, 피코르나바이러스, 구제역바이러스, 엔테로바이러스, 콕사키바이러스, 폴리오바이러스, 라이노바이러스과, 폭스바이러스과, 레오바이러스과, 로타바이러스, HIV바이러스, 백혈병바이러스, 풍진바이러스, C형간염바이러스(HCV), B형간염바이러스, Epstein Barr 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 인간면역결핍바이러스(HIV), 호흡기 바이러스 및 그 임의의 조합으로부터 선택되는 바이러스에 인한 감염을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0178] 종양의 예시로는 혈액종양과 고형종이 포함하나 이에 한정되지 않고, 혈액 종양은 골수종, 백혈병, 림프종 등을 포함하나 이에 한정되지 않으며, 고형종양은 결장직장암, 비소세포폐암, 소세포폐암, 난소암, 유방암, 췌장암, 위암, 방광암, 식도암, 중피종, 흑색종, 두경부암, 호지킨 림프종, 간세포암, 말기 신장암, 전립선암, 갑상선암, 난소암 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다.
- [0179] 혈관 신생에 관련된 질병의 예시로는 황반변성(연령에 관련된 황반변성 포함), 관절염(류마티스 관절염 포함), 동맥경화증, 당뇨병 망막병증, 혈관종, 염증성 질병 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 본 발명의 이중 재조합 바이러스 벡터 시스템은 다발성 경화증과 같은 자가 면역성 질병을 치료하는 데에 사용될 수도 있다.
- [0180] 달리 명시되지 않는 한, 아래에 설명된 실시예의 방법 및 재료는 모두 시중에서 구입할 수 있는 통상적인 제품이다. 당업자는 이하에서 설명하는 방법 및 재료는 예시적인 것에 불과하고, 본 발명의 범위를 한정하는 것으로 간주해서는 아니되는 것을 이해할 수 있다.
- [0181] **실시예 1 HEK 293 및 hARPE-19세포에서 이중 rAAV벡터에 의해 매개되는 Avastin(베바시주맵)의 발현과 단일 rAAV벡터의 비교**
- [0182] A. 재료 및 방법

[0183] 1. AAV백터 설계 및 생성

[0184] 완전한 항체 서열을 발현시키는 백터(AAV-Avastin단일 백터), 경쇄만 발현시키는 백터(AAV-Avastin 경쇄, 즉 AAV-Avastin-L) 및 중쇄만 발현시키는 백터(및 AAV-Avastin 중쇄, 즉 AAV-Avastin-H)의 개략도는 도 1a에 도시된 바와 같고, 완전한 항체 서열을 발현시키는 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.Avastin 및 경쇄 또는 중쇄만 발현시키는 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.Avastin-L 및 pAAV2.CMV.Avastin-H는 각각 도 1a에 도시된 두개의 ITR 및 그 사이의 요소를 포함한다. AAV에 의해 매개되는 항체 발현을 위한 단일 백터 설계에서, 중쇄와 경쇄 코딩 서열 사이에 F2A자가 절단 펩티드 모티프를 삽입하여, 하나의 프로모터의 조절 제어 하에 동시에 두개의 폴리펩티드를 발현시키는 것을 구현하였다(예를 들어, US20110065779A1, US9527904B2, US10093947B2, US20180155412A1 참조).

[0185] 재조합 AAV는 AAV2의 *rep* 및 *cap*유전자를 발현시키는 pAAV.R2C2 플라스미드(즉 pRC플라스미드), 아데노 바이러스에서 유래한 보조 유전자를 발현시키는 pAdDelta6 플라스미드(즉 pHelper플라스미드) 및 전이 플라스미드 이 3개의 플라스미드로 293FT 세포를 형질감염하여 제조하고, Xiao and Samulski, 1998, J Virol.을 참조한다. 여기서 pAdDelta6 플라스미드는 Addgene플라스미드 # 112867 서열을 참조하여 DNA를 자가 합성하여 구축하였다. pAAV.R2C2플라스미드는 Addgene플라스미드 # 112864 pAAV.R2C8에서 AAV8 *cap*유전자를 제거하고, AAV2 *cap*유전자를 삽입하여 구축하고, AAV2 계놈 서열은 GenBank: AF043303을 참조한다.

[0186] 단일 백터 전이 플라스미드의 구축: 목적 항체(Avastin) 유전자를 중쇄 리더 서열, 중쇄, F2A, 경쇄 리더 서열, 경쇄의 순서에 따라 직렬 설계 및 합성하고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하며, 효소 절단 및 연결을 통해, 이를 AAV 발현 백터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH(Addgene플라스미드 # 105530를 참조하여 DNA를 자가 합성하여 구축)의 프로모터와 poly A 사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 재조합 AAV 항체 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.Avastin을 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 목적 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다. 여기서 사용되는 서열은 이하와 같고, 그 중 Avastin서열은 <https://go.drugbank.com/drugs/DB00112>를 참조한다:

단일 백터	
명칭	아미노산 서열
Avastin 중쇄	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFITNYGMNWVRQAPGKGLEWVGWINTYTGEPTY AADFRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGGSSHWYFDVWGQGTLLT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVHLQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19)

[0187]

Avastin 경쇄	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLITYFTSSLHSGVPS RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLT LSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20)
명칭	뉴클레오타이드 서열
중쇄 리더 서열	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCTACAG GAGTGCCTCC (SEQ ID NO:1)
중쇄	GAGGTGCAGCTGGTCGAATCCGGCGGAGGCCTGGTGCAGCCCGGC GGGTCTCTGCGGCTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTACACCTTCACCA ACTACGGCATGAATTGGGTGAGACAGGCCCCTGGCAAGGGCCTGG AATGGGTGGGCTGGATCAACACCTATACCGGCGAGCCACCTACGC CGCCGACTTCAAGCGGCGGTTCACGTTACGCTGGATACCTCCAA ATCTACAGCCTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCCGAGGACAC CGCTGTGTACTACGCGCAAGTACCCTCACTACTCGGCTCTTCT CACTGGTATTTTCGACGTGTGGGGCCAGGGAACACTGGTCACAGTG TCCTCTGCCTCTACCAAGGGCCCTTCTGTGTTTCTCTGGCCCTA GCAGCAAGTCCACCTCCGGCGGCACCGCCGCTGGGCTGCCTGG TGAAGGACTACTTCCCAGAACCTGTGACCGTGTCTTGAAGTCCG GCGCTCTGACCTCTGGCGTGCACACATTTCCAGCTGTTCTGCAGTC CTCCGACTGTACTCTCTGTCTCCGTTGTGACCGTGCCTTCCAGC AGCTTGGGCACACAGACCTACATCTGCAACGTGAACCAACAAGCCT TCTAACACCAAAAGTGGATAAGAAGGTGGAACCTAAGTCTGCGAC AAGACCCACACCTGCCCTCCTTGTCTGCTCCTGAGCTGCTGGGC GGACCTTCTGTGTTCTCTGTTCCCTCCTAAGCCCAAGGACACCCTGA TGATCTCTAGAACCCCGAGGTGACATGCGTGGTGGTGGACGTGTC TCACGAGGATCCTGAAGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGT GGAAGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTACA ACTTACCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGTGCAACAGG ACTGGCTGAACGGCAAGAGTACAAGTGAAGGTGTCAACAAG GCTCTGCCTGCTCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGGCCAAAGGC CAGCCTCGCGAGCCTCAAGTGTACACCCTGCCCCATCTCGGGAA GAGATGACCAAGAACCAGGTGTCTTAACCTGTCTGGTCAAGGGC TTCTACCCCTCCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGTCCAACGGCCAG CCTGAGAACAATAACAAAACACCCCTCCCGTGTCTGGACTCCGAT GGCTCCTTCTTCTGTACTCCAAGCTGACCGTGGACAAGTCCAGAT GGCAGCAGGGCAACGTGTTCTCTGCTCCGTGATGCACGAGGCC TGATAATCACTACACCCAGAGTCTCTGTCCCTGTCTCTGGCAA G (SEQ ID NO:2)
F2A	GGCAGCGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTG GCCGGCGACGTGGAGAGCAACCCCGGCC (SEQ ID NO:3)
경쇄 리더 서열	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCTACCGCTACCG GCGTGCCTCT (SEQ ID NO:4)
경쇄	GATATCCAGATGACCCAGTCTCCAGCTCTCTGTCTGCTTCTGTGG

[0188]

	GCGACAGAGTGACCATCACCTGTCTGCTCTCAGGACATCTCCAA CTACCTGAACTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAAGT GCTGATCTACTTACCTCCAGCCTGCACTCCGGAGTGCCAGCCGG TTCTCCGGCTCTGGCTCCGGCACCGACTTACCCCTGACAATCTCTT CTCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACTC TACCCTGCTTGGACCTTCGGCCAGGGAACCAAGTGGAAATCAA GCGGACCGTGGCCGCTCCATCCGTGTTTCTCTCCCTCCTTCCGAC GAACAGCTGAAGTCTGGCACAGCCTCCGTGGTGTGCTGCTGAAC AACTTCTACCTAGAGAGGCCAAGGTGCAAGTGAAGGTGGACAAC GCCCTGCAGTCCGGCAACTCCCAAGAGTCCGTACCGAGCAGGAT TCCAAGGACTCCACCTACTCCCTGTCTTCCACACTGACCCTGTCTA AGGCCGACTCAGAGAAGCACAAGGTGTACGCTGCGAGGTGACC CACCAGGCGCTGAGCTCTCCTGTGACCAAGTCTTCAACAGAGGC GAGTGTga (SEQ ID NO:5)
--	--

[0189]

[0190]

이중 벡터 전이 플라스미드의 구축(중쇄 전이 플라스미드 및 경쇄 전이 플라스미드 포함):

