



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월04일
(11) 등록번호 10-2760654
(24) 등록일자 2025년01월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) C07K 14/705 (2006.01)
C12N 9/14 (2006.01) C12N 9/24 (2006.01)
C12N 9/34 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C07K 16/2896 (2013.01)
C07K 14/70596 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7000160
- (22) 출원일자(국제) 2018년06월06일
심사청구일자 2021년06월02일
- (85) 번역문제출일자 2020년01월03일
- (65) 공개번호 10-2020-0015932
- (43) 공개일자 2020년02월13일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/036306
- (87) 국제공개번호 WO 2018/226861
국제공개일자 2018년12월13일
- (30) 우선권주장
62/516,656 2017년06월07일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
KR1020170010896 A*
(뒷면에 계속)

- (73) 특허권자
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
- (72) 발명자
백 앤드류
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내 시그나 캐서린
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 26 항

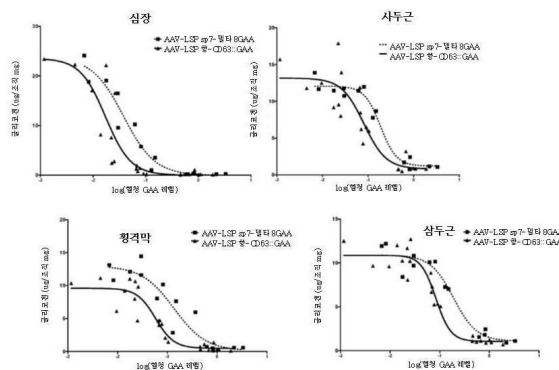
심사관 : 조경주

(54) 발명의 명칭 효소 내재화를 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

효소 결핍 질환을 치료하기 위한 조성물 및 방법이 개시된다. 내재화 효과기 결합 도메인 및 리소솜 대체 효소 활성을 함유하는 다중 도메인 치료 단백질이 개시된다. 다중 도메인 치료 단백질은 세포에 들어가서, 리소솜에 분리되어서, 대체 효소 활성을 리소솜에 전달할 수 있다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 9/14 (2013.01)
C12N 9/24 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12N 9/2428 (2013.01)
C07K 2317/24 (2013.01)
C07K 2317/31 (2013.01)
C07K 2317/77 (2013.01)
C07K 2317/92 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)

(72) 발명자

원혜르 크리스토퍼

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

키랏소스 크리스토스

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

왕 쉐

미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드
777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내

(56) 선행기술조사문헌

Nanomedicine 8(5): 731-739(2011.09.09. 온라인
공개)*
US20060182745 A1
KR1020120125611 A
Bioconjug Chem. 24(1):97-104(2013.01.16. 공개)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

62/574,719 2017년10월19일 미국(US)
62/673,098 2018년05월17일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드로서,
전달 도메인은 인간 CD63에 결합하고,

(a) 서열번호 46/54에 제시된 HCVR/LCVR 쌍 내에 함유된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열;

(b) 서열번호 48-50-52-56-58-60에 제시된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열; 또는

(c) 서열번호 46/54에 제시된 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는 항원-결합 단백질이고,

전달 도메인은 단쇄 가변 단편 (scFv)이며,

효소 도메인은 인간 알파-글루코시다아제 (GAA) 또는 이의 일부를 포함하고;

폴리뉴클레오티드는 바이러스 핵산 서열을 더 포함하되, 바이러스 핵산 서열은 아데노-관련 바이러스 (AAV) 핵산 서열인, 폴리뉴클레오티드.

청구항 2

제1 항에 있어서,

(i) HCVR/LCVR 쌍은 N-말단에서 C-말단까지: HCVR, 링커, 및 LCVR를 포함하고;

(ii) 효소 도메인은 링커를 통해 LCVR의 C-말단에 부착되고;

(iii) 효소 도메인은 서열번호 1 또는 서열번호 78에 제시된 아미노산 서열, 또는 이의 단편을 포함하고;

(iv) 다중 도메인 치료 단백질은 서열번호 79에 제시된 아미노산 서열을 포함하고;

(v) AAV 핵산 서열은 내부 말단 반복 서열을 포함하고; 및/또는

(vi) AAV 핵산 서열은 서열번호 6, 서열번호 7, 또는 둘 다를 포함하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 3

제1 항에 있어서,

(i) 폴리뉴클레오티드는 조직 특이적 조절 요소를 더 포함하고;

(ii) 폴리뉴클레오티드는 간 특이적 프로모터를 더 포함하고;

(iii) 폴리뉴클레오티드는 서열번호 8, 서열번호 9, 또는 둘 다에 제시된 서열을 포함하는 조직 특이적 조절 요소를 더 포함하고; 및/또는

(iv) 폴리뉴클레오티드는 서열번호 11에 제시된 핵산 서열을 포함하고/하거나 서열번호 10 또는 서열번호 78에 제시된 아미노산 서열을 암호화하는 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드.

청구항 4

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터.

청구항 5

제4 항에 있어서, 벡터는 바이러스 벡터인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 6

제5 항에 있어서, 바이러스 벡터는 천연 바이러스, 조작된 바이러스, 또는 키메라 바이러스인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 7

제4 항에 있어서, 네이키드 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 8

제4 항에 있어서, 폴리뉴클레오티드 복합체를 포함하되, 폴리뉴클레오티드 복합체는 폴리뉴클레오티드 및 지질을 포함하는 지질 나노입자인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 9

제4 항에 있어서, 유전자 요법 벡터는:

- (i) 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스, 수두 바이러스, 우두 바이러스, 웬티바이러스, 또는 AAV로 이루어진 군으로부터 선택된 바이러스 벡터; 또는
- (ii) AAV2/8 키메라 또는 특정 조직에 대한 위형 AAV인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 10

제9 항에 있어서, 특정 조직은 간인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 11

전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 재조합 다중 도메인 치료 단백질로서, 단백질은 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는, 재조합 다중 도메인 치료 단백질.

청구항 12

전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 생체 외 세포에서 발현시키는 방법으로서, 방법은

- (a) 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자 요법 벡터와 세포를 접촉시키는 단계;
- (b) 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌 내로 통합시키는 단계; 및
- (c) 세포가 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 생산할 수 있게 하는 단계를 포함하며, 유전자 요법 벡터는 제4 항에 따르는 것인, 방법.

청구항 13

전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 생체 내 세포에서 발현시키는 방법에서 사용하기 위한 유전자 요법 벡터로서, 방법은

- (a) 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자 요법 벡터와 세포를 접촉시키는 단계;
- (b) 폴리뉴클레오티드를 세포의 게놈 유전자좌 내로 통합시키는 단계; 및
- (c) 세포가 재조합 다중 도메인 치료 단백질을 생산할 수 있게 하는 단계를 포함하며, 유전자 요법 벡터는 제4 항에 따르는 것인, 유전자 요법 벡터.

청구항 14

제12 항에 있어서,

- (i) 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고;

(ii) 세포의 게놈 유전자좌는 세이프 하버(safe harbor) 유전자좌이고;

(iii) 게놈 유전자좌는 EESYR 유전자좌, SARS 유전자좌, 인간 염색체 1 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 188,083,272, 인간 염색체 10 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 3,046,320, 인간 염색체 17 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 67,328,980, 염색체 19 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그 상에서 아데노-관련 바이러스 부위 1(AAVS1), 케모카인 수용체 5 (CCR5) 유전자, HIV-1 공수용체를 암호화하는 케모카인 수용체 유전자, 마우스 Rosa26 유전자좌 또는 이의 비릿과 포유류 오쏘로그, 및 인간 알부민 (*alb*) 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자좌에 존재하거나 그 근위에 존재하고;

(iv) 세포는 인간 세포이거나 또는 마우스 세포이고; 및/또는

(v) 세포는 간 세포인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 15

제13 항에 있어서,

(i) 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고;

(ii) 세포의 게놈 유전자좌는 세이프 하버(safe harbor) 유전자좌이고;

(iii) 게놈 유전자좌는 EESYR 유전자좌, SARS 유전자좌, 인간 염색체 1 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 188,083,272, 인간 염색체 10 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 3,046,320, 인간 염색체 17 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 67,328,980, 인간 염색체 19 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그 상에서 아데노-관련 바이러스 부위 1(AAVS1), 케모카인 수용체 5 (CCR5) 유전자, HIV-1 공수용체를 암호화하는 케모카인 수용체 유전자, 마우스 Rosa26 유전자좌 또는 이의 비릿과 포유류 오쏘로그, 및 인간 알부민 (*alb*) 유전자좌로 이루어진 군으로부터 선택된 유전자좌에 존재하거나 그 근위에 존재하고;

(iv) 세포는 인간 세포이거나 또는 마우스 세포이고; 및/또는

(v) 세포는 간 세포인 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 16

유전자 요법 벡터를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 필요한 환자에서 조직 내 글리코겐 축적을 감소시키는 방법에서 사용하기 위한 제4 항의 유전자 요법 벡터.

청구항 17

제16 항에 있어서,

(i) 조직은 심장, 간, 및 골격근으로 이루어진 군으로부터 선택되고;

(ii) 다중 도메인 치료 단백질은 항-CD63 scFv-GAA를 포함하고;

(iii) GAA의 높은 혈청 레벨이 적어도 12주 동안 유지되거나, 또는 12주차에 GAA의 혈청 레벨이 GAA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 전달 도메인 없이 투여된 대상체에서의 GAA의 혈청 레벨보다 2.5-3배 더 높고;

(iv) 심장, 골격근, 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 야생형 레벨까지 감소되고; 및/또는

(v) 조직 내 글리코겐 레벨은 유전자 요법 벡터의 투여 후 3개월 동안 야생형 레벨로 유지되는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 18

제17 항에 있어서, 전달 도메인은 서열번호 46/54에 제시된 HCVR/LCVR 쌍을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 19

제18 항에 있어서, HCVR/LCVR 쌍은 N-말단에서 C-말단까지: HCVR, 링커, 및 LCVR을 포함하는 것을 특징으로 하

는 유전자 요법 벡터.

청구항 20

제19 항에 있어서, 효소 도메인은 링커를 통해 LCVR의 C-말단에 부착되는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 21

제17 항에 있어서, GAA는 서열번호 1 또는 서열번호 78에 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 22

제17 항에 있어서, 항-CD63 scFv-GAA는 서열번호 79에 제시된 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 23

유전자 요법 벡터를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는, 효소 결핍의 치료가 필요한 환자에서 효소 결핍을 치료하고 및/또는 결핍된 효소에 대해 환자의 면역 내성을 유도하는 방법에서 사용하기 위한 제4 항의 유전자 요법 벡터로서, 유전자 요법 벡터는 효소 도메인 및 전달 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는, 유전자 요법 벡터.

청구항 24

제23 항에 있어서,

- (i) 다중 도메인 치료 단백질은 항-CD63 scFv-GAA이고;
- (ii) 유전자 요법 벡터를 투여한 후 적어도 12주 동안 환자에서 GAA의 높은 혈청 레벨이 유지되고;
- (iii) 유전자 요법 벡터의 투여 후 12주차에 환자에서 GAA의 혈청 레벨은 GAA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 전달 도메인 없이 투여한 대상체에서 GAA의 혈청 레벨보다 2.5~3배 더 높고;
- (iv) 환자의 심장, 골격근, 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 야생형 레벨까지 감소되고;
- (v) 환자의 심장, 골격근, 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 유전자 요법 벡터의 투여 후 3개월 동안 야생형 레벨로 유지되고;
- (vi) 치료 후 환자의 근강도는 야생형 수준으로 복구되고;
- (vii) 환자는 폼페병 환자이고;
- (viii) 환자는 효소 도메인을 전달 도메인 없이 투여 받은 대조군 환자와 비교해 효소에 대한 항체가 감소하였고;
- (ix) 방법은 하나 이상의 면역 억제제로 환자의 면역을 억제시키는 단계를 추가로 포함하고;
- (x) 방법은 환자에게 결핍된 효소를 투여하는 단계를 마지막 단계로서 추가로 포함하고; 및/또는
- (xi) 환자는 GAA, 이의 일부분, 또는 GAA 또는 이의 일부분을 포함하는 다중 도메인 치료 폴리펩티드의 환자로의 추가 투여가 불필요하게 하는 폴리뉴클레오티드의 치료 유효량을 투여받는 것을 특징으로 하는, 유전자 요법 벡터.

청구항 25

제24 항에 있어서, 항-CD63 scFv-GAA는 서열번호 79에서 제시된 아미노산 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 유전자 요법 벡터.

청구항 26

제4 항의 유전자 요법 벡터 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 리소좀 축적 질환의 치료에 사용하기 위한 약학적 조성물로서, 리소좀 축적 질환은 폼페병인, 약학적 조성물.

- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제
- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원에 대한 교차 참조

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119(e)에 의거하여 2018년 5월 17일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/673,098호; 2017년 10월 19일에 출원된 미국 특허 가출원 제62/574,719호; 및 2017년 6월 7일에 출원된 미국 특허 제 62/516,656호의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 인용된다.

[0003] 기술 분야

[0004] 본원은 일반적으로 리소좀 축적 질환 치료를 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본원은 구체적으로 대체 효소를 함유하는 표적화된 단백질 복합체 및 리소좀 축적 질환 치료에서의 이들의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0005] 리소좀 축적 질환은 리소좀 내의 무수한 기질의 분해에 영향을 미치는 희귀 질환의 일종이다. 그러한 기질들에는 세포 사멸로 이르는 질환을 가진 이들의 세포에 축적될 수 있는, 스펅고리피드, 뮤코다당류, 당단백질, 글리코겐 및 올리고당류를 포함한다. 리소좀 축적 질환에 의해 영향을 받는 기관으로는 중추 신경계 (CNS), 말초 신경계 (PNS), 폐, 간, 뼈, 골격근 및 심장근 및 망상내피계를 포함한다.

[0006] 리소좀 축적 질환 치료를 위한 옵션으로는 효소 대체 요법 (enzyme replacement therapy, ERT), 기질 감소 요법 (substrate reduction therapy), 약리학적 샤프론 매개 요법 (pharmacological chaperone-mediated therapy), 조혈 모세포 이식 요법 (hematopoietic stem cell transplant therapy), 및 유전자 요법이 있다. 기질 감소 요법의 한 예는 고세 타입 1을 치료하기 위한 Miglustat 또는 Eliglustat의 사용을 포함한다. 이 약물들은 합성 효소 활성을 차단함으로써 작용하며, 후속적인 기질 생산을 감소시킨다. 조혈 모세포 요법(HSCT)은, 예를 들어, MPS의 일부 형태를 가진 환자에서 음성 중추 신경계 표현형을 개선하고 감속시키는 데 사용된다. R.M. Boustany, "Lysosomal storage diseases--the horizon expands," 9(10) Nat. Rev. Neurol. 583-98, Oct. 2013 참고. 표 1은 몇몇 리소좀 축적 질환 및 이 질환과 연관된 효소 또는 기타 단백질을 나열하고 있다.

표 1

리소좀 축적 질환

분류	질환	관련 효소/단백질
스핑고리피드축적증	파브리병	α -갈락토시다아제 A
	파이버 지방육아종증	세라미다아제
	고체병 타입 I	β -글루코시다아제
	고체병 타입 II 및 III	사포신-C 활성제
	니만-피크병 타입 A 및 B	스핑고미엘리다아제
	GM1-겐글리오시드축적증	β -갈락토시다아제
	GM2-겐글리오시드축적증 (샌드호프(Sandhoff))	β -헥소사미니다아제 A 및 B
	GM2-겐글리오시드축적증 (테이-사흐(Tay-Sachs))	β -헥소사미니다아제 A
	GM2-겐글리오시드축적증 (GM2-활성제 결핍)	GM2-활성제 단백질
	GM3-겐글리오시드축적증	GM3 합성효소
	이염색 백색질장애	아릴설파타아제 A
	스핑고리피드-활성제 결핍	스핑고리피드 활성제
뮤코당류축적증	MPS I (샤이에, 헐러-샤이에, 헐러병(Scheie, Hurler-Scheie, Hurler disease))	α -아이두로니다아제
	MPS II (헌터(Hunter))	아이두로니다아제-2-설파타아제
	MPS IIIA (산필리포(Sanfilippo) A)	헤파란 <i>M</i> -설파타아제
	MPS IIIB (산필리포 B)	<i>N</i> -아세틸- α -글루코사미니다아제
	MPS IIIC (산필리포 C)	아세틸-CoA; α -글루코사미드 <i>M</i> -아세틸트랜스퍼라아제
	MPS IIID (산필리포 D)	<i>M</i> -아세틸글루코사민-6-설파타아제
	MPS IVA (모르키오증후군(Morquio syndrome) A)	<i>M</i> -아세틸갈락토사민-6-설파이브 설파타아제
	MPS IVB (모르키오증후군 B)	β -갈락토시다아제
	MPS VI (마로토-라미(Maroteaux-Lamy))	<i>M</i> -아세틸갈락토사민-4-설파타아제 (아릴설파타아제 B)
	MPS VII (슬라이병(Sly disease))	β -글루쿠로니다아제
MPS IX	히알루로니다아제	
글리코겐 축적 질환	폼페병(Pompe) (글리코겐 축적 질환 타입 II)	α -글루코시다아제 2
지질 대사	리소좀 산 리파아제 결핍 (LAL-D; 울만병(Wolman disease))	리소좀 산 리파아제

[0007]

[0008]

가장 흔한 LSD 중 두 가지는 폼페병과 파브리병이다. 1만 명에 1명 꼴로 발병하는 것으로 추산되는 폼페병은 결합 있는 리소좀 효소 알파-글루코시다아제(GAA)에 의해 야기되며, 이로 인해 리소좀 글리코겐에 대한 결합 있는 가공이 초래된다. 리소좀 글리코겐의 축적은 골격, 심장 및 간 조직에서 주로 일어난다. 영유아 발병 폼페병은 심장비대, 근긴장저하, 간비대 및 보통 2세 이전에, 심장호흡 부전으로 인한 사망을 초래한다. 성인 발병 폼페병은 20 내지 60세 정도로 늦게 발생하며 보통 골격근만 연관된다. 현재 이용 가능한 치료는 Genzyme MYOZYME®/LUMIZYME® (알글루코시다아제 알파)를 포함하며, 이는 CHO 세포에서 생산되고 정맥내 주입으로 투여되는 재조합 인간 알파-글루코시다아제이다.

[0009]

경증 후발성 사례를 포함하여 3천 명 중에 1명 꼴로 발병하는 것으로 추산되는 파브리병은 결합 있는 리소좀 효소 알파-갈락토시다아제 A(GLA)에 의해 야기되며, 혈관 및 다른 조직과 기관 내에 글로보트리아오실세라미드(globotriaosylceramide)가 축적되는 결과를 초래한다. 파브리병과 연관된 증상으로는 신경 손상 및/또는 소소포 폐쇄로 인한 통증, 신기능 장애 및 결과적인 부전, 고혈압과 심근증과 같은 심장 합병증, 혈관각화증, 무한증 또는 다한증의 형성과 같은 피부병 증상, 및 나이테각막 병증, 스포크-형 백내장, 및 결막과 망막 혈관 이상과 같은 안 질환이 있다. 현재 이용 가능한 치료는 CHO 세포에서 생산되고 정맥내 주입으로 투여되는 재조합 인간 알파-갈락토시다아제 A인 Genzyme의 FABRAZYME® (아갈시다아제 베타); 인간 섬유아 세포에서 생산되고 정맥내 주입에 의해 투여되는 재조합 인간 알파-갈락토시다아제인 Shire의 REPLAGAL™ (아갈시다아제 알파); 및 비정상적 알파-갈락토시다아제 A의 접힘을 기능적인 형태로 변화시키는 경구 투여형 소분자 샤페론인 Amicus의 GALAFOLD™(미갈라스타스 또는 1-데옥시갈락토노지리마이신)을 포함한다.

[0010]

현재의 리소좀 축적 질환 치료는 최적에 이르지 못하고 있다. 예를 들어, ERT는 일반적으로 높은 빈도 및 높은 투여량, 예를 들어 격주로 최대 40 mg/kg까지 투여해야 한다. 또한 몇몇 대체된 효소는 면역학적으로 교차 반응성(CRIM)을 나타내어, 대상에서 IgG 생산을 자극하여 만노오스-6-포스페이트(M6P) 수용체를 통해 리소좀으로 효소를 전달하는 것을 방해할 수 있다. IgG는 대체 효소의 M6P 잔기를 차폐할 수도 있으며, 항원-IgG-항체 복합

체는 Fc 수용체를 통해 세포 리소좀 내로 방출되어, 대체 효소를 대식세포 보다 우선적으로 이동시킬 수 있다.

[0011] 또한 적절한 영향을 받는 조직에 대체 효소를 전달하는 것은 비효율적이다(표 2 및 Desnick & Schuchman, "Enzyme replacement therapy for lysosomal diseases: lessons from 20 years of experience and remaining challenges," 13 Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 307-35, 2012 참조). 예를 들어, 영유아 폼페병에 대해 장기간 효소 대체 요법을 받는 환자들은, 과잉비음 소리, 잔류 근육 약화, 안검하수, 골감소증(osteopenia), 청력 손실, 흡인 위험(risk for aspiration), 연하곤란(dysphagia), 심장 부정맥(cardiac arrhythmia) 및 삼킴 곤란으로 여전히 고통받을 수 있다. 대체 효소의 투여량은 종종 시간이 지남에 따라 매주 또는 격주로 40 mg/kg로 증가되어야 한다.

표 2

ERT의 비효율적 조직 표적화

질환	아형(들)	도달하기 쉬운 조직	도달하기 곤란한 조직
고세병	타입 1	비장, 간, 골수	폐
	타입 2 및 3	비장, 간, 골수	폐, 뇌
파브리병	전형적 및 늦은 발병	혈관 내피세포	신장, 심장
뮤코다당류축적증	전부	비장, 간, 골수	폐, 뇌, 연골
α -만노시드축적증	---	비장, 간, 골수	폐, 뇌
니만-피크병	타입 B	비장, 간, 골수	폐포 대식세포
폼페병	영유아	---	심장, 평활근 및 골격근
	늦은 발병	---	평활근 및 호흡기 골격근

[0012]

[0013] 내인성 만노오스-6 인산 수용체 (MPR)는 대부분의 재조합 효소를 리소좀으로 수송하는 것을 매개한다. MPR의 두 가지 상보적인 형태가 존재한다: 양이온-의존성 (CI-MPR), 및 양이온 의존성 (CD-MPR). 형태에 무관하게 녹아웃은 리소좀 효소를 잘못 분류하였다. 리소좀 가수분해효소는 소포체에서 합성되어 시스-골지 네트워크로 이동하며, 만노오스-6 인산(M6P)기의 첨가에 의해 공유적으로 변형된다. 이러한 마커의 형성은 2개의 리소좀 효소의 순차적 영향에 따라 달라진다. UDP-N-아세틸글루코사민-1-포스포트랜스퍼라아제 (G1cNac-포스포트랜스퍼라아제) 및 N-아세틸글루코사민-1-포스포다이에스테르- α -N-아세틸-글루코사미니다아제 (노출 효소). G1cNac-포스포트랜스퍼라아제는 가수분해효소의 고-만노오스 타입 올리고당에서 선택된 만노오스의 C6 위치로 UDP-G1cNac로부터의 G1cNac-1-포스페이트염 잔기의 전달을 촉매한다. 그런 다음 노출 효소는 말단 G1cNac을 제거하여, M6P 인식 신호를 노출시킨다. 트랜스-골지 네트워크에서, M6P 신호는 M6P 수용체에 대한 선택적 결합을 통하여 다른 모든 유형의 단백질로부터 리소좀 가수분해효소를 분리할 수 있게 한다. 클라트린-코팅 소포는 트랜스-골지 망으로부터 발아하고 후기 엔도솜과 융합한다. 후기 엔도솜의 낮은 pH에서, 가수분해효소는 M6P 수용체로부터 해리되고 빈 수용체는 추가 수송 라운드를 위해 골지체 장치로 재순환된다.

[0014] 만노오스 수용체를 통해 전달되는, β -글루코세레브로시다아제를 제외하고, 재조합 리소좀 효소는 M6P 당질화를 포함하고, 주로 CI-MPR/IGF2R을 통해 리소좀에 전달된다. 그러나 당질화/CI-MPR 매개 효소 대체 전달이 모든 임상적으로 관련된 조직에 도달하지는 못한다 (표 2). 효소 대체 요법의 개선은 (i) β 2-작용제 클렌부테롤 (clenbuterol)을 사용하여 CI-MPR의 표면 발현을 증가시키는 것 (Koeberl 등, "Enhanced efficacy of enzyme replacement therapy in Pompe disease through mannose-6-phosphate receptor expression in skeletal muscle," 103(2) Mol. Genet. Metab. 107-12, 2011), (ii) 효소 위의 M6P 잔기 양을 증가시키는 것 (Zhu 등, "Conjugation of mannose-6-phosphate-containing oligosaccharides to acid alpha-glucosidase improves the clearance of glycogen in Pompe mice," 279(48) J. Biol. Chem. 50336-41, 2004), 또는 (iii) IGF-II 도메인을 효소에 융합시키는 것 (Maga 등, "Glycosylation-independent lysosomal targeting of acid alpha-glucosidase enhances muscle glycogen clearance in Pompe mice," 288(3) J. Biol. Chem. 1428-38, 2013)에 의해서 CI-MPR 전달을 개선하는 것에 집중되어 왔다.

[0015] 다수의 리소좀 축적 질환이 효소 대체 요법이나 유전자 요법에 의해 적절하게 치료되지 못하는데, 이는 주로 관련 조직이나 기관에 대한 대체 효소의 표적화 미숙, 수혜자 숙주에서의 부정적인 면역학적 반응, 및 짧은 혈청 반감기로 인한 것이다. 효소의 더욱 양호한 조직 생체분포 및 리소좀 흡수를 향상시키고 촉진시키는 개선된 효소 대체 요법에 대한 필요성이 존재한다. 출원인은, 손상된 표적 조직의 리소좀에 대한 항체-유도식 효소 전달을 이용하는 개선된 효소 대체 요법을 개발하였는데, 항체 유도는 CI-MPR과 독립적으로 발생한다.

발명의 내용

- [0016] 출원인은, 대체 효소가 다중 도메인 치료 단백질의 일부인 전달 도메인과 연관될 때 표적 세포에 효과적으로 전달될 수 있다는 것을 발견하였다. 다중 도메인 치료 단백질은 다중 도메인 치료 단백질의 코딩 서열을 포함하는 유전자 요법 벡터, 예를 들어, 바이러스 벡터, 네이키드 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 복합체 등을 통해 생체 외 또는 생체 내에 있을 수 있는 세포에게 전달될 수 있다.
- [0017] 일 양태에서, 본 발명은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 폴리뉴클레오티드를 제공한다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 효소 도메인 및 전달 도메인을 함유한다. 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 또한 바이러스 벡터 핵산 서열을 함유한다. 구체적인 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 또한 아데노-관련 바이러스(AAV) 핵산 서열을 함유한다.
- [0018] 일 구현예에서, 효소 도메인은 글리코실라아제, 글리코시다아제(예: 알파-글루코시다아제(GAA) 또는 알파-갈락토시다아제 A(GLA))와 같은 가수분해효소 활성을 갖는다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 서열번호 1로 기재된 아미노산 서열 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 포함한다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 서열번호 78로 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 서열번호 78로 기재된 아미노산 서열로 본질적으로 구성된다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 서열번호 78로 기재된 아미노산 서열로 구성된다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 내포되어 리소솜으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 ITGA7 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63 또는 ITGA7에 결합하는 scFv이다 (예를 들어, 도 1a, 패널 G).
- [0019] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 2개의 전달 도메인을 포함한다(예를 들어, 도 1a, 패널 H). 일 구현예에서, 제1 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하여 적절한 표적 세포 또는 표적 세포 이하 구획에 대한 효소의 전달을 용이하게 하며; 제2 전달 도메인은 세포외배출 효과기에 결합하여 배위 막, 간 내피, 혈액-뇌 장벽 등과 같은 생리학적 장벽에 걸쳐 다중 도메인 치료 단백질의 수송을 용이하게 한다. 구체적인 일 구현예에서, 제2 전달 도메인은 항-트랜스페린 수용체(TfR) scFv 도메인이다. 구체적인 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA 효소 도메인, 항-CD63 scFv 제1 전달 도메인, 및 항-TfR scFv 제2 전달 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA 효소 도메인, 항-ITGA7 scFv 제1 전달 도메인, 및 항-CD63 scFv 제2 전달 도메인을 포함한다.
- [0020] 일 양태에서, 본 발명은 효소 도메인 및 전달 도메인을 함유하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전자 치료 벡터, 예컨대, AAV 벡터, 네이키드 폴리뉴클레오티드, 폴리뉴클레오티드 복합체 등을 제공한다.
- [0021] 일 구현예에서, 효소 도메인은 글리코실라아제, 글리코시다아제(예: 알파-글루코시다아제 또는 알파-갈락토시다아제 A)와 같은 가수분해효소 활성을 갖는다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원 결합 단백질이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 내포되어 리소솜으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 ITGA7 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63 또는 ITGA7에 결합하는 scFv이다.
- [0022] 일 양태에서, 본 발명은 효소 도메인 및 전달 도메인을 함유하는 다중 도메인 치료 단백질을 제공한다. 일 구현예에서, 효소 도메인은 글리코실라아제, 글리코시다아제(예: 알파-글루코시다아제 또는 알파-갈락토시다아제 A)와 같은 가수분해효소 활성을 갖는다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원 결합 단백질이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 내포되어 리소솜으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 또 다른 구현예에서, 내재화 효과기는 ITGA7 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63 또는 ITGA7에 결합하는 scFv이다.
- [0023] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 효소 대체 요법을 필요로 하는 환자를 치료하는 데 사용된다.
- [0024] 일 양태에서, 본 발명은 효소 도메인 및 전달 도메인을 함유하는 다중 도메인 치료 단백질을 세포에서 생산하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전자 치료 벡터와 세포를 접촉시킴으로써 생산된다. 핵산 서열이 DNA인 경우, 핵산 서열이 전사되고 번역되는 세포의 게놈 유전자좌 내로 핵산 서열이 순차적으로 통합되고, 핵산 서열이 RNA인 경우, 핵

산 서열이 번역되는 세포의 게놈 유전자좌 내로 핵산이 순차적으로 통합되어, 다중 치료 단백질이 생산된다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 세포 형질감염에 공통적으로 사용되는, 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터와 같은 것이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 네이키드 폴리뉴클레오티드이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 폴리뉴클레오티드 복합체, 예를 들어 지질 나노입자이다. 일 구현예에서, 게놈 유전자좌는 세이프 하버 유전자좌이며, 이는 필수 유전자의 발현에 간섭하거나 중앙유전자 또는 다른 유해 유전자의 발현을 촉진하지 않으면서 다중 도메인 치료 단백질의 높은 발현을 가능하게 한다. 일 구현예에서, 게놈 유전자좌는 아데노-관련 바이러스 부위이다.

[0025] 일 구현예에서, 세포는 포유류 세포, 예컨대 인간 세포 또는 마우스 세포이다. 일 구현예에서, 세포는 생체 외 세포주, 예컨대 HEK293 세포주이다. 또 다른 구현예에서, 세포는 생체 내에 있고, 다중 도메인 치료 단백질 코딩 핵산 서열을 함유하는 유전자 요법 벡터는 인간 또는 비인간 대상체에게 투여된다.

[0026] 일 구현예에서, 효소 도메인은 글리코실라아제, 글리코시다아제(예: 알파-글루코시다아제(GAA) 또는 알파-갈락토시다아제 A(GLA))와 같은 가수분해효소 활성을 갖는다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 내포되어 리소솜으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63(예: 서열번호 2)에 결합하는 scFv이다. 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 폴리펩티드는, GAA(서열번호 1로 제시됨) 또는 이의 생물학적 활성 부분(서열번호:78로 제시됨)에 작동 가능하게 연결된 CD63(예를 들어, 서열번호 2로 제시된 아미노산 서열을 포함하는 scFv)에 결합하는 scFv를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 폴리펩티드는 서열번호 10 또는 서열번호 79로 제시된 서열을 포함한다.

[0027] 구체적인 구현예에서, scFv-가수분해 효소 융합 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터가 인간 또는 비인간 대상체에게 투여된다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 유전자좌에 순차적으로 통합되고, 암호화된 융합 단백질이 생산된다. 구체적인 구현예에서, 융합 단백질은 항-CD63scFv-GAA 융합 단백질(예를 들어, 서열번호 10 또는 서열번호 79에 제시된 바와 같음) 또는 항-ITGA7scFv-GAA 융합 단백질이고, 인간 또는 비인간 대상체는 내인성 GAA 활성을 결여하고, GAA 활성은 대상체에서 효과적으로 복원된다.

[0028] 일 양태에서, 본 발명은 효소 결핍 환자(인간 또는 비인간)를 치료하는 방법으로서, 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 유전자 요법 벡터를 환자에게 투여함으로써 치료하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 효소 도메인은 GAA(예: 서열번호 1) 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분(예: 서열번호 78) 또는 GLA(예: UniProtKB 번호 P06280, aa32-429, 서열 번호 13)과 같은 글리코시다아제를 포함하고, 환자는 폼페병 또는 파브리병 환자이다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질의 전달 도메인은 CD63 또는 ITGA7과 같은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 CD63에 결합하는 scFv 분자이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 ITGA7에 결합하는 scFv 분자이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질(예: 서열번호 10 또는 서열번호:79)을 암호화하는 핵산 서열을 함유하는 AAV 벡터를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질(예: 서열번호 10 또는 서열번호:79)을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 네이키드 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 네이키드 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질(예: 서열번호 10 또는 서열번호:79)을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 복합체를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 복합체를 포함한다.

[0029] 일 양태에서, 본 발명은 약물에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 조성물에 관한 것이다. 일 구현예에서, 조성물, 예를 들어, 약학적 조성물은 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질의 전달 도메인은 CD63 또는 ITGA7과 같은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 CD63에 결합하는 scFv 분자이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 ITGA7에 결합하는 scFv 분자이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 유전자

요법 벡터는 조직 특이적 조절 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 조직 특이적 조절 요소는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 둘 다로 제시된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 유전자 요법 벡터는 서열번호 11의 핵산 서열을 포함한다.

[0030] 일 양태에서, 효소 결핍 환자(인간 또는 비인간)의 치료에 사용하고/하거나 인간 또는 비인간 대상체의 조직에서 글리코겐 축적을 감소시키는 데 사용하기 위한 조성물로서, 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 요법 벡터를 포함하는 조성물이 기술된다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질의 전달 도메인은 CD63 또는 ITGA7과 같은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 CD63에 결합하는 scFv 분자이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 ITGA7에 결합하는 scFv 분자이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 효소 결핍을 수반하는 임상적 징후는 예컨대 폼페병(Pompe's Disease) 또는 파브리병(Fabry's disease)일 수 있지만 이들로 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 유전자 요법 벡터는 조직 특이적 조절 요소를 포함한다. 일부 구현예에서, 조직 특이적 조절 요소는 서열번호 8, 서열번호 9 또는 둘 다로 제시된 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 유전자 요법 벡터는 서열번호 11의 핵산 서열을 포함한다.

[0031] 일 양태에서, 효소 결핍 환자(인간 또는 비인간)의 치료 및/또는 인간 또는 비인간 대상체에서 글리코겐 축적의 감소와 같은 치료에 적용하기 위한 약제 제조를 위한, 본 발명에 따른 약학적 조성물의 용도가 기술된다. 상기 조성물은, 예를 들어, 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 요법 벡터를 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질의 전달 도메인은 CD63 또는 ITGA7과 같은 내재화 효과기에 결합하는 항원-결합 단백질이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 CD63에 결합하는 scFv 분자이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 ITGA7에 결합하는 scFv 분자이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-CD63-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 또 다른 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 항-ITGA7-GAA 융합 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 AAV 벡터이다. 효소 결핍을 수반하는 임상적 징후는 예컨대 폼페병 또는 파브리병일 수 있지만 이들로 한정되지는 않는다.

[0032] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA 효소 도메인을 포함하고, GAA의 높은 혈청 레벨은 유전자 요법 벡터 투여 후 적어도 12주 동안 환자의 혈청에서 유지된다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA 효소 도메인을 포함하고, 환자의 심장, 골격근 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 유전자 요법 벡터 투여 3개월 후에 야생형 레벨로 유지된다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA 효소 도메인을 포함하고, 치료 후 환자의 근강도는 야생형 레벨로 복구된다.

[0033] 일 양태에서, 본 발명은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자 요법 벡터를 투여함으로써 인간 또는 비인간 대상체에서 조직 내 글리코겐 축적을 감소시키는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 조직은 간, 심장, 또는 골격근이다. 일 구현예에서, 인간 또는 비인간 대상체는 폼페병을 갖는다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 항-CD63 scFv-GAA 융합 단백질을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 항-ITGA7 scFv-GAA 융합 단백질을 포함한다.

[0034] 일 양태에서, 효소 결핍 환자(인간 또는 비인간)에서 효소에 대항하는 교차 반응성 면역학적 물질을 감소시키는 방법으로서, 대체 효소만을 암호화하거나 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 요법 벡터를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이며, 이는 키메라 AAV 벡터(예를 들어, AAV2/8)일 수 있다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 GAA(예: 서열번호 1) 또는 GLA(예: UniProtKB 번호 P06280, aa32-429, 서열 번호 13)와 같은 글리코시다아제를 포함하고, 환자는 폼페병 또는 파브리병을 가지며, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원 결합 단백질이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는, 교차 반응성 면역학적 물질이 감소되거나 검출 가능한 양으로 교차 반응성 면역 물질이 생성되지 않도록 GAA의 혈청 레벨을 증가시키기에 충분한 양으로 투여된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 일정 기간에 걸쳐 GAA의 혈청 레벨을 증가시키기에 충분한 양으로 투여된다. 일부 구현예에서, 환자는 유전자 요법 벡터를 포함하는 바이러스(예: AAV)로 감염되고, 임의로, 바이러스는 GALT, 간, 조혈 줄기 세포, 적혈구, 또는 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직 또는 세포를 특이적으로 표적화하도록 위형화되고/되거나, 유전자 요법 벡터는, 예를 들어, 간 특이적 인헨서(예: 세르피나 1(serpina 1)) 및/또는 간 특이적 프로모터(예: TTR)를 포함한다. 일 구현예에서, 내

재화 효과기는 내포되어 리소좀으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63(예: 서열번호 2)에 결합하는 scFv이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 적어도 하나의 면역억제제와 조합하여 본원에 기술된 유전자 요법 벡터를 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 유전자 요법 벡터 및 면역억제제는 동시에 및/또는 순차적으로 투여된다. 일부 구현예에서, 환자는 일정 수준의 면역 억제제를 유지한다.

