



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0095211
(43) 공개일자 2024년06월25일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/04 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7013639
(22) 출원일자(국제) 2022년11월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/079339
(87) 국제공개번호 WO 2023/081850
국제공개일자 2023년05월11일
- (30) 우선권주장
63/275,731 2021년11월04일 미국(US)
63/369,761 2022년07월28일 미국(US)
- (71) 출원인
리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드
미합중국 뉴욕주 10591 타리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777
- (72) 발명자
사빈 리
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
스텍 마이클
미국 뉴욕 10591 테리타운 올드 소우 밀 리버 로드 777 리제너론 파마슈티칼스 인코포레이티드 내
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 59 항

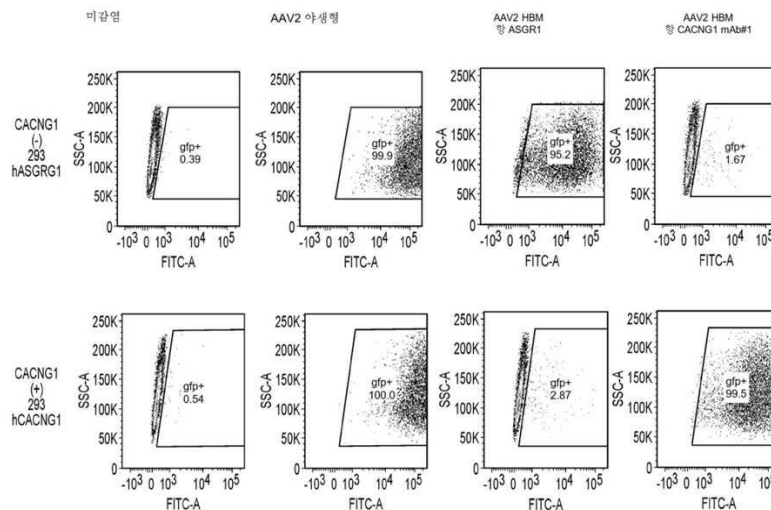
(54) 발명의 명칭 골격근에 재표적화된 바이러스 입자

(57) 요약

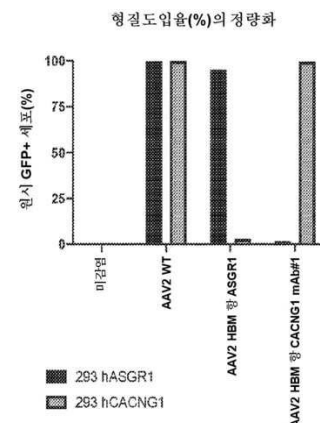
근육 특이적 표면 단백질을 사용하여 바이러스 입자, 예를 들어 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자를 근육 세포로 재표적화하기 위한 조성물 및 방법이 본원에 제공된다. 이에 맞게 구성된 AAV는 골격근 관련 장애(예를 들어, X-연관 근관 근병증(XLMTM), 뒤시엔느 근 이영양증(DMD), 근긴장성 이영양증(DM1), 근시상완골 근 이영양증 1형(FSHD), 선천성 근 이영양증 1A형(MDC1A), 지대근 이영양증, 디스트로글리칸증 등)의 치료를 필요로 하는 환자에서 이를 치료하기 위한 실행 가능한 유전자 요법 플랫폼일 수 있다.

대표도

도 1a



도 1b



(52) CPC특허분류

A61P 21/04 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C07K 16/18 (2013.01)

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14145 (2013.01)

(72) 발명자

머피 앤드류 제이.

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

키랏수스 크리스토스

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

몰러-탱크 스벤

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

사마이 폴라미

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

명세서

청구범위

청구항 1

제조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자로서,

- (i) 변형된 AAV 캡시드 단백질, 및
- (ii) 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드를 포함하되,
변형된 AAV 캡시드 단백질은 표적화 리간드와 작동 가능하게 연결되는, 제조합 AAV 입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

- (a) 변형된 AAV 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및 제2 구성원을 포함하고,
- (b) 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드를 포함하되,
단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 바이러스 입자의 향성을 포유류 근육 세포로 유도하도록 연관되는, 제조합 AAV 입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 포유류 근육 특이적 표면 단백질은 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질인, 제조합 AAV 입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포는 포유류 골격근 세포인, 제조합 AAV 입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포의 표면에서 발현된 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합된 변형된 AAV 캡시드 단백질을 포함하는, 제조합 AAV 입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포의 표면에서 발현된 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합된 변형된 AAV 캡시드 단백질을 포함하되,

포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질이고,

포유류 근육 세포는 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 비인간 동물 근육 세포인, 제조합 AAV 입자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합된 AAV 캡시드 단백질을 포함하되,

포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질이고,

포유류 근육 세포는 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질을 발현하도록 유전적으로 변형된 설치류 근육 세포인, 제조합 AAV 입자.

청구항 8

제7항에 있어서, 설치류 근육 세포는 랫트 근육 세포 또는 마우스 근육 세포인, 재조합 AAV 입자.