- [0191] 중쇄 전이 플라스미드: 목적 항체(Avastin)의 중쇄 유전자를 중쇄 리더 서열, 중쇄의 순서에 따라 설계하고 합성하며, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하고, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 벡터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH의 프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 재조합 AAV항체 중쇄 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.Avastin-H를 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다.
- [0192] 중쇄 전이 플라스미드 중의 중쇄 리더 서열 및 중쇄의 서열은 각각 단일 벡터 전이 플라스미드 중의 중쇄 리더 서열 및 중쇄 서열과 같다.
- [0193] 경쇄 전이 플라스미드: 목적 항체(Avastin)의 경쇄 유전자를 경쇄 리더 서열, 경쇄의 순서에 따라 설계하고 합성하며, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하고, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 벡터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 재조합 AAV항체 경쇄 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.Avastin-L을 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다.
- [0194] 경쇄 전이 플라스미드 중의 경쇄 리더 서열 및 경쇄의 서열은 각각 단일 벡터 전이 플라스미드 중의 경쇄 리더 서열 및 경쇄 서열과 같다.
- [0195] pAAV.R2C2, pAdDelta6 및 상술한 3가지 전이 플라스미드 중의 각각을 1040 μ g DNA의 총량 및 1:1:1의 몰비로 2E+08 HEK293FT 세포에 공동 형질감염하였다. 형질감염 48시간 후 재조합 AAV벡터를 수득하였다. 0.25%의 Trypsin-EDTA로 접착 플레이트에서 세포를 박리하고, 동결 해동을 3회 반복하여 세포를 용해시켰다. 12,000 rpm으로 8분간 원심 분리한 후, 상등액을 수집하여, 각각 재조합 AAV벡터 AAV2-Avastin(단일 벡터) 또는 AAV2-Avastin-L(이중 벡터 중의 경쇄 벡터) 및 AAV2-Avastin-H(이중 벡터 중의 중쇄 벡터)를 얻고, 액적 디지털 PCR(ddPCR)을 통해 각 재조합 AAV벡터 조세포 용해물의 바이러스 게놈 역가를 확정하였다.
- [0196] 2. 벡터 형질도입 및 항체 검출
- [0197] AAV2-Avastin을 사용하거나 AAV2-Avastin-L 및 AAV2-Avastin-H 둘 모두를 사용하여 HEK293FT 세포를 형질도입하고, 여기서 AAV2-Avastin-L과 AAV2-Avastin-H의 비율은 각각 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1 및 6:1(바이러스 게놈 역가 기준)이다. 경쇄만 포함하는 벡터 또는 중쇄만 포함하는 벡터도 형질도입하여 대조군으로 사용하였다. 24 웰 플레이트에 웰당 1.2E+05개의 293FT 세포를 접종하고, DMEM/10%의 FBS완전 배지로 37° C, 5%CO₂에서 배양하며, 배지를 제거하고, 총량이 5.0E+10vg이고 상술한 완전 배지로 희석한 바이러스 벡터를 첨가하여, 37° C, 5%의 CO₂의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 신성한 완전 배지를 첨가하여 계속 배양하였다. 형질도입 48시간 후 세포 배양 상등액을 수집하였다. 각 샘플은 비환원(도 1b) 및 환원 조건(도 1c)의 로딩 완충액으로 각각 희석하고, 염소 항 인간 IgG항체(Invitrogen, Cat No: A18811)를 이용하여 웨스턴 블롯으로 Avastin 발현을 검출하였다.
- [0198] hARPE-19세포는 웰당 8.0E+04개 세포로 24웰 플레이트에 접종하여, F12/10%의 FBS 배지를 사용하여 37° C, 5%의 CO₂로 배양하고, 배지를 제거하며, 총량이 5.0E+10vg이고 F12/10%의 FBS 배지로 희석한 바이러스 벡터를 첨가되, 각각 AAV2-Avastin, AAV2-Avastin-L, AAV2-Avastin-H이고, AAV2-Avastin-L 및 AAV2-Avastin-H를 바이러스 게놈 역가 비율 1:4, 1:2, 1:1, 2:1, 4:1로 조합하고, 37° C, 5%의 CO₂의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 신성한 완전 배지를 첨가하여 계속 배양하였다. 형질도입 48시간 후 세포 배양 상등액을 수집하였다. 각 샘플은 비환원 조건(도 1d)의 로딩 완충액으로 희석하고, 염소 항 인간 IgG항체(Invitrogen, Cat No: A18811)를 이용하여 웨스턴 블롯으로 Avastin 발현을 검출하였다.
- [0199] 웨스턴 블롯 양성 대조는 정제된 Avastin항체이고, 음성 대조는 바이러스가 형질도입되지 않은 세포의 상등액이다.
- [0200] B. 결과
- [0201] 도 1에 도시된 바와 같이, 단일 벡터 형질도입 및 이중 벡터 형질도입은 모두 성공적으로 HEK293FT 세포(도 1b 및 c) 및 hARPE-19세포(도 1d)에서 분비한 Avastin항체를 생성하였다. 경쇄 벡터의 비율이 상승됨에 따라 항체 농도가 상승되었다. 도 b 및 도 d는 비환원 완충액 로딩 전기 영동에 의한 것으로, Avastin항체 중쇄 및 경쇄는 사량체 형태로 존재하고, 도 c는 환원 완충액 로딩 전기 영동에 의한 것으로, Avastin항체가 해리되어, 중쇄 및 경쇄가 각각 단일 사슬 형태로 존재한다.

- [0202] 실시예 2 세포주에서 다른 혈청형 캡시드를 갖는 이중 rAAV벡터에 의해 매개되는 Avastin의 발현
- [0203] A. 재료 및 방법
- [0204] 다른 하나의 실시예에서, 상기 AAV벡터 캡시드 혈청형은 AA8, AAV9 또는 AAV5형이다. pAAV.R2C9 플라스미드는 Addgene플라스미드 # 112864 pAAV.R2C8에서 AAV8 *cap*유전자를 제거하고, AAV9 *cap*유전자를 삽입하여 구축하며, AAV9 *cap*유전자 서열은 GenBank: AY530579.1을 참조한다. pAAV.R2C5플라스미드는 Addgene플라스미드 # 112864 pAAV.R2C8에서 1 AAV8 *cap*유전자를 제거하고, AAV5 *cap*유전자를 삽입하여 구축하며, AAV5 게놈 서열은 NCBI 서열: NC_006152를 참조한다. 패키징 단계는 실시예 1의 재료 및 방법 1에서 설명한 패키징 단계와 같으나, 여기서 AAV 게놈 rep 및 *cap*유전자를 포함하는 pAAV.R2C2를 각각 상술한 혈청형*cap*유전자를 포함하는 pAAV.R2C8, pAAV.R2C9 및 pAAV.R2C5플라스미드로 대체하고, pAdDelta6, 및 완전 항체 발현 카세트 pAAV2.CMV.Avastin를 포함하거나 항체 중쇄 pAAV2.CMV.Avastin-H 또는 경쇄 pAAV2.CMV.Avastin-L 발현 카세트만 포함하는 플라스미드와 공동으로 HEK293FT 세포를 형질감염하여, 48시간 후 세포 배양 상등액 및 세포 중의 바이러스를 수득하고, 각각 AAV8캡시드를 갖는 AAV8-Avastin, AAV8-Avastin-L, AAV8-Avastin-H, AAV9캡시드를 갖는 AAV9-Avastin, AAV9-Avastin-L, AAV9-Avastin-H, AAV5캡시드를 갖는 AAV5-Avastin, AAV5-Avastin-L, AAV5-Avastin-H를 얻고, ddPCR방법으로 바이러스 게놈 역가를 측정하다.
- [0205] HEK293FT 세포는 웰당 1.2×10^5 세포수, hARPE-19세포는 웰당 8.0×10^4 세포수의 밀도로 24웰 플레이트에 접종하여, 각각 500 μ L DMEM/10%의 FBS 또는 F12/10%의 FBS 배지에 첨가하고, 밤새 배양하였다. 24시간 후 배지를 제거하고, 각각 총량 약 1.3×10^{10} vg, 역가 4.0×10^{10} vg/mL 또는 총량 약 3.8×10^{10} vg, 역가 1.2×10^{11} vg/mL인 재조합 AAV 또는 재조합 AAV 조합을 첨가하였다(비율은 바이러스 게놈 역가 기준):
- [0206] AAV8-Avastin,
- [0207] AAV8-Avastin-L: AAV8-Avastin-H 4:1,
- [0208] AAV8-Avastin-L: AAV8-Avastin-H 2:1,
- [0209] AAV8-Avastin-L: AAV8-Avastin-H 1:1,
- [0210] AAV8-Avastin-L: AAV8-Avastin-H 1:2,
- [0211] AAV9-Avastin,
- [0212] AAV9-Avastin-L: AAV9-Avastin-H 4:1,
- [0213] AAV9-Avastin-L: AAV9-Avastin-H 2:1,
- [0214] AAV9-Avastin-L: AAV9-Avastin-H 1:1,
- [0215] AAV9-Avastin-L: AAV9-Avastin-H 1:2,
- [0216] AAV5-Avastin,
- [0217] AAV5-Avatin-L: AAV5-Avastin-H 4:1,
- [0218] AAV5-Avatin-L: AAV5-Avastin-H 2:1,
- [0219] AAV5-Avastin-L: AAV5-Avastin-H 1:1 또는
- [0220] AAV5-Avastin-L: AAV5-Avastin-H 1:2.
- [0221] 37° C, 5%의 CO₂의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 신선한 배지를 첨가하여, 계속 67 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 배양 상등액을 수집하고, 항인간 IgG항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 Avastin 항체 발현을 검출하였다.
- [0222] B. 결과
- [0223] 도 2에 도시된 바와 같이, AAV8캡시드, AAV9캡시드 및 AAV5캡시드(a, b, c)를 갖는 단일 벡터 또는 이중 벡터로 HEK293FT 또는 hARPE-19세포에 형질도입하여 모두 Avastin항체를 발현할 수 있고, AAV8캡시드 및 AAV9캡시드를 갖는 이중 벡터가 293FT 세포에서 매개하는 항체 발현 수준이 단일 벡터보다 높으며, 경쇄 벡터 비율이 향상됨에 따라, 발현 수준도 상승되었다. AAV5캡시드를 갖는 이중 벡터는 현저한 경쇄 및 중쇄 비율 관련성을 나타내

지 않으나 여전히 단일 벡터에 비해 발현량이 높고, hAPRE-19 세포에 대한 친화성이 강하였다.

[0224] 단일 벡터로 발현시킨 Avastin에는 분자량이 항체 자체보다 현저히 크거나 작은 밴드를 가지고, 정확히 매칭되지 않은 항체 단일 사슬일 수 있으며, 불순한 발현이 AAV 전달 항체의 체 내에서의 응용을 제한하였다. AAV8캡시드, AAV9캡시드 및 AAV5캡시드를 갖는 이중 벡터 시스템으로 발현시킨 항체는 미스매치 밴드 함량이 현저히 저하되었다.

[0225] **실시예 3: 시험관 내 플라스미드 형질감염과 바이러스 벡터 형질도입된 항체 발현의 비교**

[0226] 다른 하나의 실시예에서, AAV 바이러스 벡터 및 플라스미드 벡터 발현 항체의 효율을 비교하였다.