[0035] 일 양태에서, 효소 결핍 환자(인간 또는 비인간)에서 효소에 대한 내성을 유도하는 (즉, 환자를 효소에 대해 내성화시키는) 방법으로서, 환자에서 교차 반응성 면역학적 물질을 감소시키는 단계, 예를 들어, 대체 효소만을 암호화하거나 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 요법 벡터를 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 효소 결핍 환자에서 효소에 대한 내성을 유도하는 방법으로서, 대체 효소만을 암호화하거나, 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 치료 벡터를, 환자에서 검출 가능한 교차 반응성 면역학적 물질의 증가가 발생하지 않도록 일정 기간에 걸쳐 환자에게 투여하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다. 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고, 이는 키메라 AAV 벡터(예: AAV2/8) 및/또는 조각된 AAV 벡터(예를 들어, 간세포 또는 간, 점막 조직, 적혈구, 조혈 줄기 세포, 등과 같은 세포 또는 조직에 의해 우선적으로 또는 배타적으로 발현되는 수용체 또는 마커의 표적화에 유용한 항성 변형된 재조합 바이러스 벡터)일 수 있고, 임의로, 유전자는 인헨서 및/또는 세포나 조직에 특이적인 프로모터, 예를 들어, 간 특이적 프로모터 등에 의해 발현이 조절된다. 일부 구현예에서, 효소 도메인은 GAA(예: 서열번호 1) 또는 GLA(예: UniProtKB 번호 P06280, aa32-429, 서열 번호 13)와 같은 글리코시다아제를 포함하고, 환자는 폼페병 또는 파브리병을 가지며, 전달 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 항원 결합 단백질이다. 일 구현예에서, 내재화 효과기는 내포되어 리소좀으로 수송되는 세포-표면 분자이다. 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63 분자이다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체, 항체 단편, 또는 단쇄 가변 단편(scFv), 예컨대 CD63(예: 서열번호 2)에 결합하는 scFv이다. 일부 구현예에서, 효소 결핍 환자의 치료 방법은, 효소의 재조합 형태 및/또는 아이소자임(예를 들어, 폼페병 환자의 GAA, 예컨대, scFv63::GAA, GAA, 최적화된 GAA, 또는 이들의 조합)을 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 환자는 효소에 대해 내성이 있고, 예를 들어, 환자는 본원에 개시된 방법에 따라 효소에 내성이 생겼다. 따라서, 일부 구현예에서, 효소 결핍 환자에게 효소를 투여하는 방법은, 예를 들어, 효소를 암호화하거나 효소를 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자 요법 벡터를 투여하되, 바람직하게는, 교차 반응성 면역학적 물질이 효소가 결핍되지 않은 환자에서 발견되는 것과 비슷한 레벨이 되도록, 효소의 혈청 레벨을 증가시키기에 충분한 양으로 투여함으로써 효소에 대해 환자를 내성화시키는 단계를 포함하되, 임의로, 유전자 요법 벡터는 간에 대해 특이적으로 표적화되고/되거나 간 특이적 인헨서 및/또는 프로모터를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 유전자 표적화 벡터의 투여 후, 효소를 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 포함하여, 효소 및/또는 이의 재조합 변이체를 추가로 투여하는 단계를 추가로 포함한다.

[0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 인간 CD63에 결합하는 항체 및 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 항체는, GAA 또는 GLA와 같은 효소의 내재화를 특이적으로 유도하고/하거나 리소좀 수송하는 데 특히 유용하다. 이와 같이, 본 발명의 이러한 양태는 인간 CD63에 결합하는 이중특이적 항체, 이의 항원 결합 단편, 및 항체-단백질 융합 작제물을 또한 제공한다(예를 들어, 도 1a 참조).

[0037] 본 발명의 예시적인 항-CD63 항체는 표 11에 열거되어 있다. 표 11은 중쇄 가변 영역(HCVR) 및 경쇄 가변 영역(LCVR)의 아미노산 및 핵산 서열 식별자뿐만 아니라 예시적인 항-CD63 항체의 중쇄 상보성 결정 영역(HCDR1, HCDR2 및 HCDR3), 및 경쇄 상보성 결정 영역(LCDR1, LCDR2 및 LCDR3)을 제시한다.

[0038] 본 발명은 표 11에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, HCVR을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0039] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, LCVR을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.

[0040] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 임의의 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나와 쌍을 이룬 표 11에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 쌍(HCVR/LCVR)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느

하나에 함유된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 구현예에서, HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍은 서열번호 14/22, 서열번호 30/38, 서열번호 46/54, 및 서열번호 62/70으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

- [0041] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 HCDR1 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 중쇄 CDR1(HCDR1)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0042] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 HCDR2 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 중쇄 CDR2(HCDR2)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 중쇄 CDR3(HCDR3)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0044] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 LCDR1 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 경쇄 CDR1(LCDR1)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0045] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 LCDR2 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 경쇄 CDR2(LCDR2)를 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0046] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 LCDR3 아미노산 서열 중 임의의 것으로부터 선택된 아미노산 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함하는, 경쇄 CDR3(LCDR3)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다.
- [0047] 본 발명은 또한 표 11에 열거된 임의의 LCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나와 쌍을 이룬 표 11에 열거된 HCDR3 아미노산 서열 중 어느 하나를 포함하는 HCDR3 및 LCDR3 아미노산 서열 쌍(HCDR3/LCDR3)을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 구현예에 따르면, 본 발명은 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느 하나에 함유된 HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍을 포함하는, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 구현예에서, HCDR3/LCDR3 아미노산 서열 쌍은 서열번호 20/28, 서열번호 36/44, 서열번호 52/60, 및 서열번호 68/76으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0048] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느 하나에 함유된 6개의 CDR로 이루어진 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 특정 구현예에서, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열은 서열번호 16-18-20-24-26-28, 서열번호 32-34-36-40-42-44, 서열번호 48-50-52-56-58-60, 및 서열번호 64-66-68-72-74-76로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0049] 관련 구현예에서, 본 발명은 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 6개의 CDR로 이루어진 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 서열번호 14/22, 서열번호 30/38, 서열번호 46/54, 및 서열번호 62/70으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. HCVR 및 LCVR 아미노산 서열 내의 CDR을 식별하기 위한 방법 및 기술은 당업계에 공지되어 있고, 본원에 개시된 특정 HCVR 및/또는 LCVR 아미노산 서열 내에서 CDR을 확인하는 데 사용될 수 있다. CDR의 경계를 식별하는 데 사용될 수 있는 예시적인 규정(convention)은, 예를 들어, Kabat 정의, Chothia 정의, 및 AbM 정의를 포함한다. 일반적인 조건에서, Kabat 정의는 서열 변동성에 기초하고, Chothia 정의는 구조적 루프 영역의 위치에 기초하며, AbM 정의는 Kabat 및 Chothia 접근법을 절충한 것이다. 예를 들어, 문헌[Kabat, "Sequences of Proteins of Immunological Interest", National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani 등의 *J. Mol. Biol.* 273:927-948 (1997); 및 Martin 등의 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:9268-9272 (1989)]을 참조한다. 공공 데이터베이스도 항체 내에서 CDR 서열을 확인하는 데 이용할 수 있다.
- [0050] 본 발명은 또한 항-CD63 항체 또는 이의 일부분을 암호화하는 핵산 분자를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 표 11에 열거된 HCVR 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에

열거된 HCVR 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.

- [0051] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 LCVR 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 LCVR 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0052] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 HCDR1 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 HCDR1 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0053] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 HCDR2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 HCDR2 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0054] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 HCDR3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 HCDR3 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0055] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 LCDR1 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 LCDR1 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0056] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 LCDR2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 LCDR2 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0057] 본 발명은 또한, 표 11에 열거된 LCDR3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며; 특정 구현예에서는, 핵산 분자는 표 11에 열거된 LCDR3 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 실질적으로 유사한 서열을 포함한다.
- [0058] 본 발명은 또한, HCVR을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며, 여기서 HCVR은 3개의 CDR로 이루어진 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3)를 포함하고, HCDR1-HCDR2-HCDR3 아미노산 서열 세트는 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 바와 같다.
- [0059] 본 발명은 또한, LCVR을 암호화하는 핵산 분자를 제공하며, 여기서 LCVR은 3개의 CDR로 이루어진 세트(즉, LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하고, LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트는 표 11에 열거된 예시적인 항-CD63 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 바와 같다.
- [0060] 본 발명은 또한 HCVR 및 LCVR 둘 다를 암호화하는 핵산 분자를 제공하며, 여기서 HCVR은 표 11에 열거된 HCVR 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하고, LCVR은 표 11에 열거된 LCVR 아미노산 서열 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 구현예에서, 핵산 분자는 표 11에 열거된 HCVR 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열, 및 표 11에 열거된 임의의 LCVR 핵산 서열 중 어느 하나로부터 선택된 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 이에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 실질적으로 유사한 서열을 포함한다. 본 발명의 이러한 양태에 따른 특정 구현예에서, 핵산 분자는 HCVR 및 LCVR을 암호화하되, HCVR 및 LCVR 둘 다는 표 11에 열거된 동일한 항-CD63 항체로부터 유래된다.
- [0061] 본 발명은 또한, 항-CD63 항체의 중쇄 또는 경쇄 가변 영역을 포함하는 폴리펩티드를 발현할 수 있는 재조합 발

현 백터를 제공한다. 예를 들어, 본 발명은 전술한 핵산 분자 중 어느 하나, 즉 표 11에 제시된 바와 같은 HCVR, LCVR, 및/또는 CDR 서열 중 어느 하나를 암호화하는 핵산 분자를 포함하는 재조합 발현 백터를 포함한다. 본 발명의 범주에는, 이러한 백터가 도입된 숙주 세포, 및 항체 또는 항체 단편의 생산을 가능하게 하는 조건 하에서 숙주 세포를 배양하고, 그렇게 생산된 항체 및 항체 단편을 회수함으로써 항체 또는 이의 일부분을 생산 하는 방법이 또한 포함된다.

[0062] 일부 양태에서, 본 발명은 변형된 글리코실화 패턴을 갖는, 항-CD63 항체와 같은 항체 또는 이의 항원-결합 단편을 포함한다. 일부 구현예에서, 세포독성이 바람직한 경우, 예를 들어, 항체 의존적 세포 독성(ADCC) 기능을 증가시키기 위해 바람직하지 않은 글리코실화 부위를 제거하는 변형이 유용하거나, 올리고당 사슬에 존재하는 푸코오스 잔기가 결여된 항체가 유용할 수 있다(Shields 등 (2002) JBC 277:26733 참조). 다른 응용예에서, 보체 의존적 세포독성(CDC)을 변형시키기 위해 갈락토실화 변형이 이뤄질 수 있다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 발명은 CD63에 특이적으로 결합하는 재조합 인간 항체 또는 이의 단편, 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 관련된 양태에서, 본 발명은 항-CD63 항체 및 제2 치료제의 조합인 조성물을 포함한다. 일 구현예에서, 제2 치료제는 항-CD63 항체와 유리하게 조합되는 임의의 제제이다. 본 발명의 항-CD63 항체를 포함하는 추가적인 병용 요법 및 보조-제형은 본원의 다른 곳에서 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0064] **도 1a**는 다중 도메인 치료 단백질을 개략적으로 나타낸다. 패널 A는 이중 특이적 항체(ii)를 포함하는 다중 도메인 단백질 및 대체 효소(i)를 도시한다. 패널 B는 다중 도메인 치료 단백질을 형성하기 위해 내재화 효과기-특이적 반수체(ii)와 효소-Fc 융합 폴리펩티드(i)를 결합시키는 것을 도시한다. 패널 C는 항-내재화 효과기 항체의 중쇄의 C-말단에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다. 패널 D는 항-내재화 효과기 항체의 중쇄의 N-말단에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다. 패널 E는 항-내재화 효과기 항체의 경쇄의 C-말단에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다. 패널 F는 항-내재화 효과기 항체의 경쇄의 N-말단에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다. 패널 G는 VH 영역(음영이 표시된 사각형) 및 VL 영역(흰색 사각형)을 함유하는 단쇄 가변 단편(scFv)의 C-말단에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다. 패널 H는 2개의 scFv 도메인, 즉 제1 전달 도메인의 역할을 하는 제1 scFv(i) 및 제2 전달 도메인의 역할을 하는 제2 scFv(ii)에 공유 결합된 대체 효소(육각형)를 도시한다.

도 1b는 패널에 표시된 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 AAV 유전자 요법 백터의 비제한적인 예시시를 도시한 것으로, scFv는 항-인간 CD63 scFv이고 대체 효소는 GAA이다(예를 들어, 항-hCD63scFv::hGAA; 예를 들어, 서열번호 10에 제시된 아미노산 서열 참조). 서열번호 10의 아미노산 1-119는 H5C6 항체의 중쇄 가변 도메인(V_H)의 아미노산 서열을 제공하고; 서열번호 10의 아미노산 120-134는 H5C6의 중쇄 가변 도메인과 경쇄 가변 도메인 사이에서 아미노산 링커 서열을 제공하고; 서열번호 10의 아미노산 135-245는 H5C6 항체의 경쇄 가변 도메인(V_L)의 아미노산 서열을 제공하고; 서열번호 10의 아미노산 136-250은 항-hCD63scFv와 GAA 사이에서 아미노산 링커 서열을 제공하며; 서열번호 10의 아미노산 251-1133은 GAA의 아미노산 서열을 제공한다. 예시적인 5' ITR 및 3' ITR 서열은 서열번호 6 및 서열번호 7로서 각각 제시된다. 예시적인 간 특이적 인핸서(세르피나 1)는 서열번호 9로서 제시된다. 예시적인 간 특이적 프로모터(TTR)는 서열번호 8로서 제시된다. 항-CD63 항체 또는 이의 항원 결합 부분을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 작제하는 데 사용될 수 있는 추가의 예시적인 항-CD63 V_H 및 V_L 아미노산 서열(및 이를 암호화하는 뉴클레오티드 서열)은 표 11에 제공된다.

도 2는 조직 1 mg당 축적된 글리코겐의 양(μ g)을 전달된 효소의 함수로서 도시한 막대 그래프이다. X-축은 CD63^{hu/hu}; GAA^{-/-} 마우스 유래의 조직을 도시하며, 좌측에서 우측으로 심장, 사두근, 비복근, 횡격막, 비장근, 및 장지신근(EDL)이다. 검은 박스("1")는 미처리 마우스 폼페병 모델에서의 축적된 글리코겐의 양을 도시한다. 옐렌지색 박스("2")는 미처리 야생형 마우스 모델에서의 축적된 글리코겐의 양을 도시한다. 황녹색 박스("3")는 AAV-hGAA(인간 GAA를 암호화하는 유전자를 함유하는 아데노-연관 바이러스 백터)의 투약량 10¹⁰ vg로 치료한 마우스 폼페병 모델에서의 축적된 글리코겐의 양을 도시한다. 짙은 황녹색 박스("4")는 AAV-hGAA의 투약량 10¹¹ vg로 치료한 마우스 폼페병 모델에서의 축적된 글리코겐의 양을 도시한다. 연청색 박스("5")는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA(인간 GAA에 연결된 항-인간 CD63 scFv 도메인을 암호화하는 유전자를 함유하는 아데노-관련 바이러스 백터)의 투약량 10¹⁰ vg로 치료한 마우스 폼페병 모델에서의 축적된 글리코겐의 양을 도시한다. 짙은 청

색 박스("6")는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA의 투약량 10^{11} vg로 치료한 마우스 폼페병 모델에서의 측정된 글리코겐의 양을 도시한다.

도 3은 AAV 주입 후 3개월차에 각 마우스의 골격근 조직에서 측정된 평균 글리코겐($\mu\text{g}/\text{mg}$)을 도시하는 막대 그래프이다. 각각의 측정치는 특정 효소 작제물의 특정 투약량으로 치료한 마우스당 GAA 노출(즉, 혈청 레벨)의 함수로서 도시된다. 채워진 사각형은 AAV-hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 삼각형은 AAV-hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 역삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 마름모는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다.

도 4는 AAV 주입 후 3개월차에 심장 조직에서 측정된 평균 심근 글리코겐($\mu\text{g}/\text{mg}$)을 특정 투약량의 특정 효소 작제물로 치료한 마우스당 GAA 노출(즉, 혈청 레벨)의 함수로서 도시한 점 도표이다. 채워진 사각형은 AAV-hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 삼각형은 AAV-hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 역삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 채워진 마름모는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다.

도 5는 AAV 주입 후 3개월차에 항-GAA 항체 역가를, 특정 투약량의 특정 효소 작제물로 치료한 마우스당 GAA 노출(즉, 혈청 레벨)의 함수로서 도시한 점 도표이다. 빈 사각형은 AAV-hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 빈 원은 AAV-hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 빈 마름모는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 육각형은 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다.

도 6은 AAV 주입 후 3개월차에 항-GAA 항체 역가를 효소 작제물과 투약량의 함수로서 도시한 점 도표이다. 원은 공 AAV 벡터가 주입된 대조군 마우스를 나타낸다. 사각형은 AAV-hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 삼각형은 AAV-hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 역삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 마름모는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다.

도 7a는 GAA(입의 단위 "a.u."; y-축)의 혈청 레벨을 유전자 요법 벡터 주입 후 주단위 시간의 함수로서 도시한 선 그래프이다. 사각형은 AAV-hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 삼각형은 AAV-hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 역삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{10} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다. 마름모는 AAV-항-hCD63scFv::hGAA가 10^{11} vg의 투약량으로 투여된 것을 나타낸다.

도 7b는 CD63 HumIn GAA KO 마우스(GAA-/-, CD63hu/hu 마우스) 또는 GAA+/+, CD63hu/hu 마우스에서 AAV 작제물의 투여 후 mRNA 비율(mGADPH mRNA에 대해 상대적인 hGAA mRNA)을 도시한 막대 그래프로서, 가령: (1) 미처리 대조군, (2) AAV-간-특이적 프로모터-hGAA(1e10vg), (3) AAV-간-특이적 프로모터-hGAA(1e11vg), (4) AAV-간-특이적 프로모터-hCD63::hGAA(1e10vg), (5) AAV-간-특이적 프로모터-항-hCD63::hGAA(1e11vg), 또는 (6) 미처리 대조군(GAA+/+, CD63hu/hu)이다. GAA의 간 발현은 AAV 작제물의 모든 주입량에 대해 검출되었다.

도 7c는 융합 단백질(사각형)을 암호화하는 AAV가 투여되는 마우스 및 GAA를 암호화하는 AAV가 투여되는 마우스를 대상으로, GAA 혈청 레벨을 GAA의 RNA 발현 레벨과 비교한 도표 그래프이다(두 작제물 모두는 발현을 유도하는 간-특이적 프로모터(LSP)를 제공하였음).

도 7d는 간-특이적 프로모터에 의해 유도되고 hGAA를 암호화하는 작제물인, 항-hCD63 scFv::GAA(융합 작제물) 또는 비-결합 융합 작제물인 scFv::GAA(대조군)를 사용해 일시적으로 형질감염시킨 Huh-7 인간 간세포를 도시한 막대 그래프이다. 형질감염 후 3일차에, 분비된 상청액에서의 단백질 비율은 hGAA 단독보다는 두 scFv::GAA 융합 작제물 모두에서 더 높았다. CI-MPR 매개 흡수를 완화시키기 위해 실험 기간 동안 상청액에 M6P를 첨가하는 것은 비율에 영향을 미치지 않았다(* = $p < 0.05$, $n=3$).

도 8은 lamp1로 염색한 마우스 근섬유 내의 리소좀을 도시한 형광 현미경 사진으로, 핵을 드러내기 위해 DAPI로

대조염색한 것이다. 패널 A 및 A1은 미처리 야생형($GAA^{+/+}$) 마우스 유래의 사두근 세포로서, lamp1로 염색한 것(패널 A)과 핵(패널 A1)을 도시한다. 패널 B 및 B1은 미처리 $GAA^{-/-}$ 마우스 유래의 사두근 세포로서, lamp1로 염색한 것(패널 B)과 핵(패널 B1)을 도시한다. 패널 C 및 C1은 AAV-hGAA 작제물로 처리한 $GAA^{-/-}$ 마우스 유래의 사두근 세포로서, lamp1로 염색한 것(패널 C)과 핵(패널 C1)을 도시한다. 패널 D 및 D1은 AAV-hCD63scFv::hGAA 작제물로 처리한 $GAA^{-/-}$ 마우스 유래의 사두근 세포로서, lamp1로 염색한 것(패널 D)과 핵(패널 D1)을 도시한다.

도 9는 AAV-LSP hGAA 또는 AAV-LSP 항-hCD63::hGAA로 처리된 마우스의 파지 강도 및 로타로이드(Rotarod) 시험 성능을 보여주는 선 그래프를 도시한다. 야생형 마우스(역삼각형), 미처리 마우스(사각형), AAV-LSP-hGAA 처리(1e11vg/마우스) 마우스(삼각형), 또는 AAV-LSP-항-hCD63::hGAA 처리(1e11vg/마우스) 마우스(원)의 가속 로타로이드 측정(A) 및 앞발 파지 강도 측정(B)을 매월 간격으로 6개월 동안 실시하였다. 에러 바는 +/- SD이다. 모든 그룹에 대해 N=8~10이다.

도 10a 및 도 10b는 GAA를 가이드하기 위한 항-ITGA7(인테그린 알파-7) scFv 융합 단백질과 같은, 가이드로서의 다른 막 단백질을 사용한 것을 도시한다. **도 10a**는 5 mM MGP의 존재와 상관없이 항-마우스 CD63-GAA 또는 항-마우스 ITGA7-GAA로 밤새 배양한 C2C12 마우스 근육아세포의 GAA 활성(y축)을 보여준다. **도 10b**는 CD63에 대해 인간화된 GAA KO 마우스($GAA^{-/-}$;CD63hu/hu)에 유체역학적 전달(HDD)에 의해 scFv::GAA 포맷의 항-hCD63::GAA를 암호화하는 플라스미드를 주입하거나(2), 항-마우스 인테그린 알파-7의 전장 IgG4::GAA 포맷을 주입하고(3), 이어서 HDD 이후 3주차에 조직 글리코젠 레벨을 측정하는 것을 도시한 것이다. 미처리 대조군 마우스인 $GAA^{-/-}$;CD63hu/hu(1) 및 미처리 야생형 GAA 대조군 마우스인 $GAA^{+/+}$;CD63hu/hu(4)에 대해서도 동일한 조직에서 글리코젠 레벨을 시험하였다.

도 11은 AAV 주입 후 1개월차에 GAA의 혈청 레벨(임의 단위 "a.u."; y축)을 효소 작제물 및 투약량의 함수로서 도시한 점 도표이다. 사각형은 AAV-LSP-8GAA를 나타낸다. 삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::GAA를 나타낸다. 두 작제물 모두는 발현을 유도하기 위한 간 특이적 프로모터(LSP)를 제공하였다. 투약량은 마우스의 체중(kg)당 바이러스 계놈(vg)으로서 제공된다.

도 12는 조직(심장, 사두근, 횡격막 또는 삼두근) 1 mg당 μ g 단위의 글리코젠 레벨을 GAA 혈청 레벨의 함수로서 도시한 점 도표를 제공한다. 사각형은 AAV-LSP-8GAA를 나타낸다. 삼각형은 AAV-항-hCD63scFv::GAA를 나타낸다. 두 작제물 모두는 발현을 유도하기 위한 간 특이적 프로모터(LSP)를 제공하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] 본 발명은 기술된 특정한 구현예, 조성물, 방법 및 실험 조건으로 한정되지 않는데, 이러한 구현예, 조성물, 방법 및 조건이 다양할 수 있기 때문이다. 본 발명의 범위는 단지 첨부된 청구항에 의해 한정되므로, 본원에서 사용된 용어는 특정 구현예를 설명하고자 할 뿐 한정하는 것은 아니다.

[0066] 본원에 기재된 방법 및 재료와 유사 또는 동등한 어떠한 방법 및 재료도 본 발명의 실시 또는 검사에 사용될 수 있으며, 몇몇 바람직한 방법 및 재료를 지금부터 설명한다. 본원에 인용된 모든 공개문헌은 그 전체가 본원에 참고로 인용되어 있다. 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속한 당해 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 널리 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.

[0067] "효소-결핍 질환(enzyme-deficiency diseases)"은 크라베병(Krabbe disease)(갈락토실세라미다아제(galactosylceramidase)), 페닐케톤뇨증(phenylketonuria), 갈락토오스혈증(galactosemia), 단풍시럽뇨병(maple syrup urine disease), 미토콘드리아 장애(mitochondrial disorder), 프리드라이히 운동실조(Friedreich ataxia), 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome), 부신백질이영양증(adrenoleukodystrophy), 윌슨병(Wilson disease), 혈색소침착증(hemochromatosis), 오르니틴 트랜스카르바밀라아제 결핍(ornithine transcarbamylase deficiency), 메틸말론산혈증(methylmalonic academia), 프로피온산혈증(propionic academia), 및 리소좀 축적 질환(lysosomal storage disease)과 같은 비-리소좀 축적 질환을 포함한다. "리소좀 축적 질환"은 리소좀 기능의 결함으로 인한 임의의 장애를 포함한다. 현재, 대략 50가지 리소좀 축적 장애가 확인되었는데, 가장 잘 알려진 것은 테이-삭스병, 고세병, 니먼-피크병을 포함한다. 이 질환의 병인은 보통 단백질 기능의 상실로 인한, 리소좀에서의 불완전한 분해 산물의 축적(buildup)에 기인한다. 리소좀 축적 질환은 그것의 정상적인 기능이 리소좀 함유물을 분해시키거나 분해를 조정하는 것인 단백질에서의 기능 상실 또는 변이체를 감소시킴으로써 발생한다. 리소좀 축적 질환과 관련된 단백질에는 효소, 수용체 및 기타 막관통 단백질

(예, NPC1), 번역-후 변형 단백질(예, 설파타아제), 막 수송 단백질, 및 비-효소 보조인자 및 기타 가용성 단백질(예, GM2 갱글리오시드 활성화제)를 포함한다. 따라서, 리소좀 축적 질환은 결합있는 효소에 기인하는 이들 장애 그 자체보다 많은 것을 포괄하며, 임의의 분자적 결함으로 인한 임의의 장애도 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "효소"는 리소좀 축적 질환과 연관된 다른 단백질을 포괄하는 의미를 갖는다.

[0068] 분자 병변의 성질은 많은 경우 질환의 중증도에 영향을 미친다, 즉, 완전한 기능 상실은 출생전 또는 신생아 발병과 연관되는 경향이 있으며, 심각한 증상을 수반하고; 부분적 기능 상실은 (상대적으로) 가벼운 나중 발병하는 질환과 연관이 있다. 일반적으로, 결합있는 세포의 대사 결함을 교정하기 위해서 단지 약간의 활성 비율만 회복되면 된다. 표 1은 보다 일반적인 몇몇 리소좀 축적 질환과 그와 연관된 기능 상실을 나열하고 있다. 리소좀 축적 질환은 일반적으로 Desnick and Schuchman, 2012에 설명되어 있다.

[0069] 리소좀 축적 질환은 결함이 있는 리소좀 내에 축적되는 산물의 유형에 따라 분류될 수 있다. 스펅고리피드 축적증은 지방족 아미노 알코올에 연결된 지방산을 함유하는 지질인, 스펅고리피드의 대사에 영향을 미치는 질환의 부류이다 (S. Hakomori, "Glycosphingolipids in Cellular Interaction, Differentiation, and Oncogenesis," 50 Annual Review of Biochemistry 733-764, July 1981에서 검토됨). 스펅고리피드 축적증의 축적 산물은 갱글리오시드(예, 테이-삭스병), 당지질(예, 파브리병) 및 글루코세레브로시드(예, 고세병)를 포함한다.

[0070] 뮤코다당류 축적증은 골, 연골, 힘줄, 각막, 피부 및 결합 조직을 만드는 데 도움이 되는 반복적인 이당류의 긴 미-분지형 사슬인, 글리코사미노글리칸 (GAGS 또는 뮤코다당류)의 대사에 영향을 미치는 질환 군이다(J. Muenzer, "Early initiation of enzyme replacement therapy for the mucopolysaccharidoses," 111(2) Mol. Genet. Metab. 63-72 (Feb. 2014); Sasisekharan 등의 "Glycomics approach to structure-function relationships of glycosaminoglycans," 8(1) Ann. Rev. Biomed. Eng. 181-231 (Dec. 2014)에서 검토됨). 뮤코다당류 축적증의 축적된 산물로는 헤파란 설페이트, 더마탄 설페이트, 케라틴 황산염, 각종 형태의 콘드로이친 설페이트 및 히알루론산이 있다. 예를 들어, 모르키오 증후군 A는 케라틴 설페이트와 콘드로이친 6-설페이트의 리소좀 축적을 초래하는, 리소좀 효소 갈락토오스-6-설페이트 설파타아제의 결함으로 인한 것이다.

[0071] 글리코겐 축적 질환 (글리코겐 축적증으로도 알려짐)은 세포가 글리코겐을 대사 (생성 또는 분해)할 수 없음에 따른 결과이다. 글리코겐 대사는 글루코오스-6-포스파타아제, 산 알파-글루코시다아제, 글리코겐 탈-분지 효소, 글리코겐 분지 효소, 근육 글리코겐 인산화효소, 간 글리코겐 인산화효소, 근육 포스포프럭토키나아제, 인산화 효소 키나아제, 글루코오스 수송체, 알돌라아제 A, 베타-엔올라아제 및 글리코겐 합성효소를 포함한 다양한 효소 또는 기타 단백질에 의해 조절된다. 예시적인 리소좀 축적/글루코겐 축적 질환은 폼페병이며, 결합있는 산 알파-글루코시다아제가 글리코겐이 리소좀에 축적되게 하는 것이다. 증상으로는 간비대, 근육 약화, 심장마비, 및 영유아기 변이의 경우 2세까지의 사망이 포함된다 (DiMauro and Spiegel, "Progress and problems in muscle glycogenesis," 30(2) Acta Myol. 96-102 (Oct. 2011) 참조).

[0072] "다중 도메인 치료 단백질"은 (i) 2개 이상의 기능성 도메인을 함유하는 단일 단백질, (ii) 2개 이상의 폴리펩티드 사슬을 함유하는 단백질, (iii) 2개 이상의 단백질 또는 2개 이상의 폴리펩티드의 혼합물을 포함한다. 용어 폴리펩티드는 일반적으로 펩티드 결합을 통해 함께 연결된 단쇄의 아미노산을 의미하는 것으로 간주된다. 용어 단백질은 폴리펩티드라는 용어를 포함하지만, 또한 더 복잡한 구조를 포함한다. 즉, 단일 폴리펩티드는 단백질이고, 단백질은 고차원 구조와 결합된 하나 이상의 폴리펩티드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 헤모글로빈은 2개의 알파 글로빈 폴리펩티드와 2개의 베타 글로빈 폴리펩티드인, 4개의 폴리펩티드를 함유하는 단백질이다. 미오글로빈은 또한 단백질이지만, 단일 미오글로빈 폴리펩티드만 함유하고 있다.

[0073] 다중 도메인 치료 단백질은 하나 이상의 폴리펩티드(들) 및 2가지 기능을 제공하는 적어도 2개의 도메인을 포함한다. 이들 도메인 중 하나는 효소 결핍 질환과 관련된 결함 단백질을 활성화시키는 "효소 도메인"이다. 이들 도메인 중 다른 하나의 도메인은 내재화 효과기에 결합하는 "전달 도메인"이다. 따라서, 효소 교체 활성을 제공하고, 내재화 효과기에 결합하는 능력을 제공하는 단일 폴리펩티드(내재화 효과기 결합 단백질(전달 도메인 활성화)로도 알려짐)가 다중 도메인 치료 단백질이다. 하나의 단백질이 효소 기능을 제공하고, 또 다른 단백질이 내재화 효과기 결합 활성을 갖는 단백질 혼합물도 다중 도메인 치료 단백질이다. 도 1a는 다중 도메인 치료 단백질의 다양한 예시를 도시한다. 일 실시예(도 1, 패널 A)에서, 다중 도메인 치료 단백질은 효소(육각형으로 표시됨), 및 효소(격자선으로 표시됨)와 내재화 효과기(실선)에 결합하는 이중특이적 항체(IE-BP)를 함유한다. 여기서, 이중특이적 항체의 하나의 아암은 효소에 비공유 결합하고, 다른 하나의 아암은 내재화 효과기에 비공유 결합하여, 대체 효소가 세포 또는 세포 내 구획에 내재화할 수 있게 한다. 또 다른 실시예(패널 B)에서, 다중 도메인 치료 단백질은 2개의 폴리펩티드를 함유하는 단일 단백질을 포함하며, 이 중 하나의 폴리펩티드는 효소 기

능을 갖고 다른 하나는 전달 도메인 기능을 갖는다. 여기서, 효소는 면역글로불린 Fc 도메인 또는 중쇄 불변 영역에 융합되는데, 이는 효소 절반 항체의 Fc 도메인과 결합하여 이기능성 다중 도메인 치료 단백질을 형성한다. 패널 B에 도시된 구현예는 효소가 절반 항체의 면역글로불린 가변 도메인에서의 항원-항체 상호작용을 통하기 보다는, 절반 항체 중 하나에 공유 결합되는 것을 제외하면, 패널 A의 것과 유사하다.

[0074] 다른 실시예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 (링커를 통해 직접적으로 또는 간접적으로) 전달 도메인에 공유 결합된 효소로 구성된다. 하나의 구현예에서, 효소는 면역글로불린 분자의 C-말단(예: 중쇄이거나 대안적으로는 경쇄)에 부착된다. 또 다른 구현예에서, 효소는 면역글로불린 분자의 N-말단(예: 중쇄이거나 대안적으로는 경쇄)에 부착된다. 이러한 실시예에서, 면역글로불린 분자는 전달 도메인이다. 또 다른 구현예에서, 효소는 내재화 효과기에 결합하는 scFv 분자의 C-말단에 부착된다.

[0075] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 2개의 전달 도메인을 포함한다. 일 구현예에서, 제1 전달 도메인은 리소솜 수송 분자 또는 다른 내재화 효과기(예: CD63)에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 제2 전달 도메인은 세포외배출 효과기에 결합하여 다중 도메인 치료 단백질의 세포간 수송을 용이하게 한다. 일 실시예에서, 세포외배출 효과기는, 특히, LDL 수용체, IgA 수용체, 트랜스페린 수용체, 또는 신생아 Fc 수용체(FcRn)이다. 구체적인 구현예에서, 세포외배출 전달 도메인은 트랜스페린 수용체에 결합하는 분자, 예를 들어, 항-트랜스페린 수용체 항체 또는 항-트랜스페린 수용체 scFv 분자를 포함한다. Tuma 및 Hubbard의 "Transcytosis: Crossing Cellular Barriers," *Physiological Reviews*, 83(3): 871-935 (1 July 2003)는 본 발명의 실시예 유용한 세포외배출을 매개하는 세포 표면 수용체에 대한 참조로써 본원에 통합된다.

[0076] "효소 도메인" 또는 "효소"는 효소 결핍 질환의 병인 또는 생리학적 효과와 관련된 임의의 단백질을 지칭한다. 효소는 실제 효소, 수송 단백질, 수용체, 또는 결합이 있고 질환을 일으킨 분자 병변으로 인한 다른 단백질을 포함한다. 효소는 또한 질환의 분자 병변을 대체하거나 우회하는 유사하거나 충분한 생화학적 또는 생리학적 활성을 제공할 수 있는 임의의 단백질을 포함한다. 예를 들어, "아이소자임"이 효소로서 사용될 수 있다. 리소솜 축적 질환 관련 단백질의 실시예는 표 1에서 "관련 효소/단백질"로 열거한 것들과 효소 결핍 질환의 분자 결합을 우회하는 임의의 알려졌거나 나중에 발견된 단백질 또는 다른 분자를 포함한다.

[0077] 일부 구현예에서, 효소는 에스테라아제, 글리코실라아제, 에테르 결합에 작용하는 가수분해효소, 펩티다아제, 선형 아미다아제, 디포스파타아제, 케톤 가수분해효소, 할로게나아제, 포스포아미다아제, 설포가수분해효소, 설피나아제, 데설피나아제 등을 포함하는 가수분해효소이다. 일부 구현예에서, 효소는 글리코시다아제 및 N-글리코실라아제를 포함하는 글리코실라아제이다. 일부 구현예에서, 효소는 알파-아밀라아제, 베타-아밀라아제, 글루칸 1,4-알파-글루코시다아제, 셀룰로오스, 엔도-1,3(4)-베타-글루카나아제, 이눌리나아제, 엔도-1,4-베타-크틸라나아제, 엔도-1,4-b-크실라나아제, 텍스트라나아제, 키티나아제, 폴리갈락투로니다아제, 리소솜, 엑소-알파-시알리다아제, 알파-글루코시다아제, 베타-글루코시다아제, 알파-갈락토시다아제, 베타-갈락토시다아제, 알파-만노시다아제, 베타-만노시다아제, 베타-프록토폴라노시다아제, 알파,알파-트라할로오스, 베타-글루쿠로니다아제, 크실란 엔도-1,3-베타-크실로시다아제, 아밀로-알파-1,6-글루코시다아제, 히알루로노글루코사미니다아제, 히알루로노글루쿠로니다아제, 등을 포함하는 글루코시다아제이다.

[0078] 분자적 결합이 α-글루코시다아제 활성의 결함인, 폼페병의 경우, 효소는 인간 알파-글루코시다아제, "아이소자임", 예컨대 다른 알파-글루코시다아제, 조각된 재조합 알파-글루코시다아제, 기타 글루코시다아제, 재조합 글루코시다아제, 단일 알파-글루코오스 분자를 방출하기 위해 말단 비-환원성 1-4 결합 알파-글루코오스 잔기를 가수분해하도록 조각된 임의의 단백질, 임의의 EC 3.2.1.20 효소, 글리코겐 또는 전분을 위한 천연 또는 재조합 저 pH 탄수화물 가수분해효소, 및 글루코실 가수분해효소, 예컨대 수크라아제 아이소말타아제, 말타아제 글루코아밀라아제, 글루코시다아제 II 및 중성 알파-글루코시다아제를 포함한다.

[0079] "내재화 효과기"는 세포 내로 내재화될 수 있거나 그렇지 않으면 역행성 막 수송(trafficking)에 관여하거나 이의 한 원인이 되는 단백질을 포함한다. 일부 경우에, 내재화 효과기는 세포외배출을 거치는 단백질이다; 즉, 단백질은 세포의 한 쪽에서 내재화되고, 세포의 다른 쪽으로 (예를 들어, 정점에서 바닥으로) 수송된다. 많은 구현예에서, 내재화 효과기 단백질은 세포 표면 발현된 단백질 또는 가용성 세포 외 단백질이다. 그러나 본 발명은 또한 내재화 효과기 단백질이 엔도솜, 소포체, 골지, 리소솜 등과 같은 세포 내 구획 내에서 발현되는 구현예도 고려한다. 예를 들어, 역행성 막 수송(예컨대 초기/재순환 엔도솜으로부터 트랜스-골지 네트워크까지의 경로)에 관련된 단백질은 본 발명의 다양한 구현예에서 내재화 효과기 단백질로 작용할 수 있다. 어떠한 경우에도, 내재화 효과기 단백질에 대한 전달 도메인의 결합은 전체 다중 도메인 치료 단백질 및 이와 결합된 임의의 분자(예를 들어, 효소)가 세포 내로 내재화되도록 한다. 아래에서 설명된 바와 같이, 내재화 효과기 단

백질은 세포 내로 직접적으로 내재화되는 단백질뿐 아니라 세포 내로 간접적으로 내재화되는 단백질도 포함한다.