청구항 9

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합된 AAV 캡시드 단백질을 포함하되,

포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 인간 근육 세포 특이적 표면 단백질이고,

포유류 근육 세포는 인간 근육 세포인, 재조합 AAV 입자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 시험관 내 재조합 AAV 입자인, 재조합 AAV 입자.

청구항 11

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 생체 내 재조합 AAV 입자인, 재조합 AAV 입자.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 포유류 칼슘 전압-개폐식 보조 서브유닛 감마 1(CACNG1)인, 재조합 AAV 입자.

청구항 13

제12항에 있어서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 인간 CACNG1인, 재조합 AAV 입자.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열 중 어느 하나와 각각 적어도 90% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열(들)의 세트를 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

(a) 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원은 SpyTag, Isopeptag, SnoopTag, SpyTag002, SpyTag003, 또는 이의 임의의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체를 포함하고,

(b) 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 다음을 포함하고:

(i) SpyCatcher, KTag, 필린-C, SnoopCatcher, SpyCatcher002, SpyCatcher003, 또는 이의 임의의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체, 및

(ii) 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드, 및

(c) 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 이소펩티드 결합에 의해 연결되는, 재조합 AAV 입자.

청구항 16

제15항에 있어서,

(a) 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원은 SpyTag 또는 이의 임의의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체를 포함하고,

(b) 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드에 융합된 SpyCatcher 또는 이의 임의의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체를 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 17

제2항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 바이러스 캡시드 단백질에 작동 가능하게 연결하는 제1 및/또는 제2 링커를 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 18

제17항에 있어서, 제1 링커와 제2 링커는 동일하지 않은, 재조합 AAV 입자.

청구항 19

제17항에 있어서, 제1 링커와 제2 링커는 동일한, 재조합 AAV 입자.

청구항 20

제17항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 링커는 10개 아미노산의 길이이고/이거나 제2 링커는 10개 아미노산의 길이인, 재조합 AAV 입자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 변형된 VP1 캡시드 단백질, 변형된 VP2 캡시드 단백질, 및/또는 변형된 VP3 캡시드 단백질을 포함하고,

변형된 VP1 캡시드 단백질, 변형된 VP2 캡시드 단백질, 및/또는 변형된 VP3 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 표적화 리간드의 삽입을 포함하고,

단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 표적화 리간드의 삽입을 포함하는 변형된 VP1 캡시드 단백질, 변형된 VP2 캡시드 단백질, 및/또는 변형된 VP3 캡시드 단백질의 일부는 야생형 AAV의 상응하는 캡시드 단백질과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열을 추가로 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 22

제21항에 있어서, 변형된 VP1 캡시드 단백질, 변형된 VP2 캡시드 단백질, 및/또는 변형된 VP3 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 표적화 리간드의 삽입에 추가하여 다음을 추가로 포함하는, 재조합 AAV 입자:

- (i) 아미노산의 치환, 삽입, 또는 결실,
- (ii) 키메라 아미노산 서열, 또는
- (iii) (i) 및 (ii)의 임의의 조합.

청구항 23

제22항에 있어서, 아미노산의 치환, 삽입, 또는 결실은 바이러스 입자의 자연 향성을 감소시키고/시키거나 검출 가능한 표지를 생성하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, 표 2에 열거된 비영장류 동물 AAV, 및 이의 임의의 키메라로 이루어진 군으로부터 선택되는, 재조합 AAV 입자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV2인, 재조합 AAV 입자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 아미노산 위치 I-453 및/또는 I-587에 삽입되고, 일측 또는 양측 상의 링커를 통해 AAV 서열에 임의로 연결된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAV2 VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 27

제26항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 위치 G453에 임의로 링커를 통해 삽입된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAV2 VP1 캡시드 단백질을 포함하고,

임의로, 변형된 AAV2 VP1 캡시드 단백질은 R585A, R588A, R484A, R487A, K532A, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 돌연변이를 추가로 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원이 결합된 AAV2 VP1 캡시드 단백질의 제2 세트를 포함하는 모자이크 AAV2 캡시드를 포함하고,

임의로, AAV2 VP1 캡시드 단백질의 제2 세트는 R585A, R588A, R484A, R487A, K532A, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 29

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV9인, 재조합 AAV 입자.

청구항 30

제29항에 있어서, 바이러스 캡시드는 위치 I-453 또는 I-589에 임의로 링커를 통해 삽입된 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAV9 VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 31

제30항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 위치 G453에 임의로 링커를 통해 삽입된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAV9 VP1 캡시드 단백질을 포함하고,

임의로, 변형된 AAV9 VP1 캡시드 단백질은 N272A, W503A, 및 이들의 조합으로부터 선택된 돌연변이를 추가로 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 32

제30항 또는 제31항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원이 결합된 AAV9 VP1 캡시드 단백질의 제2 세트를 포함하는 모자이크 바이러스 캡시드이고,

임의로, AAV9 VP1 캡시드 단백질의 제2 세트는 N272A, W503A, 및 이들의 조합으로부터 선택된 돌연변이를 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 33

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 조류 AAV(AAAV), 비영장류 포유류 AAV, 또는 유린류 AAV인, 재조합 AAV 입자.