[0227] A. 재료 및 방법

[0228] 실시예 1의 재료 및 방법 1에서 설명한 패키징 단계와 같이, AAV2-Avastin, AAV2-Avastin-L 및 AAV2-Avastin-H를 패키징하여 생산하며, ddPCR 방법으로 바이러스 게놈 역가를 측정하였다. HEK293FT 세포는 웰당 2.0×10^5 세포수의 밀도로 24웰 플레이트에 접종하여, $500 \mu\text{L}$ DMEM/10%의 FBS 배지를 첨가하고, hARPE-19 세포는 웰당 8.0×10^4 세포수로 접종하여, F12/10%FBS 배지를 첨가하며, 밤새 배양하였다. 24시간 후 AAV바이러스 벡터를 웰당 총량 $1.0 \times 10^{10}\text{vg}$, 역가 $3.3 \times 10^{10}\text{vg/mL}$, 부피 $300 \mu\text{L}$ 로 HEK293FT 세포를 형질도입하고, 전이 플라스미드를 총 질량 $0.1 \mu\text{g}$ 또는 $1.0 \mu\text{g}$ (1.0×10^{10} 복제수 또는 1.0×10^{11} 복제수에 상당)로 각각 두배 질량의 PEI와 혼합하여 HEK293FT 및 hARPE-19 세포에 형질감염하였다. 제조합 AAV 또는 제조합 AAV 조합, 플라스미드 조합은 각각 이하와 같다:

[0229] AAV2-Avastin,

[0230] AAV2-Avastin-H,

[0231] AAV2-Avastin-L,

[0232] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 4:1,

[0233] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 2:1,

[0234] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 1:1,

[0235] pAAV2.CMV.Avastin,

[0236] pAAV2.CMV.Avastin-H,

[0237] pAAV2.CMV.Avastin-L, pAAV2.CMV.Avastin-L: pAAV2.CMV.Avastin-H 4:1,

[0238] pAAV2.CMV.Avastin-L: pAAV2.CMV.Avastin-H 2:1,

[0239] pAAV2.CMV.Avastin-L: pAAV2.CMV.Avastin-H 1:1,

[0240] pAAV2.CMV.Avastin-L: pAAV2.CMV.Avastin-H 1:2.

[0241] 37°C , 5%의 CO_2 의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL 의 신선한 배지를 첨가하여, 계속 67 시간 동안 인큐베이션하였다. 세포 배양 상등액을 수집하고, 항인간 IgG항체를 이용하여 웨스턴 블롯으로 Avastin 항체 발현을 검출하였다.

[0242] B. 결과

[0243] 도 3에 도시된 바와 같이, 양성 대조는 정제된 Avastin항체이고, 로딩량은 20 ng 이다. 도 a에서, 유전자 복제수가 바이러스 벡터의 10배인 플라스미드로 세포를 형질감염하여 항체를 발현시키고(1-4번), 그 발현량은 여전히 바이러스 벡터로 세포에 형질도입한 발현량보다 낮았다(8-10번). 바이러스 벡터의 경우, 이중 벡터가 발현시키는 항체는 단일 벡터 발현량보다 높고, 바이러스 이중 벡터 상등액의 항체 농도가 $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 보다 높으며, 경쇄 비율이 증가되고, 항체 발현 수준이 이에 따라 상승되었다. 도 b에서, 플라스미드 벡터가 바이러스 벡터 게놈 복제수와 유사한 경우, HEK293FT(1-7번) 세포 또는 hARPE-19세포(8 및 9번)에 형질감염되는 것에 무관하게, 상등액 항체 농도는 모두 바이러스 벡터(12번)보다 훨씬 낮았고, $1 \text{ ng}/\mu\text{L}$ 보다 훨씬 낮았다.

[0244] **실시예 4 hiPSC-RPE 세포에서 이중 rAAV벡터에 의해 매개되는 Avastin의 발현**

[0245] 본 실시예에서, 제조합 AAV이중 벡터는 인간 유도성 다능성 줄기세포에서 분화된 망막 색소 상피(hiPSC-RPE)에

형질도입되어 항체를 발현시킨다.

[0246] A. 재료 및 방법

[0247] 망막 색소 상피 전구체 세포(RPE precursor, Nuwacell)는 소생 후 Matrigel로 코팅된 6웰 플레이트에서 연속적으로 배양되고, 배지에는 RPE maintenance(Nuwacell, RP0106-H), Maintenance supplement(Nuwacell, RP01016-H), Blebbistatin, 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함되며, 2일마다 용액을 교체하였다. 12일 후, 세포를 1회 계대하고, 웰당 1.0E+06 세포 밀도로 12웰 플레이트에 접종하여, 계속하여 상기 배지에서 배양하며, 2일마다 용액을 교체하였다. 접종 13일 후, 실시예 1 및 실시예 2에 기재된 방식에 따라, 총량이 1.5E+10vg인 바이러스를 첨가하여 세포에 형질도입하고, 재조합 AAV 또는 재조합 AAV 조합은 각각 이하와 같다:

[0248] AAV2-Avastin,

[0249] AAV2-Avastin-H,

[0250] AAV2-Avastin-L,

[0251] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 4:1,

[0252] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 2:1,

[0253] AAV2-Avastin-L: AAV2-Avastin-H 1:1.

[0254] 형질도입 후 2, 6, 12, 15, 18일째의 배양 상등액을 수집하고, 새로운 배지를 첨가하였다. 실시예 1-3에 기재된 웨스턴 블롯 방법으로 상등액 중의 Avastin항체를 검출하고, Avastin 양성 대조 로딩량은 40 ng이며, 측정할 상등액의 로딩량은 20 μ L이고, 로딩 완충액은 비환원 완충액이다.

[0255] B. 결과

[0256] 도 4에 도시된 바와 같이, AAV 형질도입 2일째 이후, hiPSC-RPE세포에서 발현 분비된 Avastin 항체가 현저히 향상되었고, 18일째 검출 시, 분비량은 여전히 변함없이 유지되었다. 이중 AAV백터 형질도입 세포 항체 발현량은 단일 AAV백터 발현보다 현저히 우수하였다.

[0257] 실시예 5 293세포에서 이중 rAAV백터에 의해 매개되는 ABTAA의 발현

[0258] 일부 실시예에서, 이중 AAV백터는 anti-Ang2 항체 ABTAA를 전달하는 데 사용된다.

[0259] A. 재료 및 방법

[0260] 실시예 1에서 Avastin 전이 플라스미드의 구축 방법과 유사하게, 완전 ABTAA항체 서열을 발현시키는 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.ABTAA 및 경쇄 또는 중쇄만 발현시키는 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.ABTAA-L 및 pAAV2.CMV.ABTAA-H의 개략도는 도 5a에 도시된 바와 같다.

[0261] 목적 항체(ABTAA)유전자를 중쇄 리더 서열, 중쇄, F2A, 경쇄 리더 서열, 경쇄의 순서에 따라 직렬 설계 및 합성하고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하며, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 백터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH의 프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 AAV-ABTAA단일 백터의 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.ABTAA를 얻었다. ABTAA는 US 9,902,767 B2의 SAIT-ANG2-AB-m10D6의 중쇄 가변영역(US 9,902,767 B2 SEQ ID NO: 7) 및 경쇄 가변영역(US 9,902,767 B2 SEQ ID NO: 9)을 참조하여, 역번역 및 코돈 최적화를 거쳐 얻고, 각각 인간 IgG4 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역에 연결된다. Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다. 여기서 이용한 서열은 이하와 같다:

ABTAA	
명칭	아미노산 서열
중쇄 가변 영역	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLICTVTGYSITSDYAWNWIQFPGNK LEWMGYINYSGNTDYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNSVTTGD TATYYCARGNFEGAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO:21)
경쇄	SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSP

[0262]

가변 영역	KLIIYYASNRYPGVPDRFTGSGYGTDFTFITISTVQAEDLAVYFCQQ DYSSPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO:22)
명칭	핵산 서열
중쇄 리더 사슬	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCTACCG GAGTGCACTCC (SEQ ID NO:6)
중쇄	GACGTGCAGCTGCAAGAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCC CAGTCCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGACCGGCTACTCCATCACCT CCGACTACGCCCTGGAAGTGGATCAGACAGTTCCCCGGCAACAAGC TGGAATGGATGGGCTACATCAACTACTCTGGAACACCGACTACAA CCCTTCTCTGAAGTCCAGATCCTCTATCACCAGAGATACCTCCAAG AACCAGTTCTTCTGCAGCTGAACTCCGTGACCACCGGCGACACC GCCACCTACTACTGCGCCAGAGGCAACTTCGAGGGCGCCATGGAC TACTGGGGCCAGGGCACCTCTGTGACAGTGTCTCCGCCTCTACAA AGGGCCCCAGCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGCACCA GCGAATCTACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCC TGAGCCTGTGACCGTGTCTGGAACTCTGGCGCTCTGACAAGCGG AGTGACACACCTTTCCAGCCGTGCTGCAAAGCAGCGGCCTGTA TCTGAGCAGCGTGGTCACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACCAA GACCTACACCTGTAATGTGGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGT GGACAAGCGCGTGAATCTAAGTACGGCCCTCCTGTCTCTCATGT CCTGCACCTGAGTTTCTCGGCGGACCCTCCGTGTTCTGTCTTCTC CAAAGCCTAAGGATACCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGA CCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCAAGAGGATCCTGAGGTGCA TCAATTGGTACGTGGACGGCGTGAAGTGCACAACGCCAAGACCA AGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCACCTACAGAGTGGTGTCCG TGCTGACAGTGTGCAACAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTACA AGTGCAAGGTGTCCAAACAAGGGCCTGCCTAGCAGCATCGAGAAA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAGGTGTAC ACACTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAGAACCAGGTGTCC CTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTCCGATATCGCCGTGG AATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACCTACAAGACAACC CCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCTGTACAGCAGAC TGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTGTTCTCCT GCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAGT CTCTGTCCCTGTCTCTGGGCAAG (SEQ ID NO:7)
F2A	GGCAGCGGCGTGAAGCAGACCCTGAACTTCGACCTGCTGAAGCTG GCCGGCGACGTGGAGAGCAACCCCGGCC (SEQ ID NO:8)
경쇄 리더 사슬	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGGTGGCCACCGCTACCG GAGTGCACTCC (SEQ ID NO:9)
경쇄	TCCATCGTGATGACCCAGACCCCTAAGTTCCTGCTGGTGTCTGCTG GCGACAGAGTGACCATCACCTGCAAGGCCTCTCAGTCCGTGTCCA ACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCCAAGC TGCTGATCTACTACGCCTCCAACAGATACCCCGGCGTGCCTGACCG GTTACCCGGCTCTGGCTACGGCACCGACTTCACCTTTACAATCTCC

[0263]

	ACCGTGCAGGCCGAGGACCTGGCCGTGTAATTCTGCCAGCAGGAC TACTCCTCTCCTTGGACCTTCGGCGGCGGAACCAAGCTGGAAATCA AGAGAACCCTGGCCGCCCTAGCGTGTCATCTTCTCCCTCTGA CGAGCAGCTGAAATCTGGCACCGCTTCGGTGGTCTGCCTGCTGAA CAACTTCTACCCAGAGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAA CGCCCTGCAGTCTGGCAACTCCCAAGAAAGCGTGACCGAGCAGG ACTCCAAGGACTCTACATACAGCCTGTCTCCACCCTGACCCTGTC CAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCTTGTGAAGTGAC CCACCAGGACTGTCTCCCTGTGACCAAGTCTTTCAATCGGGGC GAGTGCTga (SEQ ID NO:10)
--	---

[0264]

[0265]

이중 벡터 전이 플라스미드의 구축(중쇄 전이 플라스미드 및 경쇄 전이 플라스미드 포함)은 실시예 1에 기재된 방법과 유사하다:

[0266]

중쇄 전이 플라스미드: 목적 항체(ABTAA)의 중쇄 유전자를 중쇄 리더 서열, 중쇄의 순서에 따라 설계 및 합성하

고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하며, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 벡터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH의 프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 AAV-ABTAA 중쇄의 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.ABTAA-H를 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다.