- [0080] 세포 내로 직접적으로 내재화되는 내재화 효과기 단백질은 적어도 하나의 세포 외 도메인을 갖는 막 결합 분자 (예를 들어, 막관통 단백질, GPI 닻형 단백질 등)를 포함하는데, 그것들은 세포 내재화를 거치며, 바람직하게는 세포 내 분해 및/또는 재순환 경로를 통해 치료된다. 세포 내로 직접적으로 내재화되는 내재화 효과기 단백질의 구체적인 비 제한적 예로는 예를 들어, CD63, MHC-I (예, HLA-B27), 크레멘-1, 크레멘-2, LRP5, LRP6, LRP8, 트랜스페린 수용체, LDL-수용체, LDL-관련 단백질 1 수용체, ASGR1, ASGR2, 아밀로이드 전구체 단백질 유사 단백질-2(APLP2), 아펠린 수용체(APLNR), MAL(미엘린 및 림프구 단백질, 일명 VIP17), IGF2R, 액포형 H+ ATP아제, 디프테리아 독소 수용체, 엽산 수용체, 글루타메이트 수용체, 글루타티온 수용체, 랩틴 수용체, 스캐빈저 수용체(예, SCARA1-5, SCARB1-3, CD36) 등이 포함된다.
- [0081] 특정 구현예에서, 내재화 효과기는 프로락틴 수용체(PRLR)이다. PRLR은 일부 치료적 적용을 위한 표적일 뿐만 아니라 높은 내재화 및 전환(turn-over) 비율을 기반으로 한 효율적인 내재화 효과기 단백질이기도 하다는 점이 발견되었다. 내재화 효과기 단백질로서의 PRLR의 가능성은 예를 들어 WO2015/026907에서 설명되었는데, 그 중에서도 시험관 내에서 항-PRLR 항체가 PRLR을 발현하는 세포에 의해 효과적으로 내재화됨이 증명되었다.
- [0082] 특정 구현예에서, 내재화 효과기는 신장 특이적 내재화제, 예컨대 CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (부갑상선 호르몬 수용체), SLC22A13 (용질 운반체 군 22 멤버 13), SLC5A2 (나트륨/글루코오스 공동수송체 2) 및 UMOD (Uromodulin)이다. 다른 특정한 구현예에서, 내재화 효과기는 근육 특이적 내재화제, 예컨대 BMPRI1A(골 형성 단백질 수용체 1A), m-카데린, CD9, MuSK(근육 특이적 키나아제), LGR4/GPR48(G 단백질-결합 수용체 48), 콜린효능성 수용체(니코틴성) 알파 1, CDH15(Cadherin-15), ITGA7(인테그린 알파-7), CACNG1(L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-1), CACNA1S(L-형 칼슘 채널 서브유닛 알파-15), CACNG6(L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-6), SCN1B(나트륨 채널 서브유닛 베타-1), CHRNA1(Ach 수용체 서브유닛 알파), CHRND(Ach 수용체 서브유닛 델타), LRRC14B(류신-풍부 반복체-함유 단백질 14B), 디스트로글리칸(DAG1), 및 POPDC3(파파이 도메인-함유 단백질 3)이다. 일부 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, 또는 PRLR이다.
- [0083] 내재화 효과기 (IE)가 세포 내로 직접적으로 내재화되는 구현예에서, 전달 도메인은 예를 들면, IE에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원-결합 단편, 또는 IE와 특이적으로 상호 작용하는 리간드 또는 리간드의 부분일 수 있다. 예를 들어, IE가 크레멘-1 또는 크레멘-2인 경우, 전달 도메인은 크레멘 리간드(예, DKK1) 또는 이의 크레멘 결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다. 다른 실시예로서, IE가 ASGR1과 같은 수용체 분자인 경우, 전달 도메인은 이러한 수용체에 특이적인 리간드(예: 아시알로오소뮤코이드 [ASOR] 또는 베타-GalNAc) 또는 이의 수용체-결합 부분을 포함하거나 그것으로 구성될 수 있다.
- [0084] 세포 내로 간접적으로 내재화되는 내재화 효과기 단백질은, 단독으로 내재화하지 않지만 결합 후에 또는 그렇지 않으면 세포 내로 직접적으로 내재화되는 제2 단백질 또는 폴리펩티드와 결합한 후에 세포 내로 내재화되는 단백질 및 폴리펩티드를 포함한다. 세포 내로 간접적으로 내재화되는 단백질에는 예를 들어, 내재화 세포 표면에 발현된 수용체 분자에 결합할 수 있는 가용성 리간드가 포함된다. 내재화 세포 표면에 발현된 수용체와의 상호 작용을 통하여 세포 내로 (간접적으로) 내재화되는 가용성 리간드의 비 제한적인 예는 트랜스페린이다. IE가 트랜스페린(또는 간접적으로 내재화되는 또 다른 단백질)인 구현예에서, IE에 대한 전달 도메인의 결합, 및 트랜스페린 수용체(또는 내재화 세포-표면 발현된 또 다른 수용체 분자)와 IE의 상호 작용은, 전체 전달 도메인 및 이와 결합된 임의의 분자(예: 효소)가 IE 및 이의 결합 파트너의 내재화와 동시에 세포에 내재화되게 한다.
- [0085] IE가 세포 내로 간접적으로 내재화되는 구현예에서, 전달 도메인은, 예를 들어, IE에 특이적으로 결합하는 항체 또는 항체의 항원 결합 단편이거나, 가용성 효과기 단백질과 특이적으로 상호 작용하는 수용체 또는 수용체의 일부분일 수 있다. 예를 들어, IE가 사이토카인인 경우, 전달 도메인은 상응하는 사이토카인 수용체 또는 이의 리간드 결합 부분을 포함하거나 이로 구성될 수 있다.
- [0086] 예시적인 IE는 세포막에 4차레 걸쳐 있는 세포 표면 단백질의 테트라스패닌 상과군(tetraspanin superfamily)의 멤버인, CD63이다. CD63은 사실상 모든 조직에서 발현되며 신호전달 복합체를 형성하고 안정화시키는 데 관여하는 것으로 여겨진다. CD63은 세포막, 리소좀 막, 및 후기 엔도솜 막에 국재화된다. CD63은 인테그린과 결합하는 것으로 알려져 있으며 상피-중간엽 전이(epithelial-mesenchymal transition)에 관여할 수도 있다. H. Maecker 등, "The tetraspanin superfamily: molecular facilitators," 11(6) FASEB J. 428-42, May 1997; 및 M. Metzelaar 등, "CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening

procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells," 266 J. Biol. Chem. 3239-3245, 1991 참조.

- [0087] 또 다른 예시적인 IE는 APP (아밀로이드 전구체 단백질) 과의 광범위하게 발현된 멤버인, 아밀로이드 베타 (A4) 전구체 유사 단백질 2 ("APLP2")이다. APLP2는 주요 조직적합성 복합체 (MHC) 클래스 I 분자 (예, Kd)와 상호 작용하는 것으로 알려진 막-결합 단백질이다. 이는 세포 표면에서 Kd에 결합하고 견인해서 Kd와 클라트린-의존 적 방식으로 내재화된다. Tuli 등의 "Mechanism for amyloid precursor-like protein 2 enhancement of major histocompatibility complex class I molecule degradation," 284 The Journal of Biological Chemistry 34296 -34307 (2009) 참조.
- [0088] 또 다른 IE 예시는 프로락틴 수용체 (PRLR)이다. 프로락틴 수용체는 타입 I 사이토카인 수용체 과의 멤버이며, 리간드 결합 및 후속하는 이량체화 시에 "티로신 키나아제 Jak2, Fyn 및 Tec, 포스포타아제 SHP-2, 구아닌 뉴클 레오티드 교환 인자 Vav 및 신호전달 억제자 SOCS"를 활성화시킨다 (Clevenger 및 Kline, "Prolactin receptor signal transduction," 10(10) Lupus 706-18 (2001), 초록 참조). 프로락틴 수용체는 엔도시토시스 재순환을 거치며 리소좀 구획에서 발견될 수 있다. Genty 등의 "Endocytosis and degradation of prolactin and its receptor in Chinese hamster ovary cells stably transfected with prolactin receptor cDNA," 99(2) Mol. Cell Endocrinol. 221-8 (1994); 및 Ferland 등의 "The effect of chloroquine on lysosomal prolactin receptors in rat liver," 115(5) Endocrinology 1842-9 (1984) 참조.
- [0089] 본원에서 사용되는, "면역 반응"은 일반적으로 외부 또는 "비-자기(non-self)" 단백질에 대한 환자의 면역 반응을 의미한다. 이 면역 반응에는 알레르기 반응과 대체 효소의 효과를 방해하는 항체의 발달이 포함된다. 몇몇 환자는 기능하지 않는 단백질 중 어느 것을 생산하지 않아서, 대체 효소를 "외래" 단백질로 만든다. 예를 들어, GLA가 부족한 파브리병 환자에게 반복적으로 재조합 GLA (rGLA)를 주사하면 알레르기 반응이 자주 발생한다. 다 른 환자들에서는, rGLA에 대한 항체 생산이 질환 치료에 있어서 대체 효소의 효과를 감소시키는 것으로 나타났다. 예를 들어, GLA를 대체하기 위해 변형된 NAGA를 "아이소자임"으로 사용하는 것에 대해 논의하고 있는 Tajima 등의 ("Use of a Modified α -N-Acetylgalactosaminidase (NAGA) in the Development of Enzyme Replacement Therapy for Fabry Disease," 85(5) Am. J. Hum. Genet. 569-580 (2009))을 참조한다. 변형된 NAGA는 GLA와 면역학적 교차 반응성을 갖지 않으며, "재조합 GLA로 반복적으로 치료한 파브리병 환자의 혈청에 는 반응하지 않았다(did not react to serum from a patient with Fabry disease recurrently treated with a recombinant GLA.)" 상기 문헌의 초록 참조.
- [0090] "면역억제제"는 일반적인 면역억제를 생성하는 약물 및/또는 단백질을 포함하며, 대체 효소에 대한 교차 반응성 면역학적 물질(CRIM), 예를 들어 폼페병 또는 파브리병 환자에게서 GAA 또는 GLA를 예방하는 데 사용될 수 있다. 면역억제제의 비제한적인 실시예는 메토티렉세이트, 마이코페놀레이트 모페틸, 시클로포스파미드, 라파마 이신 DNA 알킬화제, 항-CD20 항체, 항-BAFF 항체, 항-CD3 항체, 항-CD4 항체, 및 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0091] 간과 같은 조직에 특이적인 조절 요소, 예를 들어, 프로모터는, 조절 요소가 특이적인 조직 내에서 이러한 조절 요소의 조절에 의해 핵산 서열, 예를 들어, 유전자의 발현을 증강시킨다. 간 특이적 조절 요소, 예를 들어 간 특이적 프로모터의 비 제한적인 예는 Chuah 등의 (2014) *Mol. Ther.* 22:1605-13을 참조한다.
- [0092] 용어 "단백질"은 아미드 결합을 통해 공유 결합된 약 20개 넘는 아미노산을 갖는 임의의 아미노산 중합체를 의 미한다. 단백질은 당업계에서 "폴리펩티드"로 일반적으로 알려져 있는 하나 이상의 아미노산 중합체 사슬을 함 유한다. 따라서, 폴리펩티드는 단백질일 수도 있고, 단백질은 단일의 기능을 하는 생물분자를 형성하기 위해 다 수의 폴리펩티드를 함유할 수도 있다. (시스틴 잔기들의 사이에서 시스틴을 형성하는) 이황화 브릿지가 일부 단 백질에 존재할 수 있다. 이러한 공유 연결은 단일 폴리펩티드 사슬 내, 또는 2개의 개별 폴리펩티드 사슬 사이 에 존재할 수도 있다. 예를 들어, 이황화 브릿지는 인슐린, 면역글로불린, 프로타민 등의 적절한 구조와 기능에 필수적이다. 이황화 결합 형성에 관한 최근의 검토는, Oka 및 Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum", 1833(11) *Biochim Biophys Acta* 2425-9 (2013)를 참조한다.
- [0093] 본원에서 사용되는, "단백질"은 생물치료 단백질, 연구 또는 치료에 사용되는 재조합 단백질, 트랩(trap) 단백 질 및 기타 Fc-융합 단백질, 키메라 단백질, 항체, 단일클론 항체, 인간 항체, 이중특이적 항체, 항체 단편, 나 노바디, 재조합 항체 키메라, scFv 융합 단백질, 사이토카인, 케모카인, 펩티드 호르몬 등을 포함한다. 단백질 은 재조합 세포 기반 생산 시스템, 예컨대 곤충 바콜로바이러스 시스템, 효모 시스템 (예, 피키아 속(*Pichia* sp.)), 포유류 시스템 (예, CHO 세포 및 CHO-K1 세포와 같은 CHO 유도체)을 사용하여 생산될 수도 있다. 생물치 료 단백질과 그 생산에 관한 최근의 검토는, Ghaderi 등의 "Production platforms for biotherapeutic

glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation," 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012)을 참조한다.

[0094] 용어 "항체"는 본원에서 사용되는 바와 같이, 4개의 폴리펩티드 사슬, 즉 이황화 결합에 의해 상호 연결된 2개의 중(H)쇄 및 2개의 경(L)쇄를 포함하는 면역글로불린 분자를 포함한다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본 설명에서 HCVR 또는 VH로 약칭됨)과 중쇄 불변 영역을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 세 개의 도메인 CH1, CH2 및 CH3을 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본 설명에서 LCVR 또는 VL로 약칭됨)과 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인, CL을 포함한다. VH와 VL 영역은 추가적으로, 더 보존적이면서 프레임워크 영역(FR)인 영역들이 중간에 끼어 있는, 상보성 결정 영역(CDR)이라 지칭되는 초가변성 영역으로 다시 나누어질 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단 쪽으로 다음 순서로 배열된 세 개의 CDR과 네 개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR는 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3로 약칭될 수도 있고; 경쇄 CDR는 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3로 약칭될 수도 있다. 용어 "고 친화도" 항체는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어, BIACORE™ 또는 용액-친화도 ELISA에 의해 측정했을 때, 그들의 표적에 대해 적어도 10^{-9} M, 적어도 10^{-10} M; 적어도 10^{-11} M; 또는 적어도 10^{-12} M의 결합 친화도를 갖는 항체를 지칭한다. 용어 "항체"는 예를 들어, 단클론 또는 다클론과 같은 임의의 유형의 항체를 포함할 수 있다. 또한, 항체는 예컨대 포유류 또는 비-포유류와 같은 임의의 기원일 수 있다. 일 구현예에서, 항체는 포유류 또는 조류 항체일 수 있다. 추가의 구현예에서, 항체는 인간 기원일 수 있고 인간 단클론 항체일 수 있다.

[0095] 문구 "이중특이적 항체"는 2개 이상의 에피토프에 선택적으로 결합할 수 있는 항체를 포함한다. 이중특이적 항체는 일반적으로 상이한 2개의 중쇄를 포함하며, 각각의 중쇄는 2개의 상이한 분자 (예, 항원) 또는 (예를 들어, 동일한 항원 상의) 동일한 분자 상에서 상이한 에피토프에 특이적으로 결합한다. 이중특이적 항체가 2개의 상이한 에피토프(제1 에피토프 및 제2 에피토프)에 선택적으로 결합할 수 있는 경우, 제1 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도는 제2 에피토프에 대한 제1 중쇄의 친화도보다 일반적으로 적어도 수 배에서 수십 배, 또는 수백 배, 또는 수천 배 낮거나 그 반대가 된다. 이중특이적 항체에 의해 인식되는 에피토프는 동일하거나 상이한 표적(예, 동일하거나 상이한 단백질)에 존재할 수 있다. 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄들을 조합함으로써, 이중특이적 항체가 생성될 수 있다. 예를 들어, 동일한 항원의 상이한 에피토프를 인식하는 중쇄 가변 서열을 암호화하는 핵산 서열은 상이한 중쇄 불변 영역을 암호화하는 핵산 서열에 융합될 수 있으며, 이러한 서열들은 면역글로불린 경쇄를 발현하는 세포에서 발현될 수 있다. 전형적인 이중특이적 항체는 각각 3개의 중쇄 CDR, 그 다음에 (N-말단에서 C-말단으로) CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인 및 CH3 도메인이 뒤따르는, 2개의 중쇄, 및 항체-결합 특이성을 부여하지는 않지만 각각의 중쇄와 결합할 수 있는 것, 또는 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄 항원-결합 영역에 의해 결합된 하나 이상의 에피토프를 결합할 수 있는 것, 또는 각각의 중쇄와 결합할 수 있고 중쇄의 하나 또는 둘 모두를 하나 또는 둘 모두의 에피토프에 결합시킬 수 있는 것인, 면역글로불린 경쇄를 갖는다.

[0096] "중쇄" 또는 "면역글로불린 중쇄"라는 문구는 임의의 유기체의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 중쇄 가변 도메인을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은 달리 명시되지 않는 한, 3개의 중쇄 CDR 및 4개의 FR 영역을 포함한다. 중쇄의 단편에는 CDR, CDR 및 FR 및 이들의 조합이 포함된다. 일반적인 중쇄는, (N 말단에서 C 말단까지) 가변 도메인에 이어서, CH1 도메인, 힌지, CH2 도메인 및 CH3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능성 단편은 항원을 특이적으로 인식할 수 있고 (예, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 KD로 항원을 인식함), 세포로부터 발현 및 분비가 가능하고, 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 단편을 포함한다.

[0097] "경쇄"라는 문구는 임의의 유기체의 면역글로불린 경쇄 불변 영역 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 인간 카파(kappa) 및 람다(lambda) 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 (VL) 도메인은 달리 명시되지 않는 한, 일반적으로 3개의 경쇄 CDR 및 4개의 프레임워크(FR) 영역을 포함한다. 일반적으로, 전장 경쇄는 아미노 말단에서 카르복실 말단까지, FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4를 포함하는 VL 도메인, 및 경쇄 불변 도메인을 포함한다. 본 발명에서 사용될 수 있는 경쇄는 예를 들어, 항원-결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 제1 항원 또는 제2 항원에 선택적으로 결합하지 않는 것들을 포함한다. 적절한 경쇄는 기존의 항체 라이브러리(웨트 라이브러리 또는 가상 환경 라이브러리)에서 가장 일반적으로 사용되는 경쇄를 스크리닝하여 확인할 수 있는 것들을 포함하며, 이때 경쇄가 항원-결합 단백질의 항원-결합 도메인의 친화성 및/또는 선택성을 실질적으로 간섭하지 않는다. 적절한 경쇄는 항원-결합 단백질의 항원-결합 영역에 의해 결합되는 하나 또는 둘 모두의 에피토프에 결합할 수 있는 것들을 포함한다.

[0098] "가변 도메인"이라는 문구는 (달리 명시되지 않는 한) N-말단에서 C-말단까지 순서로, 다음과 같은 아미노산 영

역들을 포함하는 면역글로불린 경쇄 또는 중쇄 (원하는 경우 변형됨)의 아미노산 서열을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. "가변 도메인"은 이중 베타 시트 구조를 갖는 정식 도메인 (VH 또는 VL)으로 접힐 수 있는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상기 베타 시트들이 제1 베타 시트와 제2 베타 시트의 잔기 사이의 이황화 결합에 의해 연결된다.

[0099] 문구 "상보성 결정 영역", 또는 용어 "CDR"은 보통 (즉, 야생형 동물에서) 면역글로불린 분자 (예, 항체 또는 T 세포 수용체)의 경쇄 또는 중쇄의 가변 영역의 2개의 프레임워크 영역 사이에 나타나는, 유기체의 면역글로불린 유전자의 핵산 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 포함한다. CDR은 예를 들어, 생식계열 서열 또는 재배열되거나 재배열되지 않은 서열에 의해 암호화될 수 있으며, 예를 들어, 미처리 B 세포 또는 성숙한 B 세포 또는 T 세포에 의해 암호화될 수 있다. 일부 경우에 (예: CDR3의 경우), CDR은, (예컨대, 재배열되지 않은 핵산 서열에서는) 서로 인접하지 않지만 B 세포 핵산 서열 내에서는 인접하는 2개 이상의 서열(예: 생식계열 서열)에 의해, 예를 들어 서열의 접합 또는 연결(예를 들어, 중쇄 CDR3을 형성하기 위한 V-D-J 재조합)의 결과로서 암호화될 수 있다.

[0100] 용어 "항체 단편"은 항원에 특이적으로 결합하는 능력을 보유하는 항체의 하나 이상의 단편을 의미한다. "항체 단편"이라는 용어 내에 포함되는 결합 단편의 예로는 (i) VL, VH, CL 및 CH1 도메인으로 이루어진 1가 단편인, Fab 단편; (ii) 힌지 영역에서 이황화 브릿지에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편인, F(ab')₂ 단편; (iii) VH 및 CH1 도메인으로 이루어진 Fd 단편; (iv) 항체의 단일 아암의 VL 및 VH 도메인으로 이루어진 Fv 단편, (v) VH 도메인으로 이루어진, dAb 단편 (Ward 등. (1989) Nature 241:544-546), (vi) 단리된 CDR, 및 (vii) Fv 단편 VL 및 VH의 2개의 도메인으로 이루어지며, 합성 링커에 의해 연결되어 VL 및 VH 영역이 1가 분자를 형성하도록 쌍을 이루는 단일 단백질 사슬을 형성하게 되는, scFv를 포함한다. 디아바디(diabody)와 같은 다른 형태의 단쇄 항체 또한 "항체"라는 용어 하에 포함된다(예를 들어, Holliger 등. (1993) PNAS USA 90:6444-6448; Poljak 등. (1994) Structure 2:1121-1123 참조).

[0101] 문구 "Fc-함유 단백질"은 항체, 이중특이적 항체, 면역접합체(immunoadhesin), 및 면역글로불린 CH2 및 CH3 영역의 적어도 기능성 부분을 포함하는 다른 결합 단백질을 포함한다. "기능성 부분"이란 Fc 수용체 (예, FcγR; 또는 FcRn, 즉, 신생아 Fc 수용체)에 결합할 수 있고, 그리고/또는 상보체 활성화에 참여할 수 있는, CH2 및 CH3 영역을 의미한다. CH2 및 CH3 영역이 결실, 치환 및/또는 삽입 또는 임의의 Fc 수용체에 결합할 수 없고 상보체를 활성화시키지 못하게 하는 다른 변형을 포함하면, CH2 및 CH3 영역은 기능성이 아니다.

[0102] Fc-함유 단백질은 변형이 결합 단백질의 하나 이상의 효과기 기능에 영향을 미치는 경우를 포함하여, 면역글로불린 도메인의 변형 (예, FcγR 결합, FcRn 결합, 그에 따른 반감기 및/또는 CDC 활성화에 영향을 미치는 변형)을 포함할 수 있다. 이러한 변형은 면역 글로불린 불변 영역의 EU 넘버링을 참조하는 다음의 변형 및 이들의 조합을 포함하되, 이들로 한정되지는 않는다: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 315, 318, 320, 322, 324, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, 및 439.

[0103] 예를 들어, 제한은 아니지만, 결합 단백질은 Fc-함유 단백질이며, (언급된 변형(들)이 없는 동일한 Fc-함유 단백질과 비교하여) 개선된 혈청 반감기를 나타내며 위치 250 (예, E 또는 Q); 250 및 428 (예, L 또는 F); 252 (예, L/Y/F/W 또는 T), 254 (예, S 또는 T), 및 256 (예, S/R/Q/E/D 또는 T)에서의 변형; 또는 428 및/또는 433 (예, L/R/SI/P/Q 또는 K) 및/또는 434 (예, H/F 또는 Y)에서의 변형; 또는 250 및/또는 428에서의 변형; 307 또는 308 (예, 308F, V308F), 및 434에서의 변형을 갖는다. 또 다른 실시예에서, 변형은 428L (예, M428L) 및 434S (예, N434S) 변형; 428L, 259I (예, V259I), 및 308F (예, V308F) 변형; 433K (예, H433K) 및 434 (예, 434Y) 변형; 252, 254, 및 256 (예, 252Y, 254T, 및 256E) 변형; 250Q 및 428L 변형 (예, T250Q 및 M428L); 307 및/또는 308 변형 (예, 308F 또는 308P)을 포함할 수 있다.

[0104] 본원에서 사용되는, 용어 "항원-결합 단백질"은 본 발명의 세포 특이적 항원 및/또는 표적 항원과 같은, 항원 상의 에피토프를 특이적으로 인식하는 폴리펩티드 또는 단백질 (기능적 단위로 복합체화된 하나 이상의 폴리펩티드)을 지칭한다. 항원-결합 단백질은 다중특이적일 수도 있다. 항원-결합 단백질과 관련하여 "다중특이적"이란 용어는 동일한 항원 또는 상이한 항원 상의 다른 에피토프를 단백질이 인식하는 것을 의미한다. 본 발명의 다중특이적 항원-결합 단백질은 단일한 다기능성 폴리펩티드일 수 있거나, 상호 간에 공유적으로 또는 비 공유적으로 결합되는 2개 이상의 폴리펩티드의 다량체 복합체일 수 있다. "항원-결합 단백질"이라는 용어는 다른 기

능성 분자, 예를 들어, 다른 펩티드 또는 단백질에 연결되거나 공동-발현될 수 있는 본 발명의 항체 또는 그의 단편을 포함한다. 예를 들어, 항체 또는 그의 단편은 (예, 화학적 커플링, 유전 융합, 비공유 결합 또는 그 외에 의하여) 단백질 또는 그의 단편과 같은, 하나 이상의 다른 분자 엔티티와 기능적으로 연결되어서 제2 결합 특이성을 갖는 이중특이적 또는 다중특이적 항원-결합 분자를 생산할 수 있다.

[0105] 본원에서 사용되는, 용어 "에피토프"는 다중특이적 항원-결합 폴리펩티드에 의해 인식되는 항원 부분을 의미한다. 단일 항원 (예컨대 항원 폴리펩티드)은 하나 이상의 에피토프를 가질 수도 있다. 에피토프는 구조적 또는 기능적으로 정의될 수도 있다. 기능적 에피토프는 일반적으로 구조적 에피토프의 서브세트이며, 항원-결합 폴리펩티드와 항원 사이의 상호작용의 친화성에 직접 기여하는 잔기로 정의된다. 에피토프는 또한 즉, 비선형 아미노산으로 구성된, 입체 구조일 수도 있다. 특정 구현예에서, 에피토프는 아미노산, 당 측쇄, 포스포릴 기 또는 설포닐 기와 같은, 분자들의 화학적으로 활성인 표면 그룹인 결정기를 포함할 수 있으며, 소정의 구현예들에서, 특이적인 3차원 구조적 특성, 및/또는 특이적인 전하 특성을 가질 수도 있다. 연속하는 아미노산으로부터 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매에 노출시 유지되는 반면, 3차 접힘에 의해 형성된 에피토프는 통상적으로 변성 용매로 처리시 손실된다.

[0106] 용어 "도메인"은 특정 기능 또는 구조를 갖는 단백질 또는 폴리펩티드의 임의의 부분을 지칭한다. 바람직하게는, 본 발명의 도메인은 세포-특이적 또는 표적 항원에 결합한다. 세포-특이적 항원- 또는 표적 항원-결합 도메인 등은, 본원에서 사용되는 바와 같이, 항원을 특이적으로 결합하는, 임의의 자연 발생하는, 효소적으로 수득가능한, 합성, 또는 유전자 조작된 폴리펩티드 또는 당단백질을 포함한다.

[0107] 상호교환적으로 사용되는, 용어 "반수체" 또는 "절반 항체"는 하나의 중쇄와 하나의 경쇄를 필수적으로 포함하는, 항체의 절반을 의미한다. 항체 중쇄는 이량체를 형성할 수 있어서, 하나의 반수체의 중쇄는 다른 분자 (예, 다른 반수체) 또는 다른 Fc-함유 폴리펩티드와 연관된 중쇄와 결합할 수 있다. 2개의 약간 다른 Fc-도메인은 이중특이적 항체 또는 다른 이중이량체, -삼량체, -사량체 등의 형성에서처럼 "이중이량체화"될 수도 있다. Vincent 및 Murini, "Current strategies in antibody engineering: Fc engineering and pH-dependent antigen binding, bispecific antibodies and antibody drug conjugates," 7 Biotechnol. J. 1444-1450 (2012); 및 Shimamoto 등의 "Peptibodies: A flexible alternative format to antibodies," 4(5) MABs 586-91 (2012) 참조.

[0108] 하나의 구현예에서, 반수체 가변 도메인은 내재화 효과기를 특이적으로 인식하고 반수체 Fc-도메인은 대체 효소 (예, 펩티다제)를 포함하는 Fc-융합 단백질로 이량체화한다(상기 문헌, 586 참조).

[0109] 용어 "단쇄 가변 단편" 또는 "scFv"는 면역글로불린 중쇄 가변 영역(VH) 및 면역글로불린 경쇄 가변 영역(VL)을 함유하는 단쇄 융합 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, VH 및 VL은 10 내지 25개 아미노산의 링커 서열에 의해 연결된다. ScFv 폴리펩티드는 CL 또는 CH1 영역과 같은 다른 아미노산 서열을 포함할 수도 있다. ScFv 분자는 파지 디스플레이에 의해 제조되거나, 하이브리도마 또는 B-세포로부터 중쇄 및 경쇄를 직접 서브클로닝함으로써 제조될 수 있다. 아메드 등의 Clinical and Developmental Immunology, volume 2012, article ID 98025는 파지 디스플레이 및 항체 도메인 클로닝에 의해 scFv 단편을 제조하는 방법에 대한 참조로서 본원에 통합된다.

[0110] "알파-글루코시다아제" (또는 " α -글루코시다아제"), " α -글루코시다아제 활성", "GAA", 및 "GAA 활성"은 상호교환적으로 사용되며, 글리코젠과 전분의 1,4-알파 결합을 글루코오스로 가수분해하는 것을 촉진시키는 임의의 단백질을 의미한다. 특히, GAA는 EC 3.2.1.20, 말타아제, 글루코인버타아제, 글루코시도수크라아제, 말타아제-글루코아밀라아제, 알파-글루코피라노시다아제, 글루코시도인버타아제, 알파-D-글루코시다아제, 알파-글루코시드 가수분해효소, 알파-1,4-글루코시다아제, 및 알파-D-글루코시드 글루코가수분해효소로도 알려져 있다. GAA는 리소좀 내부와 소장의 솔 경계(brush border)에서 발견할 수 있다. 폼페병을 앓고 있는 환자는 리소좀 α -글루코시다아제 기능이 부족하다. S. Chiba, "Molecular mechanism in alpha-glucoisidase and glucoamylase," 61(8) Biosci. Biotechnol. Biochem. 1233-9 (1997); 및 Hesselink 등의, "Lysosomal dysfunction in muscle with special reference to glycogen storage disease type II," 1637(2) Biochim. Biophys. Acta. 164-70 (2003) 참조.

[0111] "알파-갈락토시다아제 A" (또는 " α -갈락토시다아제 A"), " α -갈락토시다아제 A 활성", " α -갈락토시다아제", " α -갈락토시다아제 활성", "GLA", 및 "GLA 활성"은 상호교환적으로 사용되며, 당지질과 당단백질로부터 말단 α -갈락토실 부분의 가수분해를 촉진시키고, 또한 α -D-푸코시드를 가수분해하는 임의의 단백질을 의미한다. 특히, GLA는 EC 3.2.1.22, 멜리비아제, α -D-갈락토시다아제, α -갈락토시다아제 A, α -갈락토시드 갈락토가수

분해효소, α -D-갈락토시드 갈락토가수분해효소로도 알려져 있다. GLA는 X-연결 GLA 유전자에 의해 암호화된 리소좀 효소이다. GLA의 결함은 파브리병으로 이어질 수 있는데, 글로보트리아아오실세라마이드(일명 Gb3, GL-3 또는 세라마이드 트리헥소시드)라고 알려진 당지질이 혈관 내에 축적되어 (즉, 현저한 혈관병증), 신장, 심장, 피부 및/또는 뇌혈관 조직, 및 기타 조직 및 기관의 통증과 기능 손상을 초래한다. 예를 들면 Prabakaran 등의 "Mannose 6-phosphate receptor and sortilin mediated endocytosis of α -galactosidase A in kidney endothelial cells," 7(6) PLoS One e39975 pp. 1-9 (2012) 참조.

[0112] 일 양태에서, 본 발명은 리소좀 축적 질환 환자(또는 대상체)를 치료하는 방법으로서, 환자에게 "다중 도메인 치료 단백질"을 투여함으로써 상기 질환을 치료하는 방법을 제공한다. 상기 다중 도메인 치료 단백질은 환자의 세포 내로 들어가고, 효소("내인성 효소") 또는 LSD와 연관되는 효소 활성을 대체하는 효소 또는 효소 활성(즉, "대체 효소")을 리소좀에 전달한다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자 요법 벡터를 통해 환자에게 전달된다.

[0113] LSD는 스팅고리피드축적증, 뮤코다당류축적증, 및 글리코겐 축적 질환을 포함한다. 일부 구현예에서, LSD는 파브리병, 고세병 타입 I, 고세병 타입 II, 고세병 타입 III, 니먼-피크병 타입 A, 니먼-피크병 타입 B, GM1-갱글리오시드축적증, 샌드호프병, 데이-삭스병, GM2-활성제 결핍, GM3-갱글리오시드축적증, 이염색 백색질장애, 스팅고리피드-활성제 결핍, 샤이에병, 헐러-샤이에병, 헐러병, 헌터병, 산필리포 A, 산필리포 B, 산필리포 C, 산필리포 D, 모르키오증후군 A, 모르키오증후군 B, 마로토-라미병, 슬라이병, MPS IX, 및 폼페병 중 어느 하나 이상이다. 구체적인 구현예에서, LSD는 파브리병이다. 또 다른 구현예에서, LSD는 폼페병이다.

[0114] 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 (a) 대체 효소, 및 (b) 내재화 효과기에 결합하는 분자 엔티티(전달 도메인)를 포함한다. 일부 경우에, 대체 효소는 α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 사포신-C 활성제, 세라미다아제, 스팅고미엘리나아제, β -헥소사미니다아제, GM2 활성제, GM3 합성효소, 아틸설파타아제, 스팅고리피드 활성제, α -아이두로니다아제, 아이두로니다아제-2- 설파타아제, 헤파린 N-설파타아제, N-아세틸- α -글루코사미니다아제, α -글루코사מיד N-아세틸트랜스퍼라아제, N-아세틸글루코사민-6-설파타아제, N-아세틸갈락토사민-6-설페이트 설파타아제, N-아세틸갈락토사민-4-설파타아제, β -글루쿠로니다아제, 및 히알루로니다아제 중 임의의 하나 이상이다.

[0115] 일부 경우에, 대체 효소가 투여된 후에는 환자에 의해 대체 효소가 "비-자기(non-self)"로 인식되고, 이어서 면역학적 반응이 뒤따르도록, 환자는 충분한 단백질을 만들지 못하게 될 수 있다. 이것은 바람직하지 않다. 따라서, 일부 구현예에서, 대체 효소는 대상체에게서 면역 반응을 유도하는 것을 회피하지 않도록 하는 방식으로 설계되거나 생산된다. 그러한 해결책 중 하나는 "아이소자임"을 대체 효소로 사용하는 것이다. 아이소자임은 환자의 "자기" 단백질에 충분히 가깝지만, LSD의 증상을 완화시키기에 충분한 대체 효소 활성을 가지고 있다.

[0116] LSD가 폼페병이고 내인성 효소가 α -글루코시다아제 (GAA)인, 하나의 특정 구현예에서, 아이소자임은 산 α -글루코시다아제, 수크라아제-아이소말타아제 (SI), 말타아제-글루코아밀라아제 (MGAM), 글루코시다아제 II (GANAB) 및 중성 α -글루코시다아제 (C GNAC) 중 어느 하나일 수 있다. LSD가 파브리병이고 내인성 효소가 α -갈락토시다아제 A (GLA)인, 또 다른 특정 구현예에서, 아이소자임은 GLA 활성을 갖도록 조작되는 α -N-아세틸갈락토사미니다아제일 수 있다.

[0117] 본원에서, 아이소자임을 사용하지 않고, 대체 효소에 대항하는 교차 반응성 면역학적 물질(CRIM)을 감소시키는 방법이 제공된다. 도 5 및 도 6에서 입증된 바와 같이, 내재화 효과기 결합 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 (예를 들어, 유전자 치료 벡터를 통해) 투여하는 단계는, (내재화 효과기 도메인이 없고 효소 도메인을 포함하는) 대조군 치료 단백질의 투여에 포함된 대체 효소에 대항하는 CRIM 레벨을 감소시킨다. 이와 같이, 일 구현예에서, 효소 결핍 환자에게서 효소에 대항하는 CRIM을 감소시키는 단계는 환자의 다중 도메인 치료 단백질(또는, 이를 암호화하는 핵산, 예를 들어, 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자를 함유하는 유전자 치료 벡터로서, 다중 도메인 치료 단백질은 전달 도메인(예: 내재화 효과기 결합 단백질)을 포함함) 또는 효소 도메인을 환자에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0118] 다중 도메인 치료 단백질은 대체 효소를 세포 내로 흡수할 수 있게 하는 내재화 효과기 결합 단백질 성분을 가진다. 따라서, 일부 구현예에서, 내재화 효과기는 CD63, MHC-I, 크레멘-1, 크레멘-2, LRP5, LRP6, LRP8, 트랜스페린 수용체, LDL-수용체, LDL-관련 단백질 1 수용체, ASGR1, ASGR2, 아밀로이드 전구체 단백질 유사 단백질-2(APLP2), 아펠린 수용체(APLNR), PRLR (프로락틴 수용체), MAL(미엘린 및 림프구 단백질, 일명 VIP17), IGF2R, 액포형 H+ ATP아제, 디프테리아 독소 수용체, 엽산 수용체, 글루타메이트 수용체, 글루타티온 수용체, 렙틴 수용체, 스캐빈저 수용체, SCARA1-5, SCARB1-3, 및 CD36일 수 있다. 특정 구현예에서, 내재화 효과기는 신

장 특이적 내재화제, 예컨대 CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (부갑상선 호르몬 수용체), SLC22A13 (용질 운반체 군 22 멤버 13), SLC5A2 (나트륨/글루코오스 공동수송체 2) 및 UMOD (Uromodulin)이다. 다른 특정 구현예에서, 내재화 효과기는 근육 특이적 내재화제, 예컨대 BMPRI1A(골 형성 단백질 수용체 1A), m-카데린, CD9, MuSK(근육 특이적 키나아제), LGR4/GPR48(G 단백질-결합 수용체 48), 콜린효능성 수용체(니코틴성) 알파 1, CDH15(Cadherin-15), ITGA7(인테그린 알파-7), CACNG1(L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-1), CACNA1S(L-형 칼슘 채널 서브유닛 알파-15), CACNG6(L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-6), SCN1B(나트륨 채널 서브유닛 베타-1), CHRNA1(Ach 수용체 서브유닛 알파), CHRND(Ach 수용체 서브유닛 델타), LRRC14B(류신-풍부 반복체-함유 단백질 14B), 디스트로글리칸(DAG1), 및 POPDC3(파파이 도메인-함유 단백질 3)이다. 일부 구체적인 구현예에서, 내재화 효과기는 ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2 또는 PRLR이다.

[0119] 일부 구현예에서, 내재화 효과기-결합 단백질은 예를 들어, 수용체-융합 분자, 트랩 분자, 수용체-Fc 융합 분자, 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단쇄 Fv (scFv) 분자, dAb 단편, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR), CDR3 펩티드, 제약적 FR3-CDR3-FR4 펩티드, 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결실된 항체, 키메라 항체, CDR-그래프트된 항체, 이중체, 삼중체, 사중체, 미니바디, 나노바디, 1가 나노바디, 2가 나노바디, 작은 모듈의 면역의약품(SMIP), 카멜리드 항체 (VHH 중쇄 동종이량체 항체), 및 상어 가변성 IgNAR 도메인을 포함하는, 항원-결합 단백질을 포함한다.

[0120] 하나의 구현예에서, 내재화 효과기에 결합하는 분자 엔티티는 항체, 항체 단편, 또는 기타 항원-결합 단백질이다. 예를 들어, 분자 엔티티는 하나의 아암이 내재화 효과기(예, ITGA7, CD9, CD63, PRLR, APLP2, ASGR1, ASGR2)에 결합하며, 다른 아암은 대체 효소에 결합하는 이중특이적 항체일 수 있다. 여기서, 다중 도메인 치료 단백질은 이중특이적 항체와 대체 효소를 포함한다(도 1a). 구체적인 구현예에서, 질환은 파브리병이고, 다중 도메인 치료 단백질은 GLA, 및 GLA와 CD63에 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 질환은 파브리병이고, 다중 도메인 치료 단백질은 GLA, 및 GLA와 ITGA7에 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 치료되는 질환은 폼페병이고, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA, 및 GAA와 CD63에 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다. 또 다른 구체적인 구현예에서, 치료되는 질환은 폼페병이고, 다중 도메인 치료 단백질은 GAA, 및 GAA와 ITGA7에 결합하는 이중특이적 항체를 포함한다.

[0121] 또 다른 구현예에서, 내재화 효과기에 결합하는 분자 엔티티는 절반 항체를 포함하고, 대체 효소는 Fc 도메인 (효소-Fc 융합 폴리펩티드)을 함유한다. 하나의 구현예에서, 효소-Fc 융합 폴리펩티드의 Fc 도메인은 내재화 효과기-특이적 반수체의 Fc 도메인과 결합하여 다중 도메인 치료 단백질을 형성한다(도 1b).