청구항 34

제33항에 있어서, 비영장류 동물 AAV는 AAAV인, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 35

제34항에 있어서, 바이러스 캡시드는 위치 I-444 또는 I-580에 임의로 링커를 통해 삽입된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAAV VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 36

제33항에 있어서, 비영장류 동물 AAV는 유린류 AAV인, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 37

제33항에 있어서, 비영장류 동물 AAV는 텍수염 도마뱀 AAV인, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 38

제37항에 있어서, 바이러스 캡시드는 위치 I573 또는 I436에 임의로 링커를 통해 삽입된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 턱수염 도마뱀 VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 39

제33항에 있어서, 비영장류 동물 AAV는 비영장류 포유류 AAV인, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 40

제39항에 있어서, 비영장류 포유류 AAV는 바다사자 AAV인, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 41

제34항에 있어서, 바이러스 캡시드는 위치 I429, I430, I431, I432, I433, I434, I436, I437, 및 I565로 이루어진 군으로부터 선택된 위치에 임의로 링커를 통해 삽입된 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 변형된 AAV VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 재조합 바이러스 입자 또는 조성물.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 AAV 입자는 모자이크 바이러스 캡시드이고, 임의로, 모자이크 바이러스 캡시드는 (i) 각각이 표적화 리간드와 연관되지 않은 제1 복수의 기준 캡시드 단백질, 및 (ii) 각각이 표적화 리간드와 연관된 제2 복수의 캡시드 단백질을 포함하고, 임의로, 모자이크 AAV 입자는 제1 복수의 기준 캡시드 단백질 및 제2 복수의 캡시드 단백질을 1:7의 비율로 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 재표적화 리간드는 항체 또는 이의 일부인, 재조합 AAV 입자.

청구항 44

제1항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 캡시드 내에 캡슐화된 관심 뉴클레오티드를 추가로 포함하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 45

제44항에 있어서, 관심 뉴클레오티드는 리포터 유전자인, 재조합 AAV 입자.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 관심 뉴클레오티드는 β -갈락토시다아제, 녹색 형광 단백질(GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(eGFP), MmGFP, 청색 형광 단백질(BFP), 강화된 청색 형광 단백질(eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 황색 형광 단백질(YFP), 강화된 황색 형광 단백질(eYFP), 에머랄드(Emerald), CyPet, 홍색 형광 단백질(CFP), 진청색(Cerulean), T-사파이어, 루시페라제, 알칼리 포스파타아제, 또는 이들의 조합을 암호화하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 47

제44항에 있어서, 관심 뉴클레오티드는 치료 단백질, 자살 유전자, 항체 또는 이의 단편, CRISPR/Cas 시스템 또는 이의 일부(들), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, RNAi 분자, 또는 shRNA 분자를 암호화하는, 재조합 AAV 입자.

청구항 48

다음에 포함하는 약학적 조성물: (a) 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 재조합 AAV 입자 및 (b) 약학적으로 허용 가능한 담체 또는 부형제.

청구항 49

관심 뉴클레오티드를 포유류 근육 세포에 전달하는 방법으로서, 포유류 근육 세포를 (a) 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 재조합 AAV 입자 또는 (b) 제48항의 약학적 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하되,

근육 세포는 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질을 발현하는, 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 생체 외에서 수행되는, 방법.

청구항 51

제49항에 있어서, 상기 접촉시키는 단계는 대상체에서 수행되는, 방법.

청구항 52

제51항에 있어서, 대상체는 영장류 동물, 바람직하게는 인간인, 방법.

청구항 53

제49항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포는 포유류 골격근 세포인, 방법.

청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질은 CACNG1인, 방법.

청구항 55

제49항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 뉴클레오티드는 치료 단백질, 자살 유전자, 항체 또는 이의 단편, CRISPR/Cas 시스템 또는 이의 일부(들), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, RNAi 분자, 또는 shRNA 분자를 암호화하는, 방법.

청구항 56

근육 소모성 또는 유전적 근육 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이를 치료하는 방법으로서,

(a) 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 재조합 AAV 입자 또는 (b) 제48항의 약학적 조성물을 환자에게 투여하는 단계를 포함하되,

바이러스 입자는 바이러스 캡시드 내에 캡슐화된 관심 뉴클레오티드를 포함하고,

관심 뉴클레오티드는 치료 단백질, 자살 유전자, 항체 또는 이의 단편, CRISPR/Cas 시스템 또는 이의 일부(들), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, RNAi 분자, 또는 shRNA 분자를 암호화하는, 방법.

청구항 57

근육 소모성 또는 유전적 근육 질환을 치료하기 위한 의약의 제조를 위한 제1항 내지 제47항 중 어느 한 항에 따른 바이러스 입자 또는 조성물 또는 제48항의 약학적 조성물의 용도.