[0267] 중쇄 전이 플라스미드 중의 중쇄 리더 서열 및 중쇄의 서열은 각각 단일 벡터 전이 플라스미드 중의 중쇄 리더 서열 및 중쇄 서열과 같다.

[0268] 경쇄 전이 플라스미드: 목적 항체(ABTAA)의 경쇄 유전자를 경쇄 리더 서열, 경쇄의 순서에 따라 설계 및 합성하고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하며, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 벡터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 AAV-ABTAA 경쇄의 전이 플라스미드 pAAV2.CMV.ABTAA-L를 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다.

[0269] 경쇄 전이 플라스미드 중의 경쇄 리더 서열 및 경쇄의 서열은 각각 단일 벡터 전이 플라스미드 중의 경쇄 리더 서열 및 경쇄 서열과 같다.

[0270] 제조합 AAV패키징 및 수득은 실시예 1의 방법과 일치하고, pAAV.R2C2, pAdDelta6 및 상술한 3가지의 전이 플라스미드 중의 각각을 1040 µg DNA의 총량 및 1:1:1의 몰비로 모두 2E+08 HEK293FT 세포에 형질감염하였다. 형질감염 48시간 후 제조합 AAV벡터 AAV2-ABTAA(단일 벡터) 또는 AAV2-ABTAA-L(이중 벡터 중의 경쇄 벡터) 및 AAV2-ABTAA-H(이중 벡터 중의 중쇄 벡터)를 수득하고, 액적 디지털 PCR(ddPCR)로 각 제조합 AAV벡터 조세포 용해물의 바이러스 게놈 역가를 확정하였다.

[0271] 2. 벡터 형질도입 및 항체 검출

[0272] AAV2-ABTAA 또는 AAV2-ABTAA-L 및 AAV2-ABTAA-H 둘 모두로 HEK293FT 세포에 공동 형질도입하고, 여기서 AAV2-ABTAA-L과 AAV2-ABTAA-H의 비율은 각각 1:4, 1:2, 1:1, 2:1 및 4:1이다(바이러스 게놈 역가 기준). 경쇄만 포함하는 벡터 또는 중쇄만 포함하는 벡터도 형질도입하여 대조군으로 사용하였다. 24웰 플레이트에 웰당 1.2E+05 개의 293FT 세포를 접종하고, DMEM/10%의 FBS완전 배지로 37° C, 5%의 CO₂에서 밤새 배양하여, 배지를 제거하고, 총량이 7.0E+09vg인 상술한 완전 배지로 희석한 바이러스 벡터를 첨가하며, 37° C, 5%의 CO₂의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 신성한 완전 배지를 첨가하여 계속 배양하였다. 형질도입 48시간 후 세포 배양 상등액을 수집하였다. 각 샘플은 비환원(도 5b) 및 환원 조건(도 5c)의 로딩 완충액으로 각각 희석하고, 염소 항 인간 IgG항체(Invitrogen, Cat No: A18811)를 이용하여 웨스턴 블롯으로 ABTAA 발현을 검출하였다.

[0273] B. 결과

[0274] 도 5에 도시된 바와 같이, 단일 벡터 형질도입 및 이중 벡터 형질도입 HEK293FT 세포에서 모두 성공적으로 ABTAA 항체를 생성하였다. 도 b는 비환원 완충액 로딩 전기 영동에 의한 것으로, ABTAA항체 중경쇄는 사량체 형태로 존재하고, 도 c는 환원 완충액 로딩 전기 영동에 의한 것으로, ABTAA항체가 해리되어, 중경쇄가 각각 단일 사슬 형태로 존재한다. 이중 벡터 형질도입(2-6번)의 발현량은 단일 벡터(1번)보다 현저히 높았다. 경쇄 벡터의 비율이 상승됨에 따라, 발현 항체의 농도가 상승될 뿐만 아니라, 미스매치가 발생하는 이중 밴드의 함량도 감소되었다.

[0275] 실시예 6 이중 rAAV벡터에 의해 매개되는 이중 특이적 항체 발현

[0276] 본 실시예에서, 이중 AAV벡터는 이중 특이적 항체를 전달하는 데 사용되고, 제1 항체는 ABTAA이며, 그 서열은 실시예 5에 기재된 ABTAA와 같고, 제2 항체는 항VEGF단일 사슬 항체(VEGF scFv)이다. 제2 항체의 가변영역이 제1 항체의 중쇄 또는 경쇄에 연결되고, 하나의 AAV벡터로 전달되며, 상응하게, 제1 항체의 경쇄 또는 중쇄는 다른 하나의 AAV벡터에 의해 전달된다.

[0277] A. 재료 및 방법

[0278] 1. 벡터 구축 및 바이러스 패키징: 제1 조합 방식: ABTAA-H-G15-VEGF-LH 및 ABTAA-L이중 벡터이며, 도 6a에 도시된 바와 같다. ABTAA-H-G15-VEGF-LH벡터에 대해, anti-VEGF항체의 경쇄 및 중쇄 가변영역은 연결 펩티드를 통해 ABTAA의 중쇄에 연결되고, 유전자는 ABTAA 중쇄 리더 서열, ABTAA 중쇄, 연결 펩티드, VEGF-scFv-VL-VH의 순서에 따라 직렬 설계 및 합성하고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가

ABTAA 경쇄 (ABTAA-L)	
명칭	뉴클레오타이드 서열
ABTAA 경쇄 리더 서열	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGCCACCGCTACCGGAG TGCACTCC (SEQ ID NO:9)
ABTAA 경쇄	TCCATCGTGATGACCCAGACCCCTAAGTTCCTGCTGGTGTCTGCTGGCG ACAGAGTGACCATCACCTGCAAGGCCTCTCAGTCCGTGTCCAACGACG TGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCCAAGCTGCTGATCTA CTACGCCTCCAACAGATACCCCGGCGTGCCTGACCGGTTACCCGGCTCT

[0282]

	GGCTACGGCACCGACTTCACCTTTACAATCTCCACCGTGCAGGCCGAGG ACCTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTACTCCTCTCCTTGACCTT CGGCGGCGGAACCAAGCTGGAAATCAAGAGAACCGTGGCCGCCCTAG CGTGTTTCATCTTTCTCCCTCTGACGAGCAGCTGAAATCTGGCACCGCTT CCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCAGAGAGGCTAAGGTGCA GTGGAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCTGGCAACTCCCAAGAAAGCGT GACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTACATACAGCCTGTCCTCCACCCTG ACCCTGTCCAAGGCCGATTACGAGAAGCACAAGGTCTACGCTTGTGAA GTGACCCACCAGGACTGTCTCCCTGTGACCAAGTCTTTCAATCGGG GCGAGTGCCTga (SEQ ID NO:10)
--	--

[0283]

[0284]

제2 조합 방식: ABTAA-L-E4-VEGF-LH 및 ABTAA-H이중 벡터이고, 도 6b에 도시된 바와 같다. ABTAA-L-E4-VEGF-LH 벡터에 대해, anti-VEGF항체의 경쇄 및 중쇄 가변영역은 연결 펩티드를 통해 ABTAA의 경쇄에 연결되고, 유전자는 ABTAA 경쇄 리더 서열, ABTAA 경쇄, 연결 펩티드, VEGF-scFv-VL-VH의 순서에 따라 직렬 설계 및 합성되고, 다운스트림 및 업스트림에 각각 Not I 및 Hind III 효소 절단 부위를 추가하며, 효소 절단 및 연결을 통해 이를 AAV 발현 벡터 pAAV.CMV.PI.EGFP.WPRE.bGH의 프로모터 및 poly A사이에 구축하고, 형질전환, 클론 증폭을 거쳐 ABTAA-L-E4-VEGF-LH의 전이 플라스미드를 얻고, Sanger 시퀀싱을 거쳐 타겟 서열 정렬을 진행하여 일치하면 삽입된 서열이 완전히 정확한 것을 나타낸다. 여기서 이용한 서열은 이하와 같다:

ABTAA-L-E4-VEGF-LH	
명칭	핵산 서열
경쇄 리더 서열	ATGGGCTGGTCCTGCATCATCCTGTTCTGCTGGCCACCGCTACCGGA GTGCACTCC (SEQ ID NO:9)
ABTAA	TCCATCGTGATGACCCAGACCCCTAAGTTCCTGCTGGTGTCTGCTGGC GACAGAGTGACCATCACCTGCAAGGCCTCTCAGTCCGTGTCCAACGA

[0285]

경쇄	CGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCTGGCCAGTCTCCCAAGCTGCTGA TCTACTACGCCCTCCAACAGATACCCCGGCGTGCCTGACCGGTTCAAC GGCTCTGGCTACGGACCGACTTCACCTTTACAATCTCCACCGTGCA GGCCGAGGACCTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTACTCCTCTC CTTGACCTTCGGCGGCGGAACCAAGCTGGAATCAAGAGAACCGT GGCCGCCCTAGCGTGTTCATCTTCCCTCCCTCTGACGAGCAGCTGA AATCTGGCACCGCTTCCGTGGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCCC AGAGAGGCTAAGGTGCAGTGGAAAGTGGACAACGCCCTGCAGTCTG GCAACTCCCAAGAAAGCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCTAC ATACAGCCTGTCTCCACCCCTGACCCTGTCCAAGGCCGATTACGAGA AGCACAAGGTCTACGCTTGTGAAGTGACCCACCAGGGACTGTCTCTC CCTGTGACCAAGTCTTTCAATCGGGGCGAGTGC (SEQ ID NO:13)
연결 펩티드	gaatagaagtacggaccccatctccacetaagcca (SEQ ID NO:14)
VEGF VL-VH(scFv)	Gatatacagctgaaccagctctctcttagcttctgtctgctctgtggcgacagagtgaccatcacctgctccgccag ccaggacatctccaactacctgaactggtaccagcagaagcctggcaaggctcctaaggctgtgatctacttac ctctctctgcaacttgagtgccctccgggttcagtggttctggtctggcaagactttaccctgaccatctctcc ctgcagcccgaggacttgcacagctactactgcccagcagtaactcaacgtgccttggaacttggccaggggcacc aagggtgagatcaagggcgccggcgtctgcccggcaggctccggcggtggcgccagcgaagtgcagc tggtggaatccggcgaggcctggtgcagcctggcgatctctgctgctgagctgtccgcttctggtacgatt tcacccactacggcatgaactgggtgcggcagccctggcaaggcctggaatgggtggatggaacac atacaccggcgagcctactacgctgcgacttcaagcgagatcacttgcagcctggacaccttaaatctacc gctacctgcagatgaactcctgagagccgagataccgcgtgtaactgctgccaagtaccctactattatg gcacatctcactgtatttgcagtggtggggccaggggcaccctggtcaccgtgtcctctTGA (SEQ ID NO:12)