[0122] 다른 구현예에서, 대체 효소는 내재화 효과기-결합 단백질에 공유 결합된다. Fc 이량체가 하나 이상의 이황화 브릿지를 통해 고정될 수 있기 때문에, 이전 단락 (도 1b 또한 참조)에서 설명한 효소-Fc 융합:반수체 구현예가 본 분류에 속한다. 효소 활성 도메인 또는 폴리펩티드와 내재화-결합 도메인 또는 폴리펩티드 사이의 공유 결합은 임의의 유형의 공유 결합, 즉, 전자들의 공유와 연관되는 임의의 결합일 수도 있다. 몇몇 경우에, 공유 결합은 2개의 아미노산 사이의 펩티드 결합이어서, 융합 단백질에서와 같이, 대체 효소 및 내재화 효과기-결합 단백질은 전체적으로 또는 부분적으로 연속적인 폴리펩티드 사슬을 형성한다. 몇몇 경우에, 대체 효소 부분과 내재화 효과기-결합 단백질은 직접 연결되어 있다. 다른 경우에, 링커는 두 부분을 묶는 데 사용된다. Chen 등, "Fusion protein linkers: property, design and functionality," 65(10) Adv Drug Deliv Rev. 1357-69 (2013) 참조.

[0123] 특정 구현예에서, 대체 효소는 항-내재화 효과기 항체의 중쇄의 C-말단 (도 1c 참조) 또는 경쇄의 C-말단 (도 1e)에 공유 결합된다. 또 다른 특정 구현예에서, 대체 효소는 항-내재화 효과기 항체의 중쇄의 N-말단 (도 1d 참조) 또는 경쇄의 N-말단 (도 1f)에 공유 결합된다. 다른 특정 구현예에서, 효소는 항-내재화 효과기 scFv 도메인의 C-말단에 연결된다(도 1g).

[0124] 일부 경우에, 특히 대체 효소가 리소좀에서 정상적으로 단백질분해 처리되지 않는 경우에, 항체-효소 융합을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질의 구현예에 절단가능 링커가 첨가된다. 일부 구현예에서, a) 가급적 입체적으로 큰 항체를 제거하여 효소 활성을 보존하는 데 도움이 되고 b) 가급적 효소의 리소좀 반감기를 증가시키기 위해서, 카텝신 절단가능 링커가 항체와 대체 효소 사이에 삽입되어 리소좀 내에서 항체를 제거하는 것을 용이하게 한다.

[0125] 일 특정 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 유전자 요법 벡터를 통해 환자에게 또는 세포에 전달된다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 전달 도메인 및 효소 도메인을 포함한다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 CD63, MHC-I, 크레멘-1, 크레멘-

2, LRP5, LRP6, LRP8, 트랜스페린 수용체, LDL-수용체, LDL-관련 단백질 1 수용체, ASGR1, ASGR2, 아밀로이드 전구체 단백질 유사 단백질-2(APLP2), 아펠린 수용체(APLNR), PRLR (프로락틴 수용체), 미엘린 및 림프구 단백질(MAL), IGF2R, 엑포형 H+ ATP아제, 디프테리아 독소 수용체, 엽산 수용체, 글루타메이트 수용체, 글루타티온 수용체, 렙틴 수용체, 스캐빈저 수용체 A1-5(SCARA1-5), SCARB1-3, 또는 CD36과 같은 내재화 효과기에 결합한다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 CD63에 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv)(즉, 항-CD63 scFv)이다. 일 구현예에서, 전달 도메인은 ITGA7에 결합하는 단쇄 가변 단편(scFv)(즉, 항-ITGA7 scFv)이다.

[0126] 하나의 특정 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질의 효소 도메인은 가수분해효소를 포함한다. 구체적인 구현예에서, 효소 도메인은 글리코실라아제인 가수분해효소를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 효소 도메인은 글리코시다아제인 글리코실라아제를 포함한다. 보다 구체적인 구현예에서, 효소 도메인은 알파-글루코시다아제인 글리코시다아제이다.

[0127] 일반적으로, 폼페병 환자에서 리소좀 축적 질환의 치료, 예를 들어, 글리코겐의 감소 및/또는 GAA에 대한 면역 내성을 강화함에 있어서, 내재화 효과기 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드(예: (m)RNA, DNA, 및 이들의 변형된 형태)의 용도 및 이들을 포함하는 조성물이 본원에 개시된다.

[0128] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 융합 폴리펩티드, 예를 들어, 내재화 효과기 도메인 및 효소 도메인을 포함하는 다중 도메인 치료 폴리펩티드와 같은 융합 폴리펩티드를 포함하여 적어도 하나의 폴리펩티드를 암호화하는 뉴클레오티드(예를 들어, RNA 또는 DNA)의 중합체를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 폴리뉴클레오티드는 변형 및 비변형 뉴클레오티드 둘 다를 포함하는 중합체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 코딩 및 비-코딩 영역을 함유할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 천연 공급원으로부터 정제될 수 있고, 재조합 발현 시스템을 사용하여 생산될 수 있으며, 임의로 정제되고, 화학적으로 합성될 수 있다. 경우에 따라, 예를 들어, 화학적으로 합성된 분자의 경우, 폴리뉴클레오티드는 화학적으로 변형된 염기 또는 당, 백본 변형 등을 갖는 유사체와 같은 뉴클레오시드 유사체를 포함할 수 있다. 달리 명시되지 않는 한, 폴리뉴클레오티드 서열은 5'에서 3' 방향으로 제시된다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 천연 뉴클레오시드(예: 아데노신, 구아노신, 시티딘, 우리딘); 뉴클레오시드 유사체(예: 2-아미노아데노신, 2-티오티미딘, 이노신, 피롤로-피리미딘, 3-메틸 아데노신, 5-메틸 시티딘, C-5 프로피닐-시티딘, C-5 프로피닐-우리딘, 2-아미노아데노신, C5-브로모우리딘, C5-플루오로우리딘, C5-요오드우리딘, C5-프로피닐-우리딘, C5-프로피닐-시티딘, C5-메틸시티딘, 2-아미노아데노신, 7-데아자아데노신, 7-데아자구아노신, 8-옥소아데노신, 8-옥소구아노신, 0(6)-메틸구아닌, 및 2-티오시티딘); 화학적으로 변형된 염기; 생물학적으로 변형된 염기(예: 메틸화 염기); 삽입 염기; 변형된 당(예: 2'-플루오로리보오스, 리보오스, 2'-디옥시리보오스, 아라비노오스, 및 핵소오스); 및/또는 변형된 인산기(예: 포스포로티오에이트 및 5'-N-포스포라미티드 연쇄)이거나 이를 포함한다.

[0129] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 이상의 비표준 뉴클레오티드 잔기를 포함한다. 비표준 뉴클레오티드 잔기는, 예를 들어, 5-메틸-시티딘("5mC"), 슈도우리딘(".psi.U"), 및/또는 2-티오-우리딘("2Su")을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제8,278,036호 또는 W02011012316는 각각 이러한 잔기 및 이들의 폴리뉴클레오티드 내 통합에 관한 논의에 대한 참조로서 그 전체가 본원에 통합된다. 비표준 뉴클레오티드 잔기가 존재하는 폴리뉴클레오티드는, 동일한 서열을 갖지만 표준 잔기만을 함유하는 대조군 폴리뉴클레오티드에 비해 더 안정적이고/이거나 덜 면역원성이 될 수 있다. 추가의 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 이소시토신, 슈도이소시토신, 5-브로모우라실, 5-프로피닐우라실, 6-아미노푸린, 2-아미노푸린, 이노신, 디아미노푸린 및 2-클로로-6-아미노푸린 시토신으로부터 선택된 하나 이상의 비표준 뉴클레오티드 잔기뿐만 아니라 이들 변형 및 기타 핵염기의 변형의 조합을 포함할 수 있다. 특정 구현예는 추가로 푸라노오스 고리 또는 핵염기에 대한 추가의 변형을 포함할 수 있다. 추가적인 변형은 예를 들어, 당 변형 또는 치환(예를 들어, 2'-O-알킬 변형, 잠금 핵산(LNA) 중 하나 이상)을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 추가의 폴리뉴클레오티드 및/또는 펩티드 폴리뉴클레오티드(PNA)와 복합체를 이루거나 하이브리드화될 수 있다.. 당 변형이 2'-O-알킬 변형인 구현예에서, 이러한 변형은 2'-데옥시-2'-플루오로 변형, 2'-O-메틸 변형, 2'-O-메톡시에틸 변형 및 2'-데옥시 변형을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지는 않는다. 특정 구현예에서, 이들 변형 중 어느 하나는, 개별적으로 또는 조합으로 0-100%의 뉴클레오티드에서, 예를 들어, 0%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75%, 85%, 90%, 95%, 또는 100% 초과 구성 뉴클레오티드에서 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 메신저 RNA(mRNA)를 포함하는데, 이는 변형되거나 변형되지 않을 수 있으며, 예를 들어, 이들의 안정성을 증가시키고/시키거나 이들의 면역원성을 감소시키는 잘 알려진 방법에 의해 변형된 뉴클레오티드를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다. 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 DNA 분자를 포함하는데, 이는 변형되거나 변형되지 않을 수 있으며, 예를 들어, 이들

의 안정성을 증가시키고/시키거나 이들의 면역원성을 감소시키는 잘 알려진 방법에 의해 변형된 뉴클레오티드를 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.

[0130] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 또한 "유전자좌-표적화 핵산 서열"을 포함한다. 유전자좌 표적화 서열은 다중 도메인 치료 단백질 암호화 폴리뉴클레오티드를 숙주 세포의 게놈 내로 통합시킬 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자좌 표적화 서열은 상동성 재조합을 가능하게 하기 위한 측면 상동 아암을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자좌 표적화 서열은 통합을 용이하게 하기 위한 가이드 RNA 서열 및 II형 Cas 효소(즉, CRISPR-Cas9 방법)를 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자좌 표적화 서열은 통합을 용이하게 하기 위한 가이드 징크-핑거 뉴클레아제(ZFN) 인식 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자좌 표적화 서열은 통합을 용이하게 하기 위한 전사 활성인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN) 인식 서열을 포함한다. 여전히 다른 구현예에서, 유전자좌 표적화 서열은 통합을 용이하게 하기 위한, BuD-유래 뉴클레아제에 의해 사용되는 단일 잔기-대-뉴클레오티드 코드를 포함한다.

[0131] 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질 암호화 폴리뉴클레오티드가 통합되는 게놈 유전자좌는 "세이프 하버 유전자좌"이다. 일 구현예에서, "세이프 하버 유전자좌"는 필수 유전자의 발현에 간섭하거나 종양유전자 또는 다른 유해 유전자의 발현을 촉진하지 않으면서 다중 도메인 치료 단백질의 높은 발현을 가능하게 한다. 일 구현예에서, 게놈 유전자좌는 간-발현 알부민(A1b) 유전자좌, EESYR 유전자좌, SARS 유전자좌, 인간 염색체 1 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 188,083,272, 인간 염색체 10 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 3,046,320, 인간 염색체 17 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그의 위치 67,328,980, 염색체 상의 아데노-관련 바이러스 부위 1(AAVS1), 인간 염색체 19 또는 이의 비인간 포유류 오쏘로그 상에서 AAV 바이러스의 자연 발생 통합 부위, 케모카인 수용체 5(CCR5) 유전자, HIV-1 공수용체를 암호화하는 케모카인 수용체 유전자, 마우스 Rosa26 유전자좌 또는 이의 비릿과 포유류 오쏘로그에 존재하거나 그 근위에 존재한다. 일 구현예에서, 게놈 유전자좌는 아데노-관련 바이러스 부위이다. 일 구현예에서, 통합을 위한 게놈 유전자좌는 Papapetrou 및 Schambach, J. Molecular Therapy, vol. 24 (4):678-684, April 2016(유전자 요법 벡터 통합을 위한 세이프 하버 게놈 유전자좌의 단계별 선택에 대한 참조로서 본원에 통합됨) 및 에 따라 선택되며, 또한 Barzel 등의 Nature, vol. 517:360-364(간-발현 알부민(A1b) 내로 프로모터 없이 유전자 표적화하는 것에 대한 참조로서 그 전체가 본원에 통합됨)를 또한 참조한다.

[0132] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, DNA는 또한 다중 도메인 치료 단백질 암호화 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 함유한다. 구체적인 구현예에서, 프로모터는 특정 조직에서 유전자 발현을 유도하는 조직-특이적 프로모터이다. 일 구현예에서, 조직 특이적 프로모터는 세르피나1(예: 서열번호 9) 및/또는 TTR 프로모터(서열번호 8)로부터 유래된 간-특이적 인헨서/프로모터이다. 다른 구현예에서, 프로모터는 CMV 프로모터이다. 다른 구현예에서, 프로모터는 유비쿼터 프로모터이다.

[0133] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질 암호화 "유전자 요법 벡터"는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 숙주, 예를 들어 환자에게 전달할 수 있는 임의의 벡터이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는, 예를 들어, 조직 특이적 전달과 같은 국소 전달을 위해, 특정 숙주 세포 또는 기관을 표적화한다. 전형적으로, 국소 전달은 mRNA에 의해 암호화된 단백질(예: 다중 도메인 치료 단백질)이 주로 기관(예: 간)에서 및/또는 이에 의해 번역되고 발현되는 것을 필요로 하는데, 이에 의해 단백질의 생산(및 분비)를 위한 간 데포(liver depot)와 같은 데포가 형성된다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 환자의 간에 다중 도메인 치료 단백질 폴리뉴클레오티드를 전달해 간 데포를 형성한다. 예를 들어, Derosa 등의 Gene Therapy, vol. 10:699-707을 참조한다(그 전체는 본원에 참조로 통합됨). 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 환자의 근육 조직에 전달한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 환자의 뇌에 전달한다.

[0134] 현재 알려져 있거나 미래에 개발되는 천연 또는 조작된 유전자 요법 전달 벡터가 본 발명을 실시하는 데 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 바이러스 벡터이고, 예를 들어, 바이러스, 바이러스 캡시드, 바이러스 게놈 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 네이키드 폴리뉴클레오티드, 예를 들어, 에 피솜이다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 폴리뉴클레오티드 복합체를 포함한다. 유전자 요법 벡터로서 사용하기 위한 예시적인 비제한적인 폴리뉴클레오티드 복합체는, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리plex, 덴드리머, 무기 나노입자(예: 폴리뉴클레오티드 코팅된 금, 실리카, 산화철, 인산칼슘 등)를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 요법 벡터는 바이러스 벡터, 네이키드 폴리뉴클레오티드, 및 폴리뉴클레오티드 복합체의 조합을 포함한다.

- [0135] 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 레트로바이러스, 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스, 수두 바이러스, 우두 바이러스, 렌티바이러스 또는 아데노-관련 바이러스를 포함하는 바이러스이다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 및 AAV11, 또는 이들의 조작되었거나 자연 선택된 변이체를 포함하는 아데노-관련 바이러스(AAV)이다.
- [0136] 일 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 아데노-관련 바이러스(AAV) 핵산 서열을 또한 함유한다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 둘 이상의 혈청형 유래의 유전 요소를 함유하는 키메라 아데노-관련 바이러스이다. 예를 들어, AAV1 유래의 rep 유전자 및 AAV2 유래의 cap 유전자(AAV1/2 또는 AAVRC1/2로 표시됨)를 갖는 AAV 벡터가 유전자 요법 벡터로서 사용되어 다중 도메인 치료 단백질 폴리뉴클레오티드를 세포 또는 이를 필요로 하는 환자의 세포에 전달할 수 있다. 일 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 AAV1/2, AAV1/3, AAV1/4, AAV1/5, AAV1/6, AAV1/7, AAV1/8, AAV1/9, AAV1/10, AAV1/11, AAV2/1, AAV2/3, AAV2/4, AAV2/5, AAV2/6, AAV2/7, AAV2/8, AAV2/9, AAV2/10, AAV2/11, AAV3/1, AAV3/2, AAV3/4, AAV3/5, AAV3/6, AAV3/7, AAV3/8, AAV3/9, AAV3/10, AAV3/10, AAV4/1, AAV4/2, AAV4/3, AAV4/5, AAV4/6, AAV4/7, AAV4/8, AAV4/9, AAV4/10, AAV4/11, AAV5/1, AAV5/2, AAV5/3, AAV5/4, AAV5/6, AAV5/7, AAV5/8, AAV5/9, AAV5/10, AAV5/11, AAV6/1, AAV6/2, AAV6/3, AAV6/4, AAV6/5, AAV6/7, AAV6/8, AAV6/9, AAV6/10, AAV6/10, AAV7/1, AAV7/2, AAV7/3, AAV7/4, AAV7/5, AAV7/6, AAV7/8, AAV7/9, AAV7/10, AAV7/11, AAV8/1, AAV8/2, AAV8/3, AAV8/4, AAV8/5, AAV8/6, AAV8/7, AAV8/9, AAV8/10, AAV8/11, AAV9/1, AAV9/2, AAV9/3, AAV9/4, AAV9/5, AAV9/6, AAV9/7, AAV9/8, AAV9/10, AAV9/11, AAV10/1, AAV10/2, AAV10/3, AAV10/4, AAV10/5, AAV10/6, AAV10/7, AAV10/8, AAV10/9, AAV10/11, AAV11/1, AAV11/2, AAV11/3, AAV11/4, AAV11/5, AAV11/6, AAV11/7, AAV11/8, AAV11/9, AAV11/10, 키메라 비리온, 또는 이들의 유도체이다. Gao 등의 "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy," PNAS 99(18): 11854-11859, Sep. 3, 2002는 유전자 요법 벡터로서 유용한 AAV 벡터 및 키메라 비리온, 및 이들의 구조 및 사용에 대한 참조로서 본원에 통합된다.
- [0137] 보다 구체적인 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 혈청형 2 rep 유전자 서열과 혈청형 8 캡 서열("AAV2/8" 또는 "AAV RC2/8)을 갖는 키메라 AAV 벡터이다.
- [0138] 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 특이적 세포, 예를 들어, 간세포를 표적화하도록 위형화된(예를 들어, 조작된) 바이러스 벡터이다. 바이러스 벡터를 사용한 표적화된 유전자 치료의 진보는 바이러스 벡터의 비-재조합(비-유전자) 또는 재조합(유전자) 변형으로서 요약될 수 있으며, 이는 바이러스 벡터의 위형화, 증식, 및/또는 바이러스 벡터의 자연 향성의 재표적화로 이어진다. (Nicklin 및 Baker (2002) *Curr. Gene Ther.* 2:273-93; Verheiji 및 Rottier (2012) *Advances Virol* 2012:1-15에서 검토됨). 비-유전적 접근법은 일반적으로 야생형(비변형) 바이러스 표면 단백질 및 표적 세포 둘 모두를 인식하는 어댑터를 이용한다. (야생형 바이러스에 대한) 가용성 의사-수용체, 폴리에틸렌 글리콜 같은 중합체, 및 항체 또는 그의 일부가 어댑터의 바이러스 결합 도메인으로서 사용되어 온 반면, 천연 펩티드 또는 비타민 리간드, 및 항체 및 이의 일부는 전술한 어댑터의 세포 결합 도메인으로서 사용되어 왔다. 예를 들어, 표적 세포에 대한 바이러스 벡터의 재표적화는 표적 세포 표면, 예컨대 세포 표면 단백질에서 발견된 단백질에 벡터:어댑터 복합체가 결합함에 따라 달성될 수 있다. 이러한 접근법은 AAV(Bartlett 등 (1999) *Nat. Biotechnol.* 74: 2777-2785), adenoviruses (Heminki 등. (2001) *Cancer Res.* 61: 6377-81; van Beusechem 등. (2003) *Gene Therapy* 10:1982-1991; Einfeld, 등. (2001) *J. Virol.* 75:11284-91; Glasgow 등. (2009) *PLOS One* 4:e8355), herpesviruses (Nakano 등. (2005) *Mol. Ther.* 11:617-24), 파라믹소바이러스(Bian 등. (2005) *Cancer Gene Ther.* 12:295-303; Bian 등. (2005) *Int. J. Oncol.* 29:1359-69), 및 코로나바이러스(Haijema 등. (2003) *J. Virol.* 77:4528-4538; Wurdinger 등. (2005) *Gene Therapy* 12:1394-1404)에 사용되어 왔다.
- [0139] 보다 대중적인 접근법은 바이러스 캡시드 단백질, 즉 바이러스 캡시드 표면의 재조합 유전자 변형이었다. 간접적인 재조합 접근법에서, 바이러스 캡시드는 이중 "스캐폴드(scaffold)"를 사용해 변형되고, 이어서 어댑터에 연결된다. 어댑터는 스캐폴드와 표적 셀에 결합한다. (Arnold 등. (2006) *Mol. Ther.* 5:125-132; Ponnazhagen 등. (2002) *J. Virol.* 76:12900-907; 및 WO 97/05266 참조). 스캐폴드, 예컨대 (1) 항체 어댑터의 Fc에 결합하는 Fc 결합 분자(예컨대 Fc 수용체, 단백질 A 등), (2) 비오틴화 어댑터에 결합하는 (스트렙트)아비딘, (3) (스트렙트)아비딘과 융합된 어댑터에 결합하는 비오틴, 및 (4) SpyTag가 생성된 어댑터에 결합하는 SpyCatcher와 같은 이성질체 펩티드 결합을 형성하는 단백질:단백질 결합 쌍 등은 Ad(Pereboeva 등. (2007) *Gene Therapy* 14: 627-637; Park 등. (2008) *Biochemical and Biophysical Research Communications* 366: 769-774; Henning 등. (2002) *Human Gene Therapy* 13:1427-1439; Banerjee 등. (2011) *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 21:4985-4988), AAV(Gigout 등. (2005) *Molecular Therapy* 11:856-865; Stachler 등. (2008)

Molecular Therapy 16:1467-1473), 및 토가바이러스(Quetglas 등. (2010) *Virus Research* 153:179-196; Ohno 등. (1997) *Nature Biotechnology* 15:763-767; Klimstra 등. (2005) *Virology* 338:9-21)에 통합되어 왔다.

- [0140] 직접적인 재조합 표적화 접근법에서, 표적화 리간드는 바이러스 캡시드에 직접 삽입되거나, 바이러스 캡시드에 결합되고, 단백질 바이러스 캡시드는 이중 리간드를 발현하도록 변형된다. 그런 다음, 리간드는 표적 세포 상에서 우선적으로 또는 배타적으로 발현되는 수용체 또는 마커를 재유도, 예를 들어 이에 결합한다. (Stachler 등 (2006) *Gene Ther.* 13:926-931; White 등. (2004) *Circulation* 109:513-519). 직접적인 재조합 접근법은 AAV(Park 등, (2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653-59; Girod 등. (1999) *Nature Medicine* 5:1052-56; Grifman 등. (2001) *Molecular Therapy* 3:964-75; Shi 등. (2001) *Human Gene Therapy* 12:1697-1711; Shi 및 Bartlett (2003) *Molecular Therapy* 7:515-525), 레트로바이러스(Dalba 등. *Current Gene Therapy* 5:655-667; Tai 및 Kasahara (2008) *Frontiers in Bioscience* 13:3083-3095; Russell 및 Cosset (1999) *Journal of Gene Medicine* 1:300-311; Erlwein 등. (2002) *Virology* 302:333-341; Chadwick 등. (1999) *Journal of Molecular Biology* 285:485-494; Pizzato 등. (2001) *Gene Therapy* 8:1088-1096), 수두바이러스(Guse 등. (2011) *Expert Opinion on Biological Therapy* 11:595-608; Galmiche 등. (1997) *Journal of General Virology* 78:3019-3027; Paul 등. (2007) *Viral Immunology* 20:664-671), 파라믹소바이러스(Nakamura 및 Russell (2004) *Expert Opinion on Biological Therapy* 4:1685-1692; Hammond 등. (2001) *Journal of Virology* 75:2087-2096; Galanis (2010) *Clinical Pharmacology and Therapeutics* 88:620-625; Blechacz 및 Russell (2008) *Current Gene Therapy* 8:162-175; Russell 및 Peng (2009) *Current Topics in Microbiology and Immunology* 330:213-241), 및 헤르페스바이러스(Shah 및 Breakefield (2006) *Current Gene Therapy* 6:361-370; Campadelli-Fiume 등. (2011) *Reviews in Medical Virology* 21:213-226)에 사용되어 왔다.
- [0141] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 요법 벡터는 조절 반응, 예를 들어, 대체 효소에 대한 내성을 생성하기에 특히 적합한 이들 조직에 대해 위형화된다. 이러한 조직은 점막 조직, 예를 들어, 장-관련 림프 조직(GALT), 조혈 줄기 세포, 및 간을 포함하지만, 이에 한정되지는 않는다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 유전자 요법 벡터 또는 유전자는 이들 조직에 특이적인 프로모터, 예를 들어, 간 특이적 프로모터의 조절 하에 발현된다.
- [0142] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 요법 벡터는 네이키드 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 다중 도메인 치료 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드는, 예를 들어, 근육내 주입되거나, 저장소를 형성하도록 조직 내에 직접 주입되거나, 정맥내 주입되거나 할 수 있다. 네이키드 폴리뉴클레오티드의 전달 강화에 대해 잘 알려진 추가 방법은 전기천공, 초음파분해, 폴리뉴클레오티드가 코팅된 금 입자를 발사하기 위한 유전자 총의 사용, 자기감염, 및 유체역학적 전달을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.
- [0143] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 유전자 요법 벡터는 나노입자(예: 폴리뉴클레오티드 자가-조립식 나노 입자, 중합체 기반 자가-조립식 나노입자, 무기 나노입자, 지질 나노입자, 반도체성/금속성 나노입자), 겔 및 하이드로겔, 양이온과 음이온을 갖는 폴리뉴클레오티드 복합체, 극미립자, 및 이들의 임의의 조합과 같은, 그러나 이들로 한정되지는 않는 폴리뉴클레오티드 복합체를 포함한다.
- [0144] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 자가-조립식 나노 입자로서 제형화될 수 있다. 비-제한적 예로서, 폴리뉴클레오티드는, 폴리뉴클레오티드를 위한 전달 시스템에서 사용될 수 있는 나노입자를 만드는데 사용될 수 있다(예를 들어, 국제 공개 제W02012125987호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드 자가-조립식 나노 입자는 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드의 코어 및 중합체 셸을 포함할 수 있다. 중합체 셸은 본원에서 기술된 중합체 중 어느 하나일 수 있고, 당업계에 알려져 있다. 추가 구현예에서, 중합체 셸은 코어 내의 폴리뉴클레오티드를 보호하기 위해 사용될 수 있다.
- [0145] 일부 구현예에서, 이러한 자가-조립식 나노입자는 폴리뉴클레오티드 헤어핀의 긴 중합체로 형성된 마이크로스폰지일 수 있는데, 폴리뉴클레오티드 헤어핀의 긴 중합체는 마이크로스폰지로 자가-조립 되기 전에 결정질 '주름(pleated)' 시트를 형성한다. 이들 마이크로스폰지는 치밀하게 채워진 스폰지와 같은 극미립자로서, 효율적인 담체로서 기능할 수 있고 세포에 물질을 전달할 수 있다. 마이크로스폰지의 직경은 1 μm 내지 300 nm일 수 있다. 마이크로스폰지는 당업계에 알려진 다른 제제와 착화되어 더 큰 마이크로스폰지를 형성할 수 있다. 비제한적인 예로서, 마이크로스폰지는 제제와 착화되어 세포 흡수를 촉진하기 위한, 폴리양이온 폴리에틸렌아민(PEI)과 같은 외부층을 형성할 수 있다. 이러한 복합체는 고온(150°C에서 안정적으로 유지될 수 있는 250 nm 직경 입자를 형성할 수 있다(Grabow 및 Jaegar, *Nature Materials* 2012, 11:269-269; 그 전체는 참조로서 본원에 통합

됨). 또한, 이들 마이크로스폰지는 리보뉴클레아제에 의한 분해로부터 보통 이상의 보호를 나타낼 수 있다. 또 다른 구현예에서, 마이크로스폰지와 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 중합체 기반 자가-조립식 나노 입자는 완전히 프로그래밍될 수 있는 나노입자일 수 있다. 나노입자의 기하학적 구조, 크기 및 화학량론은, 폴리뉴클레오티드와 같은, 그러나 이에 제한되지 않는, 물질의 전달을 위한 최적의 나노입자를 생성하도록 정밀하게 제어될 수 있다.

[0146] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 무기 나노입자로 제형화될 수 있다(미국 특허 제8,257,745호; 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 무기 나노입자는 수팽윤성인 점토 물질을 포함할 수 있지만, 이에 한정되지 않는다. 비제한적인 예로서, 무기 나노입자는 단순한 규산염으로 만들어진 합성 스펙타이트 점토를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제5,585,108호 및 제8,257,745호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0147] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 반도체성 또는 금속성 재료를 포함하는 수분산성 나노입자로 제형화되거나(미국 특허 제20120228565호; 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨) 자기 나노입자로 형성될 수 있다(미국 공개 제20120265001호 및 제20120283503호, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 수분산성 나노입자는 소수성 나노입자 또는 친수성 나노입자일 수 있다.

[0148] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 대상체에게 주입될 때 겔을 형성할 수 있는, 당업계에 알려진 임의의 하이드로겔로 캡슐화될 수 있다. 하이드로겔은 친수성인 중합체 사슬의 네트워크이고, 물이 분산 매질인 콜로이드성 겔로서 흔히 발견된다. 하이드로겔은 높은 흡수력의(99%가 넘게 물을 함유할 수 있음) 천연 또는 합성 중합체이다. 하이드로겔은 또한 이들의 상당한 수분 함량으로 인해 천연 조직과 매우 유사한 정도의 유연성을 갖는다. 본원에 기술된 하이드로겔은 생체적합성, 생분해성 및/또는 다공성인 지질 나노입자를 캡슐화하기 위해 사용될 수 있다.

[0149] 비제한적인 예로서, 하이드로겔은 앵타머-관능화된 하이드로겔일 수 있다. 상기 앵타머-관능화된 하이드로겔은 폴리뉴클레오티드 혼성화를 사용하여 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 방출하도록 프로그래밍될 수 있다. (Battig 등, J. Am. Chem. Society. 2012 134:12410-12413; 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨). 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 지질 나노입자에 캡슐화된 다음, 지질 나노입자가 하이드로겔로 캡슐화될 수 있다.

[0150] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 피브린 하이드로겔 또는 피브린 글루로 캡슐화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 피브린 하이드로겔 또는 피브린 글루로 캡슐화되기 전에 지질 나노입자 또는 신속 제거형 지질 나노입자로 제형화될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 피브린 겔, 피브린 하이드로겔 또는 피브린 글루로 캡슐화되기 전에 리포플렉스로서 제형화될 수 있다. 피브린 겔, 하이드로겔, 및 글루는 2개의 성분, 즉 피브로겐 용액 및 칼슘이 풍부한 트롬빈 용액을 포함한다(예를 들어, Spicer 및 Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd 등의. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 피브린 겔, 하이드로겔, 및/또는 글루의 성분의 농도는 겔, 하이드로겔, 및/또는 글루의 특성, 네트워크 메시 크기, 및/또는 분해 특성을 변화시키도록(예컨대 피브린 겔, 하이드로겔 및/또는 글루의 방출 특성을 변화시키는 것을 포함하지만, 이로 한정되지 않음) 변경될 수 있다. (예를 들어, Spicer 및 Mikos, Journal of Controlled Release 2010. 148: 49-55; Kidd 등의. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas 등의. Tissue Engineering 2008. 14:119-128을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨). 이러한 특징은 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위해 사용될 때 유리할 수 있다. (예를 들어, Kidd 등의. Journal of Controlled Release 2012. 157:80-85; Catelas 등의. Tissue Engineering 2008. 14:119-128을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0151] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 양이온이나 음이온을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 제형은 Zn²⁺, Ca²⁺, Cu²⁺, Mg⁺ 및 이들의 조합과 같은 금속 양이온을 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 비제한적인 예로서, 제형은 중합체 및 금속 양이온과 착화된 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 제6,265,389호 및 제6,555,525호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합됨).

[0152] 일부 구현예에서, 폴리뉴클레오티드는 나노입자 및/또는 극미립자에 제형화될 수 있다. 이들 나노입자 및/또는 극미립자는 임의의 크기, 형상 및 화학물질로 성형될 수 있다. 일례로서, 나노입자 및/또는 극미립자는 LIQUIDA TECHNOLOGIES.RTM (노스캐롤라이나주 모리스빌 소재)의 PRINT® 기술을 사용해 제조될 수 있다(예를 들어, 국제 공개 제WO2007024323호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨).

- [0153] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는 Keystone Nano(펜실베이니아주 스테이트 칼리지 소재)에 의해 나노자켓(NanoJacket) 및 나노리포솜으로 제형화될 수 있다. 나노자켓은 칼슘, 인산염 등 신체에서 자연적으로 발견되는 화합물로 만들어지며 소량의 규산염을 포함할 수도 있다. 나노자켓은 크기가 5 내지 50 nm일 수 있고, 폴리뉴클레오티드, 일차 작제물 및/또는 폴리뉴클레오티드와 같은, 그러나 이들로 한정되지는 않는 친수성 및 소수성 화합물을 전달하는 데 사용될 수 있다. 나노리포솜은 신체에서 자연적으로 발생하는 지질과 같은, 그러나 이에 한정되지 않는 지질로 만들어진다. 나노리포솜은 크기가 60 내지 80 nm일 수 있고, 폴리뉴클레오티드, 일차 작제물 및/또는 폴리뉴클레오티드와 같은, 그러나 이들로 한정되지는 않는 친수성 및 소수성 화합물을 전달하는 데 사용될 수 있다. 일 양태에서, 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드는, 세라미드 나노리포솜과 같은 나노리포솜으로 제형화되지만, 이에 한정되지 않는다.
- [0154] 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질은 항-CD63 scFv-GAA 융합 단백질 또는 항-ITGA7 scFv-GAA 융합 단백질을 포함한다. AAV 전달을 통한 항-CD63 scFv-GAA 융합 단백질 또는 항-ITGA7 scFv-GAA 융합 단백질의 투여는 다중 도메인 치료 단백질 보유 유전자 요법 벡터의 투여 후 환자의 혈청에서 GAA의 장기적이고 안정한 생성을 제공한다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질 보유 유전자 치료 벡터의 투여 후 1개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월 후에 수혜 환자의 혈청 내 GAA 레벨은 전달 도메인에 연결되지 않은 GAA를 투여 받은 환자의 혈청 레벨에 비해 1.5배 이상 내지 100배 이하, 1.5배 이상 내지 10배 이하, 2.5배 이상, 2.5배 내지 3배, 2.5배, 2.6배, 2.7배, 2.8배, 2.9배, 3.0배, 3.1배, 3.2배, 3.3배, 3.4배, 3.5배, 3.6배, 3.7배, 3.8배, 3.9배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 또는 10배 더 높다.
- [0155] 일 구현예에서, AAV-전달을 통한 항-CD63 scFv-GAA 융합 단백질 또는 항-ITGA7 scFv-GAA 융합 단백질의 투여는, 폼페병 환자에서 축적된 글리코겐 레벨의 장기적이고 안정한 감소를 제공한다. 일 구현예에서, 환자의 심장, 골격근, 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 야생형(비질환) 레벨까지 감소된다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질 보유 유전자 치료 벡터의 투여 후 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월차에 환자의 심장, 골격근 및 간 조직에서의 글리코겐 레벨은 야생형 레벨로 유지된다.
- [0156] 일 구현예에서, AAV-전달을 통한 항-CD63 scFv-GAA 융합 단백질 또는 항-ITGA7 scFv-GAA 융합 단백질의 투여는, 폼페병 환자에서 근 강도의 장기적인 회복을 제공한다. 일 구현예에서, 다중 도메인 치료 단백질 보유 유전자 치료 벡터의 투여 후 1개월, 2개월, 3개월, 4개월, 5개월, 또는 6개월차에 파지 강도에 의해 측정된 환자의 강도는 정상(즉, 비질환 정상 레벨)로 회복된다.
- [0157] 또 다른 양태에서, 본 발명은 효소 활성 및 항원-결합 단백질을 포함하는 조성물을 제공하며, 여기서 상기 효소는 효소 결핍 질환(LSD) 및 내재화 효과기-결합 단백질과 연관된다. 리소좀 축적 질환과 연관된 효소(그 자체로 축적이 아닌 단백질을 포함함)는 예를 들어, α -갈락토시다아제, β -갈락토시다아제, α -글루코시다아제, β -글루코시다아제, 사포신-C 활성제, 세라미다아제, 스펅고미엘리나아제, β -헥소사미니다아제, GM2 활성제, GM3 합성효소, 아틸설파타아제, 스펅고리피드 활성제, α -아이두로니다아제, 아이두로니다아제-2-설파타아제, 헤파린 N-설파타아제, N-아세틸- α -글루코사미니다아제, α -글루코사미드 N-아세틸트랜스퍼라아제, N-아세틸글루코사민-6-설파타아제, N-아세틸갈락토사민-6-설페이트 설파타아제, N-아세틸갈락토사민-4-설파타아제, β -글루루로니다아제, 히알루로니다아제 등을 포함한다.
- [0158] 내재화 효과기-결합 단백질은 예를 들어, 수용체-융합 분자, 트랩 분자, 수용체-Fc 융합 분자, 항체, Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fd 단편, Fv 단편, 단쇄 Fv (scFv) 분자, dAb 단편, 단리된 상보성 결정 영역 (CDR), CDR3 펩티드, 제약적 FR3-CDR3-FR4 펩티드, 도메인-특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결합된 항체, 키메라 항체, CDR-그래프트된 항체, 이중체, 삼중체, 사중체, 미니바디, 나노바디, 1가 나노바디, 2가 나노바디, 작은 모듈의 면역의약품(SMIP), 카멜리드 항체 (VHH 중쇄 동종이량체 항체), 및 상어 가변성 IgNAR 도메인, 기타 항원-결합 단백질 등을 포함한다.
- [0159] 내재화 효과기는 CD63, MHC-I, 크레멘-1, 크레멘-2, LRP5, LRP6, LRP8, 트랜스페린 수용체, LDL-수용체, LDL-관련 단백질 1 수용체, ASGR1, ASGR2, 아밀로이드 전구체 단백질 유사 단백질-2(APLP2), 아펠린 수용체(APLNR), PRLR (프로락틴 수용체), MAL(미엘린 및 림프구 단백질, 일명 VIP17), IGF2R, 액포형 H+ ATP아제, 디프테리아 독소 수용체, 엽산 수용체, 글루타메이트 수용체, 글루타틴 수용체, 랩틴 수용체, 스캐빈저 수용체, SCARA1-5, SCARB1-3, 및 CD36을 포함한다. 특정 구현예에서, 내재화 효과기는 신장 특이적 내재화제, 예컨대 CDH16 (Cadherin-16), CLDN16 (Claudin-16), KL (Klotho), PTH1R (부갑상선 호르몬 수용체), SLC22A13 (용질 운반체 군 22 멤버 13), SLC5A2 (나트륨/글루코오스 공동수송체 2) 및 UMOD (Uromodulin)이다. 다른 특정 구현예들에서, 내재화 효과기는 근육 특이적 내재화제, 예컨대 BMP1A (골 형성 단백질 수용체 1A), m-카데린, CD9, MuSK (근

육 특이적 키나아제), LGR4/GPR48 (G 단백질-결합 수용체 48), 폴린효능성 수용체 (니코틴성) 알파 1, CDH15 (Cadherin-15), ITGA7 (인테그린 알파-7), CACNG1 (L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-1), CACNA1S (L-형 칼슘 채널 서브유닛 알파-15), CACNG6 (L-형 칼슘 채널 서브유닛 감마-6), SCN1B (나트륨 채널 서브유닛 베타-1), CHRNA1 (ACh 수용체 서브유닛 알파), CHRND (ACh 수용체 서브유닛 델타), LRRC14B (류신-풍부 반복체-함유 단백질 14B), 디스트로글리칸(DAB1), 및 POPDC3 (과파이 도메인-함유 단백질 3)이다. 일부 구체적인 구현예들에서, 내재화 효과기는 ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, 또는 PRLR이다.

[0160] 일부 구현예에서, 효소는 항원-결합 단백질에 공유 결합된다 (즉, 원자를 통해 전자 공유). 하나의 특정 구현예에서, 내재화 효과기-결합 단백질은 반수체로 구성되거나 이를 함유하며; 효소는 Fc-융합 도메인에 융합되며 (예를 들어, C-말단에서); 효소에 공유 결합되는 Fc-도메인은 항원-결합 단백질의 Fc-도메인과 결합하여 하나 이상의 이황화 브릿지를 함유한다. 이 특정 구현예는 도 1a, 패널 B에 개략적으로 도시되어 있다.