청구항 58

제56항 또는 제57항에 있어서, 근육 소모성 또는 유전적 근육 질환은 X-연관 근관 근병증(XLMTM), 뒤시엔느 근 이영양증(DMD), 근긴장성 이영양증(DM1), 근시상완골 근 이영양증 1형(FSHD), 선천성 근 이영양증 1A형(MDC1A), 지대근 이영양증, 및 디스트로글리칸증(dystroglycanopathy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법 또는 용도.

청구항 59

제56항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 재조합 AAV 입자 또는 약학적 조성물의 환자에게 투여하는 것은 투여 전 간 효소(예: ALT, AST) 또는 보체 성분(예: Bb, C3a)의 상응하는 수준보다 간 효소 또는 보체 성분의 수준을 3배 더, 바람직하게는 1.5배 더 높이 증가시키지 않는, 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본원의 개시는 골격근 세포와 같은 근육 세포의 변형에 유용한 근육 특이적 표면 단백질, 예를 들어 칼슘 전압-개폐식 보조 서브유닛 감마 1(CACNG1) 또는 카드헤린 15(Cadherin 15, CAD15)에 재표적화된 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 바이러스 입자, 예를 들어 재조합 AAV 입자를 시험관 내에서 또는 생체 내에서 제조하고 사용하는 방법에 관한 것이다.

서열 목록

[0003] 2022년 11월 4일에 생성되었고 252 Kb인 “11074W001.xml”이라는 명칭의 xml 포맷으로 된 서열 목록은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

배경기술

[0004] 특정 표적 세포 내로 유전자를 전달하는 것은 다양한 만성 유전적 질환의 잠재적인 치료를 위한 현대 의학에 있어서 가장 중요한 기술 중 하나가 되었다. 이상적으로, 유전자 전달 비히클은 원하는 세포 내로 유전 물질을 안정적으로 도입하고 비표적 세포 내로는 유전 물질이 도입되지 않게 할 수 있다.

[0005] 유전자 전달 비히클로서의 바이러스 입자, 특히 아데노-연관 바이러스(AAV)에 기반한 바이러스 입자들은 많은 연구의 초점이 되어 왔는데, 이는 AAV가 광범한 영양류 종 및 조직을 생체 내에서 형질도입할 수 있고, 독성이 나 병원성의 증거가 없기 때문이다. (Muzyczka 등의 문헌[(1992) *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158:97-129]). 또한, AAV는 분열후 조직을 안전하게 형질도입한다. 바이러스가 가끔씩 숙주 염색체에 통합될 수는 있지만, 매우 드물게 인간 염색체 19의 세이프 하버(safe-harbor) 유전자좌 내로 통합되고, 복제 (Rep) 단백질이 트랜스로 공급될 때에 한해서 통합된다. AAV 게놈은 감염된 세포에서 신속하게 순환하고 연쇄체화(concatemerize)되며 감염된 세포에서 안정한 에피솜 상태로 존재하여 이들의 페이로드(payload)를 장기적으로 안정하게 발현한다.

[0006] 또한, AAV 감염증을 조작하고 특정 세포에 대해 재유도하는 것이 달성된 것은 불과 몇 년 전이다. 바이러스 입자를 사용한 표적화 유전자 요법의 진전은 바이러스 입자의 비-재조합(비-유전자) 또는 재조합(유전자) 변형으로서 요약될 수 있으며, 이는 바이러스 입자의 위형화, 증식, 및/또는 바이러스 입자의 자연 형성의 재표적화로 이어진다. (Nicklin 및 Baker의 문헌[(2002) *Curr. Gene Ther.* 2:273-93]; Verheiji 및 Rottier의 문헌[(2012) *Advances Virol* 2012:1-15]에서 검토됨).

[0007] 직접적인 재조합 표적화 접근법에서, 표적화 리간드는 바이러스 캡시드에 직접 삽입되거나 이에 결합된다. 즉, 단백질 바이러스 캡시드 유전자가 이중 표적화 리간드를 포함하는 캡시드 단백질을 발현하도록 변형된다. 그런 다음, 표적화 리간드는 표적 세포 상에서 우선적으로 또는 배타적으로 발현되는 수용체 또는 마커를 재유도(예를 들어 이에 결합)한다. (Stachler 등의 문헌[(2006) *Gene Ther.* 13:926-931]; White 등의 문헌[(2004) *Circulation* 109:513-519]과 더불어 Park 등의 문헌[(2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653-59]; Girod 등의 문헌[(1999) *Nature Medicine* 5:1052-56]; Grifman 등의 문헌[(2001) *Molecular Therapy* 3:964-75]; Shi 등의 문헌[(2001) *Human Gene Therapy* 12:1697-1711]; Shi 및 Bartlett의 문헌[(2003) *Molecular Therapy* 7:515-525]도 참조한다).