[0286]

[0287] ABTA-H의 전이 플라스미드는 실시예 5 중 AAV-ABTA 중쇄의 전이 플라스미드와 같고, 여기서 이용한 서열은 이
하와 같다:

ABTA 중쇄(ABTA-H)	
명칭	뉴클레오타이드 서열
ABTA 중쇄 리더 서열	ATGGGCTGGTCTGCATCATCTGTTTCTGGTGGCCACCGCTACAGGA GTGCACTCC (SEQ ID NO:6)
ABTA 중쇄	GACGTGCAGCTGCAAGAGTCCGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCTTCCC AGTCCCTGTCCCTGACCTGCACCGTGACCGGCTACTCCATCACCTCC GACTACGCCTGGAAGTGGATCAGACAGTTCCTCCGGAACAAGCTGG AATGGATGGGCTACATCACTACTCTGGAACACCGACTACAACCCT TCTCTGAAGTCCAGATCCTCTATCACCAGAGATACCTCCAAGAACCA GTTCTTCTGCAGCTGAAGTCCGTGACCACCGGCGACACCGCCACCT ACTACTGCGCCAGAGGCAACTTCGAGGGCGCCATGGACTACTGGGG CCAGGGCACCTCTGTGACAGTGTCTCCGCCTCTACAAAGGGCCCCA

[0288]

	GCGTTTTCCCACTGGCTCCCTGTAGCAGAAGCACCAGCGAATCTACA GCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTTCCTGAGCCTGTGAC CGTGTCTGGAACCTCTGGCGCTCTGACAAGCGGAGTGCACACCTTTC CAGCCGTGCTGCAAAGCAGCGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTC ACAGTGCCTAGCTCTAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGTAATGT GGACCACAAGCCTAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGAATCT AAGTACGGGCCCTCCTTGTCTCCATGTCTGCACCTGAGTTTCTCGGC GGACCCTCCGTGTTCTGTTTCTCCAAAGCCTAAGGATACCTGATG ATCAGCAGAACCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGTCCCA AGAGGATCCTGAGGTGCAGTTCAATTGGTACGTGGACGGCGTGGAA GTGCACAACGCCAAGACCAAGCCTAGAGAGGAACAGTTCAACAGCA CCTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACAGTGTGACACAGGATTGGCTG AACGGCAAAGAGTACAAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCTA GCAGCATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAAGAGA ACCCAGGTGTACACACTGCCTCCAAGCCAAGAGGAAATGACCAAG AACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTGAAGGGATTCTACCCCTCCGA TATCGCGTGGAAATGGGAGAGCAATGGACAGCCCGAGAACAACACTAC AAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACAGCGACGGCTCATTCTTCCTGTA CAGCAGACTGACCGTGGACAAGAGCAGATGGCAAGAGGGCAACGTG TTCTCTGCAGCGTGTGACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCA GAAGTCTCTGTCCCTGTCTCTGGGCAAGTga (SEQ ID NO:15)
--	--

[0289]

[0290]

재조합 AAV 패키징 및 수득은 실시예 5의 방법과 일치하고, pAAV.R2C2, pAdDelta6 및 상술한 전이 플라스미드 중의 각각을 1040 µg DNA 의 총량 및 1:1:1의 물비로 모두 2E+08 HEK293FT 세포에 형질감염하였다. 형질감염 48시간 후 재조합 AAV백터 ABTAA-H-G15-VEGF-LH, ABTAA-L, ABTAA-L-E4-VEGF-LH, ABTAA-H를 수득하고, 액적 디지털 PCR(ddPCR)로 각 재조합 AAV백터 조세포 용해물의 바이러스 게놈 역가를 확정하였다.

[0291]

2. 백터 형질도입 및 항체 검출

[0292]

ABTAA-H-G15-VEGF-LH 및 ABTAA-L, 또는 ABTAA-L-E4-VEGF-LH 및 ABTAA-H로 HEK293FT 세포에 공동으로 형질도입하고, 여기서 ABTAA 경쇄(ABTAA-L)와 중쇄(ABTAA-H)백터 비율은 각각 6:1, 4:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:4이고(바이러스 게놈 역가 기준), 또한, 각 AAV백터도 각각 단독으로 세포에 형질도입하였다. 24웰 플레이트에 웰당 1.2E+05개의 293FT 세포를 접종하고, DMEM/10%의 FBS완전 배지로 37° C, 5%의 CO₂에서 밤새 배양하여, 배지를 제거하고, 총량이 7.0E+09vg인 상술한 완전 배지로 희석한 바이러스 백터를 첨가하며, 37° C, 5%의 CO₂의 인큐베이터에서 2.5시간 동안 인큐베이션한 후, 1 mL의 신선한 완전 배지를 첨가하여 계속 배양하였다. 형질도입 48시간 후 세포 배양 상등액을 수집하였다. 각 샘플은 비환원 로딩 완충액으로 각각 희석하고, 염소 항 인간 IgG 항체(Invitrogen, Cat No: A18811)를 이용하여 웨스턴 블롯으로 ABTAA 발현을 검출하고, 그 중 양성 대조는 정제된 ABTAA항체이다.

[0293]

B. 결과

[0294]

도 6에 도시된 바와 같이, 두가지 AAV백터 조합 방식은 모두 ABTAA-VEGF 이중 특이적 항체를 생성할 수 있다. 제2 항체가 제1 항체 중쇄에 연결되는 경우, 도 6c에 도시된 바와 같이, 경쇄 백터 비율이 높을 수록, 항체 발현량이 더욱 높고, 현저한 미스매치 밴드가 발견되지 않았다. 제2 항체가 제1 항체 경쇄에 연결되는 경우, 도 6d에 도시된 바와 같이, 많은 미스매치링으로 인해 발생하는 이중 밴드가 나타났고, 경쇄 및 중쇄 비율이 6:1이 될 때 까지(도 7d 1번), 현저한 이중 밴드가 발생하지 않았다. 이중 AAV백터가 ABTAA 단일 항체(7 및 8번)를 발현시키는 것은 이중 백터가 이중 특이적 항체를 발현시키는 것에 비해 효율이 높다.

[0295]

실시예 7 이중 AAV백터의 마우스 체 내로의 Avastin유전자 전달 및 발현

[0296]

본 실시예에서, 이중 AAV백터는 마우스 체 내에 Avastin항체 유전자를 전달하는 데 사용되고, 단일 AAV백터 전달 효율과 비교한다. AAV형질형은 8형이고, 실시예 2에 기재된 백터와 동일하다.

[0297]

A. 재료 및 방법

[0298]

동물 시험 설계: 시험은 18마리의 SPF급 C57BL/6 마우스를 선택하여, 무작위로 그룹당 3마리씩 6그룹으로 나누고, 각각 100 µL/마리 부피로 상응 총량의 이하 백터 또는 백터 조합을 1회 꼬리에 정맥 주사하였다.

[0299]

AAV8-Avastin 2E+11vg

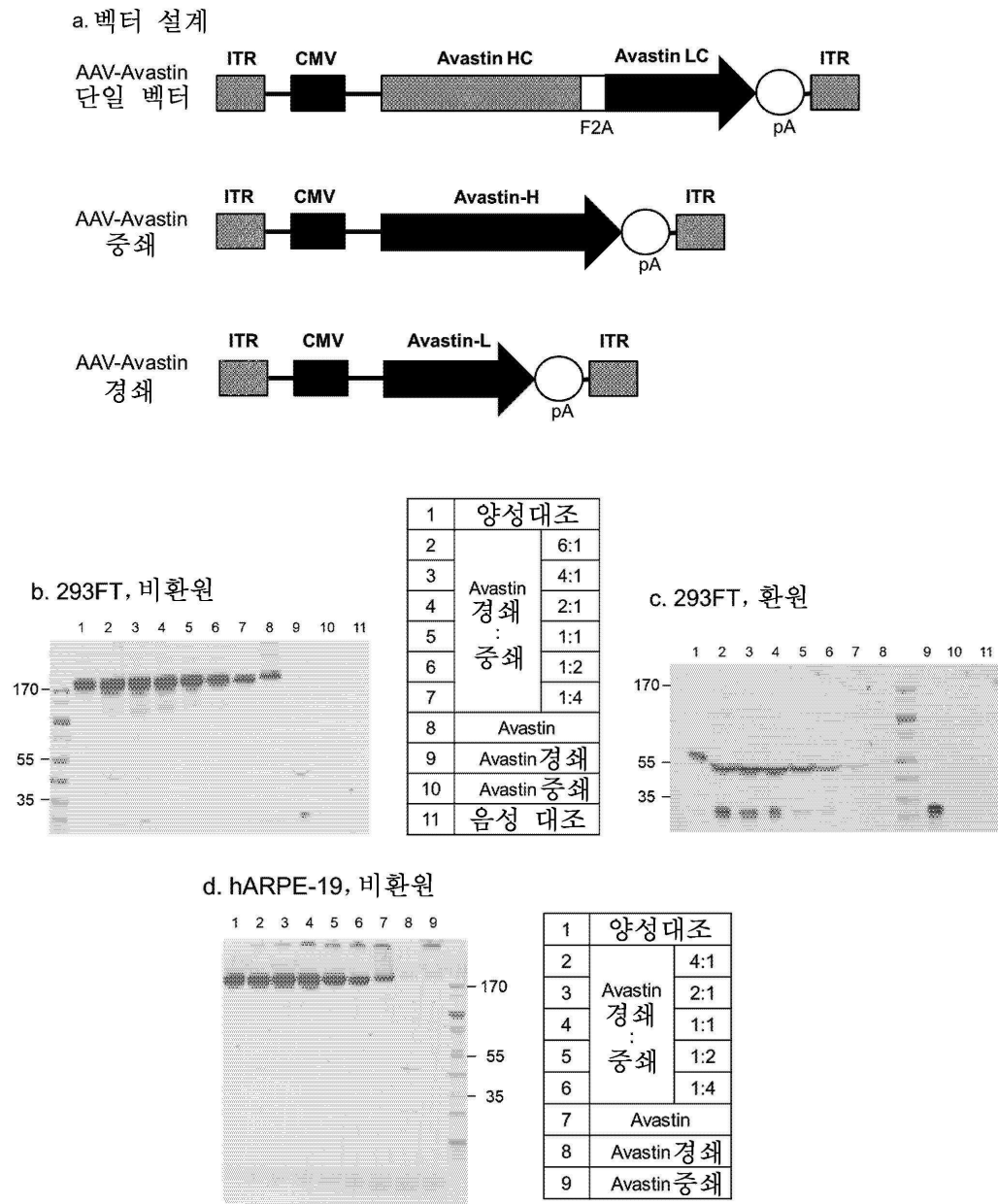
[0300]