[0161] 또 다른 특정 구현예에서, 내재화 효과기-결합 단백질(전달 도메인)은 항체 또는 항체 단편으로 이루어져 있거나 이를 함유하고 있으며, 효소는 항체 또는 항체 단편에 공유 결합되어 있다. 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체이고, 효소는 (펩티드 결합을 통해 직접적으로, 또는 링커를 통해 간접적으로) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 C-말단에 공유 결합된다 (각각 도 1a, 패널 C 또는 E). 또 다른 구체적인 구현예에서, 전달 도메인은 항체이고, 효소는 (펩티드 결합을 통해 직접적으로, 또는 링커를 통해 간접적으로) 항체의 중쇄 또는 경쇄의 N-말단에 공유 결합된다 (각각 도 1a, 패널 D 또는 F).

[0162] 일부 구현예에서, 효소와 전달 도메인은 공유 결합되어 있지 않지만, 혼화제에 조합되어 있다. 전달 도메인과 효소는 비공유 결합을 통해 결합하여 복합체를 형성할 수 있다. 예를 들어, 하나의 특정 구현예에서, 전달 도메인은 항체의 한 아암이 내재화 효과기에 결합하고 다른 아암이 효소에 결합하는 이중특이적 항체이다. 이 구현예는 도 1a, 패널 A에 개략적으로 도시되어 있다.

[0163] 일부 구현예에서, 효소는 GAA이거나 GAA 활성 (예를 들어, GAA 활성을 갖는 아이소자임)을 포함하고, 내재화 효과기는 ITGA7, CDH15, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, 또는 PRLR이다. 특정 구현예에서, 효소는 GAA이거나 GAA 활성을 포함하고, 내재화 도메인은 CD63이고, 전달 도메인은 CD63 및 GAA에 특이성을 갖는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, 효소는 GAA이거나 GAA 활성을 포함하고, 내재화 도메인은 ITGA7이고, 전달 도메인은 ITGA7 및 GAA에 특이성을 갖는 이중특이적 항체이다.

[0164] 일부 구현예에서, 효소는 GLA이거나 GLA 활성 (예를 들어, GAA 활성을 갖는 아이소자임)을 포함하고, 내재화 효과기는 ITGA7, CD9, CD63, APLP2, ASGR1, ASGR2, 또는 PRLR이다. 특정 구현예에서, 효소는 GLA이거나 GLA 활성을 포함하고, 내재화 도메인은 CD63이고, 전달 도메인은 CD63 및 GLA에 특이성을 갖는 이중특이적 항체이다. 특정 구현예에서, 효소는 GLA이거나 GLA 활성을 포함하고, 내재화 도메인은 ITGA7이고, 전달 도메인은 ITGA7 및 GLA에 특이성을 갖는 이중특이적 항체이다.

[0165] *약학적 조성물 및 이의 투여*

[0166] 약학적 제형은, 원하는 특정 투여량 형태에 적합한, 임의의 및 모든 용매, 분산 배지, 희석제, 또는 다른 액체 비히클, 분산 또는 현탁 보조제, 표면 활성제, 등장제, 증점제 또는 유화제, 보존제, 고체 결합제, 윤활제 등을 포함하는 약학적으로 허용 가능한 부형제를 추가로 포함할 수 있다. Remington's The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, A. R. Gennaro(LippincottWilliams & Wilkins, Baltimore, Md., 2006; 그 전체가 참조로써 본원에 통합됨)는 약학적 조성물의 제형화에 사용되고, 이의 제조를 위한 공지된 기술에 사용된 다양한 부형제를 개시하고 있다. 임의의 종래의 부형제 매질이, 예컨대, 임의의 바람직하지 않은 생물학적 영향을 생성하거나, 달리 유해한 방식으로 약학적 조성물의 임의의 다른 성분(들)과 상호작용함으로써 물질 또는 이의 유도체와 호환되지 않는 경우를 제외하고, 이의 사용은 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 고려된다.

[0167] 일부 구현예에서, 약학적으로 허용 가능한 부형제는 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100% 순수하다. 일부 구현예에서, 부형제는 인간 및 수의과용으로 사용되도록 승인된다. 일부 구현예에서, 부형제는 미국 식품 의약국(FDA)에 의해 승인된다. 일부 구현예에서, 부형제는 약학 등급이다. 일부 구현예에서, 부형제는 미국 약전(USP), 유럽 약전(EP), 영국 약전, 및/또는 국제 약전의 표준을 만족한다.

[0168] 약학적 조성물의 제조에 사용되는 약학적으로 허용 가능한 부형제는 불활성 희석제, 분산제 및/또는 과립화제, 표면 활성제 및/또는 유화제, 분해제, 결합제, 보존제, 현탁제, 윤활제 및/또는 오일을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 이러한 부형제는 약학적 조성물에 임의로 포함될 수 있다.

[0169] 예시적인 희석제는 탄산칼슘, 탄산나트륨, 인산칼슘, 인산이칼슘, 황산칼슘, 인산칼슘, 인산수소칼슘, 인산나트

를 락토오스, 수크로오스, 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 카올린, 만니톨, 소르비톨, 이노시톨, 염화나트륨, 건조 전분, 옥수수 전분, 분말 설탕 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0170] 예시적인 과립화제 및/또는 분산제는 감자 전분, 옥수수 전분, 타피오카 전분, 전분 글리콜산나트륨, 점토, 알긴산, 구아 검, 시트러스 펄프, 한천, 벤토나이트, 셀룰로오스 및 목재 산물, 천연 스폰지, 양이온 교환 수지, 탄산칼슘, 규산염, 탄산나트륨, 가교결합된 폴리(비닐-피롤리돈) (크로스포비돈), 소듐 카복시메틸 전분(전분글리콜산나트륨), 카복시메틸 셀룰로오스, 가교결합된 카복시메틸 셀룰로오스 나트륨(크로스카멜로오스), 메틸셀룰로오스, 젤라틴화 전분(전분 1500), 미정질 전분, 불수용성 전분, 칼슘 카복시메틸 셀룰로오스, 마그네슘 알루미늄 실리케이트(VEEGUM®), 라우릴황산나트륨, 사차암모늄 화합물 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0171] 예시적인 표면 활성제 및/또는 유화제는 천연 유화제(아카시아, 한천, 알긴산, 알긴산 나트륨, 트라가칸트, 콘드릭스, 콜레스테롤, 크산탄, 펙틴, 젤라틴, 난황, 카세인, 양모지, 콜레스테롤, 왁스, 및 레시틴), 콜로이드성 점토(예: 벤토나이트[알루미늄 실리케이트] 및 VEEGUM® [마그네슘 알루미늄 실리케이트]), 장쇄 아미노산 유도체, 고분자량 알코올(예: 스테아릴 알코올, 세틸 알코올, 올레일 알코올, 트리아세틴 모노스테아레이트, 에틸렌 글리콜 디스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 및 프로필렌 글리콜 모노스테아레이트, 폴리비닐 알코올), 카보머(예: 카복시 폴리메틸렌, 폴리아크릴산, 아크릴산 중합체, 및 카복시비닐 중합체), 카라기난, 셀룰로오스 유도체(예: 카복시메틸셀룰로오스 나트륨, 분말 셀룰로오스, 히드록시메틸 셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스), 소르비탄지방산 에스테르(예: 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트[TWEEN® 20], 폴리옥시에틸렌 소르비탄[TWEEN® 60], 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노올레이트[TWEEN® 80], 소르비탄 모노팔미테이트[SPAN® 40], 소르비탄 모노스테아레이트[SPAN® 60], 소르비탄 트리스테아레이트[SPAN® 65], 글리세릴 모노올레이트, 소르비탄 모노올레이트[SPAN® 80]), 폴리옥시에틸렌 에스테르(예: 폴리옥시에틸렌 모노스테아레이트[MYRJ® 45], 폴리옥시에틸렌 수소화 피마자유, 폴리에톡시화 피마자유, 폴리옥시메틸렌 스테아레이트, 및 SOLUTOL®), 수크로오스 지방산 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 지방산 에스테르(예: CREMOPHOR®), 폴리옥시에틸렌 에테르(예: 폴리옥시에틸렌 라우릴 에테르[BRIJ® 30]), 폴리(비닐-피롤리돈), 디에틸렌 글리콜 모노알루레이트, 트리에탄올아민 올레이트, 올레산나트륨, 올레산칼륨, 올레산에틸, 올레산, 라우린산에틸, 라우릴황산나트륨, PLUORINC® F 68, POLOXAMER® 188, 세트리모늄브로마이드, 염화세틸피리디늄, 염화벤즈알코늄, 도큐세이트 나트륨, 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0172] 예시적인 결합제는 전분(예: 옥수수 전분 및 전분 페이스트); 젤라틴; 당(예: 수크로오스, 글루코오스, 텍스트로오스, 텍스트린, 당밀, 락토오스, 락티톨, 만니톨); 천연 및 합성 검(예: 아카시아, 알긴산나트륨, 아이리시모스 추출물, 판위 검, 이사폴 피의 점액, 카복시메틸셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 에틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시프로필 셀룰로오스, 히드록시프로필 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 아세트산 셀룰로오스, 폴리(비닐-피롤리돈), 마그네슘 알루미늄 실리케이트(Veegum®), 및 낙엽송 아라보갈락탄); 알긴산염; 폴리에틸렌 옥사이드; 폴리에틸렌 글리콜; 무기 칼슘염; 규산; 폴리메타크릴레이트; 왁스; 물; 알코올 등, 및 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0173] 예시적인 보존제는 항산화제, 킬레이트제, 향균 보존제, 항진균 보존제, 알코올 보존제, 산성 보존제, 및/또는 기타 보존제를 포함할 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 항산화제는 알파 토코페롤, 아스코르브산, 아스코르빌 팔미테이트, 부틸화 히드록시아니솔, 부틸화 히드록시톨루엔, 모노티오글리세롤, 메타중황산칼륨, 프로피온산, 프로필 갈레이트, 아스코르브산나트륨, 메타중황산나트륨, 및/또는 아황산나트륨을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 킬레이트제는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA), 시트르산 일수화물, 에데트산 이나트륨, 에데트산 이칼륨, 에데트산, 푸마르산, 말산, 인산, 에데트산 나트륨, 타르타르산 및/또는 에데트산 삼나트륨을 포함한다. 예시적인 향균 보존제는 염화 벤즈알코늄, 염화 벤제토늄, 벤질 알코올, 브로노폴, 세트리미드, 염화 세틸피리디늄, 클로르헥시딘, 클로로 부탄올, 클로로 크레졸, 클로로 실레놀, 크레졸, 에틸 알코올, 글리세린, 헥세티딘, 이미드우레아, 페놀, 페녹시에탄올, 페닐에틸 알코올, 페닐질산수은, 프로필렌 글리콜, 및/또는 티메로살을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 항진균 보존제는 부틸 파라벤, 메틸 파라벤, 에틸 파라벤, 프로필 파라벤, 벤조산, 히드록시벤조산, 벤조산칼륨, 소르브산칼륨, 벤조산나트륨, 프로피온산나트륨, 및/또는 소르브산을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 알코올 보존제는 에탄올, 폴리에틸렌 글리콜, 페놀, 페놀 화합물, 비스페놀, 클로로부탄올, 히드록시벤조에이트, 및/또는 페닐에틸 알코올을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 산성 보존제는 비타민 A, 비타민 C, 비타민 E, 베타-카로틴, 시트르산, 아세트산, 디하이드로아세트산, 아스코르브산, 소르브산, 및/또는 피트산을 포함하지만, 이

들로 한정되지는 않는다. 다른 보존제는 토코페롤, 토코페롤 아세테이트, 디테록심 메실레이트, 세트리미드, 부틸화 히드록시아니솔(BHA), 부틸화 히드록시톨루엔(BHT), 에틸렌디아민, 라우릴 황산나트륨(SLS), 라우릴 에테르 황산나트륨(SLES), 아황산나트륨, 아황산칼륨, 메타중아황산칼륨, GLYDANT PLUS®, PHENONIP®, 메틸파라벤, GERMALL® 115, GERMABEN® II, NEOLONE.TM., KATHON.TM., 및/또는 EUXYL®을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0174] 예시적인 완충제는 시트레이트 완충액, 아세테이트 완충액, 인산염 완충 용액, 염화암모늄, 탄산칼슘, 염화칼슘, 시트르산칼슘, 글루비오산칼슘, 글루셴트산칼슘, 글루콘산 칼슘, D-글루콘산, 글리세로인산칼슘, 락트산칼슘, 프로판산, 레볼린산칼슘, 발레르산, 이염기성 인산칼슘, 인산, 삼염기성 인산칼슘, 수산화 인산칼슘, 아세트산칼륨, 염화칼륨, 글루콘산칼륨, 칼륨혼합물, 이염기성 인산칼륨, 일염기성 인산칼륨, 인산칼륨 혼합물, 아세트산나트륨, 중탄산나트륨, 염화나트륨, 구연산나트륨, 락트산나트륨, 이염기성 인산나트륨, 일염기성 인산나트륨, 인산나트륨 혼합물, 트로메타민, 수산화마그네슘, 수산화알루미늄, 알긴산, 발열원 제거수(pyrogen-free water), 등장성 염수, 링거 용액, 에틸 알코올 등 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0175] 예시적인 유희제는 스테아르산마그네슘, 스테아르산칼슘, 스테아르산, 실리카, 탈크, 말트, 글리세릴 베헤네이트, 수소화 식물유, 폴리에틸렌 글리콜, 벤조산나트륨, 아세트산나트륨, 염화나트륨, 류신, 라우릴 황산마그네슘, 라우릴 황산나트륨, 등, 및 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0176] 예시적인 오일은, 아몬드(almond), 행인(apricot kernel), 아보카도, 바바수야자(babassu), 베르가못(bergamot), 블랙 커런트 씨(black current seed), 지치(borage), 케이드(cade), 카모마일(camomile), 캐놀라(canola), 캐러웨이(caraway), 브라질납야자(carnauba), 피마자(castor), 시나몬(cinnamon), 코코아 버터, 야자, 대구 간(cod liver), 커피, 옥수수, 목화씨, 에무(emu), 유칼립투스, 달맞이꽃, 생선, 아마씨(flaxseed), 게라니올(geraniol), 조롱박(gourd), 포도씨, 헤이즐넛, 우슬초(hyssop), 이소프로필 미리스테이트, 호호바(jojoba), 쿠쿠이넛(kukui nut), 라반딘, 라벤더, 레몬, 리세아쿠베바, 마카데미아넛, 아욱, 망고씨, 메도우폼 씨, 밍크, 옥두구, 올리브, 오렌지, 오렌지 러피, 팜, 팜 핵, 복숭아 핵, 땅콩, 양귀비씨, 호박씨, 유채, 쌀겨, 로즈마리, 홍화, 백단, 사스쿠아나, 사보우리, 산자나무, 참깨, 시어 버터, 실리콘, 대두, 해바라기, 차나무, 영경귀, 츠마키, 베티버, 호두 및 윗점(wheat germ) 오일을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 예시적인 오일로는, 스테아르산 부틸, 카프릴릭 트리글리세리드, 카프릭 트리글리세리드, 시클로메티콘, 디에틸 세바케이트, 디메티콘 360, 이소프로필 미리스테이트, 광유, 옥틸도데칸올, 올릴 알코올, 실리콘 오일, 및/또는 이들의 조합을 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다.

[0177] 코코아 버터와 좌제 왁스, 착색제, 코팅제, 감미료, 향료, 및/또는 향미제와 같은 부형제가 제형자(formulator)의 판단에 따라 조성물 내에 존재할 수 있다.

[0178] 전달

[0179] 본 발명은, 약물 전달 과학에 있어서의 가능한 진전을 고려한 임의의 적절한 경로로 유전자 요법 벡터(예: 폴리뉴클레오티드)를 전달하는 것을 포함한다. 전달은 네이키드 전달 또는 제형화 전달일 수 있다.

[0180] 네이키드 전달

[0181] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 세포에 네이키드로 전달될 수 있다. 본원에 사용된 바와 같이, "네이키드(naked)"는 형질감염을 촉진하는 제제가 없는 폴리뉴클레오티드를 전달하는 것을 의미한다. 예를 들어, 세포에 전달되는 폴리뉴클레오티드는 변형을 함유하지 않을 수 있다. 네이키드 폴리뉴클레오티드는 당업계에 공지되고 본원에 기술된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.

[0182] 제형화된 전달

[0183] 폴리뉴클레오티드는 본원에 기술된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 폴리뉴클레오티드를 함유할 수 있고, 추가로 세포 침투제, 약학적으로 허용 가능한 담체, 전달제, 생분해성 또는 생체적합성 중합체, 용매, 및 서방형 전달 데포 제제를 포함할 수 있지만, 이들로 한정되지는 않는다. 제형화된 폴리뉴클레오티드는 mRNA는 당업계에 공지되고 본원에 기술된 투여 경로를 사용하여 세포에 전달될 수 있다.

[0184] 투여

[0185] 본 발명의 폴리뉴클레오티드는 치료적으로 효과적인 결과를 생성하는 임의의 경로를 통해 투여될 수 있다. 이러한 경로에는 장 내, 위장관, 경막 외, 경구, 경피, 경막 외, 뇌 내, 뇌실 내, 피하(피부 도포), 피 내(피부 자

체), 피하(피부 아래), 비강 투여(코를 통한), 정맥 내, 동맥 내, 근육 내, 심장 내, 골수 내 주입, 척수강 내(척수관 내), 복강 내(복막 내로의 주입 또는 주사); 정맥 내 주입; 유리체 내(안구를 통과함); 정맥 내 주입(음경의 기부 내); 질내 투여; 자궁 내; 양수 외 투여; 경피(전신 분포를 위해 온전한 피부를 통해 확산함), 경점막 내(점막을 통한 확산), 흡입(코 흡입), 설하, 입술 내, 관장, 눈 점적(점막 위), 또는 귀 점적이 포함되지만, 이들로 한정되지는 않는다. 구체적인 구현예에서, 조성물이 혈액-뇌 장벽, 혈관 장벽, 또는 다른 상피 장벽을 넘어갈 수 있게 하는 방식으로 조성물이 투여될 수 있다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드, 1차 작제물, 또는 mRNA에 대한 비제한적 투여 경로는 아래에 기술되어 있다.

[0186] 비경구 및 주입식 투여

[0187] 비경구 투여를 위한 액체 투약 형태는 약학적으로 허용되는 유화액, 마이크로유화액, 용액, 현탁액, 시럽 및/또는 엘릭서를 포함하지만, 이들로 한정되지는 않는다. 활성 성분 이외에, 액체 투약 형태는, 예를 들어, 물 또는 기타 용매, 가용화제 및 유화제, 예컨대, 에틸 알코올, 이소프로필 알코올, 탄산에틸, 아세트산에틸, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸렌 글리콜, 디메틸포름아미드, 오일(특히, 면실유, 땅콩유, 옥수수유, 배아유, 올리브유, 피마자유, 및 참기름), 글리세롤, 테트라하이드로푸르푸릴 알코올, 폴리에틸렌 그리콜, 및 소르비탄의 지방산 에스테르, 및 이들의 혼합물과 같은, 당업계에서 흔히 사용되는 불활성 희석제를 포함할 수 있다. 불활성 희석제 이외에, 구강 조성물은 습윤제, 유화 및 현탁제, 감미제, 향미제 및/또는 방향제와 같은 보조제를 포함할 수 있다. 비경구 투여에 대한 특정 구현예에서, 조성물은 CREMOPHOR®, 알코올, 오일, 개질 오일, 글리콜, 폴리소르베이트, 시클로덱스트린, 중합체 및/또는 이들의 조합과 같은 가용화제와 혼합된다.

[0188] 주사식 제제, 예를 들어, 살균된 주사식 수성 또는 유지성 현탁액은 적절한 분산제, 습윤제 및/또는 현탁제를 사용해 공지된 기술분야에 따라 제형화될 수 있다. 살균된 주사식 제제는, 예를 들어, 1,3-부탄디올의 용액으로서, 비독성 비경구적으로 허용가능한 희석제 및/또는 용매 중의 멸균된 주사식 용액, 현탁액, 및/또는 유화액일 수 있다. 허용 가능한 비히클과 용매 중에서 사용가능한 것은 물, 링거 용액, U.S.P., 및 등장성 염화나트륨 용액이다. 살균된, 고정식 오일은 통상적으로 용매 또는 현탁매질로서 사용된다. 이를 위해, 합성 모노글리세라이드 또는 디글리세라이드를 포함하는 임의의 블랜드 고정식 오일을 사용할 수 있다. 올레산과 같은 지방산이 주사제의 제조에 사용될 수 있다.

[0189] 주사가 가능한 제형은, 예를 들어, 박테리아 유보 필터를 통한 여과에 의해 멸균되고/되거나, 사용 직전에 멸균수 또는 다른 멸균 주사식 매질에 녹이거나 분산시킬 수 있는 멸균된 고형 조성물의 형태로 멸균제를 통합함으로써 멸균될 수 있다.

[0190] 활성 성분의 효과를 연장시키기 위해, 피하 또는 근육 내 주입된 활성 성분의 흡수를 느리게 하는 것이 종종 바람직하다. 이는 용해성이 낮은 결정질 또는 비정질 물질의 현탁액을 사용하는 것에 의해 달성될 수 있다. 그 다음에는, 약물의 흡수 속도가 약물의 용해 속도에 의존적이며, 이는 결국 결정 크기 및 결정 형태에 따라 달라질 수 있다. 대안적으로, 비경구 투여된 약물 형태의 흡수 지연은 오일 비히클에 약물을 용해 또는 현탁함으로써 달성된다. 주사가 가능한 데포 형태는 폴리락타이드-폴리글리콜리드와 같은 생분해성 중합체 중에 약물의 마이크로캡슐 매트릭스를 형성하여 제조된다. 약물 대 중합체의 비율 및 사용된 특정 중합체의 성질에 따라, 약물 방출 속도가 조절될 수 있다. 다른 생분해성 중합체의 예는 폴리(오르토에스테르) 및 폴리(무수물)를 포함한다. 데포 주사식 제형은 신체 조직과 호환성이 있는 리포솜 또는 마이크로유화액에 약물을 포획함으로써 제조된다.

[0191] 데포 투여

[0192] 본원에 기술된 바와 같이, 일부 구현예에서, 조성물은 연장 방출을 위한 데포(depot)로 제형화된다. 일반적으로, 특이적 기관 또는 조직("표적 조직")이 투여를 위해 표적화된다.

[0193] 본 발명의 일부 양태에서, 폴리뉴클레오티드는 표적 조직 내부 또는 근위에 공간적으로 보유된다. 조성물, 특히 조성물의 핵산 성분(들)이 표적 조직에 보유되도록(즉, 조성물의 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9, 99.99% 또는 그 이상이 표적 조직에 보유되도록) 하는 조건 하에 조성물과 표적 조직(하나 이상의 표적 세포를 함유함)을 접촉시킴으로써 포유류의 표적 조직에게 조성물을 제공하는 방법이 제공된다. 유리하게는, 보유하는 것(retention)은 하나 이상의 표적 세포에 들어가는 조성물에 존재하는 핵산의 양을 측정함으로써 결정된다. 예를 들어, 대상체에게 투여된 핵산의 적어도 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 99.9% 또는 그 이상이 투여 이후 일정 기간 동안 세포 내에 존재한다. 예를 들어, 포유류 대상체에 대한 근육 내 주입은 폴리뉴클레오티드 및 형질감염 시약을 함유하는 수성 조성물을 사

용하여 수행되고, 조성물의 보유는 근육 세포에 존재하는 리보핵산의 양을 측정함으로써 결정된다.

- [0194] 본 발명의 양태는 조성물이 표적 조직에 실질적으로 보유되도록 하는 조건 하에서 (하나 이상의 표적 세포를 함유하는) 표적 조직을 조성물과 접촉시킴으로써, 포유류 대상물의 표적 조직에 조성물을 제공하는 방법에 관한 것이다. 상기 조성물은 관심 폴리펩티드가 적어도 하나의 표적 세포에서 생산되도록 유효량의 폴리뉴클레오티드를 함유한다. "네이키드" 핵산(예: 세포 침투제 또는 다른 제제가 없는 핵산)가 고려되지만, 조성물은 일반적으로 세포 침투제 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 함유한다.
- [0195] 일부 환경에서, 조직의 세포에 의해 생산된 단백질의 양은 바람직하게 증가된다. 바람직하게는, 이러한 단백질 생산의 증가는 표적 조직 내 세포에 대해 공간적으로 제한된다. 따라서, 포유류 대상체의 조직에서 관심 단백질의 생산을 증가시키는 방법이 제공된다. 조성물의 단위량, 소정의 부피의 표적 세포 내에 함유된 실질적인 백분율의 세포에서 관심 폴리펩티드를 생산하도록 결정된 것을 특징으로 하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 조성물이 제공된다.
- [0196] 일부 구현예에서, 조성물은 다수의 상이한 폴리뉴클레오티드를 포함하며, 여기서 폴리뉴클레오티드 중 하나 또는 둘 이상이 관심 폴리펩티드를 암호화한다. 임의로, 조성물은 또한 조성물의 세포내 전달을 돕는 세포 침투제를 함유한다. (일반적으로, 표적 조직의 소정의 부피에 인접하거나 원위에 있는 조직에서 관심 폴리펩티드의 상당한 생산을 유도하지 않고) 표적 조직의 소정의 부피에 함유된 세포의 실질적인 백분율에서 관심 폴리펩티드를 생산하는 데 필요한 조성물의 투약량이 결정된다. 이러한 결정 후에, 결정된 투약량은 포유류 대상체의 조직 내로 직접 도입된다.
- [0197] 일 구현예에서, 본 발명은 1회 이상의 주사 또는 분할 용량 주사에 의해 폴리뉴클레오티드가 제공될 수 있게 한다.
- [0198] 일 구현예에서, 본 발명은 작은 일회용 약물 저장부, 패치 펌프 또는 삼투 펌프를 사용하여 표적 조직 근처에서 유지될 수 있다. 패치 펌프의 비제한적인 예는 BD®(뉴저지주 프랭클린 레이크스 소재), Insulet Corporation (메사추세츠주 베드포드 소재), SteadyMed Therapeutics(캘리포니아주, 샌프란시스코 소재)(예: Minimed), Unliffe(뉴저지주 브리지워터 소재), 및 SpringLeaf Therapeutics(뉴저지주 보스턴 소재)에 의해 제조 및/또는 판매되는 것들을 포함한다. 삼투 펌프의 비제한적인 예는 DURECT®(캘리포니아주 쿠프티노 소재)에 의해 제조된 것(예를 들어, DUROS® 및 ALZET®)을 포함한다.
- [0199] 투약
- [0200] 본 발명은 다중 도메인 치료 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 요법 벡터를 투여하는 단계, 및 임의로 후속하여 다중 도메인 치료 폴리펩티드를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법을 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 다중 도메인 치료 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 치료적 유효량으로 포함하는 유전자 요법 벡터를 이를 필요로 하는 환자에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 치료적 유효량은 다중 도메인 치료 폴리펩티드의 후속 투여를 제거하기에 충분한 것이다. 따라서, 일부 구현예에서, 치료가 필요한 효소 결핍 환자를 치료하는 방법, 예를 들어, 폼페병 환자에서 글리코겐 수준이 감소시키고/시키거나 GAA에 대한 CRIM을 감소시키는 방법은, 대체 효소를 포함하는 다중 도메인 치료 단백질, 예를 들어, 항-CD63 scFv::GAA 융합 단백질, 예를 들어 서열번호 11에 제시된 서열을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 치료 벡터를 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하되, 치료적 유효량은 환자에 대한 대체 효소, 예를 들어, GAA 또는 이의 유도체의 후속 투여를 필요없게 만든다. 일부 구현예에서, 치료가 필요한 효소 결핍 환자를 치료하는 방법, 예를 들어, 폼페병 환자에서 글리코겐 수준이 감소시키고/시키거나 GAA에 대한 CRIM을 감소시키는 방법은, 대체 효소를 포함하는 다중 도메인 치료 단백질, 예를 들어, 항-CD63 scFv::GAA 융합 단백질, 예를 들어 서열번호 11에 제시된 서열을 포함하는 다중 도메인 치료 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 유전자 치료 벡터를 치료적 유효량으로 환자에게 투여하는 단계를 포함하고, 치료적 유효량의 대체 효소를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함한다. 핵산, 단백질 또는 복합체, 또는 이의 제약, 영상, 진단 또는 예방적 조성물은, 질환, 장애, 및/또는 병태(예를 들어, 작동 기억 결함과 관련된 질병, 장애, 및/또는 병태)를 예방하거나, 치료, 진단하거나, 또는 관찰하는 데 효과적인 임의의 양 및 임의의 투여 경로를 사용해 대상체에게 투여될 수 있다. 정확한 필요량은 대상물의 종, 연령, 및 일반 상태, 질환의 중증도, 특정 조성물, 이의 투여 모드, 활성 모드 등에 따라 대상체마다 달라질 것이다. 본 발명에 따른 조성물은 통상적으로 투여 용이성 및 투여량 균일성을 위해 투여량 단위로 제형화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 총 일일 사용은 건전한 의학적 판단 범위 내에서 담당의에 의해 결정될 수 있음을 이해할 것이다. 특정 환자에 대한 특이적인 치료적 효과적, 예방적 또는 적절한 영상 투여량 수준

은 다음을 포함하는 다양한 인자들에 따라 달라지게 된다: 치료 중인 장애, 및 장애의 중증도; 사용되는 특정 화합물의 활성; 사용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별 및 식단; 투여 시간, 투여 경로, 및 사용된 특정 화합물의 분비 속도; 치료 기간; 사용된 특정 화합물과 조합으로 또는 동시에 사용되는 약물; 및 의학 분야에서 잘 알려진 기타 요인.

[0201] 하기 실시예들은 본 발명의 방법을 추가로 예시하도록 제공된다. 이들 실시예는 단지 예시적인 것이며 어떠한 방식으로든 본 발명의 범위를 한정하려는 것은 아니다.

[0202] 실시예

[0203] 실시예 1: 항-hCD63 ScFv::GAA 폴리뉴클레오티드 및 유전자 요법 벡터의 작제

[0204] 표준 삼중 형질감염 프로토콜을 사용하여, 인간 GAA(hGAA; 서열번호 1; 서열번호 12로 표시되는 핵산 서열) 또는 항-인간 CD63 단쇄 가변 단편(ScFv)(이의 C-말단에서 인간 GAA(항-hCD63 ScFv-hGAA; 서열번호 10; 서열번호 11로 표시되는 핵산)에 융합됨)의 발현을 위해 이들을 암호화하는 AAV2/8 바이러스를 생성하였다(문헌[Gray 등의, 2011; 및 Production of recombinant adeno-associated viral vectors and use *in vitro* and *in vivo* administration", Current Protocols in Neuroscience, John Wiley & Sons, New York (1999), pp. 4.17.1-4.17.25, Vol 1] 참조). 생산을 위해, 1×10^7 HEK293 세포를 15cm 플레이트 상에 도말하였다. 다음 날, (A) 8 μ g의 대조군 pAAV 벡터(간 특이적 세르피나1 인헨서(서열번호 9)를 포함하고 TTR 유도된 인간 GAA를 암호화함) 또는 대조군 pAAV 벡터(간 특이적 세르피나1 인헨서(서열번호 9)를 포함하고 TTR 유도된 hCD63 ScFv-hGAA를 암호화함)(도 1b 참조) 및 (B) pAAV RC2/8-유래 벡터(Gao, 2002) 및 16 μ g의 pHelper(Agilent, Cat #240074)를 사용해 PEIpro(Polyplus transfection, New York, NY catalog# 115-100)-매개 형질감염을 통해(1:1의 비율의 1ul PEIpro : 1 μ g DNA) 세포를 형질감염시켰다. 형질감염 후 72시간 후에, 세포를 수집하여, 20 mM 트리스-HCl, 1 mL MgCl₂, 2.5 mL KCl, 100 mL NaCl이 포함된 완충액 내에서 표준 동결-해동 방법을 사용해 용해시켰다. 이어서, 벤조나아제(Sigma, Cat# E1014-25KU)를 0.5 U/ μ L의 최종 농도로 샘플에 첨가한 다음, 37 °C에서 60분 동안 배양하였다. 그런 다음, 문헌[Zolotukhin 등, 1999, Gene Ther 1999;6:973-985]에 기술된 바와 같이 요오딕사놀(iodixanol) 구배의 초원심분리를 사용해 바이러스를 정제하고, 후속하여 qPCR로 적정하였다.

[0205] AAV 샘플을 DNaseI(Thermofisher Scientific, Cat #EN0525)로 1시간 동안 37°C에서 처리하고, DNA 추출 A11 Reagents(Thermofisher Scientific Cat# 4403319)를 사용해 용해시켰다. AAV2 ITR에 대해 유도된 프라이머를 사용해 QuantStudio 3 실시간 PCR 시스템을 이용해 캡시드화된 바이러스 게놈을 정량화하였다. AAV2 ITR 프라이머의 서열은 5' -GGAACCCCTAGTGATGGAGTT-3' (정방향 ITR; 서열번호 3) 및 5' -CGGCCTCAGTGAGCGA-3' (역방향 ITR; 서열번호 4)(Aurnhammer 등, (2012))이며, AAV(서열번호:6)의 좌측 내부 역전 반복(ITR) 서열 및 AAV(서열번호:7)의 우측 내부 반복(ITR) 서열로부터 각각 유도된다. AAV2 ITR 프로브의 서열은 5' -6-FAM-CACTCCCTCTCTGCGCTCG-TAMRA-3' 이다(서열번호 5)(Aurnhammer C., Haase M., Muether N., 등, 2012, Hum. Gene Ther. Methods 23, 18-28). 95°C에서 10분 동안의 활성화 단계 후, 95°C에서 15초 동안 및 60°C에서 30초 동안 2단계 PCR 사이클을 40사이클 동안 수행하였다. qPCR에는 TaqMan Universal PCR Master Mix(Thermofisher Scientific, Cat #4304437)를 사용하였다. 절대 역가를 결정하기 위한 표준으로서 DNA 플라스미드(Agilent, Cat #240074)를 사용하였다.

[0206] 항-인간 CD63 항체 및 이들의 융합에는 H5C6 마우스 항-인간 CD63 가변 도메인을 사용하였다(서열번호 10의 아미노산 1-119는 H5C6 항체의 중쇄 가변 도메인(V_H)의 아미노산 서열을 제공하고, 서열번호 10의 아미노산 서열 135-245는 H5C6 항체의 경쇄 가변 도메인(V_L)의 아미노산 서열을 제공함). 본원에서 사용된 항-hCD63 ScFv(서열번호 2)는 마우스-항-hCD63 단클론 IgG1, 카파 경쇄 항체인 H5C6 클론으로부터 유래되었다(H5C6는 August, J.T./Hildreth, J.E.K에 의해 University of Iowa에 있는 발현상 연구 하이브리도마 뱅크에 수탁되었다(DSHB Hybridoma Product H5C6; DSHB Cat# h5c6, RRID:AB_528158)). 항체의 ScFv 버전은 가변 도메인을 사용해 중쇄-경쇄의 순서로 클로닝하였고, 글리신-세린 링커를 중간에 삽입하였다(5'-VH-Gly-Ser-VL-3').

[0207] 실시예 2: AAV 전달 후 첫과 폼페병 모델의 글리코젠 함량

[0208] 관련 글리코젠 축적 생체 내 모델에서 AAA 전달 GAA에 대한 AAV 전달 항-hCD63 ScFv-GAA 융합의 효과를 결정하기 위해, 두 가지 요법 모두를 폼페병 마우스 모델에 전달하였는데, 여기서 마우스는 마우스 GAA 유전자의 결실에 대한 동형접합체였고, 75% C57BL/6; 25% 129SvJ의 계통 백그라운드를 갖는 마우스 CD63의 자리에서 인간 CD63의 발현에 대해서 동형접합체였다. 이들 마우스는 본원에서 CD63 HumIn GAA KO 마우스로 지칭되거나,

CD63hu/hu; GAA^{-/-} 마우스로 대안적으로 지칭한다.

[0209] 실험을 위해, 인간 GAA를 유도하는 TTR 간-특이적 프로모터를 갖는 게놈을 함유하는 AAV2/8 바이러스(AAV-hGAA; 실시예 1에 기술됨), 또는 C-말단에서 인간 GAA와 융합되어 항-인간 CD63 ScFv를 유도하는 TTR 간-특이적 프로모터를 갖는 게놈을 함유하는 AAV2/8 바이러스(AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA; 실시예 1에 기술됨) 중 하나를 2개월령의 CD63 HumIn GAA KO 마우스에게 꼬리 정맥 주입을 통해 투여하였다. 전달된 두 AAV2/8 바이러스의 용량은 다음 중 하나이다: 1e10 vg/마우스 또는 1e11 vg/마우스. 미처리 CD63 HumIn GAA KO 마우스 및 운전한 마우스 GAA 유전자를 갖는 미처리 CD63 HumIn을 대조군으로서 분석에 포함시켰다. 처리 후 3개월 동안 마우스를 수용하고, 혈청 내 GAA 레벨 및 항-GAA 항체를 측정하기 위해 이 기간 동안 (매월) 증분 채혈을 하였다. 3개월 후, 모든 마우스를 희생시키고, 글리코젠 측정, PAS-H 염색, 중앙 핵의 정량화, 리소좀 증식 측정, 및 LC3b 발현 측정을 위해 개별 조직을 수확하였다. 마우스군에 대한 실험 투약량 및 치료 프로토콜은 표 4에 표시되어 있다.

표 4

[0210] 마우스군에 대한 실험 투약량 및 치료 프로토콜

군	마우스	마우스 수	처리	투약량
1	CD63 HumIn GAA KO	4	없음	N/A
2	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e10 vg/마우스
3	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-hGAA	1e11 vg/마우스
4	CD63 HumIn GAA KO	5	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA	1e10 vg/마우스
5	CD63 HumIn GAA KO	4	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA	1e11 vg/마우스
6	CD63 HumIn GAA WT	2	없음	N/A

[0211] 결과는 도 2에도 도시되어 있는데, 이는 GAA 단독으로 처리한 것과 달리 항-hCD63scFv::GAA 처리가 골격근에서 글리코젠을 야생형 레벨까지 끌어내린다는 것을 보여준다. 2-도메인 항-hCD63scFv::GAA 다중 도메인 치료 단백질로 처리한 결과, 단일-도메인 GAA 대체 효소로 처리한 것과 비교해 측정된 글리코젠이 훨씬 더 많이 감소했다. 개별 마우스를 대상으로 3개월 동안의 GAA 또는 scfv-GAA의 총 혈청 발현에 대한 사두근 글리코젠 레벨(도 3) 또는 심장 글리코젠 레벨(도 4)을 도표화함으로써, 항-hCD63scFv::GAA 융합 단백질이 유사한 혈청 레벨에서조차 GAA 효소 단독보다 더 많은 글리코젠을 제거한다는 것을 관찰할 수 있었다(도 3 및 도 4).

[0212] 실시예 3: GAA에 대한 면역학적 반응

[0213] 항-인간 GAA 항체 혈청 레벨을 측정하기 위해, 제조사의 설명서에 따라 혈청 분리관(BD Biosciences, Cat#365967)을 사용해 마지막 채혈 기간에 수집한 혈액으로부터 모든 치료군의 혈청을 분리하였다. 별도로, PBS에 희석시킨 20 µg의 hGAA(R&D Systems, Cat#8329-GH-025)로 96-웰 고 단백질 결합 플레이트(ThermoFisher, Cat#15041)를 밤새 코팅하였다. PBS + 0.05% Tween(PBS-T)로 플레이트를 3회 세척하였다. PBS-T 중의 0.5% BSA로 플레이트를 차단하고, 1:300에서 1:5.1e7까지 연속 희석한 마우스 혈청을 밤새 플레이트에 첨가하였다. HRP 접합된 염소 항-마우스 IgG 항체(Jackson Immuno Research, Cat# 115-035-164) 및 BD Opt EIA 기질 키트를 사용해 전체 항-마우스 IgG(서브클래스 1 + 2a + 2b + 3)를 측정하였다. 1 N 인산을 사용해 색체계 반응(colorimetric reaction)을 중단시켰다. 그런 다음, Spectramax i3 플레이트 판독기(Molecular Devices)를 이용해 450 nm에서 흡광도를 판독하였다. 희석 곡선을 S자 곡선에 피팅시키고, 곡선으로부터 역가를 계산하였다. 평균 총 IgG 역가 +/- SD로서 표현된 역가를 표 5에 표시하였다.