[0008] 간접적인 재조합 접근법에서, 바이러스 캡시드는 이중 “스캐폴드(scaffold)”를 사용해 변형된 다음, 표적화 리간드를 포함하는 어댑터에 연결된다. 어댑터는 스캐폴드 및 표적 셀에 결합한다. (아놀드 등의 문헌[(2006) *Mol. Ther.* 5:125-132]; Ponnazhagen 등의 문헌[(2002) *J. Virol.* 76: 12900-907]; 및 WO 97/05266 참조). (1) 항체 어댑터의 Fc에 결합하는 Fc 결합 분자(예: Fc 수용체, 단백질 A, 등), (2) 비오틴화 어댑터에 결합하는 (스트렙트)아비딘, (3) (스트렙트)아비딘과 융합된 어댑터에 결합하는 비오틴, (4) 검출 가능한 표지 및 표적 분자에 비공유 결합할 수 있는 이중 특이적 어댑터가 결합된 바이러스 입자의 검출 및/또는 단리에 유용한 검출 가능한 표지, 및 최근의 (5) 이소펩티드 결합을 형성하는 단백질:단백질 결합 쌍과 같은 스캐폴드가 다양한 바이러스 입자에 대해 기술되어 왔다. (예를 들어, Gigout 등의 문헌[(2005) *Molecular Therapy* 11:856-865]; Stachler 등의 문헌[(2008) *Molecular Therapy* 16:1467-1473]; Quetglas 등의 문헌[(2010) *Virus Research* 153:179-196]; Ohno 등의 문헌[(1997) *Nature Biotechnology* 15:763-767]; Klimstra 등의 문헌[(2005) *Virology* 338:9-21] 참조).

[0009] AAV 감염을 유도하는 능력을 제공하는 데 있어서의 발전과 더불어, 관심 핵산을 관심 세포, 예를 들어 포유류

근육 세포에 특이적으로 전달하기 위한 표적을 찾아내는 것에 대한 필요성이 남아 있다.

발명의 내용

- [0010] 특정 표적 세포 내로 유전자를 전달하는 것은 다양한 만성 유전적 질환의 잠재적인 치료를 위한 현대 의학에 있어서 가장 중요한 기술 중 하나가 되었다. 이상적으로, 유전자 전달 비히클은 원하는 세포 내로 유전 물질을 안정적으로 도입하고 비표적 세포 내로는 유전 물질이 도입되지 않게 할 수 있다.
- [0011] 유전자 전달 비히클로서의 바이러스 입자, 특히 아데노-연관 바이러스(AAV)에 기반한 바이러스 입자들은 많은 연구의 초점이 되어 왔는데, 이는 AAV가 광범한 영장류 중 및 조직을 생체 내에서 형질도입할 수 있고, 독성이 나 병원성의 증거가 없기 때문이다. (Muzyczka 등의 문헌[(1992) *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 158:97-129]). 또한, AAV는 분열후 조직을 안전하게 형질도입한다. 바이러스가 가끔씩 숙주 염색체에 통합될 수는 있지만, 매우 드물게 인간 염색체 19의 세이프 하버(safe-harbor) 유전자와 내로 통합되고, 복제 (Rep) 단백질이 트랜스로 공급될 때에 한해서 통합된다. AAV 게놈은 감염된 세포에서 신속하게 순환하고 연쇄체화(concatemerize)되며 감염된 세포에서 안정한 에피솜 상태로 존재하여 이들의 페이로드(payload)를 장기적으로 안정하게 발현한다.
- [0012] 또한, AAV 감염증을 조작하고 특정 세포에 대해 재유도하는 것이 달성된 것은 불과 몇 년 전이다. 바이러스 입자를 사용한 표적화 유전자 요법의 진전은 바이러스 입자의 비-제조합(비-유전자) 또는 제조합(유전자) 변형으로서 요약될 수 있으며, 이는 바이러스 입자의 위형화, 증식, 및/또는 바이러스 입자의 자연 형성의 재표적화로 이어진다. (Nicklin 및 Baker의 문헌[(2002) *Curr. Gene Ther.* 2:273-93]; Verheiji 및 Rottier의 문헌[(2012) *Advances Virol* 2012:1-15]에서 검토됨).
- [0013] 직접적인 제조합 표적화 접근법에서, 표적화 리간드는 바이러스 캡시드에 직접 삽입되거나 이에 결합된다. 즉, 단백질 바이러스 캡시드 유전자가 이중 표적화 리간드를 포함하는 캡시드 단백질을 발현하도록 변형된다. 그런 다음, 표적화 리간드는 표적 세포 상에서 우선적으로 또는 배타적으로 발현되는 수용체 또는 마커를 재유도(예를 들어 이에 결합)한다. (Stachler 등의 문헌[(2006) *Gene Ther.* 13:926-931]; White 등의 문헌[(2004) *Circulation* 109:513-519]과 더불어 Park 등의 문헌[(2007) *Frontiers in Bioscience* 13:2653-59]; Girod 등의 문헌[(1999) *Nature Medicine* 5:1052-56]; Grifman 등의 문헌[(2001) *Molecular Therapy* 3:964-75]; Shi 등의 문헌[(2001) *Human Gene Therapy* 12:1697-1711]; Shi 및 Bartlett의 문헌[(2003) *Molecular Therapy* 7:515-525]도 참조한다).
- [0014] 간접적인 제조합 접근법에서, 바이러스 캡시드는 이중 “스캐폴드(scaffold)”를 사용해 변형된 다음, 표적화 리간드를 포함하는 어댑터에 연결된다. 어댑터는 스캐폴드 및 표적 셀에 결합한다. (아놀드 등의 문헌[(2006) *Mol. Ther.* 5:125-132]; Ponnazhagen 등의 문헌[(2002) *J. Virol.* 76: 12900-907]; 및 WO 97/05266 참조). (1) 항체 어댑터의 Fc에 결합하는 Fc 결합 분자(예: Fc 수용체, 단백질 A, 등), (2) 비오틴화 어댑터에 결합하는 (스트렙트)아비딘, (3) (스트렙트)아비딘과 융합된 어댑터에 결합하는 비오틴, (4) 검출 가능한 표지 및 표적 분자에 비공유 결합할 수 있는 이중 특이적 어댑터가 결합된 바이러스 입자의 검출 및/또는 단리에 유용한 검출 가능한 표지, 및 최근의 (5) 이소펩티드 결합을 형성하는 단백질:단백질 결합 쌍과 같은 스캐폴드가 다양한 바이러스 입자에 대해 기술되어 왔다. (예를 들어, Gigout 등의 문헌[(2005) *Molecular Therapy* 11:856-865]; Stachler 등의 문헌[(2008) *Molecular Therapy* 16:1467-1473]; Quetglas 등의 문헌[(2010) *Virus Research* 153:179-196]; Ohno 등의 문헌[(1997) *Nature Biotechnology* 15:763-767]; Klimstra 등의 문헌[(2005) *Virology* 338:9-21] 참조).
- [0015] AAV 감염을 유도하는 능력을 제공하는 데 있어서의 발전과 더불어, 관심 핵산을 관심 세포, 예를 들어 포유류 근육 세포에 특이적으로 전달하기 위한 표적을 찾아내는 것에 대한 필요성이 남아 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 ASGR1 또는 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 293 세포주에 GFP를 전달하는 AAV2-기반 재표적화된 바이러스 감염을 도시한다. (a) 산포도는 AAV2 WT 입자, AAV2 HBM 탈표적화된 돌연변이체 입자, AAV2 SpyTag 항-ASGR1 입자, 또는 AAV2 SpyTag 항-CACNG1 입자로 감염시킨 후 hASGR1 발현에 대해 양성(+)인 세포에 의해 녹색 형광 단백질(GFP) 발현을 평가하는 유세포 계측법으로부터 수득된다. 또한, AAV2 WT 입자, AAV2 HBM 탈표적화된 돌연변이체 입자, AAV2 SpyTag 항-ASGR1 입자, 또는 AAV2 SpyTag 항-CACNG1 입자로 감염시킨 후 hCACNG1 발현에 대해 양성(+)인 세포에 의해 녹색 형광 단백질(GFP) 발현을 평가하는 유세포 계측법으로부터 수득된 산