AAV8-Avastin 6E+11vg

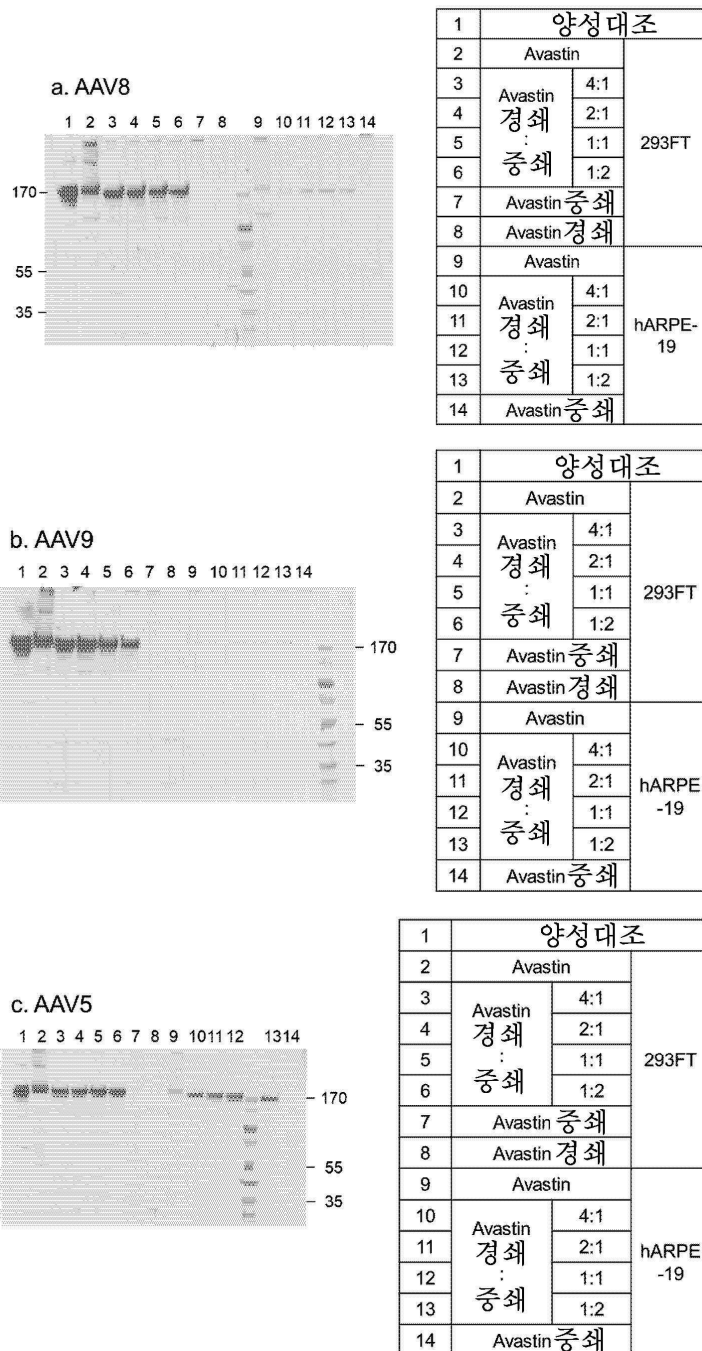
- [0301] AAV8-Avastin -L:AAV8-Avastin-H 1:1 2E+11vg
- [0302] AAV8-Avastin -L:AAV8-Avastin-H 1:1 6E+11vg
- [0303] AAV8-Avastin -L:AAV8-Avastin-H 2:1 2E+11vg
- [0304] AAV8-Avastin -L:AAV8-Avastin-H 2:1 6E+11vg
- [0305] 제조 투여 전 후의 마우스 혈청을 채취하고, 혈청 수집 시간점은: 시험 동물의 투여전 0d; 투여 시작 후 1d, 3d, 7d, 10d, 14d, 21d, 28d, 35d, 49d, 63d 및 84d이다. ELISA분석법을 이용하여 혈청 샘플 중의 Avastin 단백질 농도를 측정하고; 각각의 채혈점 혈중 약물 농도의 평균값 및 SD를 계산하였다. GraphPad Prism 6을 사용하여 약물 시간 곡선을 작성하였다.
- [0306] B. 결과
- [0307] 도 7에 도시된 바와 같이, 단일 AAV 또는 이중 벡터를 마우스 체 내에 3일간 주입한 후, Avastin 발현이 검출될 수 있고, 그 혈중 약물 농도도 모두 먼저 빠르게 상승되었다가 다시 하강하며, 최종적으로 안정되는 과정을 도달하고, 농도 피크값은 주사 후 35일 정도에 나타나며, 45일 정도에 안정되었다. 단일 벡터 고역가 및 저역가 그룹 피크값 혈중 약물 농도는 각각 $122.42 \pm 33.23 \mu\text{g/mL}$ 및 $44.21 \pm 13.50 \mu\text{g/mL}$ 이고, 최종 안정 농도가 각각 $121.61 \pm 6.96 \mu\text{g/mL}$ 및 $30.54 \pm 6.66 \mu\text{g/mL}$ 이다. 이중 벡터 경쇄와 중쇄 비율이 1:1인 경우, 고역가 및 저역가 그룹 피크값 혈중 약물 농도는 각각 $339.53 \pm 37.19 \mu\text{g/mL}$ 및 $148.69 \pm 16.63 \mu\text{g/mL}$ 이고, 최종 안정 농도가 각각 $272.69 \pm 26.53 \mu\text{g/mL}$ 및 $111.84 \pm 19.56 \mu\text{g/mL}$ 이다. 이중 벡터 경쇄와 중쇄 비율이 2:1인 경우, 고역가 및 저역가 그룹 피크값 혈중 약물 농도는 각각 $417.52 \pm 20.35 \mu\text{g/mL}$ 및 $166.64 \pm 14.08 \mu\text{g/mL}$ 이고, 최종 안정 농도가 각각 $345.68 \pm 26.38 \mu\text{g/mL}$ 및 $140.73 \pm 34.34 \mu\text{g/mL}$ 이다. 고역가 그룹 혈중 약물 농도는 저역가 그룹보다 현저히 높고, 주사한 벡터 역가 및 항체 발현량이 양호한 대응 관계를 갖는 것을 나타낸다. 동일 역가 그룹 내에서, 이중 벡터는 단일 벡터에 비해 모두 더욱 높은 발현량을 나타내었으나, 총 역가는 동일하지만 경쇄가 차지하는 비율이 중쇄보다 높은 경우, 항체 발현량이 더욱 향상되었다.
- [0308] 본 발명의 실시형태는 상기 실시예에 한정되지 않으며, 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않는 전제 하에 당업자는 형태 및 세부 내용에 있어서 다양한 변경 및 개선을 진행할 수 있으며, 이들 모두 본 발명의 보호 범위에 속하는 것으로 간주된다.

도면

도면1

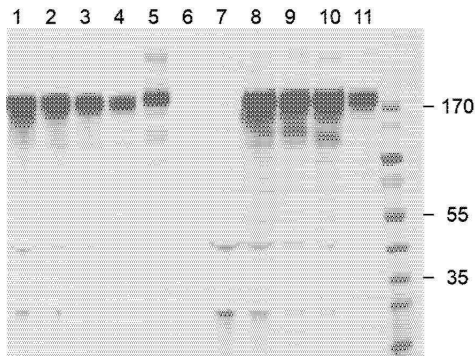


도면2



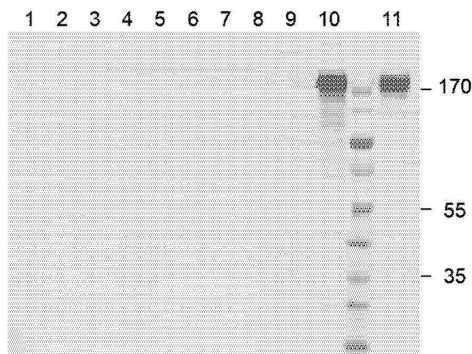
도면3

a. HEK293FT



1	Avastin 경쇄 : 중쇄	4:1	플라 스미드 (1E+11)
2		2:1	
3		1:1	
4		1:2	
5	Avastin		바이러 스 벡터 (1E+10)
6	Avastin 중쇄		
7	Avastin 경쇄		
8	Avastin 경쇄 : 중쇄	4:1	
9		2:1	
10		1:1	
11	양성 대조		

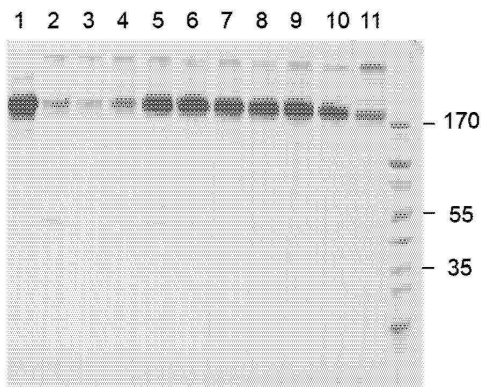
b. HEK293FT 및 hARPE-19



1	Avastin		플라 스미드 (1E+10), 293FT
2	Avastin 중쇄		
3	Avastin 경쇄		
4	Avastin 경쇄 : 중쇄	4:1	
5		2:1	
6		1:1	
7		1:2	
8	Avastin		플라스미드 (1E+10), hARPE-19
9	경쇄:중쇄	1:1	
10	경쇄:중쇄	1:2	바이러스 벡터 (1E+10), 293FT
11	양성 대조		

도면4

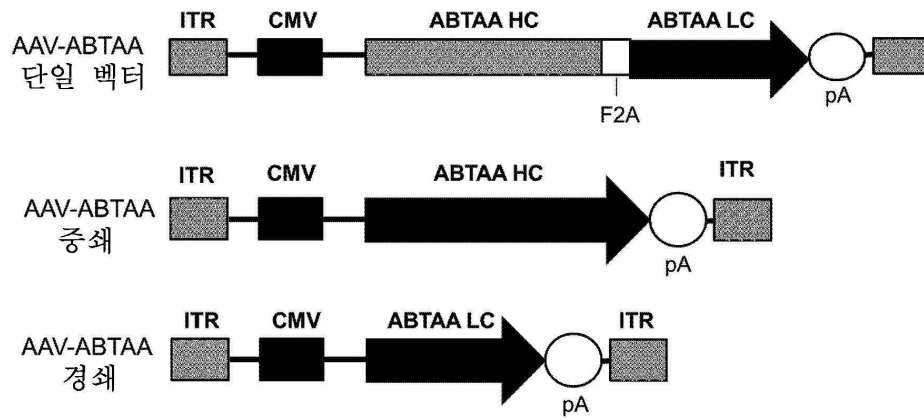
hiPSC-RPE



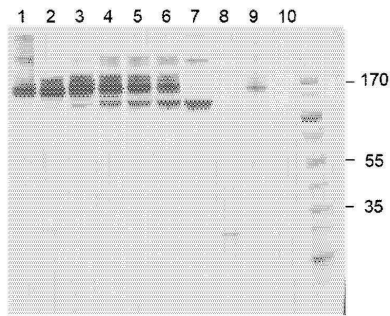
1	양성 대조		
2	Avastin 경쇄		18일째
3	Avastin 중쇄		
4	Avastin		
5	Avastin 경쇄 : 중쇄	4:1	
6		2:1	
7		1:1	
8		1:1	15일째
9		1:1	12일째
10		1:1	6일째
11		1:1	2일째