[0214] 표 5에 보이는 바와 같이, 미처리 마우스는 1.1E+03의 평균 레벨을 갖는 평균 백그라운드 역가를 보여주었다. AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA 또는 AAV-hGAA 중 어느 하나를 낮은 바이러스 투약량(1e10 vg/마우스)으로 처리한 마우스는 높은 역가를 나타낸 반면, 높은 투약량(1e11 vg/마우스)으로 처리한 마우스의 역가는 더 낮았다. 1e11 vg의 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA로 처리하여 혈청 GAA 레벨이 가장 높았던 마우스의 역가는 미처리 마우스의 역가 범위를 벗어나지 않았다.

표 5

혈청 항-GAA 항체 레벨

	총 IgG 항-GAA 역가				
	CD63 HumIn GAA KO + 미치료	CD63 HumIn GAA KO + AAV-hGAA (1e10vg)	CD63 HumIn GAA KO + AAV-hGAA (1e11vg)	CD63 HumIn GAA KO + AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (1e10vg)	CD63 HumIn GAA KO + AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (1e11vg)
평균	1.1E+03	7.6E+06	2.4E+04	5.5E+04	4.0E+03
SD	1.3E+03	1.0E+07	2.5E+04	1.9E+04	4.9E+03

[0215]

[0216]

AAV 투여 후 GAA 또는 항-hCD63scFv::GAA의 레벨이 높을 수록 항-GAA 역가는 더 낮아진다. 주입 후 3개월의 과정에 걸쳐, 높거나 낮은 역가의 AAV-항-hCD63scFv::GAA 또는 AAV-GAA가로 처리한 GAA 널 마우스의 혈청을 항-GAA 항체에 대해 평가하였다. 도 5는 개별 마우스를 대상으로 혈청 항-GAA 항체 역가 대 GAA 노출(즉, 3개월에 걸쳐 GAA 또는 scfv-GAA의 총 혈청 발현)을 도시하는데, 이는 GAA에 대한 항체 역가와 혈청 노출 사이에 부의 상관관계가 있고, GAA 노출이 높은 마우스가 GAA에 내성화된다는 것을 입증한다. 마찬가지로, GAA 또는 항-hCD63scFv::GAA 단백질을 암호화하는 AAV로 감염시킨 다양한 군에 대한 항-GAA 항체 역가를 도표화한 도 6은 작제물의 투약량이 높을수록 항-GAA의 역가가 낮아짐을 입증한다.

[0217]

실시에 4: 혈청 GAA

[0218]

실험 과정에 걸쳐 인간 GAA 혈청 레벨을 측정하기 위해, 꼬리 채혈을 통해 한 달 간격으로 샘플을 수집하였다. 제조업체의 사양에 따라 혈청 분리관(BD Biosciences, Cat# 365967)을 사용해 혈액으로부터 혈청을 분리하였다. 그런 다음 단리된 혈청 중 1 µl를 표준 절차를 사용해 4-20% Novex wedgewell pre-cast 겔 상에 로딩하여, 45분 동안 220V로 겔을 구동시킨 다음, 1시간 동안 200 mA에서 니트로셀룰로오스 막에 옮겼다. 이어서, 1:2000으로 희석하여 사용한 항-GAA 1차 항체(Abcam, #ab137068)와 1:1000으로 희석하여 사용한 항-GAPDH 항체(Abcam, #AB9484) 12 mL을 사용해 니트로셀룰로오스 막을 프로브하고, 4°C에서 밤새 배양하였다. 막을 일차 항체로 배양한 후, 1 x TBST로 1회당 5분씩 3회 세척하였다. 이어서, 1:15000으로 희석시킨 항-토끼 IgG(Licor, 926-32211) 및 항-마우스 IgG(Licor, 925-68070)(LiCor, 네브라스카주 링컨 소재) 이차 항체 12 mL을 막에 첨가하고, 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 막을 이차 항체로 배양한 후, 1 x TBST로 1회당 5분씩 2회 세척하고, 1 x TBS로 5분 동안 1회 세척하였다. 그런 다음, Licor Odyssey 기기(LI-COR Biotechnology)를 사용해 막 이미지를 촬영하고 정량화하였다. 임의 단위의 평균 +/- 표준 편차(SD)로 표현된 GAA의 혈청 레벨은 표 6에 표시하였다.

[0219]

표 6에 보이는 바와 같이, 고 투약량(10^{11} vg/마우스)의 시험된 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA 또는 AAV-hGAA로 처리한 CD63 HumIn GAA KO 마우스는 실험 과정에 걸쳐 혈청에서 GAA 레벨이 지속되는 것을 입증하였으며, GAA의 혈청 레벨은 AAV-hGAA 처리 마우스에서보다 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA 처리 마우스에서 다소 높았다. 저 투약량(10^{10} vg/마우스)의 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA 또는 AAV-hGAA로 처리한 마우스에서, GAA 레벨은 실험 과정에 걸쳐 떨어졌고, 12주차 시점에 일부 마우스에서는 무시할 정도의 레벨에 근접하였다.

표 6

혈청 GAA 레벨

주	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (10 ¹⁰ vg)		AAV-hGAA (10 ¹⁰ vg)		AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (10 ¹¹ vg)		AAV-hGAA (10 ¹¹ vg)	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
1	0.21	0.17	0.04	0.03	2.36	1.78	0.77	0.53
2	0.19	0.16	0.07	0.07	2.02	1.18	1.15	0.56
4	0.17	0.15	0.01	0.02	2.80	1.16	1.22	0.75
8	0.29	0.33	0.03	0.05	2.58	1.18	0.62	0.60
12	0.12	0.19	0.00	0.01	2.61	1.53	0.77	0.86
곡선 아래 면적	2.27	2.23	0.27	0.36	28.13	13.73	9.80	7.22

[0220]

[0221]

GAA 발현 또는 항-hCD63scfv::GAA 발현은 고 투약량(10¹¹ vg/마우스)의 AAV가 투여된 마우스에서는 시간의 경과에 따라 유지되었지만, 저 투약량(10¹⁰ vg/마우스)이 투여된 마우스에서는 떨어졌다. 도 7a는, 웨스턴 블롯으로 프로브한 바와 같이, GAA 또는 GAA에 융합된 항-hCD63 scfv를 암호화하는 AAV로 감염시킨 다양한 군을 대상으로 시간의 경과에 따른 GAA의 혈청 레벨을 도표화한 그래프이다. 융합 단백질(scFv::GAA)의 경우 전달 도메인이 없는 GAA 효소에 비해 혈청 GAA 레벨이 일관되게 더 높게(예: 2.5 내지 3배) 나타났다(도 7a).

[0222]

주입 후 3개월차에, 간, 심장 및 사두근 용해물에서 발현을 정량화한 실시간 PCR 결과는 도 7b에 도시되어 있다. 간 발현은 AAV 작제물이 주입된 모두에서 검출되었는데, AAV-hGAA 및 AAV-항-hCD63::hGAA(둘 다 간-특이적 프로모터(LSP)에 의해 유도됨) 둘 다를 대상으로 1e11 vg/마우스가 주입되었을 때 발현 레벨이 가장 높았다. 혈청 GAA 레벨을 RNA GAA 발현 레벨과도 비교하였는데(도 7c), 결과에 따르면 융합 단백질을 암호화하는 AAA가 투여된 마우스의 경우 3개월차에 더 낮은 GAA RNA 발현이 간에 국지화된 것으로 나타났지만, 해당 마우스의 경우 GAA 혈청 레벨은 높았다. AAV-LSP-hGAA가 주입된 경우, 간에서 RNA 레벨이 낮을 때 GAA 혈청 레벨이 높게 나타나지 않았다. 도 7c 참조. 이러한 데이터는 융합 단백질을 암호화하는(및 간-특이적 프로모터에 발현이 유도되는) AAV가 GAA의 분비 프로파일을 개선하였음을 시사한다.

[0223]

Huh-7 간세포에서는, 항체::hGAA 대 hGAA 단독의 세포 내 비율 보다 더 높은 분비 비율이 또한 관찰되었다. 일 실험예에서, 간-특이적 프로모터에 의해 유도되고 hGAA, 항-hCD63 scFv::GAA 융합 또는 비-결합 scFv::GAA 융합 대조군을 암호화하는 작제물을 사용해 Huh-7 인간 간세포를 일시적으로 형질감염시켰다. 형질감염 후 3일차에, 분비된 상청액 내 단백질 비율은 hGAA 단독보다는 두 scFv::GAA 융합 작제물 모두에서 더 높았다(p < 0.05, n=3 에 대해 통계적으로 유의함). CI-MPR 매개 흡수를 완화시키기 위해 실험 기간 동안 상청액에 M6P를 첨가한 것은 비율에 영향을 미치지 않았다.

[0224]

실시예 5: 글리코겐의 조직 측정 및 근육 조직의 조직학적 특성 분석

[0225]

글리코겐의 **조직 측정**: 개별 조직에서 글리코겐 함량을 측정하기 위해 CO₂로 질식시킨 직후, 모든 군의 마우스로부터 심장, 사두근, 비복근, 횡격막, 비장근, 및 EDL 조직을 절제한 다음, 액체 질소 중에서 급냉시키고, -80°C 에서 보관하였다. 글리코겐 측정을 위해, 스테인리스 스틸 비드가 구비된 벤치탑 균질화기를 이용해 각각의 조직 약 50 mg씩을, 1 mg당 물 25 µl의 비율로 종류수에 용해시켰다. 글리코겐 분석 용해물을 105° 에서 15분 동안 가열하고 21000 x g에서 원심 분리하여 찌꺼기를 제거하였다. 글리코겐 측정은 형광 분석에 대한 제조사의 지침에 따라 글리코겐 분석 키트(Sigma-Aldrich, #MAK016)를 사용하여 수행하였다. 각 샘플의 형광을 형광 플레이트 판독기(Molecular Devices, Spectramax i3) 상에서 535 nm 여기 및 587 nm 방출에서 측정하였다. 산출된 글리코겐의 양은 제조사에 의해 제공된 하기 식을 사용하여 계산하였다. 그런 다음, 각 처리군의 각 조직에 대해 계산된 글리코겐의 양을 평균화하였으며, 이는 평균 +/- 표준 편차(SD)로서 표 7에 표시되어 있다.

[0226]

표 7에 나타난 바와 같이, *Gaa*의 소실은 GAA 야생형(WT) 마우스와 비교해, 측정된 모든 조직에 걸쳐 평균 글리코겐 수준의 큰 증가를 야기한다. 10¹¹ vg/마우스의 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA를 사용한 처리는 시험된 모든 조직

에서 글리코젠을 WT 레벨까지 또는 WT 레벨에 가깝게 감소시켰으며, 이와 달리 AAV-GAA는 글리코젠 축적을 부분적으로만 감소시켰다. 바이러스와 무관하게 투약량이 낮으면 글리코젠도 감소하였지만, 투여량이 높으면 감소 정도는 더 줄었다. 10^{10} vg/마우스의 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA는 10^{11} vg/마우스의 AAV-GAA와 유사한 방식으로 글리코젠 레벨을 감소시켰다.

표 7

심장, 사두근, 비복근, 횡격막, 비장근 및 EDL 에서 측정된 평균 +/- SD 글리코젠 수준

	미처리		AAV-hGAA (10 ¹⁰ vg)		AAV-hGAA (10 ¹¹ vg)	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
심장	27.798	3.013	17.246	4.375	1.770	2.279
사두근	14.650	1.783	11.012	0.528	5.878	3.504
비복근	14.295	0.480	10.990	0.868	6.073	3.080
횡격막	15.463	1.173	11.446	1.237	3.995	3.395
비장근	17.260	2.262	13.684	2.506	6.533	5.201
EDL	13.588	0.498	11.178	1.760	6.275	3.159
	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (10 ¹⁰ vg)		AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (10 ¹¹ vg)		CD63 HumIn GAA WT 마우스 (대조군)	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD
심장	2.190	2.678	0.058	0.010	0.085	0.007
사두근	4.485	3.147	0.798	0.251	0.440	0.042
비복근	5.198	2.516	0.825	0.461	0.790	0.014
횡격막	3.083	2.968	0.388	0.121	0.385	0.007
비장근	5.268	2.786	1.040	0.896	0.545	0.049
EDL	2.495	1.750	0.313	0.099	0.260	0.141

[0227]

[0228]

조직병리학 및 정량화를 위한 사두근 수확: LC3b 발현 정량화를 위해, 저용량(1e10 vg/마우스) 처리 그룹을 포함하여 각 그룹 유래의 사두근 조직 샘플을 절제 직후 액체 질소에서 급속 냉동하여 -80℃에서 저장하거나, O.C.T 배지(Tissue-Tek, #4583)를 함유하는 블록들 상에 배치하였다.

[0229]

O.C.T 배지의 조직 샘플을 Histoserv, Inc (메릴랜드주 저먼타운 소재)에 보내 절편화하고, 과요오드산 시프 (PAS) 염색하여 다당류를 검출하였다. 중앙 핵 및 리소좀 증식의 염색을 위한 추가 절편까지 제조한 뒤 이를 돌려받았다.

[0230]

PAS 염색: 라이카 슬라이드 스캐너를 사용하여 PAS 염색 부위의 20x 배율 이미지를 촬영하였다. 각 처리군을 대표하는 마우스에 대해 생성된 영상은 도 8에 도시되어 있다.

[0231]

도 8에 도시된 바와 같이, 3개월 차에, AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA로 처리한 CD63 HumIn GAA KO는 처리하지 않은 CD63 HumIn GAA KO 마우스 및 AAV-hGAA로 처리한 CD63 HumIn GAA KO 마우스 둘 다와 비교해 현저한 염색 감소를 나타냈으며, 높은 PAS 염색 레벨을 나타냈다. 이는, AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA로 처리하는 것이 CD63 HumIn GAA KO 마우스에서 다당류 축적을 감소시킬 수 있고, 이는 근섬유에 걸쳐서도 균일한 방식으로 그렇게 할 수 있다는 것을 추가로 나타낸다.

[0232]

중앙 핵 및 리소좀 증식의 정량화: Histoserv로부터 돌려받은 미 염색 절편을 냉동기에서 꺼낸 다음, 염색 챔버 내에서 PBS 중 4% 파라포름알데히드로 15분 동안 고정시켰다. 이어서, 고정된 슬라이드를 PBS에서 5분 동안 2회 세척하고, 이어서 실온에서 1시간 동안 차단 완충액(eBiosciences, 00-4953-54)으로 배양하였다. 그런 다음, 가습된 염색 챔버 내에서, 차단 완충액으로 1:50으로 희석시킨 랫트 항-Lamp-1 항체(Abcam, #AB25245), 차단 완충액으로 1:1000으로 희석시킨 토끼 항-Laminin 항체(Sigma, #L9393), 또는 무 항체 차단 완충액 중 하나로 슬라이드를 염색한 뒤, 4℃로 옮겨 밤새 배양하였다. 다음날, PBS에서 슬라이드를 5분 동안 2회 세척하고, 이어서

염색 챔버 내에서, Alexa Fluor 647(Life Tech Thermo, #A27040)과 접합된 염소 항-랫트 IgG(H+L) 수퍼클론 이차 항체 또는 Alexa Fluor 555(Life Tech Thermo, #A21434)와 접합된 염소 항-토끼 IgG(H+L) 교차 흡착성 이차 항체로 염색하고, 이어서 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 그런 다음 염색된 슬라이드를 PBS에서 5분 동안 2회 세척한 후, DAPI가 구비된 Fluoromount-G(Life Tech Thermo, #00-4959-52)로 고정하여, Zeiss LSM710 기기(Carl Zeiss Microscopy GmbH)를 이용해 이미지화하였다. Halo 소프트웨어(Indica Labs, NM)를 사용하여 중앙에 집중된 핵의 수를 정량화하였는데, 이는 중앙 핵을 나타내는 점유의 백분율 +/- 표준 편차로 표 8에 표현되어 있다. 리소좀 증식은 도 8에 도시되어 있다.

표 8

중앙 핵의 정량화

	미처리		AAV-hGAA (1e11vg)		AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA (1e11vg)		CD63 HumIn GAA WT 마우스 (대조군)	
	평균	SD	평균	SD	평균	SD	평균	SD
중앙 핵이 있는 점유(%)	22.00	10.10	33.00	4.36	12.75	6.29	8.50	7.78

[0233]

[0234]

LC3b 발현 정량화: LC3b 발현의 정량화를 위해, 급속 냉동시킨 샘플을 해동하고 균질화한 다음, RIPA 완충액 중에서 1 mg 조직 대 25 μ L의 RIPA 완충액(150 mM NaCl, 1.0% IGEPAL[®] CA-630, 0.5% 소듐 디옥시콜레이트, 0.1% SDS, 50 mM Tris, pH 8.0, Sigma Aldrich, R0278)의 비율로 비드 층들에 의해 45초 동안 용해시켰다. 용해물을 21,000 x g에서 원심분리하여 불용성 물질을 제거한 다음, RIPA 완충액에 용해된 300 μ g의 용해물을 4-20% Novex wedgewell pre-cast 겔에 첨가하고, 니트로셀룰로오스 막에 옮겨 혈청 GAA 레벨 분석을 위해, 전술한 바와 같은 유사한 프로토콜을 사용해(GAA에 대한 일차 항체 대신에 마우스 LC3b-I 및 LC3b-II(Sigma, #L7543)를 인식하는 일차 항체를 치환해 사용함) 웨스턴 블롯을 사용해 분석하였다. 그런 다음, Licor Odyssey 기기(LICOR Biotechnology)를 사용해 막 이미지를 촬영하고 정량화하였다. 임의 단위의 (평균 +/- 표준 편차)로서 표현된 LC3b-I 및 LC3b-II 레벨을 표 9에 표시하였다.

[0235]

표 9에 보이는 바와 같이, CD63 HumIn GAA WT 마우스와 비교하여 GAA가 결여된 마우스에서는 LC3b-I 및 LC3b-II 둘 다에서 평균이 상당히 증가하였다. AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA로 처리한 결과, CD63 HumIn GAA KO에서 평균 LC3b-I 및 LC3b-II 레벨이 WT 레벨까지 또는 WT 레벨에 가깝게 감소하였다. AAV-hGAA로 처리한 CD63 HumIn GAA KO는 CD63 HumIn GAA KO 마우스와 비교하여 평균 LC3b-I 및 LC3b-II 레벨이 약간 감소하였지만, 이러한 감소는 AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA로 처리한 것만큼 두드러지지 않았다.

표 9

마우스의 사두근 내 LC3b-I 및 LC3b-II 레벨

LC3b-I 레벨(임의 단위)				
처리	미처리	AAV-hGAA	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA	CD63 HumIn GAA WT (대조군)
평균	833	628	403	282
SD	109	139	33	49
LC3b-II 레벨(임의 단위)				
처리	미처리	AAV-hGAA	AAV-항-hCD63 ScFv-hGAA	CD63 HumIn GAA WT (대조군)
평균	3308	2888	445	369
SD	582	1282	398	33

[0236]

- [0237] 실시예 6: AAV 항-hCD63::GAA 처리는 근력 강도 및 조정력에 있어서 상당한 개선을 유도한다
- [0238] AAV-LSP hGAA 또는 AAV-LSP 항-hCD63::hGAA로 처리한 마우스의 파지 강도 및 로타로이드(Rotarod) 시험 성능 (상기 참조). 야생형 GAA 마우스, 미처리 대조군, AAV-LSP-hGAA(1e11vg/마우스) 또는 AAV-LSP-항-hCD63::hGAA 처리(1e11vg/마우스) 마우스의 가속 로타로이드 측정(도 9a) 및 앞발 파지 강도 측정(도 9b)을 월 단위로 6개월 동안 실시하였다. 에러 바는 +/- SD이다. 모든 그룹에 대해 N=8~10이다.
- [0239] 실시예 7: GAA를 조직으로 유도하는 "가이드"로서의 기타 막 단백질
- [0240] 효소 결핍 마우스에서 GAA를 대체하기 위해 GAA를 조직으로 유도하는 기타 막 단백질, 예컨대 항-ITGA7(인테그린 알파-7) 융합 단백질을 시험하였다. 5 mM M6P의 존재와 상관없이, C2C12 마우스 근육아세포를 항-mCD63-GAA 또는 항-ITGA7-GAA로 밤새 배양하였다. 두 융합 단백질 모두에 대해서, 시간이 경과함에 따라 활성 GAA 효소가 근육아세포 용해물에서 검출되었다(도 10a). 추가의 실험에서, CD63에 대해 인간화된 GAA KO 마우스(GAA^{-/-};CD63^{hu/hu})에 scFv::GAA 포맷의 항-hCD63::GAA를 암호화하는 플라스미드를 유체역학적 전달(HDD)에 의해 주입하거나, 항-인테그린 알파-7의 전장 IgG4::GAA 포맷을 주입하고, HDD 이후 3주차에 마우스를 희생시켰다. 조직 글리코젠 레벨을 심장, 사두근, 비복근 및 횡격막에서 측정하였다. 미처리 대조군 마우스인 GAA^{-/-}xCD63^{hu/hu} 및 미처리 야생형 GAA 대조군 마우스인 GAA^{+/+};CD63^{hu/hu}(4)에 대해서도 동일한 조건 하에 시험하였다. 야생형 마우스에서와 같이, 글리코젠 레벨은 항-hCD63::GAA 처리된 마우스 및 항-ITGA7::GAA 처리된 마우스 군 모두에서 매우 낮은 레벨이었다. **도 10b 참조.**
- [0241] 실시예 8: 비슷한 혈청 레벨에서, AAV 항-CD63::GAA 처리는 최적화된 GAA 작제물을 갖는 AAV보다 더 효과적이다.
- [0242] 키모트립시노젠 B2 신호 펩티드(SP7)의 발현을 유도하고 인간 GAA(8GAA; 서열번호 78)의 아미노산 36-952를 함유하는 항-hCD63::GAA 멀티도메인 치료제(서열번호 10)의 발현을 유도하는 간 특이적 인헨서(세르피나1; 서열번호 9) 및 간 특이적 프로모터(LSP; TTR; 서열번호 8)를 함유하는 AAV로 감염시킨 CD63 HumIn GAA KO 마우스(GAA^{-/-} x CD63^{hu/hu})는 근력 강도 및 조정력의 시험에서 상당한 진전을 나타냈다. 각 바이러스에 대해 3가지 다른 용량을 제공하였다: 5e11vg/kg, 2e12vg/kg, 및 4e12vg/kg. 악하 채열(submandibular bleed)에 의해 정기적으로 혈청을 수집하였다. AAV 감염 1개월 후, 마우스를 희생시켰다. 심장 및 골격근 조직 샘플을 수집하고, 액체 질소에서 급속 냉동시켜 -80°C에서 보관하였다. 조직 내 글리코젠은, 증류수 내에서 비드 충돌에 의해 조직을 균질화하여 측정하였다. 샘플을 끓여 원심분리하고, 상청액을 상업용 글리코젠 분석 키트에 사용하였다. 이전의 실시예에서 기술된 바와 같이, 인간 GAA에 대한 항체를 사용해 웨스턴 블롯을 사용하여 혈청을 정량하였다. 각 마우스에 대해, 각 조직에서의 글리코젠 레벨을 1개월차 작제물의 혈청 레벨에 대해 도표화하였다. 4-파라미터 곡선 피팅을 사용하여 각 조직에서 2개의 처리군에 대한 EC50을 결정하였다.
- [0243] 항-hCD63::GAA 또는 sp7-Δ8GAA를 암호화하는 간 특이적 프로모터(LSP)를 함유하는 AAV로 감염시킨 결과, 각 감염 투약량에서 제공된 혈청 수준은 GAA의 혈청 수준과 비슷했다. **도 11.** 그러나, 분석된 모든 근육 조직에서는, 항-hCD63::GAA 대 sp7-Δ8GAA를 사용할 때 EC50의 약 2.2배 감소가 관찰되었다. 이는 동등한 혈청 레벨에서, 항-CD63::GAA가 항체에 융합되지 않은 변형된 GAA 발현 작제물보다 효율적으로 글리코젠을 제거한다는 것을 입증한다. **도 12 및 표 10 참조.**

표 10

심장, 횡격막, 사두근 및 삼두근 내의 AAV 항-hCD63::GAA 및 AAV sp7-Δ8GAA 의 EC₅₀(95% 신뢰도 구간)

조직	작제물	글리코겐 소실의 EC ₅₀ (임의 단위)	EC ₅₀ 에 대한 95% 신뢰 구간
심장	sp7-Δ8GAA	0.038	0.00036~0.064
	항-hCD63::GAA	0.017	0.0061~0.029
횡격막	sp7-Δ8GAA	0.135	넓음
	항-hCD63::GAA	0.057	0.034~0.080
사두근	sp7-Δ8GAA	0.187	0.14~0.31
	항-hCD63::GAA	0.080	넓음
삼두근	sp7-Δ8GAA	0.19	0.13~0.41
	항-hCD63::GAA	0.083	0.069~0.11

[0244]

[0245] 실시예 9: 예시적인 CD63 항체

[0246] 항-인간 CD63 항체의 생성

[0247] 인간 CD63을 사용해 마우스(예를 들어, 인간 면역 글로불린 중쇄 및 인간 카파 경쇄 가변 영역을 암호화하는 DNA를 포함하는 조작된 마우스)를 면역화함으로써 항-인간 CD63 항체를 획득하였다.

[0248] 면역화 후, 각 마우스로부터 비장세포를 수확하고, (1) 마우스 골수종 세포와 융합시켜 생존율을 유지시키고, 하이브리도마 세포를 형성하여 인간 CD63 특이성에 대해 스크리닝하거나, (2) 반응성 항체(항원 양성 B 세포)에 결합시키고, 인간 CD63 단편을 이를 식별하는 분류 시약으로서 사용해 B 세포를 분류하였다(US 2007/0280945A1 에 기술됨).

[0249] 예를 들어, 미국 특허 제7,105,348호; 미국 특허 제8,642,835호; 및 미국특허 제9,622,459호(이들 각각은 참조로서 본원에 통합됨)에 기술된 바와 같이, VELOCIMMUNE 기술을 사용해 인간 CD63에 대해 인간 가변 영역과 마우스 불변 영역을 갖는 키메라 항체를 초기에 단리하였다.

[0250] 시험을 목적으로, 일부 항체에서 마우스 불변 영역을, 원하는 인간 불변 영역(예: 야생형 인간 CH 또는 변형된 인간 CH(예: IgG1, IgG2 또는 IgG4 이소형)) 및 경쇄 불변 영역(CL)과 치환하여 항-hCD63항체 또는 그의 항원 결합 부분을 포함하는 완전한 인간 항-hCD63을 생성하였다. 선택된 불변 영역은 특정 용도에 따라 매우 다양할 수 있지만, 고친화도 항원-결합 및 표적 특이성 특성은 가변 영역에 존재한다.

[0251] 본 실시예의 방법에 따라 생성된 항-인간 CD63 결합 아암을 포함하는 예시적인 이중특이적 항체의 특정 생물학적 특성은 하기에 제시된 실시예에서 상세히 설명된다.

[0252] 항-CD63 항체의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 아미노산 및 핵산 서열

[0253] 표 11은 중쇄 또는 경쇄 가변 영역(각각 HCVR 또는 LCVR) 또는 본원에 개시된 다중 도메인 치료 항-CD63::GAA 단백질을 생성하기 위해 사용된 선택된 항-CD63 항체의 중쇄 또는 경쇄 CDR(각각 HCDR 및 LCDR)을 암호화하는 핵산(NA) 서열의 서열 식별자, 및 상기 HCVR 또는 LCVR 또는 상기 HCDR 및 LCDR의 아미노산(AA) 서열(괄호 안에 있음)의 서열 식별자를 제시한다.

표 11

항-CD63 서열 식별자

항체 명칭	서열번호							
	HCVR NA (AA)	HCDR1 NA (AA)	HCDR2 NA (AA)	HCDR3 NA (AA)	LCVR NA (AA)	LCDR1 NA (AA)	LCDR2 NA (AA)	LCDR3 NA (AA)
H1M12451N	13 (14)	15 (16)	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)
H2M12395N	29 (30)	31 (32)	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)
H4H12450N	45 (46)	47 (48)	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)
H2M12450N	61 (62)	63 (64)	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	74 (76)

[0254]

[0255]

부모 항-인간 CD63 항체에 의한 결합

[0256]

인간 CD63 발현 세포에 대한 항-CD63 항체의 상대적인 세포 표면 결합은 인간 CD63, 및 CD63 음성 HEK293/CD63 녹아웃 세포를 내인성으로 발현하는 CD63 양성 HEK293 세포(ATCC, Cat # CRL-1573)를 사용하여 유세포 측정법을 통해 접근하였다. 분석을 위해, 96웰 V 바닥 플레이트(Axygen Scientific, Cat# P-96-450-V-C-S) 내에서 2% FBS(Saradigm Cat# 1500-500)(염색 완충액)를 함유하고 칼슘과 마그네슘 없는 PBS(VWR, Cat# 45000-446) 중에 세포를 플레이팅하였다. 그런 다음, 세포를 100 nM 내지 1.7 pM 농도 범위의 항-CD63 항체 또는 이소형 대조군 항체와 함께 얼음 위에서 30분 동안 배양하였다. 항체가 포함되지 않은 웰을 대조군으로서 사용하였다. HEK293/CD63KO 세포를 가장 높은 농도(100 nM)의 항체로만 염색하였다. 이어서, 세포를 염색 완충액으로 1회 세척하고, PE 접합된 항-마우스 Fc 2차 항체(Jackson ImmunoResearch, Cat# 115-115-164) 100 nM와 함께 4°C에서 30분 동안 배양하였다. 그런 다음, 세포들을 PBS 중에 희석된 50% Cytofix(BD Biosciences, Cat# 554655) 용액을 사용해 세척하고 고정시켰다. 샘플을 Intellicyte Hypercyt 유세포 측정기에서 분석하고, Forecyt 소프트웨어(Intellicyte)에서 결과를 분석하여 평균 형광 강도(MFI)를 계산하였다. 측정된 값은 GraphPad Prism을 사용하여 12점 응답 곡선에 걸쳐 4개의 파라미터 로지스틱 등식을 이용하여 분석하였고, 생성된 EC₅₀ 값을 표 12에 보고하였다. 항체 없는 웰에 대해 항-CD63 항체 또는 대조군 항체 MFI의 비율을 계산함으로써 신호 대 잡음 비(S/N)를 결정하였다(표 12).

[0257]

표 12에 보이는 바와 같이, 본 발명의 항-CD63 항체 중 세 가지는 21.0 내지 31.6 범위의 S/N 값 및 0.5 nM 내지 1.9 nM 범위의 EC₅₀ 값으로 HEK293 세포에 결합하는 것으로 나타났다. 비결합 대조군은 HEK293 세포에 대한 결합하는 것으로 나타나지 않았다(S/N ≤ 1.5). 항-CD63 항체 및 이소형 대조군 항체 둘 다는 HEK293/CD63KO 세포에 약하게 결합하거나 거의 결합하지 않는 것으로 나타났다(S/N ≤ 4.4).

표 12

유세포 측정법에 의해 측정된 HEK293 및 HEK293/CD63 KO 세포에 대한 항-CD63 항체의 결합

항체	HEK293 EC ₅₀ (nM)	HEK293 (S/N)	HEK293/CD63 KO (S/N)
H2M12450N	0.5	26.7	2.9
H1M12451N	1.8	31.6	4.1
H2M12395N	1.9	21.0	2.9
이소형 대조군 1	ND	1.4	4.4
이소형 대조군 2	ND	1.5	1.6

ND = 미결정

[0258]

[0259]

인간 CD63 발현 세포에 결합하는 본 발명의 항-CD63 단클론 항체의 능력을 전기화학발광(ECL) 기반의 검출 검정을 사용하여 또한 결정하였다.

[0260] 과발현 세포를 생성하기 위해, 마우스 배아 섬유아세포인 NIH3T3 세포(ATCC, Cat# CRL-1658)를 형질감염시켜 인간 CD63(hCD63; 수탁 번호 NP_001771의 아미노산 M1-M238; 서열 번호 77)을 안정적으로 발현하는 세포주 "NIH3T3/hCD63"를 형성하였다. 내인성 발현 세포, 인간 안드로젠 민감성 전립선 선암종 세포주인 LNCAP(ATCC, Cat# CRL-1740), 및 인간 원발성 교아종 세포주인 U87MG(ATCC, Cat# HTB-14)에서 인간 CD63의 발현 레벨은 Quantum™ Alexa Fluor® 647 MESF(Bangs Laboratories, Cat# 647B) 및 Simply Cellular® 항-마우스 IgG(Bangs Laboratories Inc, Cat# 815)를 제조자의 지침에 따라 사용하여 분석하였다. LNCAP 세포는 U87MG 세포보다 더 적은 인간 CD63 카피 수를 가지는 것으로 확인되었다. 형광 활성화된 세포 분류(FACS)로 검출할 수 있는 인간 CD63 발현을 갖지 않는, 형질감염되지 않은 NIH3T3 세포를 음성 대조군으로서 포함시켰다.

[0261] 요약하자면, 세포주를 Ca^{2+} Mg^{2+} 가 없는 PBS 완충액에서 한 번 헹구고, 효소 없는 세포 해리 용액(Millipore, Cat# S-004-C)과 함께 37°C에서 10분 동안 배양하여 세포를 분리시켰다. 그런 다음 세포를 Ca^{2+} Mg^{2+} 가 포함된 PBS로 1회 세척하고, Cellometer™ Auto T4 세포 계수기(Nexcelom Bioscience, LLC)로 계수하였다. 대략 2.0×10^4 개의 NIH3T3/hCD63, LNCAP, U87MG 또는 NIH3T3 세포를 96-웰 탄소 전극 플레이트(Meso Scale Discovery, Cat# L15XB-6) 상에 별도로 시딩한 다음, 37°C에서 1시간 동안 배양하였다. 비특이적 결합 부위는 Ca^{2+} Mg^{2+} 가 포함된 PBS 내에서 2% BSA(w/v)를 사용해 실온(RT)에서 1시간 동안 차단시켰다. Ca^{2+} Mg^{2+} 가 포함된 PBS 내에서 농도 범위(1.7 pM 내지 100 nM)의 항-CD63 항체 또는 이소형 대조 항체를 함유하는 0.5% BSA(w/v) 용액뿐만 아니라 대조군 완충액까지, 플레이트-결합된 NIH3T3/hCD63, LNCAP, U87MG 또는 NIH3T3 세포에 중복 첨가하고, RT에서 1시간 동안 배양하였다. 이어서, 플레이트를 세척하고, 세포 세척 헤드(MDS Analytical Technologies)가 구비된 AquaMax2000 플레이트 세척기를 사용해 미결합 항체를 제거하였다. 플레이트-결합된 항체는 1 g/mL의 SULFO-TAG™-접합된 염소 다클론 항-인간 IgG 항체($Fc\gamma$ 단편에 특이적임, Jackson ImmunoResearch, Cat# 109-005-098) 또는 SULFO-TAG™-접합된 염소 다클론 항-마우스 IgG 항체($Fc\gamma$ 단편에 특이적임, Jackson ImmunoResearch, Cat# 115-005-164)를 사용해 RT에서 1시간 동안 검출하였다. 플레이트를 세척한 후 제조사의 지침에 따라 Read Buffer(MSD, Cat# R92TD-2)와 함께 배양하였다. 발광 신호는 SECTOR Imager(MSD)를 사용해 측정하였다. 상대 광 단위(RLU)로 측정된 발광 강도를 기록하여, 시험 농도 범위에서의 각 항체의 결합 강도를 표시하였다. 음성 세포 대한 동일한 농도의 항체 결합과 비교해, 인간 CD63 발현 세포에 대한 3.7 nM 항체 결합으로 검출된 신호 비는 CD63 결합의 특이성을 나타내는 표시로서 보고되었다. 3보다 큰 결합비를 갖는 항체를 특이적 결합체로서 분류하였고, 3 이하의 결합비를 갖는 항체는 비-결합체로서 분류하여 표 13에 NB로서 표기하였다. 또한, 직접 결합 신호(RLU 단위)를 항체 농도의 함수로서 분석하고, GraphPad Prism™ 소프트웨어를 사용하여 S자(4-파라미터 로지스틱) 투약량-반응 모델과 피팅시켰다. 최대 결합 신호의 50%가 검출되는 항체 농도로서 정의되는, 인간 CD63 발현 세포에 대한 결합의 EC_{50} 값을 결정하여 각 항체의 효능을 표시하였고, 특이적 결합체에 대해서만 표 13에 보고하였다.

[0262] 표 13에 보이는 바와 같이, 실시예 9에 기술된 바와 같이 생성된 4개의 항-CD63 항체 및 비교기 Ab(비교기 1)는 조작된 LNCAP 및 U87MG 세포주에서 내인성으로 발현된 인간 CD63뿐만 아니라 조작된 NIH3T3/hCD63 세포에서 발현된 인간 CD63에도 특이적으로 결합하였다. 실시예 9에 기술된 4개의 항-CD63 항체는 280 pM 내지 970 pM 범위의 EC_{50} 값으로 NIH3T3/hCD63 세포에 결합하였으며, 음성 세포주에 대한 결합비는 91 내지 281배의 범위였다. 실시예 9에 기술된 4개의 항-CD63 항체는 500 pM 내지 1.4 nM 범위의 EC_{50} 값으로 U87MG 세포에 결합하였으며, 음성 세포주에 대한 결합비는 52 내지 272배의 범위였다. 실시예 9에 기술된 4개의 항-CD63 항체는 210 pM 내지 1.7 nM 범위의 EC_{50} 값으로 LNCAP 세포에 결합하였으며, 음성 세포주에 대한 결합비는 7 내지 20배의 범위였다. U87MG 세포와 비교해, LNCAP 세포에 대한 결합비가 더 낮은 것은 이들 세포에서 CD63 카피 수가 더 낮은 것과 일치한다. 예상대로, 이소형 대조군 항체는 3 이하의 세포 결합 비율을 갖는 비-결합체였다.

표 13

전기화학발광 기반 검출에 의해 측정된 인간 CD63 발현 세포에 결합하는 항-CD63 항체

항체	세포 결합 효능, EC ₅₀ (M)			3.7nM Ab 농도에서 음성 NIH3T3 에 대해 상대적으로 인간 CD63 세포에 대한 세포 결합 신호(RLU)의 비		
	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP	NIH3T3/hCD63	U87MG	LNCAP
H1M12451N	5.7E-10	9.5E-10	1.7E-09	91	52	7
H2M12395N	2.9E-10	7.9E-10	3.5E-10	256	171	18
H4H12450N	9.7E-10	1.4E-09	1.4E-09	281	272	20
H2M12450N	2.8E-10	5.0E-10	2.1E-10	230	175	20
대조군						
비교자 Ab 1	5.7E-10	6.7E-10	2.0E-09	253	271	16
인간 IgG4 이소형 대조군	NB	NB	NB	1	1	1
마우스 IgG2 이소형 대조군	NB	NB	NB	3	2	2

NB - 비결합체; 3 이하의 결합비를 갖는 항체는 비-결합체로서 분류하였다.