포도가 도시되어 있다. 바이러스는 형질도입의 마커로서 GFP를 발현한다. (b) 그래프는 (a)의 유세포 계측도로부터 GFP+ 세포의 백분율을 정량화한다.

도 2는 ASGR1 또는 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 293 세포주에 GFP를 전달하는 AAV9-기반 재표적화된 바이러스 감염을 도시한다. (a) 산포도는 “AAV9 wt” 입자, “AAV9 탈표적화된 돌연변이체” 입자, “AAV9 SpyTag 항-ASGR1” 입자, 또는 “AAV9 SpyTag 항-CACNG1” 입자로 감염시킨 후 hASGR1 발현에 대해 양성(+)인 세포에 의해 녹색 형광 단백질(GFP) 발현을 평가하는 유세포 계측법으로부터 수득된다. 또한, “AAV9 wt” 입자, “AAV9 탈표적화된 돌연변이체” 입자, “AAV9 SpyTag 항-ASGR1” 입자, 또는 “AAV9 SpyTag 항-CACNG1” 입자로 감염시킨 후 hCACNG1 발현에 대해 양성(+)인 세포에 의해 녹색 형광 단백질(GFP) 발현을 평가하는 유세포 계측법으로부터 수득한 산포도가 도시되어 있다. 바이러스는 형질도입의 마커로서 GFP를 발현한다. (b) 그래프는 도 2a의 유세포 계측도로부터 GFP+ 세포의 백분율을 정량화한다.