도면5

a. 벡터 설계

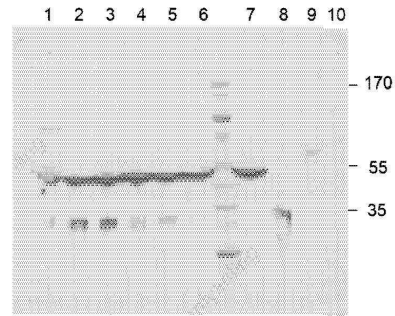


b. ABTAA, 비 환원



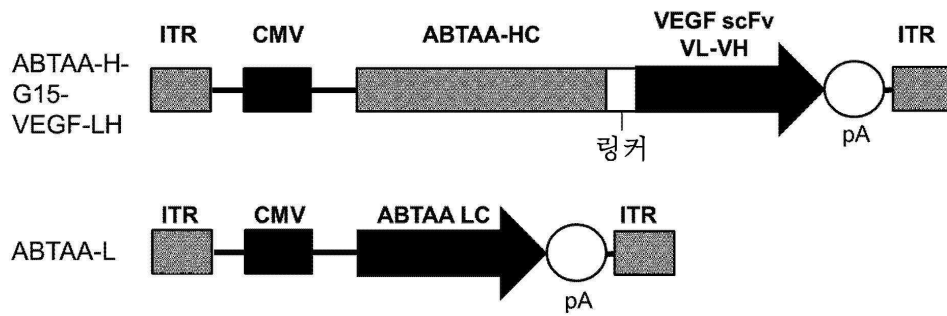
1	ABTAA	
2		4:1
3	ABTAA 경쇄 중쇄	2:1
4		1:1
5		1:2
6		1:4
7	ABTAA 중쇄	
8	ABTAA 경쇄	
9	양성 대조	
10	음성 대조	

c. ABTAA, 환원

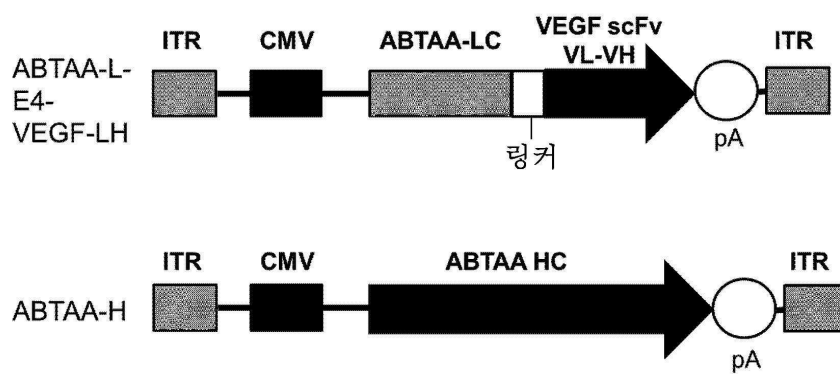


도면6ab

a. ABTAA-H-G15-VEGF-LH및ABTAA-L 벡터 설계

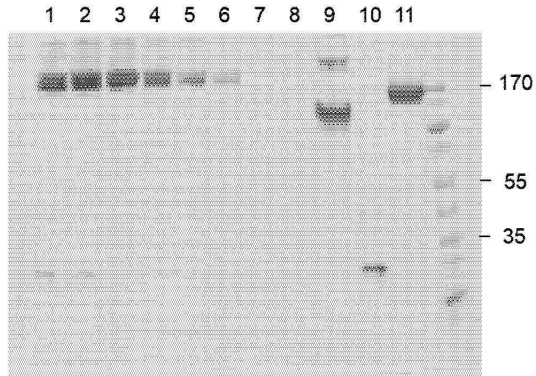


b. ABTAA-L-E4-VEGF-LH및ABTAA-H 벡터 설계



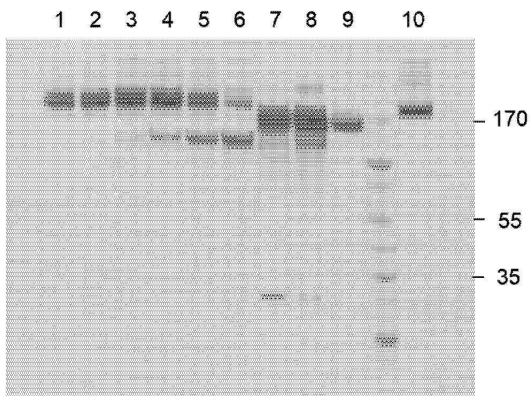
도면6cd

c. ABTAA-H-G15-VEGF-LH 및 ABTAA-L



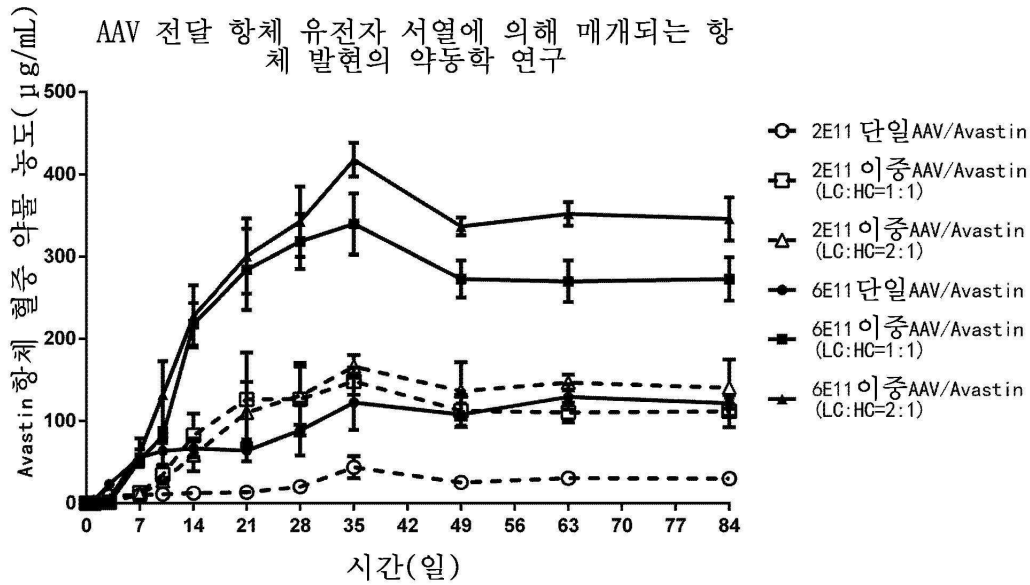
1	ABTAA-L : ABTAA-H-G15-VEGF-LH	6:1
2		4:1
3		2:1
4		1:1
5		1:2
6		1:4
7	ABTAA-H-G15-VEGF-LH	
8	tbsABTAA-L-E4-VEGF-LH	
9	ABTAA-H	
10	ABTAA-L	
11	양성대조	

d. ABTAA-L-E4-VEGF-LH 및 ABTAA-H



1	tbsABTAA-L-E4-VEGF-LH : ABTAA-H	6:1
2		4:1
3		2:1
4		1:1
5		1:2
6		1:4
7	ABTAA-L	
8	ABTAA-H	
9	ABTAA 항체	
10	Avastin 항체	

도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.

<120> DELIVERY OF ANTIBODY BY USING DUAL VIRAL VECTOR SYSTEM

<130> BD-C22264W0

<160> 23

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding Avastin heavy chain leader sequence

<400> 1

atgggctggt cctgcatcat cctgtttctg gtggccaccg ctacaggagt gcactcc 57

<210> 2

<211> 1359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding Avastin heavy chain

<400> 2

gaggtgcagc tggtcgaatc cggcggaggc ctggtgcagc ccggcgggtc tctgcggctg	60
tcttgtgccg cttctggcta caccttcacc aactacggca tgaattgggt cagacaggcc	120
cctggcaagg gcctggaatg ggtgggctgg atcaacacct ataccggcga gccacctac	180
gccgccgact tcaagcggcg gtacacgttc agcctggata cctccaaatc tacagcctac	240
ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgtgtgt actactgcgc caagtaccct	300
cactactacg gctcttctca ctggtatttc gacgtgtggg gccagggaac actggtcaca	360
gtgtcctctg cctctaccaa gggcccttct gtgtttcttc tggccctag cagcaagtcc	420
acctccggcg gcaccgccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc agaacctgtg	480
accgtgtctt ggaactccgg cgctctgacc tctggcgtgc acacatttcc agctgttctg	540
cagtctccg gactgtactc tctgtcctcc gtgtgaccg tgccttcag cagcttgggc	600
acacagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagccttcta acaccaaagt ggataagaag	660
gtggaacct agtcctgcga caagaccac acctgccctc cttgtcctgc tctgagctg	720
ctggcgggac cttctgtgtt cctgttccct cctaagccca aggacaccct gatgatctct	780
agaacccccg aggtgacatg cgtggctgtg gacgtgtctc acgaggatcc tgaagtgaag	840
ttcaactggt acgtggacgg cgtggaagtg cacaacgcca agaccaagcc tagagaggaa	900
cagtacaact ctacctacag agtgggtgtcc gtgctgaccg tgcctgacca ggactggctg	960
aacggcaaag agtacaagtg caaggtgtcc aacaaggctc tgcctgtctc tatcgagaag	1020
accatctcca aggccaaagg ccagcctcgc gagcctcaag tgtacaccct gccccatct	1080
cgggaagaga tgaccaagaa ccaggtgtct ctaacctgtc tggtaagggt cttctacccc	1140
tccgacatcg ccgtggagtg ggagccaac ggccagcctg agaacaacta caaaaccacc	1200
cctcccgctg tggactccga tggctccttc ttctgtact ccaagctgac cgtggacaag	1260
tccagatggc agcagggcaa cgtgttctcc tgctccgtga tgcacgaggc cctgcataat	1320
cactacacc agaagtctct gtccctgtct cctggcaag	1359

<210> 3

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F2A

<400> 3

ggcagcggcg tgaagcagac cctgaacttc gacctgtga agctggccgg cgactggag	60
agcaaccccc gcccc	75

<210> 4
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence encoding Avastin light chain leader sequence

<400> 4
 atgggctggg cctgcatcat cctgttcctg gtggctaccg ctaccggcgt gcactct 57

<210> 5
 <211> 645
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence encoding Avastin light chain

<400> 5
 gatatccaga tgaccagtc tcccagctct ctgtctgctt ctgtgggcga cagagtgacc 60
 atcacctgtt ctgcctctca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120
 ggcaaggctc ctaaagtgt gatctacttc acctccagcc tgcactccgg agtgcccagc 180
 cggttctccg gctctggctc cggcaccgac ttcacctga caatctcttc tctgcagcct 240