[0263]

[0264]

부모 항-인간 CD63 항체에 의해 매개된 세포 독성

[0265]

CD63 발현 세포를 내재화되는 본원에 기술된 항-CD63 항체의 능력을 평가하기 위해, 시험관 내 간접 세포독성 분석을 수행하였다. 인간 CD63 양성 T47D 세포(ATCC, Cat #HTB-133) 및 인간 CD63 음성 NIH3T3 세포(ATCC, Cat #CRL-1658)를 각각 PDL-코팅된 96-웰 플레이트(BD Biocoat, Cat #356461)에 시딩하되, 10% FBS (ATCC, Cat #30-2020), 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(Gibco, Cat #10378-016), 50uM 베타-메르캅토에탄올(Sigma, Cat #M7522) (성장 배지), 피루브산나트륨 100mM (Millipore, Cat #TMS-005-C), HEPES 1M (Irvine Scientific, Cat #9319), 및 소 인슐린 10 ug/mL (Gemini BioProducts, Cat #700-912P)가 포함된 RPMI(Irvine Scientific, Cat #9160) 중에서 웰당 6,000개의 세포를 시딩하거나, 10% 소태아 혈청(Hyclone, Cat #SH30072.03), + 페니실린/스트렙토마이신/L-글루타민(Gibco, Cat #10378-016)이 포함된 고 포도당 DME (Irvine Scientific, Cat #9033) 중에 웰당 2,000개의 세포를 시딩하고, 37°C에서 5% CO₂ 하에서 밤새 배양하였다. 세포 생존을 곡선의 경우, 세포를 3.0 pM에서 2.2 nM까지의 농도 범위로 연속 희석시킨 항-CD63 항체(H2M12450N) 또는 비-결합 이소형 대조군 항체와 함께 37°C에서 5분 동안 배양하였다. 이어서, 세포독성 페이로드 MMAF(Moradec, Cat #AM-201AF-50)에 접합된 Fab 항-mFc 이차 항체 20 nM을 각 웰에 첨가하였다. 배지는 단독으로 음성 대조군으로서 사용하였고, 33 μM의 디지토닌(Promega, Cat #G9441)을 사용하여 최대 세포독성을 결정하였다. 72시간의 배양 후, 제조사의 프로토콜에 따라 세포 계수 키트-8(Dojindo, Cat #CK04)을 사용하여 1~3시간의 인큐베이션 시간 범위로 세포 생존율을 측정하였다. Envision 플레이트 판독기(PerkinElmer)를 사용해 450 nm에서의 흡광도 (OD₄₅₀)를 측정하였다. 디지토닌 처리된 세포로부터의 백그라운드 OD₄₅₀ 레벨을 모든 웰로부터 차감하고, 생존율을 미처리 대조군의 백분율(생존율(%))로서 표현하였다. IC₅₀ 값은 8-점 반응 곡선(GraphPad Prism)에 걸쳐 4-파라미터 로지스틱 등식에서 결정하였다. 모든 IC₅₀ 값은 nM 농도로 표현되고, 처리 후 남은 최소 생존가능 세포 (%)를 보고하였다.

[0266]

표 14에 요약된 바와 같이, 항-CD63 항체인 H2M12450N은 IC₅₀ 값 0.24 nM일 때 T47D 생존율을 21%까지 감소시킨 반면, 이소형은 생존율을 64%까지만 감소시켰다. 항체는 NIH3T3 세포주의 생존율에 거의 영향을 미치지 않았거나 전혀 영향을 미치지 않았다.

표 14

T47D 및 NIH3T3 세포에서 간접 세포독성 분석에 의해 측정된 항-CD63 항체 내재화

항체	T47D (nM) IC ₅₀	T47D 생존율(%)	NIH3T3 (nM) IC ₅₀	NIH3T3 생존율(%)
H2M12450N	0.24	21	ND	83
아이소타입 대조군	ND	64	ND	91

ND = 미결정

[0267]

[0268]

[0269]

25°C 및 37°C에서 측정된 CD63(EC2) 루프 시약에 결합하는 항-CD63 단클론 항체의 Biacore 결합 동역학

정제된 항-CD63 단클론 항체에 결합하는 상이한 CD63루프 시약에 대한 평형 해리 상수 (K_D)는, 실시간 표면 플라즈몬 공명 기반 Biacore T200 바이오센서 또는 Biacore 2000 바이오센서를 사용하여 결정하였다. 모든 결합 연구는 25°C 및 37°C에서 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 및 0.05% v/v 계면활성제 Tween-20, pH 7.4(HBS-ET) 가동 완충액(running buffer) 중에서 수행하였다. 항-CD63 단클론 항체를 포획하기 위해, 먼저 Biacore CM5 센서 칩 표면을 토끼 항-마우스 Fc 특이적 다클론 항체(GE Healthcare, Cat# BR100838) 또는 항-인간 Fab 키트(GE Healthcare, Cat# 28958325) 중 하나와의 아민 결합에 의해 유도체화시켰다. 결합 연구는 C-말단 Myc-Myc-헥사히스티딘(hCD63 EC 루프 2-MMH; 서열번호 80)으로 발현시킨 재조합 인간 CD63 세포의 루프 2 또는 C-말단 인간 Fc 태그(hCD63 EC 루프 2-hFc; 서열번호 81)로 발현시킨 재조합 인간 CD63 세포의 루프 2 중 하나를 사용해 수행하였다. HBS-ET 가동 완충액 중에서, 상이한 농도의 hCD63 EC 루프 2-MMH 또는 hCD63 EC 루프 2-hFc(4배 희석물 중 50 nM 내지 12.5 nM 또는 3배 희석물 중 90 nM 내지 0.37 nM 중 하나로 시험됨)를 우선 제조하여, 35 μl/분 또는 50 μl/분의 유속으로 항-마우스 Fc 포획된 항-CD63 단클론 항체 표면에 4분 동안 주입하는 한편, CD63 시약에 결합된 단클론 항체의 해리를 HBS-ET 가동 완충액 중에서 8분 또는 10분 동안 모니터링하였다. 결합 속도(k₃) 및 해리 속도(k₄)는 Scrubber 2.0c 곡선-피팅 소프트웨어를 사용해 실제 결합 센서그램을 질량 운반 제한이 있는 상태에서 1:1 결합 모델에 피팅하여 결정하였다. 결합 해리 평형 상수 (K_D) 및 해리 반감기(t_{1/2})를 역학 속도로부터 다음과 같이 계산하였다:

[0270]

[0271]

[0272]

[0273]

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \quad \text{및} \quad t_{1/2} (\text{분}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

25°C와 37°C에서 본 발명의 상이한 항-CD63 단클론 항체에 대한 인간 CD63 EC 루프 2 단백질 결합에 대한 결합 동역학 파라미터는 표 15 내지 18에 표시되어 있다.

표 15에 보이는 바와 같이, 본 발명의 항-CD63 단클론 항체 모두는 25°C에서 530 pM 내지 11.0 nM 범위의 K_D 값으로 hCD63 EC 루프 2-MMH에 결합하였다. 표 16에 보이는 바와 같이, 본 발명의 항-CD63 단클론 항체 모두는 37°C에서 1.15 nM 내지 56.4 nM 범위의 K_D 값으로 hCD63 EC 루프 2-MMH에 결합하였다.

표 17에 보이는 바와 같이, 본 발명의 항-CD63 단클론 항체 모두는 25°C에서 150 pM 내지 753 pM 범위의 K_D 값으로 hCD63 EC 루프 2-hFc에 결합하였다. 표 18에 보이는 바와 같이, 본 발명의 항-CD63 단클론 항체 모두는 37°C에서 119 pM 내지 3.38 pM의 K_D 값으로 hCD63 EC 루프 2-hFc에 결합하였다.

표 15

25℃에서 항-CD63 단클론 항체에 결합하는 인간 CD63 EC 루프 2-MMH 의 결합 동역학 파라미터

항체	mAb 포획 레벨(RU)	50 nM 또는 90 nM Ag 결합(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2M12450N	592	65	2.27E+05	2.79E-04	1.23E-09	41
H2M12395N	472	42	1.66E+05	1.82E-03	1.10E-08	6
H1M12451N	525	52	8.59E+04	4.30E-04	5.00E-09	27
H4H12450N	296	24	1.39E+05	7.37E-05	5.30E-10	156.7

[0274]

표 16

37℃에서 항-CD63 단클론 항체에 결합하는 인간 CD63 EC 루프 2-MMH 의 결합 동역학 파라미터

항체	mAb 포획 레벨(RU)	50 nM Ag 결합(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2M12450N	617	58	1.75E+05	2.01E-04	1.15E-09	57
H2M12395N	535	31	1.65E+05	9.32E-03	5.64E-08	1
H1M12451N	597	44	8.89E+04	1.90E-03	2.14E-08	6

[0275]

표 17

25℃에서 항-CD63 단클론 항체에 결합하는 인간 CD63 EC 루프 2-hFC의 결합 동역학 파라미터

항체	mAb 포획 레벨(RU)	50 nM Ag 결합(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2M12450N	592	134	3.20E+05	4.66E-05	1.50E-10	248
H2M12395N	472	117	6.77E+05	5.10E-04	7.53E-10	23
H1M12451N	525	107	1.19E+05	8.40E-05	7.04E-10	138

[0276]

표 18

37°C에서 항-CD63 단클론 항체에 결합하는 인간 CD63 EC 루프 2-hFC의 결합 동역학 파라미터

항체	mAb 포획 레벨(RU)	50 nM Ag 결합(RU)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (1/s)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (분)
H2M12450N	617	138	4.11E+05	4.89E-05	1.19E-10	236
H2M12395N	535	123	5.29E+05	1.79E-03	3.38E-09	6
H1M12451N	597	118	6.51E+05	3.31E-04	5.09E-10	35

[0277]

[0278]

[0279]

항-CD63 결합 아암을 갖는 이중특이적 복합체의 내재화를 결정하기 위한 이중 특이적 항체의 생성

이중 본 실시예에서 기술된 바와 같이 생성된 항-CD63 항체가 이중특이적 항원 결합 분자의 일부로서 내재화하는 능력을 평가하기 위해, 하나의 결합 아암이 항-CD63 항체 VH/VL 쌍이고(표 11 부모 항체 참조) 다른 하나가 무관한 결합 아암인 이중특이적 포맷으로 항체를 재구성하였다. 이중특이적 항체를 제조하는 표준 방법을 사용하였는데, 예시적인 방법은, 예를 들어, 미국 출원 공개 제2010/0331527호, 및 미국특허 제US5731168호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 본원에 참조로서 통합된다. 인간 CD63 발현 세포를 사용해, 이중 특이적 항체의 내재화 능력에 대해 시험하였다. 분석을 위해, 인간 CD63을 내인성으로 발현하는 HEK293 세포를 폴리-D-라이신이 코팅된 바닥이 투명한 검은색의 96-웰 플레이트(Greiner, Cat# 655946) 내에서 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신/L-글루타민(Gibco, Cat# 10378016)을 포함하는 DMEM 중에 10,000 세포/웰의 밀도로 플레이트하였다. 이틀 후, 배지만 있는 대조군과 함께, 배지를 항-CD63 이중특이적 항체 및 (10 ug/mL에서 시작해 0.157 ug/mL까지) 2 배의 연속 희석물 중의 음성 대조군 항체가 포함된 새로운 배지로 교체하였다. 이어서, 세포를 37°C에서 3시간 동안 배양하여 항체를 내재화시켰다. 배양 후, 세포를 PBS로 세척하고, 4% 파라포름알데히드(Thermo Scientific, Cat# 28908) 내에 20분 동안 실온에서 고정시키고, 이어서 5% 정상 염소 혈청(NGS)(Gibco, Cat# PCN5000) 중 0.2% Triton X-100(Spectrum Chemical, Cat# TR135)으로 20분 동안 투과화(permeabilize)시켰다. 이어서, 세포를 5% NGS 중에서 2 ug/mL의 당나귀 항-마우스 Igg Alexa Fluor-647 Fab(제조, Cat#115-606-006) 또는 2 ug/mL의 염소 항-인간 Igg Alexa Fluor-647 Fab(Jackson ImmunoResearch, Cat#115-606-006)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양하였다. 이차 항체 용액을 제거한 후, 세포를 PBS로 세척하고, 이어서 2 방울/mL의 NucBlue(Invitrogen, CAT# R37605)를 함유하는 신선한 PBS를 첨가하여 활세포 핵을 염색하였다. ImagExpress High-Content Imaging System(Molecular Devices)을 이용해 항체 내재화 및 핵에 대한 40x 이미지를 촬영하고, MetApress Software Transfluor Application Module(Molecular Devices)을 사용해 항체 내재화를 정량화하였다. 항체 내재화는 세포당 피트 통합 강도 ± 표준 편차(SD)로서 보고된다.

[0280]

표 15에 보이는 바와 같이, 인간 CD63(H1M12451, H2M12450, 또는 H2M12395로부터 유래됨)에 대한 단일 아암 결합을 포함하는 모든 이중특이적 항체 및 무관한 비-결합 아암은 HEK293 세포로의 효율적인 내재화를 입증하였다. 하나의 단일 결합 아암 mAb12450을 포함하는 이중특이적 항체는 시험한 다른 이중특이적 항체보다 높은 양으로 내재화함을 입증하였다.

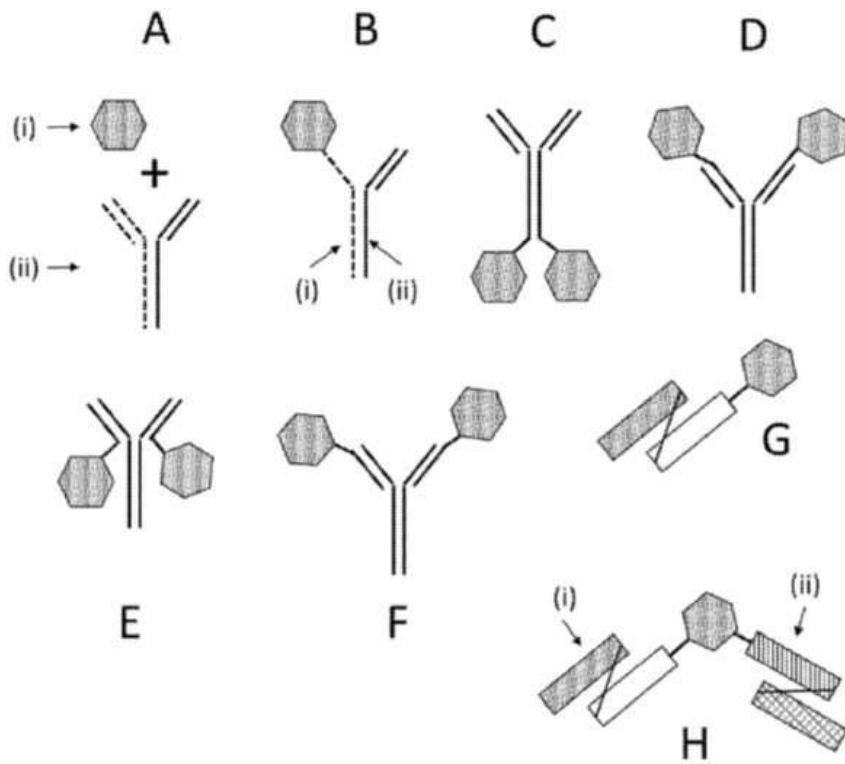
[표 15] HEK293 세포에 의한 항-CD63 이중특이적 항체의 내재화

항체 농도 ($\mu\text{g/mL}$)	항체의 내재화(피트 통합 강도) \pm SD			
	H2M12395N 이중특이적	H2M12450N 이중특이적	H1M12451N 이중특이적	음성 대조군 Ab
10	1.05E+06 \pm 4.56E+05	4.34E+06 \pm 8.77E+05	8.26E+05 \pm 2.67E+05	4.58E+03 \pm 6.50E+03
5	1.07E+06 \pm 4.06E+05	4.31E+06 \pm 5.48E+05	5.45E+05 \pm 5.20E+04	1.23E+03 \pm 8.85E+02
2.5	2.73E+05 \pm 6.01E+04	3.92E+06 \pm 5.80E+05	3.27E+05 \pm 1.06E+05	7.70E+02 \pm 6.09E+02
1.25	1.89E+05 \pm 6.61E+04	2.72E+06 \pm 2.63E+05	1.20E+05 \pm 3.91E+04	1.43E+03 \pm 1.19E+03
0.625	2.03E+05 \pm 9.37E+04	1.75E+06 \pm 1.39E+05	7.87E+04 \pm 1.07E+04	3.37E+03 \pm 5.22E+03
0.3125	3.95E+04 \pm 8.23E+03	8.57E+05 \pm 1.60E+05	3.77E+04 \pm 1.22E+04	1.99E+03 \pm 2.19E+03
0.15625	2.81E+04 \pm 1.30E+04	2.42E+05 \pm 2.54E+04	7.23E+03 \pm 6.09E+03	1.87E+03 \pm 1.16E+03
0	3.72E+03 \pm 1.66E+03	8.21E+03 \pm 3.47E+03	1.66E+04 \pm 1.80E+04	1.10E+03 \pm 1.56E+03

[0281]

도면

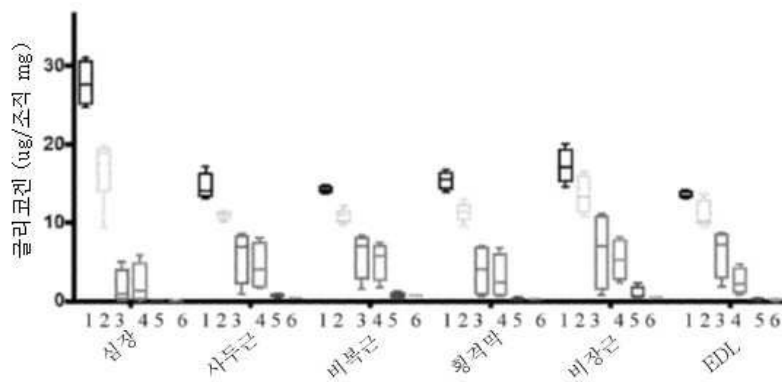
도면1a



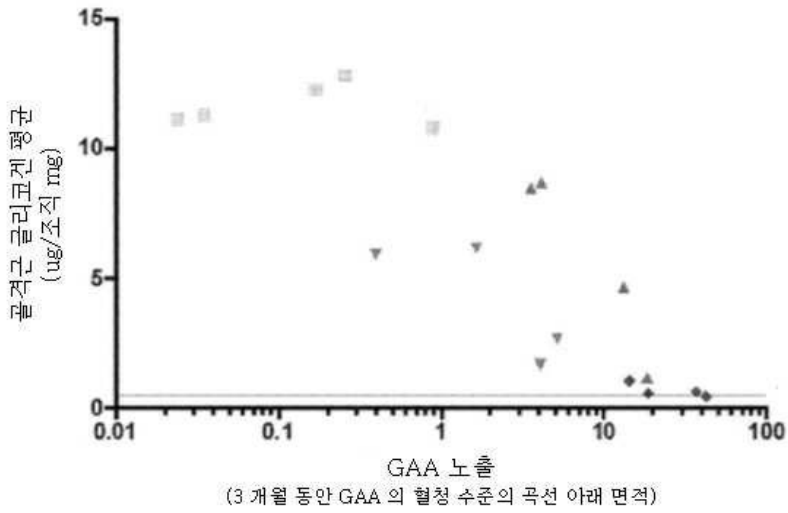
도면1b

ITR
폴리 A
GAA
항-CD63 scFV
신호 펩티드
(임의의) 간 특이적 프로모터
(임의의) 간 특이적 인핸서
ITR

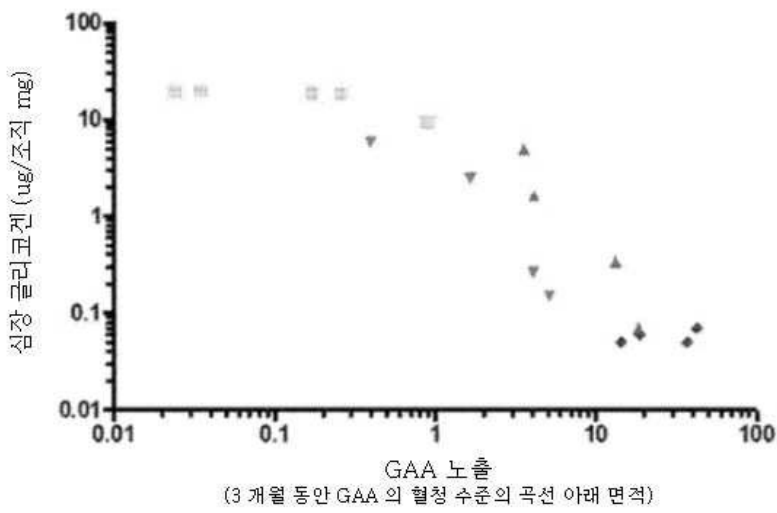
도면2



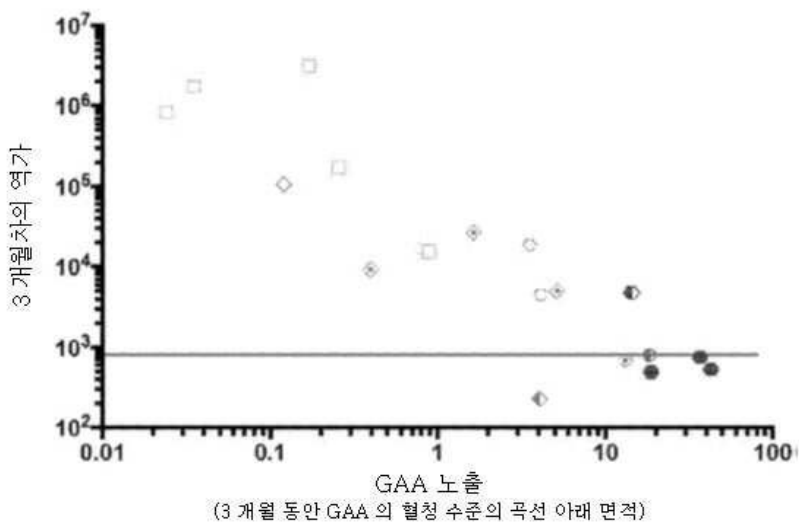
도면3



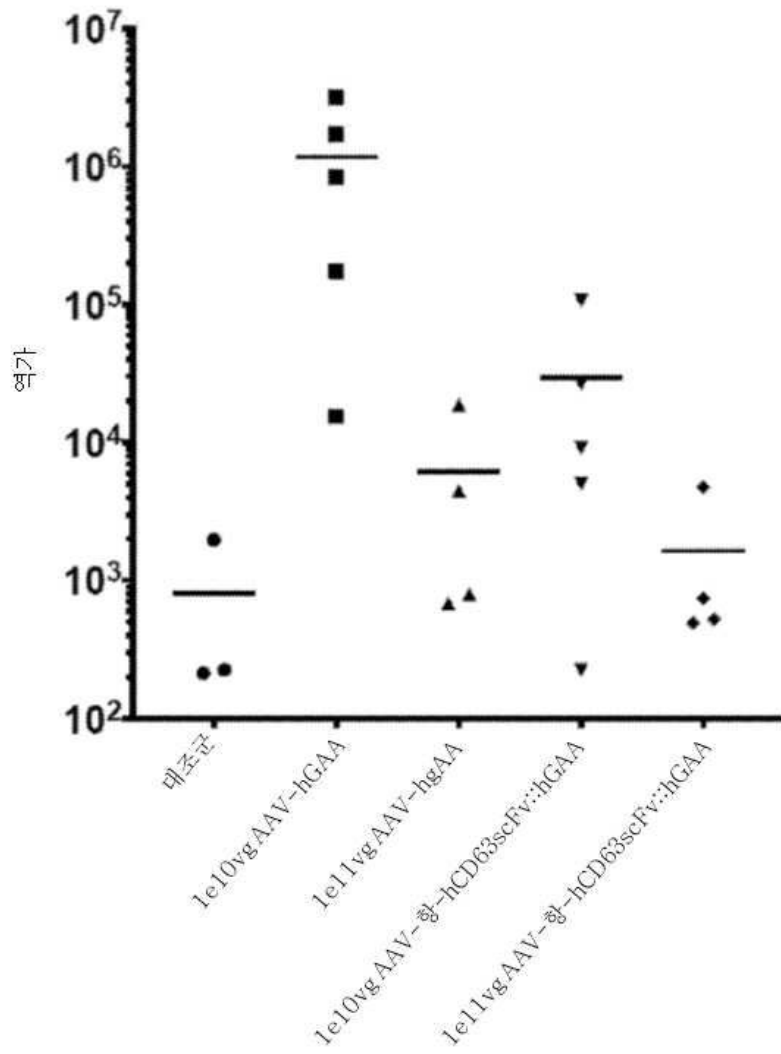
도면4



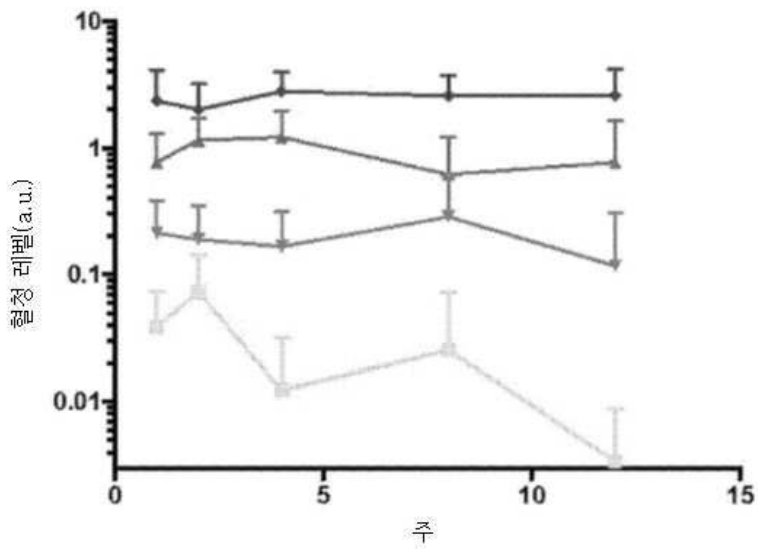
도면5



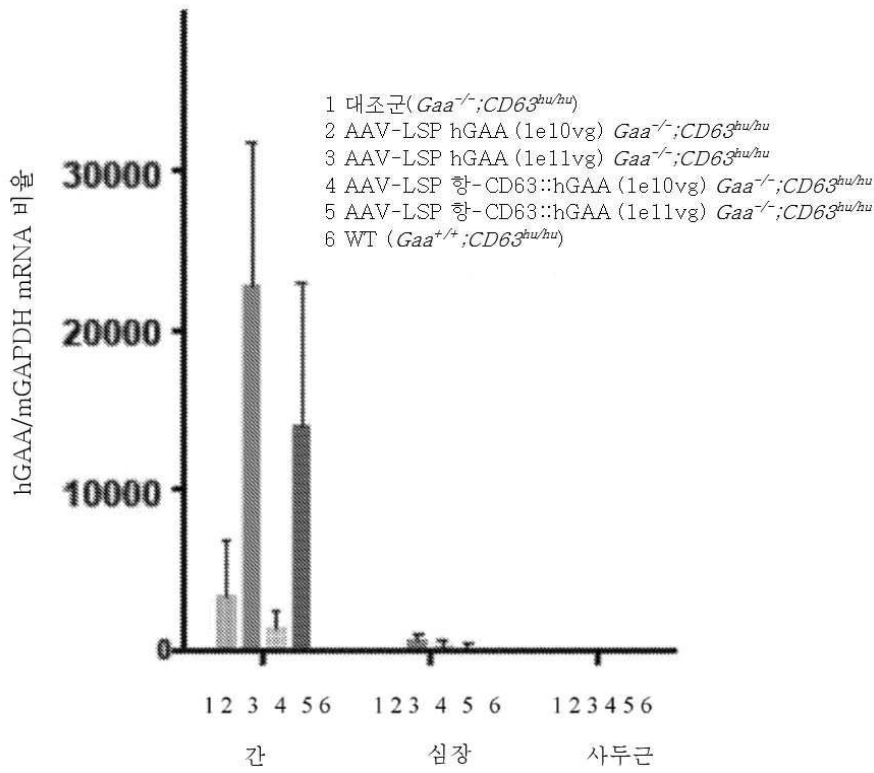
도면6



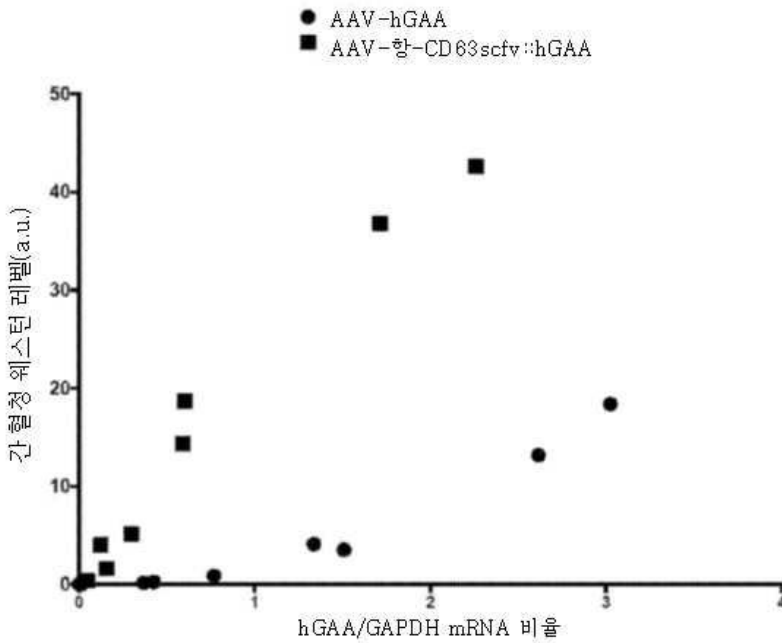
도면7a



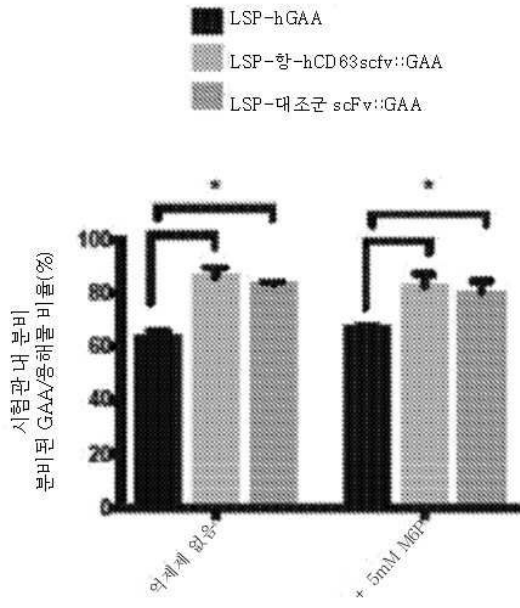
도면7b



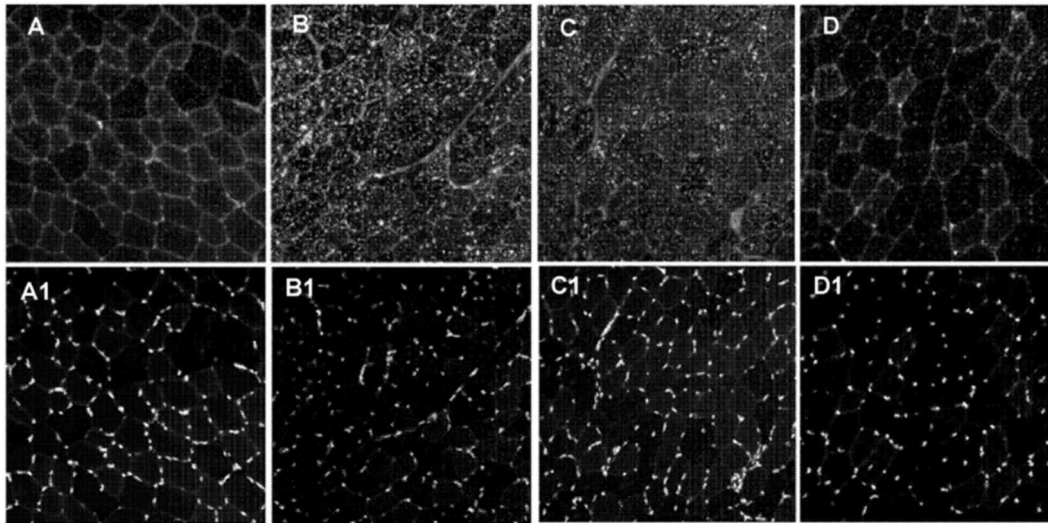
도면7c



도면7d

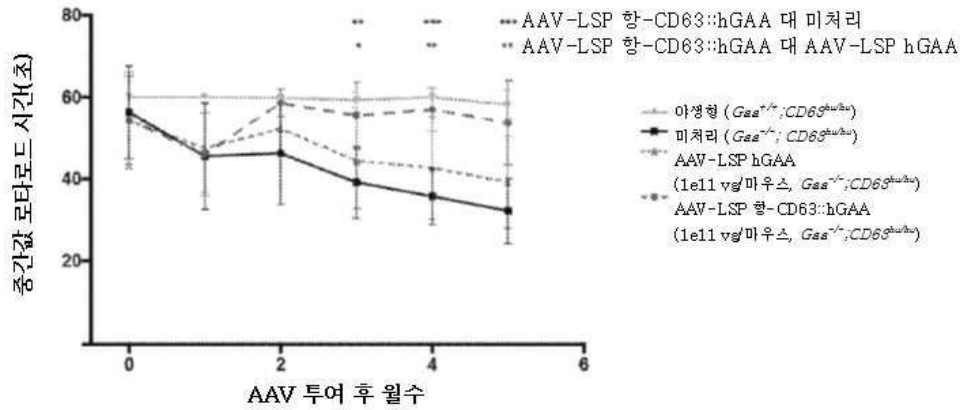


도면8

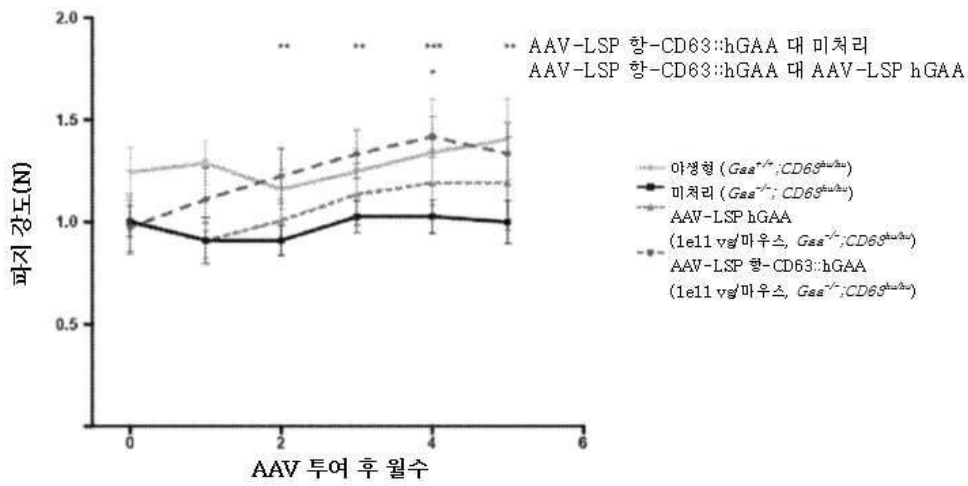


도면9

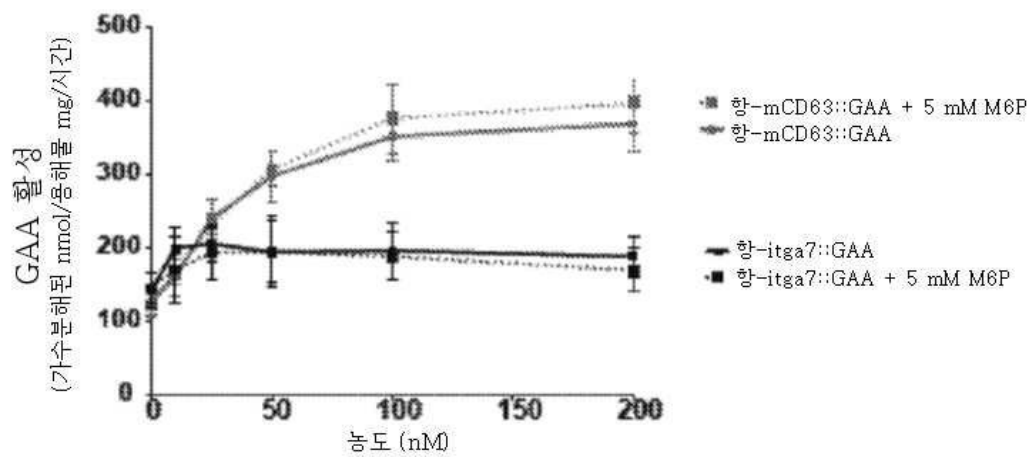
A



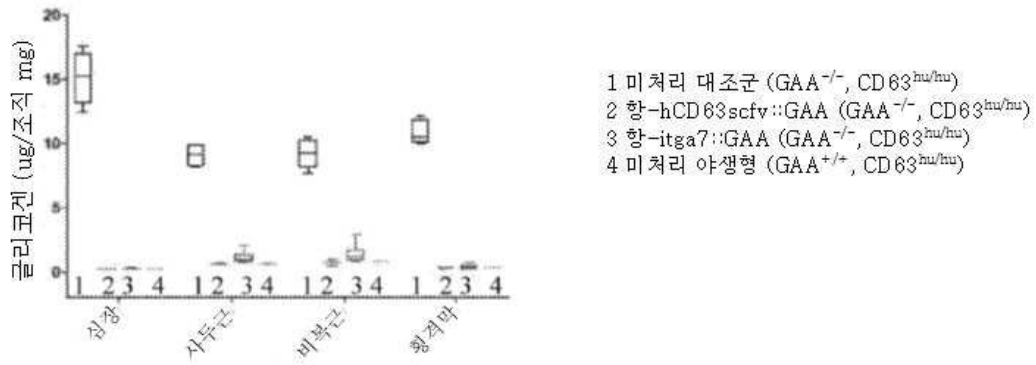
B



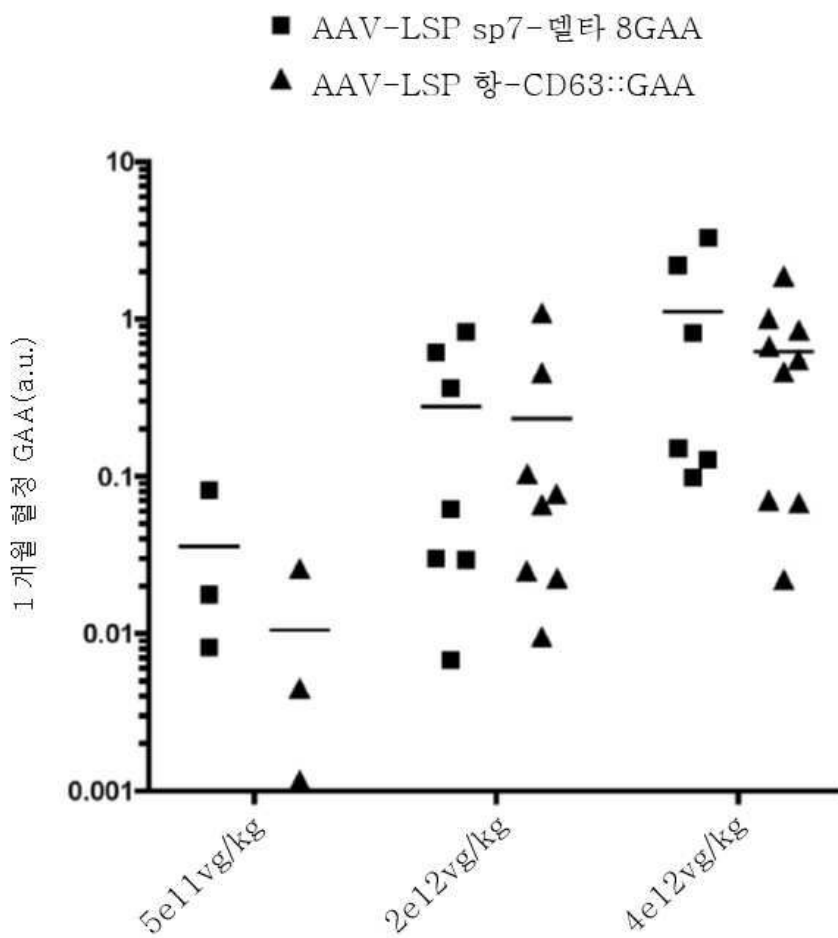
도면10a



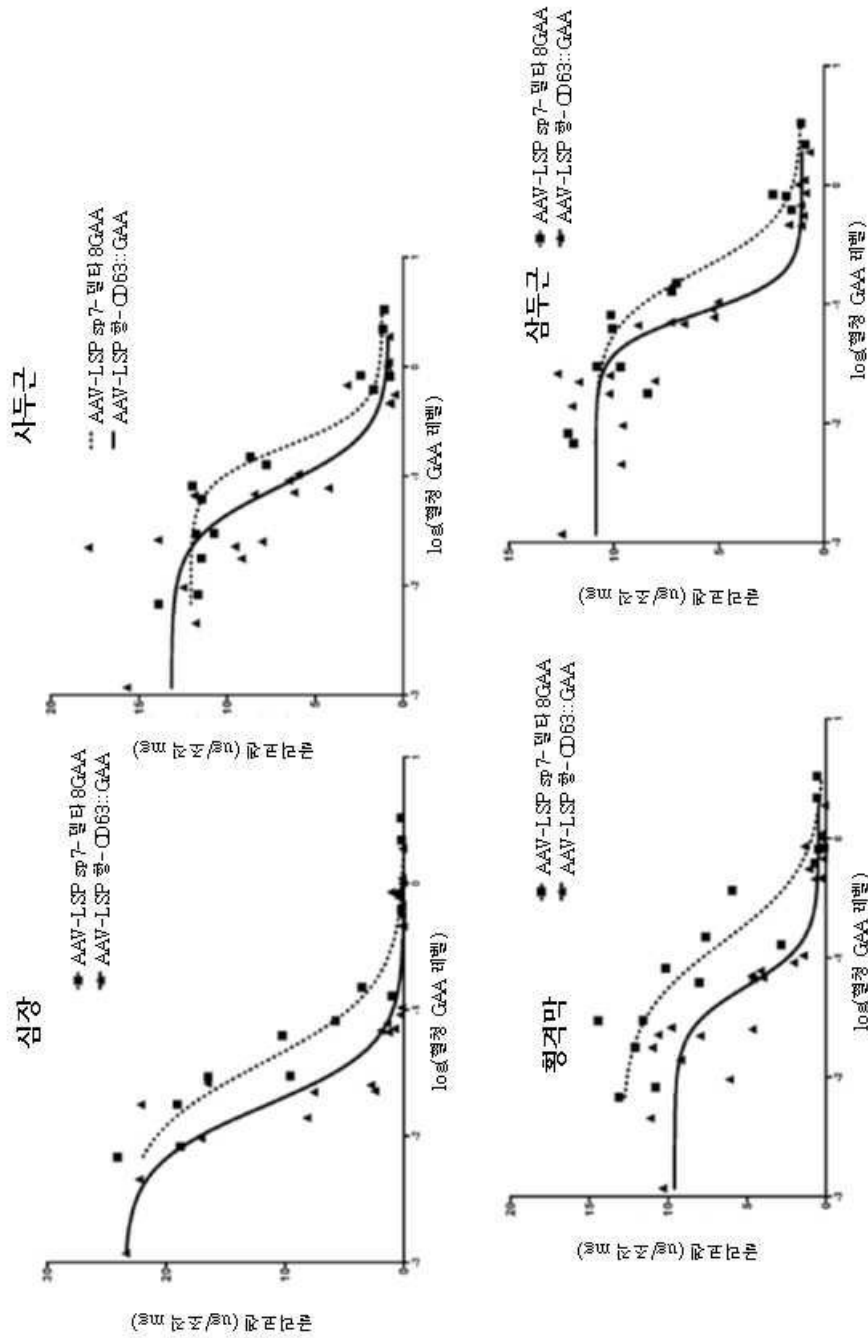
도면10b



도면11



도면12



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Regeneron Pharmaceuticals, Inc.