도 3은 ASGR1 또는 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 293 세포주에 루시퍼라아제를 전달하는 AAV2- 및 AAV9-기반 재표적화된 바이러스 감염(MOI 1x10⁶)을 도시한다. (a) 루시퍼라아제 검정을 수행하여 AAV2 WT, AAV2 HBM+ 항-hASGR1, 및 AAV2 HBM+ 항-hCACNG1 mAb#1 입자로 감염시킨 후 hCACNG1에 대해 양성(+)인 세포에 의해 반딧불이 루시퍼라아제 발현을 평가하였다. 또한, AAV2 WT, AAV2 HBM+ 항-hASGR1, 및 AAV2 HBM+ 항-hCACNG1 mAb#1 입자로 감염시킨 후 hCACNG1에 대해 양성(+)인 세포에 의해 반딧불이 루시퍼라아제 발현을 평가하는 루시퍼라아제 검정의 결과가 도시되어 있다. (b) 루시퍼라아제 검정을 수행하여 AAV9 WT, AAV9 N272A, AAV9 N272A+ 항-hASGR1 전체 항체, AAV9 N272A+ 항-hASGR1 Fab, AAV9 N272A+ 항-CACNG1 mAb#1 전체 항체, 및 AAV9 N272A+ 항-hCACNG1 mAb#1 Fab로 감염시킨 후 hCACNG1에 대해 양성(+)인 세포에 의해 반딧불이 루시퍼라아제 발현을 평가하였다. 또한, AAV9 WT, AAV9 N272A, AAV9 N272A+ 항-hASGR1 전체 항체, AAV9 N272A+ 항-hASGR1 Fab, AAV9 N272A+ 항-CACNG1 mAb#1 전체 항체, 및 AAV9 N272A+ 항-hCACNG1 mAb#1 Fab로 감염시킨 후 hCACNG1에 대해 양성(+)인 세포에 의해 반딧불이 루시퍼라아제 발현을 평가하는 루시퍼라아제 검정의 결과가 도시되어 있다.

도 4는 인간 골격 근관의 AAV2-기반 재표적화된 바이러스 형질도입을 보여준다. (a)에는 대표적인 면역형광 이미지가 제공되어 있고, (b)에는, CAG 프로모터의 조절 하에 eGFP를 발현하는 2E+5vg/세포의 표시된 AAV로 3일 동안 형질도입한 후 인간 골격 근관의 미오신 중쇄(MyHC) 양성인 영역에서 평균 GFP 발현을 정량화하여 평가한 형질도입 효율이 제공되어 있다. 형질도입 효율은 미오신 중쇄(MyHC) 양성인 근관 영역 내에서 평균 GFP 형광 강도를 정량화함으로써 평가하였다.

도 5는 인간 골격 근관의 AAV9-기반 재표적화된 바이러스 형질도입을 보여준다. (a)에는 대표적인 면역형광 이미지가 제공되어 있고, (b)에는, CAG 프로모터의 조절 하에 eGFP를 발현하는 2E+5vg/세포의 표시된 AAV로 3일 동안 형질도입한 후 인간 골격 근관의 미오신 중쇄(MyHC) 양성인 영역에서 평균 GFP 발현을 정량화하여 평가한 형질도입 효율이 제공되어 있다.

도 6은 분화된 마우스 C2C12 근관의 AAV9-기반 재표적화된 바이러스 형질도입을 보여준다. (a) 대표적인 면역형광 이미지; 및 (b) CAG 프로모터의 조절 하에 eGFP를 발현하는 2E+5vg/세포의 표시된 AAV로 3일 동안 형질도입한, 분화된 마우스 C2C12 근관의 미오신 중쇄(MyHC) 양성인 영역에서 평균 GFP 발현을 정량화하여 평가한 형질도입 효율.

도 7은 CACNG1로 재표적화하여 전신 전달한 AAV2가 생체 내에서 골격근의 항체 의존적 형질도입을 입증함을 보여준다. 그래프는, 골격근 세포 상에서 인간 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 마우스(CACNG1 인간화 마우스); 및 인산염 완충 식염수(PBS)를 정맥내 주입하였거나, 5e11개 바이러스 계농(vg)/동물의 야생형(wt) AAV2 입자, AAV2 탈표적화된 입자, 또는 관심 반딧불이 루시퍼라아제 뉴클레오티드를 갖고, (1) SpyCatcher-항-인간 ASGR1 항체 또는 (2) SpyCatcher-항-인간 CACNG1 항체에 의해 변형된, SpyTag된 AAV2 입자를 정맥내 주입한 야생형 50500 마우스로부터 단리하고, 생체 외에서 이미지를 촬영한 (a) 간, (b) 혀, (c) 횡경막, 또는 (d) 사두근(quad) 조직의 형광 이미지로부터의 평균 휘도 값(양성자/초/cm2/sr)을 제공한다. 이들 AAV2 바이러스 입자는 (a) “SpyTag” 캡시드 단백질 (SpyTag는 10개 아미노산의 링커가 일측에 위치하는 잔기 G453 바로 다음에 삽입됨) 및 (b) SpyTag는 없지만 천연 수용체 결합을 감소시키는 R585A 및 R588A 돌연변이를 함유하는 캡시드를 1:7의 비율로 포함하는 모자이크 바이러스 입자이다. 바이러스는 반딧불이 루시퍼라아제를 형질도입의 마커로서 발현한다. IV 주입 후 5주차에, 이소플루란을 사용하여 마우스를 마취시키고, 루시페린 기질을 주입하고, 7~10분 후에 안락사시켰다. 기관을 채취하고 IVIS 스펙트럼 생체 내 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 이미지를 촬영하였다. 리빙 이미지 소프트웨어(living image software)를 사용해 원시 데이터를 분석하여 평균 방사휘도(광자/초/cm2/sr)를 결정하였다.