 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tactctaccg tgccttggac cttcggccag 300
 ggaaccaaag tggaaatcaa gcggaccgtg gccgtccat ccgtgttcat cttccctcct 360
 tccgacgaac agctgaagtc tggcacagcc tccgtggtgt gcctgctgaa caacttctac 420
 cctagagagg ccaaggtgca gtggaagtg gacaacgccc tgcagtccgg caactccaa 480
 gagtccgtca ccgagcagga ttccaaggac tccacctact ccctgtctc cacaactgacc 540
 ctgtctaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgagggtgac ccaccagggc 600
 ctgagctctc ctgtgaccaa gtccttcaac agaggcgagt gttga 645

<210> 6
 <211> 57
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA heavy chain leader chain

<400> 6
 atgggctggg cctgcatcat cctgttcctg gtggccaccg ctaccggagt gcactcc 57

<210> 7

<211> 1335

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA heavy chain

<400> 7

gacgtgcagc tgcaagagtc cggccctggc ctggtgaagc cttcccagtc cctgtccctg	60
acctgcaccg tgaccggcta ctccatcacc tccgactacg cctggaactg gatcagacag	120
ttccccggca acaagctgga atggatgggc tacatcaact actctggaaa caccgactac	180
aacctttctc tgaagtccag atcctctatc accagagata cctccaagaa ccagtcttctc	240
ctgcagctga actccgtgac caccggcgac accgccacct actactgcgc cagaggcaac	300
ttcgaggggc ccatggacta ctggggccag ggcacctctg tgacagtgtc ctccgcctct	360
acaaagggcc ccagcgtttt cccactggct cctgttagca gaagcaccag cgaatctaca	420
gccgctctgg gctgcctggc caaggactac ttctctgagc ctgtgaccgt gtctctggaac	480
tctggcgctc tgacaagcgg agtgcacacc ttccagccg tgctgcaaag cagcggcctg	540
tactctctga gcagcgtggc cacagtgcct agctctagcc tgggcaccaa gacctacacc	600
tgtaatgtgg accacaagcc tagcaacacc aaggtggaca agcgcgtgga atctaagtac	660
ggccctcctt gtctccatg tcttcacac gagtttctcg gcggaccctc cgtgttctctg	720
tttctccaa agcctaagga taccctgatg atcagcagaa cccctgaagt gacctgcgtg	780
gtggtggacg tgtcccaaga ggatcctgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg	840
gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt tcaacagcac ctacagagtg	900
gtgtccgtgc tgacagtgtc gcaccaggat tggctgaacg gcaaagagta caagtgcaag	960
gtgtccaaca agggcctgcc tagcagcatc gagaaaacca tcagcaaggc caagggccag	1020
ccaagagaac ccaggtgta cactctgcct ccaagccaag aggaaatgac caagaaccag	1080
gtgtccctga cctgcctcgt gaagggtatc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag	1140
agcaatggac agcccagaaa caactacaag acaaccctc ctgtgctgga cagcgacggc	1200
tcattcttcc tgiacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcaaga gggcaacgtg	1260
ttctctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtctctgtcc	1320
ctgtctctgg gcaag	1335

<210> 8

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F2A

<400> 8

ggcagcggcg tgaagcagac cctgaacttc gacctgctga agctggccgg cgacgtggag 60
agcaaccccg gcccc 75

<210> 9

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA light chain leader chain

<400> 9

atgggctggc cctgcatcat cctgttctcg gtggccaccg ctaccggagt gcactcc 57

<210> 10

<211> 645

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA light chain

<400> 10

tccatcgtga tgaccagac ccctaagttc ctgctggtgt ctgctggcga cagagtgacc 60
atcacctgca aggcctctca gtccgtgtcc aacgacgtgg cctggtacca gcagaagcct 120
ggccagtctc ccaagctgct gatctactac gcctccaaca gataccccgg cgtgcctgac 180
cggttcaccg gctctggcta cggcaccgac ttcaccttta caatctccac cgtgcaggcc 240
gaggacctgg ccgtgtactt ctgccagcag gactactcct ctcttggac cttcggcggc 300
ggaaccaagc tggaaatcaa gagaaccgtg gccgcccta gcgtgttcat ctttctccc 360

tctgacgagc agctgaaatc tggcaccgt tccgtggtct gcctgctgaa caattctac 420
cccagagagg ctaaggtgca gtggaaagtg gacaacgccc tgcagtctgg caactccaa 480
gaaagcgtga ccgagcagga ctccaaggac tctacatata gcctgtctc caccctgacc 540
ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag gtctacgctt gtgaagtgac ccaccaggga 600
ctgtcctccc ctgtgaccaa gtctttcaat cggggcgagt gctga 645

<210> 11

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding linker peptide

<400>

> 11

ggcggcggtg gctccggtgg aggtggatct ggcgggtggag gatct 45

<210> 12

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> VEGF VL-VH (scFv)

<400> 12

gatatccagc tgaccagtc tccttctagc ttgtctgcct ctgtgggcga cagagtgacc 60

atcacctgct ccgccagcca ggacatctcc aactacctga actggtacca gcagaagcct 120

ggcaaggctc ctaaggctgt gatctacttc acctcctctc tgcactctgg agtgcctcc 180

cggttcagtg gttctggctc tggcaccgac ttaccctga ccatctcttc cctgcagccc 240

gaggacttcg ccacgtacta ctgccagcag tactccaccg tgccttggac ctttggccag 300

ggcaccaagg tggagatcaa gggcggcggc ggctctggcg gcggaggctc cggcgggtggc 360

ggcagcgaag tgcagctggt ggaatccggc ggaggcctgg tgcagcctgg cggatctctg 420

cggctgagct gtgccgcttc tggctacgat ttacccact acggcatgaa ctgggtgcgg 480

caggcccctg gcaaaggcct ggaatgggtc ggatggatca acacatacac cggcgcgcct 540

acctacgtg ccgacttcaa gcggagattc accttcagcc tggacacctc taaatctacc 600

gcctacctgc agatgaactc cctgagagcc gaggataccg ccgtgtacta ctgcgccaag 660

taccctact attatggcac atctcactgg tatttcgacg tgtggggcca gggcacctg 720

gtcacctgt cctcttga 738

<210> 13

<211> 642

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA light chain

<400> 13

tccatcgtga tgaccagac ccctaagttc ctgctggtgt ctgctggcga cagagtgacc 60

atcacctgca aggcctctca gtccgtgtcc aacgacgtgg cctggtacca gcagaagcct 120

ggccagtctc ccaagctgct gatctactac gcctccaaca gataccccgg cgtgcctgac 180

cggttcaccg gctctggcta cggcaccgac ttcaccttta caatctccac cgtgcaggcc	240
gaggacctgg ccgtgtactt ctgccagcag gactactcct ctccttggac cttcggcggc	300
ggaaccaagc tggaaatcaa gagaaccgtg gccgcccta gcgtgttcat ctttctctcc	360
tctgacgagc agctgaaatc tggcaccgct tccgtggctt gcctgctgaa caacttctac	420
cccagagagg ctaaggtgca gtggaaagtg gacaacgccc tgcagtctgg caactccaa	480
gaaagcgtga ccgagcagga ctccaaggac tctacataca gcctgtcctc caccctgacc	540
ctgtccaagg ccgattacga gaagcacaag gtctacgctt gtgaagtgac ccaccaggga	600
ctgtcctccc ctgtgaccaa gtctttcaat cggggcgagt gc	642
<210> 14	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide sequence encoding linker peptide	
<400> 14	
gaatcgaagt acggacctcc atctccacct agtcca	36
<210> 15	
<211> 1338	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> Nucleotide sequence encoding ABTAA heavy chain	
<400> 15	
gacgtgcagc tgcaagagtc cggccctggc ctggtgaagc cttcccagtc cctgtccctg	60
acctgcaccg tgaccggcta ctccatcacc tccgactacg cctggaactg gatcagacag	120
ttccccggca acaagctgga atggatgggc tacatcaact actctggaaa caccgactac	180
aacctttctc tgaagtccag atcctctatc accagagata cctccaagaa ccagttcttc	240
ctgcagctga actccgtgac caccggcgac accgccacct actactgcgc cagaggcaac	300
ttcgaggggc ccatggacta ctggggccag ggcacctctg tgacagtgtc ctccgcctct	360
acaaagggcc ccagcgtttt cccactggct cctgttagca gaagcaccag cgaatctaca	420
gccgctctgg gctgcctggc caaggactac tttctgagc ctgtgaccgt gtcctggaac	480
tctggcgctc tgacaagcgg agtgacaccc tttccagccg tgcgtcaaag cagcggcctg	540
tactctctga gcagcgtggc cacagtgcct agctctagcc tgggcaccaa gacctacacc	600

tgtaatgtgg accacaagcc tagcaacacc aaggtggaca agcgcgtgga atctaagtac 660
ggccctcctt gtctccatg tcctgcacct gagtttctcg gcggaccctc cgtgttcctg 720
tttctccaa agcctaagga taccctgatg atcagcagaa cccctgaagt gacctgcgtg 780
gtggtggacg tgcaccaaga ggatcctgag gtgcagttca attggtacgt ggacggcgtg 840
gaagtgcaca acgccaagac caagcctaga gaggaacagt tcaacagcac ctacagagtg 900
gtgtccgtgc tgacagtgtc gcaccaggat tggtgaacg gcaaagagta caagtcaag 960
gtgtccaaca agggcctgcc tagcagcatc gagaaaacca tcagcaaggc caagggccag 1020

ccaagagaac cccaggtgta cacactgcct ccaagccaag aggaaatgac caagaaccag 1080
gtgtccctga cctgcctcgt gaagggattc taccctccg atatcgccgt ggaatgggag 1140
agcaatggac agcccagaa caactacaag acaaccctc ctgtgctgga cagcgacggc 1200
tcattcttcc tgtacagcag actgaccgtg gacaagagca gatggcaaga gggcaacgtg 1260
ttctcctgca gcgtgatgca cgaggccctg cacaaccact acaccagaa gtctctgtcc 1320
ctgtctctgg gcaagtga 1338

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS linker

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> GS linker

<400> 17

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Leader sequence

<400> 18

Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 19

<211> 453

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avastin heavy chain

<400> 19

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe

50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly

115 120 125

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

130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val

145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe

165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val

180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val

195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys

210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu

225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser

290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

305 310 315 320

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

325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro

340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln

355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

370 375 380

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

385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu

405 410 415
Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser

420 425 430
Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser

435 440 445
Leu Ser Pro Gly Lys

450

<210> 20

<211> 214

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Avastin light chain

<400> 20

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr

20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile

35 40 45
Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp

85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser

195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABTAA heavy chain variable region

<400> 21

Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp

20 25 30

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Asn Tyr Ser Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Lys Ser Arg Ser Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe

65 70 75 80

Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Gly Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asn Phe Glu Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> ABTAA light chain variable region

<400> 22

Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly

50 55 60

Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Thr Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Trp

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide linker

<400> 23

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Ser Pro Pro Ser Pro

1 5 10