Baik, Andrew

Cygnar, Katherine

Schoenherr, Christopher

Kyratsous, Christos

Wang, Cheng

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INTERNALIZING ENZYMES

<130> 009108.361W01/10361W001

<150> 62/673,098

<151> 2018-05-17

<150> 62/574,719

<151> 2017-10-19

<150> 62/516,656

<151> 2017-06-07

<160> 81

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 952

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Val Arg His Pro Pro Cys Ser His Arg Leu Leu Ala Val Cys

1 5 10 15

Ala Leu Val Ser Leu Ala Thr Ala Ala Leu Leu Gly His Ile Leu Leu

 20 25 30

His Asp Phe Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val

 35 40 45

Leu Glu Glu Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly

 50 55 60

Pro Arg Asp Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr

65 70 75 80

Gln Cys Asp Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys

 85 90 95

Ala Ile Thr Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro

 100 105 110

Ala Lys Gln Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe

 115 120 125

Phe Pro Pro Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser
 130 135 140
 Glu Met Gly Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe
 145 150 155 160
 Pro Lys Asp Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu
 165 170 175
 Asn Arg Leu His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu
 180 185 190

 Val Pro Leu Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu
 195 200 205
 Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg
 210 215 220
 Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe
 225 230 235 240
 Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser Leu Pro Ser Gln Tyr
 245 250 255

 Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu Met Leu Ser Thr Ser
 260 265 270
 Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu Ala Pro Thr Pro Gly
 275 280 285
 Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu Ala Leu Glu Asp Gly
 290 295 300
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 305 310 315 320

 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 325 330 335
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 340 345 350
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 355 360 365
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr

865 870 875 880
 Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly
 885 890 895

Ala Gly Leu Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala
 900 905 910

Pro Gln Gln Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr
 915 920 925

Ser Pro Asp Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly
 930 935 940

Glu Gln Phe Leu Val Ser Trp Cys
 945 950

<210> 2

<211> 245

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 2

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Tyr Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
 50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> synthetic
 <400> 5
 cactccctct ctgcgcctc g 21
 <210> 6
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> synthetic
 <400> 6

 cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcctc 60
 gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgagagag ggagtggcca 120
 actccatcac taggggttcc t 141
 <210> 7
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> synthetic
 <400> 7
 aggaaccctt agtgatggag ttggcactc cctctctgcg cgctcgtcg ctcactgagg 60
 ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccg gctttgccc ggccgctca gtgagcgagc 120
 gagcgcgag ctgcctgcag g 141

 <210> 8
 <211> 224
 <212> DNA
 <213> Artificial
 <220><223> synthetic
 <400> 8
 gtctgtctgc acatttcgta gagcgagtgt tccgatactc taatctccct aggcaagtt 60
 cataattgtg taggttactt attctcttt tgttgactaa gtcaataatc agaatcagca 120
 ggtttggagt cagcttgcca gggatcagca gcctgggttg gaaggagggg gtataaaagc 180

cccttcacca ggagaagccg tcacacagat ccacaagctc ctga 224

<210> 9

<211> 72

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 9

gggggaggct gctggtgaat attaaccaag gtcaccccag ttatcggagg agcaaacagg 60

ggctaagtcc ac 72

<210> 10

<211> 1133

<212> PRT

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 10

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

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Lys Gly Gln Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Arg Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg Glu Asp Tyr Asp Gly Arg Leu Thr Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Ile Ser Ala Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

115 120 125

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

Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly
 385 390 395 400

Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr
 405 410 415

Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp Gln Phe Leu Gln Leu Ser Thr Ser
 420 425 430

Leu Pro Ser Gln Tyr Ile Thr Gly Leu Ala Glu His Leu Ser Pro Leu
 435 440 445

Met Leu Ser Thr Ser Trp Thr Arg Ile Thr Leu Trp Asn Arg Asp Leu
 450 455 460

Ala Pro Thr Pro Gly Ala Asn Leu Tyr Gly Ser His Pro Phe Tyr Leu
 465 470 475 480

Ala Leu Glu Asp Gly Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser
 485 490 495

Asn Ala Met Asp Val Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg
 500 505 510

Ser Thr Gly Gly Ile Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro
 515 520 525

Lys Ser Val Val Gln Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met
 530 535 540

Pro Pro Tyr Trp Gly Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser
 545 550 555 560

Ser Thr Ala Ile Thr Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His
 565 570 575

Phe Pro Leu Asp Val Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg
 580 585 590

Arg Asp Phe Thr Phe Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met
 595 600 605

Val Gln Glu Leu His Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp
 610 615 620

Pro Ala Ile Ser Ser Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp

625 630 635 640
 Glu Gly Leu Arg Arg Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro
 645 650 655
 Leu Ile Gly Lys Val Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr
 660 665 670
 Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His
 675 680 685

 Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser
 690 695 700
 Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu
 705 710 715 720
 Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala
 725 730 735
 Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu
 740 745 750

 His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu
 755 760 765
 Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe
 770 775 780
 Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser
 785 790 795 800
 Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn
 805 810 815

 Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly
 820 825 830
 Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe
 835 840 845
 Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu
 850 855 860
 Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu
 865 870 875 880

Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln
 885 890 895
 Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe
 900 905 910
 Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly
 915 920 925
 Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val
 930 935 940

 Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro
 945 950 955 960
 Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu
 965 970 975
 Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu
 980 985 990
 Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln
 995 1000 1005

 Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala
 1010 1015 1020
 Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly Glu Ala Arg Gly Glu Leu
 1025 1030 1035
 Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val Leu Glu Arg Gly Ala
 1040 1045 1050
 Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn Thr Ile Val Asn
 1055 1060 1065

 Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu Gln Leu Gln
 1070 1075 1080
 Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln Val Leu
 1085 1090 1095
 Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp Thr
 1100 1105 1110
 Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe

1115

1120

1125

Leu Val Ser Trp Cys

1130

<210> 11

<211> 3489

<212> DNA

<213> Artificial

<220><223> synthetic

<400> 11

```

atgcacagac ctagacgtcg tggaaactcgt ccacctccac tggcactgct cgctgctctc      60
ctcctggctg cagctgggtc tgatgcagaa gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta      120
gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc tgtgcaacct ctggattcac tttcagtgac      180
tattacatgt cttgggttcg ccagactcca gagaagaggc tggagtgggt cgcatatatt      240
agtagtagtg gtggtagcac ctattattca gacactgtaa agggccaatt caccatctcc      300

agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg caaatgagcc gtctgaagtc tgaggacaca      360
gccatgtatt actgtgcaag acgagaagat tacgacggaa gacttactta ctggggccaa      420
gggactctgg tcacatcttc tgcaggagga agtgggtggag gcggtcagg aggtggcggg      480
agcggcgggt acattgtgct gacacagtct cctgcttctt tagctgtatc tctggggcag      540
agggccacca tctcctgcag ggccagcaaa agtgtcagta catctggtta tagttatag      600
aactggtacc aacagaaacc aggacagcca cccaaagtcc tcatctatct tgcacccaaa      660
ctagaatctg gggtcctcgc caggttcagt ggcagtgggt caggacaga cttcacctc      720

aacatccate ctgtggagga ggaggatgct gcaacctatt actgtcagca cagtagggag      780
cttccgtaca cgttcggagg ggggacaaa ctggaaataa aaggtgggtg cggttcagca      840
caccgccgcc gtccagagc agtgcaccaca cagtgcgacg tccccccaa cagccgcttc      900
gattgcgccc ctgacaaggc catcacccag gaacagtgcg aggccccggg ctggttctac      960
atccctgcaa agcaggggct gcaggagacc cagatggggc agccctggtg cttcttccca     1020
cccagctacc ccagctaaa gctggagaac ctgagctcct ctgaaatggg ctacacggcc     1080
accctgacce gtaccacccc cactttcttc cccaaggaca tctgaccct gcggtgggac     1140

gtgatgatgg agactgagaa ccgctccac ttcacgatca aagatccagc taacaggcgc     1200
tacgaggtgc cttggagac cccgatgct cacagccggg caccgtcccc actctacagc     1260
gtggagtctt ccgaggagcc cttcggggtg atcgtgcgcc ggcagctgga cggccgcgtg     1320

```

ctgctgaaca cgacggtggc gccctgttc ttgctggacc agttccttca gctgtccacc 1380
 tcgctgccct cgcagtatat cacaggcctc gccgagcacc tcagtcccct gatgctcagc 1440
 accagctgga ccaggatcac cctgtggaac cgggaccttg cccccacgcc cgggtgcgaac 1500
 ctctacgggt ctacccttt ctacctggcg ctggaggacg gcgggtcggc acacggggtg 1560

 ttctgctaa acagcaatgc catggatgtg gtctgcagc cgagccctgc ctttagctgg 1620
 aggtcgacag gtgggatcct ggatgtctac atcttctgg gccagagcc caagagcgtg 1680
 gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac ccgttcatgc cgccatactg gggcctgggc 1740
 ttccacctgt gccgctgggg ctactcctcc accgctatca cccgccaggt ggtggagaac 1800
 atgaccaggg cccacttccc cctggacgtc cagtggaacg acctggacta catggactcc 1860
 cggagggact tcagttcaa caaggatggc ttccgggact tcccggccat ggtgcaggag 1920
 ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg atcgtggatc ctgccatcag cagctcgggc 1980

 cctgccggga gtiacagcc ctacgacgag ggtctgcgga ggggggtttt catcaccaac 2040
 gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta tggccccggg ccactgcctt ccccacttc 2100
 accaacccca cagccctggc ctgggtgggag gacatggtgg ctgagttcca tgaccaggtg 2160
 cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac gagccttcca acttcatcag gggctctgag 2220
 gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac ccaccctacg tgccctgggt ggttgggggg 2280
 accctccagg cggccaccat ctgtgcctcc agccaccagt ttctctccac aactacaac 2340
 ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc atcgcctccc acagggcgct ggtgaaggct 2400

 cgggggacac gccatttgt gatctcccgc tcgaccttg ctggccacgg ccgatacgcc 2460
 ggccactgga cgggggacgt gtggagctcc tgggagcagc tcgcctctc cgtgccagaa 2520
 atcctgcagt ttaacctgct ggggtgcct ctggctgggg ccgacgtctg cggcttctg 2580
 ggcaacacct cagaggagct gtgtgtgcgc tggaccagc tgggggcctt ctacccttc 2640
 atgcggaacc acaacagcct gctcagtctg ccccaggagc cgtacagctt cagcgagccg 2700
 gcccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc ctgcctacg cactcctccc ccactctac 2760
 aactgttcc accaggccca cgtcggggg gagaccgtgg cccggcccct ctctctggag 2820

 ttcccaagg actctagcac ctggactgtg gaccaccagc tcctgtgggg ggaggcctg 2880
 ctcatcacc cagtgtcca ggccgggaag gccgaagtga ctggctactt ccccttgggc 2940
 acatggtacg acctgcagac ggtgccagta gaggcccttg gcagcctccc accccacct 3000
 gcagctccc gtgagccagc catccacagc gaggggcagt gggtgacgt gccggcccc 3060
 ctggacacca teaactcca cctccgggct gggtacatca tcccctgca gggcctggc 3120
 ctcaacca cagagtccc ccagcagccc atggccctgg ctgtggcct gaccaagggt 3180

ggggaggccc gaggggagct gttctgggac gatggagaga gcctggaagt gctggagcga 3240

 ggggcctaca cacaggtcat cttcctggcc aggaataaca cgatcgtgaa tgagctgta 3300
 cgtgtgacca gtgagggagc tggcctgcag ctgcagaagg tgactgtcct gggcgtggcc 3360
 acggcgcccc agcaggtcct ctccaacggt gtcctgtct ccaacttac ctacagcccc 3420
 gacaccaagg tcttgacat ctgtgtctcg ctgttgatgg gagagcagtt tctcgtcagc 3480
 tgggttag 3489
 <210> 12
 <211> 2859
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 12

 atgggagtga ggcacccgcc ctgctccac cggctcctgg ccgtctgcgc cctcgtgcc 60

 ttggcaaccg ctgactcct ggggcacatc ctactccatg attcctgct ggttccccga 120
 gagctgagtg gtcctcccc agtctggag gagactcacc cagctacca gcagggagcc 180
 agcagaccag ggccccggga tgcccaggca cccccggcc gtcccagagc agtgcccaca 240
 cagtgcgacg tccccccaa cagccgcttc gattgcgcc ctgacaagc catcaccag 300
 gaacagtgcg agcccccggt ctgttgctac atccctgcaa agcaggggct gcagggagcc 360
 cagatggggc agccctggtg cttcttcca cccagctacc ccagctaaa gctggagaac 420
 ctgagctcct ctgaaatggg ctacacggcc accctgacc gtaccacccc caccttcttc 480

 cccaaggaca tctgacctc gcggctggac gtgatgatgg agactgagaa cgcctccac 540
 ttcacgatca aagatccagc taacaggcgc tacgaggtgc ccttgagac cccgcatgct 600
 cacagccggg caccgtcccc actctacagc gtggagtct cagaggagcc cttcggggtg 660
 atcgtgcgcc ggcagctgga cggcccgctg ctgctgaaca cgacggtggc gccctgttc 720
 tttcgggacc agttcttca gctgtccacc tcgctgcct cgcagtatat cacaggcctc 780
 gccgagcacc teagtcctc gatgetcagc accagctgga ccaggatcac cctgtggaac 840
 cgggacctg cgcccacgcc cggctcgaac ctctacgggt ctacccttt ctacctggcg 900

 ctggaggagc gcgggtcggc acacggggtg ttctgctaa acagcaatgc catggatgtg 960
 gtctgcagc cgagccctgc ccttagctgg aggtcgacag gtgggatcct ggatgctac 1020
 atcttctgg gccagagcc caagagcgtg gtgcagcagt acctggacgt tgtgggatac 1080
 ccgttatgc cgccatactg gggcctgggc ttccacctgt gccgctgggg ctactcctec 1140
 accgctatca cccgccaggt ggtggagaac atgaccaggg cccacttccc cctggagctc 1200

cagtggaacg acctggacta catggactcc cggagggact tcacgttcaa caaggatggc 1260
 ttccgggact tcccggccat ggtgcaggag ctgcaccagg gcggccggcg ctacatgatg 1320

 atcgtggate ctgcatcag cagctcgggc cctgccggga gctacaggcc ctacgacgag 1380
 ggtctgcgga ggggggtttt catcaccaac gagaccggcc agccgctgat tgggaaggta 1440
 tggcccgggt ccaactgcctt ccccgacttc accaacecca cagccctggc ctggtgggag 1500
 gacatggtgg ctgagttcca tgaccagggt cccttcgacg gcatgtggat tgacatgaac 1560
 gagccttcca acttcatcag gggctctgag gacggctgcc ccaacaatga gctggagaac 1620
 ccacctaag tgectggggt ggttgggggg accctccagg cggccacat ctgtgctec 1680
 agccaccagt ttctctcac aactacaac ctgcacaacc tctacggcct gaccgaagcc 1740

 atgcctccc acagggcgct ggtgaaggct cgggggacac gccatttgt gatctcccgc 1800
 tcgacctttg ctggccacgg ccgatacgc gccactgga cgggggacgt gtggagctec 1860
 tgggagcagc tcgctcctc cgtgccagaa atcctgcagt ttaacctgct gggggtgctt 1920
 ctggtcgggg ccgacgtctg cggttctctg ggcaacacct cagaggagct gtgtgtgcgc 1980
 tggaccacgc tgggggcctt ctacccttc atcggaacc acaacagcct getcagtctg 2040
 cccagagc cgtacagctt cagcagccg gccagcagg ccatgaggaa ggccctcacc 2100
 ctgcgctac cactctccc ccactctac aactgttcc accaggcca cgtcgcgggg 2160

 gagaccgtgg cccggccctt ctctctggag ttcccgaagg actctagcac ctggactgtg 2220
 gaccaccagc tctgtgggg ggagccctg ctcatcacc cagtgtcca gcccgggaag 2280
 gccgaagtga ctggctactt ccccttgggc acatggtacg acctgcagac ggtgccagta 2340
 gaggccttg gcagcctccc acccccacct gcagctccc gtgagccagc catccacagc 2400
 gagggcgagt ggtgacgct gccggcccc ctggacacca tcaactcca cctccgggct 2460
 ggtatcatca tccccctgca gggcctggc ctcaaacca cagagtccg ccagcagccc 2520
 atggccctgg ctgtggcctt gaccaagggt ggggaggccc gaggggagct gttctgggac 2580

 gatggagaga gcctggaagt gctggagcga gggcctaca cacaggtcat ctctctggcc 2640
 aggaataaca cgatcgtgaa tgagctggta cgtgtgacca gtgaggagc tggcctgcag 2700
 ctgcagaagg tgactgtcct gggcgtggcc acggcgcctc agcaggtcct ctccaacggt 2760
 gtccctgtct ccaacttcc ctacagcccc gacaccaagg tctggacat ctgtgtctcg 2820
 ctgttgatgg gagagcagtt tctcgtcagc tgggttag 2859

<210> 13
 <211> 354
 <212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 13
 caggtgcagc tgcaggagtc gggccccgga ctgatgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

 acctgcactg tcctctgggtgg ctccttcagc agttactatt ggaactggat cgggcagtcc 120
 ccagggaagg gactggagtg gattgggtat atccgttata gtggggacac caactacaag 180
 ccctccctca agagtegatt caccaatca attgacacgt ccaagaacct tttctccctg 240
 aggctgaaat ctgtgaccgc tgcggacacg gccgtgtatt actgtgcgag gatgggactg 300
 gggagtgatg cttttgatat ctggggccaa gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 14

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

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

1	5	10	15
Thr	Leu Ser	Leu Thr Cys Thr	Val Ser Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr
	20	25	30
Tyr	Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
	35	40	45
Gly	Tyr Ile Arg Tyr Ser Gly Asp Thr Asn Tyr Lys Pro Ser Leu Lys		
	50	55	60
Ser	Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Leu Phe Ser Leu		
65	70	75	80
Arg	Leu Lys Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala		
	85	90	95
Arg	Met Gly Leu Gly Ser Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr		
	100	105	110
Met	Val Thr Val Ser Ser		

115

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 15
 ggtggctcct tcagcagtta ctat 24

<210> 16
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 16
 Gly Gly Ser Phe Ser Ser Tyr Tyr
 1 5

<210> 17
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 17
 atccgttata gtggggacac c 21

<210> 18
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 18
 Ile Arg Tyr Ser Gly Asp Thr
 1 5

<210> 19
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 19
 gcgaggatgg gactggggag tgatgctttt gatatc 36

<210> 20
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

100	105	
<210> 23		
<211> 21		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 23		
cagagtggtta acaacaatta t		21
<210> 24		
<211> 7		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 24		
Gln Ser Val Asn Asn Asn Tyr		
1 5		
<210> 25		
<211> 9		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 25		
ggtgtattc		9
<210> 26		
<211> 3		
<212> PRT		
<213> Homo sapiens		
<400> 26		
Gly Val Phe		
1		
<210> 27		
<211> 27		
<212> DNA		
<213> Homo sapiens		
<400> 27		
cagcagtatg gtagttcacc ttggacg		27
<210> 28		

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 29

<211> 354

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 29

caggtgcagc tgcaggagtc gggccaaga ctggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcattg tcctcgttgg ctccatcagt aatttctact ggaactggat cggcagtc 120

ccagggaagg gactggaatg gattggatat ttcttttaca ctgggactat cgactacaac 180

ccctccctca agagtcgagt caccatatca ctggacacgt ccaagaacca gttctccctg 240

aacctgcgtc ttctgaccgc cgcagacgcg gccgtttatt attgtgcgag gatggggctg 300

ggggctaatg cttttgacat ctggggccac gggacaatgg tcaccgtctc ttca 354

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ile Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Asn Phe

 20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Tyr Phe Phe Tyr Thr Gly Thr Ile Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Lys

 50 55 60

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

65 70 75 80

Asn Leu Arg Leu Leu Thr Ala Ala Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Met Gly Leu Gly Ala Asn Ala Phe Asp Ile Trp Gly His Gly Thr
 100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 31

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

ggtggetcca tcagtaattt ctac 24

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 32

Gly Gly Ser Ile Ser Asn Phe Tyr

1 5

<210> 33

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

ttcttttaca ctgggactat c 21

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 34

Phe Phe Tyr Thr Gly Thr Ile

1 5

<210> 35

<211> 36

<212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 35
 gcgaggatgg ggctgggggc taatgctttt gacatc 36
 <210>
 36
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 36
 Ala Arg Met Gly Leu Gly Ala Asn Ala Phe Asp Ile
 1 5 10
 <210> 37
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 37
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctctctggaga aagagccacc 60
 ctctctctgca gggccagtc gcatgttagc agcaactact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtggatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240
 cctgcagatt ttgcagtgtt ttactgtcag cagtatggta actcaccttg gacgttcggc 300
 caagggacca aggtggaaat gaaa 324
 <210> 38
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 38
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln His Val Ser Ser Asn
 20 25 30
 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

Gly Gly Ser

1

<210> 43

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 43

cagcagtatg gtaactcacc ttggacg 27

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 44

Gln Gln Tyr Gly Asn Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 45

<211> 351

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 45

caggtgcaac tacaggagtc gggcccaaag gtggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60

acctgcactg tctctggtgg ctccatcagt agttactact ggaattggat cgcaccagtc 120

ccaggaagg gactggagtg gattggatat accaaaagag ggtataccga ctacaacccc 180

tccctcagga gtcgcgtcac tatacagaa gacacgtcca agaaccagtt ctccctgagg 240

atcagctctg tgaccgccgc agacacggcc gtatattact gtgcacaaat ggggtgggga 300

tcccatgctt ttgacatgtg gggccaaggg acaatggtcg ccgtctcttc a 351

<210> 46

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 46

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

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
 85 90 95
 Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

Val Ala Val Ser Ser
 115

<210> 47

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 47

ggtggtccca tcagtagtta ctac

24

<210> 48

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr Tyr

1 5

<210> 49

<211> 18

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 49

accaaagag ggtatacc

18

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Thr Lys Arg Gly Tyr Thr

1 5

<210> 51

<211> 36

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 51

gcacaaatgg ggtggggatc ccatgctttt gacatg 36

<210> 52

<

211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

Ala Gln Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met

1 5 10

<210> 53

<211> 324

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 53

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agcagctact tagcctggta ccagcagaaa 120

cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180

gacaggttca gtggcagtgg gtctgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cctgaagatt ttgcagtgta ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300

caagggacca aggtggaat caaa 324

<210> 54

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

 20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

 35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

 100 105

<210> 55

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 55

cagagtgtta gcagcagcta c

21

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens
 <400> 57
 ggtgcatcc 9
 <210> 58
 <211> 3
 <212> PRT

 <213> Homo sapiens
 <400> 58
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 59
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 59
 cagcagtatg gtagctcacc ttggacg 27
 <210> 60
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 60
 Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 61
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens
 <400> 61
 caggtgcaac tacaggagtc gggcccaaag gtggtgaagc cttcggagac cctgtccctc 60
 acctgcactg tctctgggtg ctccatcagt agttactact ggaattggat cgccagtc 120

 ccaggggaagg gactggagtg gattggatat accaaaagag ggtataccga ctacaacccc 180
 tcctcagga gtcgcgtcac tatacagaa gacacgtcca agaaccagtt ctccctgagg 240
 atcagctctg tgaccgccgc agacacggcc gtatattact gtgcacaaat ggggtgggga 300

tcccatgctt ttgacatgtg gggccaaggg acaatggtcg ccgtctcttc a 351

<210> 62

<211> 117

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser

50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg

65 70 75 80

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

85 90 95

Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met

100 105 110

Val Ala Val Ser Ser

115

<210> 63

<211> 24

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 63

ggtggetcca tcagtagtta ctac

24

<210> 64

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttaat agtaggtact tagcctgta ccagcagaaa 120
 cctggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatcca 180
 gacaggtgca gtggcagtgg gtccgggaca gacttcactc tcaccatcag cagactggag 240

cttgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcag cagtatggta gctcaccttg gacgttcggc 300
 caggggacca aggtggaat caaa 324

<210> 70

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 70

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asn Ser Arg

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Cys Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 71

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 71

cagagtgtta atagtaggta c 21

<210> 72

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 72

Gln Ser Val Asn Ser Arg Tyr

1 5

<210> 73

<211> 9

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 73

ggtgcatcc

9

<210> 74

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 74

Gly Ala Ser

1

<210> 75

<211> 27

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 75

cagcagtatg gtagctcacc ttggacg

27

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 77

<211> 238

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 77

Met Ala Val Glu Gly Gly Met Lys Cys Val Lys Phe Leu Leu Tyr Val
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Ala Phe Cys Ala Cys Ala Val Gly Leu Ile Ala Val Gly
 20 25 30

Val Gly Ala Gln Leu Val Leu Ser Gln Thr Ile Ile Gln Gly Ala Thr
 35 40 45

Pro Gly Ser Leu Leu Pro Val Val Ile Ile Ala Val Gly Val Phe Leu
 50 55 60

Phe Leu Val Ala Phe Val Gly Cys Cys Gly Ala Cys Lys Glu Asn Tyr
 65 70 75 80

Cys Leu Met Ile Thr Phe Ala Ile Phe Leu Ser Leu Ile Met Leu Val
 85 90 95

Glu Val Ala Ala Ala Ile Ala Gly Tyr Val Phe Arg Asp Lys Val Met
 100 105 110

Ser Glu Phe Asn Asn Asn Phe Arg Gln Gln Met Glu Asn Tyr Pro Lys
 115 120 125

Asn Asn His Thr Ala Ser Ile Leu Asp Arg Met Gln Ala Asp Phe Lys
 130 135 140

Cys Cys Gly Ala Ala Asn Tyr Thr Asp Trp Glu Lys Ile Pro Ser Met
 145 150 155 160

Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile Asn Val Thr Val Gly
 165 170 175

Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His Lys Glu Gly Cys Val
 180 185 190

Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val Leu Val Val Ala Ala
 195 200 205

Ala Ala Leu Gly Ile Ala Phe Val Glu Val Leu Gly Ile Val Phe Ala
 210 215 220

Cys Cys Leu Val Lys Ser Ile Arg Ser Gly Tyr Glu Val Met
 225 230 235
 <210> 78
 <211> 917
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 78
 Leu Leu Val Pro Arg Glu Leu Ser Gly Ser Ser Pro Val Leu Glu Glu
 1 5 10 15
 Thr His Pro Ala His Gln Gln Gly Ala Ser Arg Pro Gly Pro Arg Asp
 20 25 30
 Ala Gln Ala His Pro Gly Arg Pro Arg Ala Val Pro Thr Gln Cys Asp
 35 40 45
 Val Pro Pro Asn Ser Arg Phe Asp Cys Ala Pro Asp Lys Ala Ile Thr
 50 55 60
 Gln Glu Gln Cys Glu Ala Arg Gly Cys Cys Tyr Ile Pro Ala Lys Gln
 65 70 75 80
 Gly Leu Gln Gly Ala Gln Met Gly Gln Pro Trp Cys Phe Phe Pro Pro
 85 90 95
 Ser Tyr Pro Ser Tyr Lys Leu Glu Asn Leu Ser Ser Ser Glu Met Gly
 100 105 110
 Tyr Thr Ala Thr Leu Thr Arg Thr Thr Pro Thr Phe Phe Pro Lys Asp
 115 120 125
 Ile Leu Thr Leu Arg Leu Asp Val Met Met Glu Thr Glu Asn Arg Leu
 130 135 140
 His Phe Thr Ile Lys Asp Pro Ala Asn Arg Arg Tyr Glu Val Pro Leu
 145 150 155 160
 Glu Thr Pro His Val His Ser Arg Ala Pro Ser Pro Leu Tyr Ser Val
 165 170 175
 Glu Phe Ser Glu Glu Pro Phe Gly Val Ile Val Arg Arg Gln Leu Asp
 180 185 190
 Gly Arg Val Leu Leu Asn Thr Thr Val Ala Pro Leu Phe Phe Ala Asp

Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu Ala Trp Trp
 450 455 460
 Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe Asp Gly Met

 465 470 475 480
 Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly Ser Glu Asp
 485 490 495
 Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val Pro Gly Val
 500 505 510
 Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser Ser His Gln
 515 520 525
 Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly Leu Thr Glu

 530 535 540
 Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly Thr Arg Pro
 545 550 555 560
 Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg Tyr Ala Gly
 565 570 575
 His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu Ala Ser Ser
 580 585 590
 Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro Leu Val Gly

 595 600 605
 Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu Leu Cys Val
 610 615 620
 Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg Asn His Asn
 625 630 635 640
 Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser Glu Pro Ala
 645 650 655
 Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala Leu Leu Pro

 660 665 670
 His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly Glu Thr Val
 675 680 685
 Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser Thr Trp Thr

690 695 700
 Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile Thr Pro Val
 705 710 715 720
 Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro Leu Gly Thr

 725 730 735
 Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly Ser Leu Pro
 740 745 750
 Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser Glu Gly Gln
 755 760 765
 Trp Val Thr Leu Pro Ala Pro Leu Asp Thr Ile Asn Val His Leu Arg
 770 775 780
 Ala Gly Tyr Ile Ile Pro Leu Gln Gly Pro Gly Leu Thr Thr Thr Glu

 785 790 795 800
 Ser Arg Gln Gln Pro Met Ala Leu Ala Val Ala Leu Thr Lys Gly Gly
 805 810 815
 Glu Ala Arg Gly Glu Leu Phe Trp Asp Asp Gly Glu Ser Leu Glu Val
 820 825 830
 Leu Glu Arg Gly Ala Tyr Thr Gln Val Ile Phe Leu Ala Arg Asn Asn
 835 840 845
 Thr Ile Val Asn Glu Leu Val Arg Val Thr Ser Glu Gly Ala Gly Leu

 850 855 860
 Gln Leu Gln Lys Val Thr Val Leu Gly Val Ala Thr Ala Pro Gln Gln
 865 870 875 880
 Val Leu Ser Asn Gly Val Pro Val Ser Asn Phe Thr Tyr Ser Pro Asp
 885 890 895
 Thr Lys Val Leu Asp Ile Cys Val Ser Leu Leu Met Gly Glu Gln Phe
 900 905 910
 Leu Val Ser Trp Cys
 915
 <210
 > 79
 <211> 1128

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> scFv_H4H123450(VH-linker-VL)_linker_GAA

<400> 79

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Lys Val Val Lys Pro Ser Glu
 1 5 10 15
 Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Ile Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

 Gly Tyr Thr Lys Arg Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser Leu Arg Ser
 50 55 60
 Arg Val Thr Ile Ser Glu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Arg
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Gln
 85 90 95
 Met Gly Trp Gly Ser His Ala Phe Asp Met Trp Gly Gln Gly Thr Met
 100 105 110

 Val Ala Val Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 115 120 125
 Gly Ser Gly Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser
 130 135 140
 Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser
 145 150 155 160
 Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala
 165 170 175

 Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro
 180 185 190
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 195 200 205
 Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 210 215 220

465 470 475 480
 Gly Ser Ala His Gly Val Phe Leu Leu Asn Ser Asn Ala Met Asp Val
 485 490 495

 Val Leu Gln Pro Ser Pro Ala Leu Ser Trp Arg Ser Thr Gly Gly Ile
 500 505 510
 Leu Asp Val Tyr Ile Phe Leu Gly Pro Glu Pro Lys Ser Val Val Gln
 515 520 525
 Gln Tyr Leu Asp Val Val Gly Tyr Pro Phe Met Pro Pro Tyr Trp Gly
 530 535 540
 Leu Gly Phe His Leu Cys Arg Trp Gly Tyr Ser Ser Thr Ala Ile Thr
 545 550 555 560

 Arg Gln Val Val Glu Asn Met Thr Arg Ala His Phe Pro Leu Asp Val
 565 570 575
 Gln Trp Asn Asp Leu Asp Tyr Met Asp Ser Arg Arg Asp Phe Thr Phe
 580 585 590
 Asn Lys Asp Gly Phe Arg Asp Phe Pro Ala Met Val Gln Glu Leu His
 595 600 605
 Gln Gly Gly Arg Arg Tyr Met Met Ile Val Asp Pro Ala Ile Ser Ser
 610 615 620

 Ser Gly Pro Ala Gly Ser Tyr Arg Pro Tyr Asp Glu Gly Leu Arg Arg
 625 630 635 640
 Gly Val Phe Ile Thr Asn Glu Thr Gly Gln Pro Leu Ile Gly Lys Val
 645 650 655
 Trp Pro Gly Ser Thr Ala Phe Pro Asp Phe Thr Asn Pro Thr Ala Leu
 660 665 670
 Ala Trp Trp Glu Asp Met Val Ala Glu Phe His Asp Gln Val Pro Phe
 675 680 685

 Asp Gly Met Trp Ile Asp Met Asn Glu Pro Ser Asn Phe Ile Arg Gly
 690 695 700
 Ser Glu Asp Gly Cys Pro Asn Asn Glu Leu Glu Asn Pro Pro Tyr Val
 705 710 715 720

Pro Gly Val Val Gly Gly Thr Leu Gln Ala Ala Thr Ile Cys Ala Ser
 725 730 735

Ser His Gln Phe Leu Ser Thr His Tyr Asn Leu His Asn Leu Tyr Gly
 740 745 750

Leu Thr Glu Ala Ile Ala Ser His Arg Ala Leu Val Lys Ala Arg Gly
 755 760 765

Thr Arg Pro Phe Val Ile Ser Arg Ser Thr Phe Ala Gly His Gly Arg
 770 775 780

Tyr Ala Gly His Trp Thr Gly Asp Val Trp Ser Ser Trp Glu Gln Leu
 785 790 795 800

Ala Ser Ser Val Pro Glu Ile Leu Gln Phe Asn Leu Leu Gly Val Pro
 805 810 815

Leu Val Gly Ala Asp Val Cys Gly Phe Leu Gly Asn Thr Ser Glu Glu
 820 825 830

Leu Cys Val Arg Trp Thr Gln Leu Gly Ala Phe Tyr Pro Phe Met Arg
 835 840 845

Asn His Asn Ser Leu Leu Ser Leu Pro Gln Glu Pro Tyr Ser Phe Ser
 850 855 860

Glu Pro Ala Gln Gln Ala Met Arg Lys Ala Leu Thr Leu Arg Tyr Ala
 865 870 875 880

Leu Leu Pro His Leu Tyr Thr Leu Phe His Gln Ala His Val Ala Gly
 885 890 895

Glu Thr Val Ala Arg Pro Leu Phe Leu Glu Phe Pro Lys Asp Ser Ser
 900 905 910

Thr Trp Thr Val Asp His Gln Leu Leu Trp Gly Glu Ala Leu Leu Ile
 915 920 925

Thr Pro Val Leu Gln Ala Gly Lys Ala Glu Val Thr Gly Tyr Phe Pro
 930 935 940

Leu Gly Thr Trp Tyr Asp Leu Gln Thr Val Pro Val Glu Ala Leu Gly
 945 950 955 960

Ser Leu Pro Pro Pro Pro Ala Ala Pro Arg Glu Pro Ala Ile His Ser

35 40 45
 Lys Ile Pro Ser Met Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile

50 55 60
 Asn Val Thr Val Gly Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His
 65 70 75 80
 Lys Glu Gly Cys Val Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val
 85 90 95
 Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Glu Gln Lys
 100 105 110
 Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His His His His His

115 120 125
 <210> 81
 <211> 324
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> CD63 EC loop 2 hFC
 <400> 81

Arg Asp Lys Val Met Ser Glu Phe Asn Asn Asn Phe Arg Gln Gln Met
 1 5 10 15
 Glu Asn Tyr Pro Lys Asn Asn His Thr Ala Ser Ile Leu Asp Arg Met
 20 25 30
 Gln Ala Asp Phe Lys Cys Cys Gly Ala Ala Asn Tyr Thr Asp Trp Glu
 35 40 45

Lys Ile Pro Ser Met Ser Lys Asn Arg Val Pro Asp Ser Cys Cys Ile
 50 55 60
 Asn Val Thr Val Gly Cys Gly Ile Asn Phe Asn Glu Lys Ala Ile His
 65 70 75 80
 Lys Glu Gly Cys Val Glu Lys Ile Gly Gly Trp Leu Arg Lys Asn Val
 85 90 95
 Leu Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
 100 105 110

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
 115 120 125
 Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 130 135 140
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
 145 150 155 160
 Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
 165 170 175

 Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
 180 185 190
 Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
 195 200 205
 Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
 210 215 220
 Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
 225 230 235 240

 Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 245 250 255
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
 260 265 270
 Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
 275 280 285
 Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
 290 295 300

 Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Pro Gly Lys