도 8은 CACNG1로 재표적화하여 전신 전달한 AAV9가 생체 내에서 골격근의 항체 의존적 형질도입을 입증함을 보여준다. 그래프는, 인간 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 마우스(CACNG1 인간화 마우스)에게 인산염 완충 식염수(PBS)를 정맥내 주입하였거나, 5e10개 바이러스 게놈(vg)/동물의 야생형(wt) AAV9 입자, AAV9 탈표적화된 입자, 또는 관심 반딧불이 루시페라아제 뉴클레오티드를 갖고, (1) SpyCatcher-항-인간 ASGR1 전체 항체, (2) SpyCatcher-항-인간 ASGR1 Fab, (3) SpyCatcher-항-인간 CACNG1 mAb#1 전체 항체, 또는 (4) SpyCatcher-항-인간 CACNG1 mAb#1 Fab에 의해 변형된, SpyTag된 AAV9 입자를 정맥내 주입하고, 이로부터 단리하고, 생체 외에서 이미지를 촬영한 (a) 간, (b) 뒷다리, (c) 사두근(quad), 또는 (d) 혀 조직의 형광 이미지로부터의 평균 휘도 값(양성자/초/cm²/sr)을 제공한다. 이들 AAV9 바이러스 입자는 (a) “SpyTag” 캡시드 단백질 (SpyTag는 10개 아미노산의 링커가 양측에 위치하는 잔기 G453 바로 다음에 삽입됨) 및 (b) SpyTag는 없지만 천연 수용체 결합을 감소시키는 N272A 돌연변이를 함유하는 캡시드를 1:7의 비율로 포함하는 모자이크 바이러스 입자이다. 바이러스는 반딧불이 루시페라아제를 형질도입의 마커로서 발현한다. IV 주입 후 3주차에, 이소플루란을 사용하여 마우스를 마취시키고, 루시페린 기질을 주사하고, 7~10분 후에 안락사시켰다. 생체 외에서 이미지 촬영을 위해 다음 기관을 채취하였다: 간, 뒷다리, 사두근, 및 혀. IVIS 스펙트럼 생체 내 이미징 시스템(PerkinElmer)을 사용하여 기관의 이미지를 촬영하였다. 리빙 이미지 소프트웨어(living image software)를 사용해 원시 데이터를 분석하여 평균 방사휘도(광자/초/cm²/sr)를 결정하였다.

도 9는 1E+11 vg/마우스의 야생형 AAV9; 탈표적화된 AAV9 N272A; 및 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#1 및 mAb#2)에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9를 꼬리 정맥을 통해 주입한 후 3주차에 (a) CACNG1^{hu/hu}, (b) WT C57BL/6, 및 (c) D2-mdx 마우스의 간 및 대퇴사두근에서 GFP 유전자 발현을 나타낸다. Taqman-기반 qPCR 검정을 통해 GFP 발현을 정량화하고 내인성 대조군으로서의 Rplp0에 대해 정규화하였다. GFP mRNA 발현은 각 조직/마우스 계통 별로 WT AAV9에 대해 표시되어 있다.

도 10은 1E+11 vg/마우스의 야생형 AAV9; 탈표적화된 AAV9 N272A; 및 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#1, mAb#2, 및 mAb#3)에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 꼬리 정맥을 통해 주입한 후 3주차에 D2-mdx 마우스의 전경골근 및 비복근/족저근/비장근의 대표적인 면역형광 이미지를 나타낸다. WT AAV9; 탈표적화된 AAV9 N272A; 무관한 항체(hASGR1)에 접합된 AAV9; 및 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 항체(mAb#1)에 접합된 AAV9가 주입된 D2-mdx 마우스는 이들 근육에서 제한된 GFP 형광을 나타내는 반면, 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 입자가 주입된 마우스는 근육 전체에 걸쳐 근섬유의 패치에서 강력한 GFP 형광을 나타낸다.

도 11은 야생형 AAV9, 탈표적화된 AAV9 N272A, 및 CACNG1을 표적화하는 항체에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후, D2-mdx 마우스의 간 및 대퇴사두근에서의 eGFP 발현에 대한 면역조직화학 염색을 보여준다. AAV9 야생형 입자는 D2-mdx 마우스의 간에 형질도입될 수 있는 반면, AAV9 N272A 입자는 간으로부터 탈표적화되고 간에서 GFP를 발현하지 않는다. 무관한 항체(hASGR1)에 접합되었거나, 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 CACNG1-표적화 항체(mAb#1)에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 D2-mdx 마우스는 간 또는 대퇴사두근에서 염색을 거의 나타내지 않는다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 간에서 GFP 염색을 거의 나타내지 않고 대퇴사두근에서 강한 GFP 염색을 나타낸다.

도 12는 야생형 AAV9, 탈표적화된 AAV9 N272A, 및 CACNG1을 표적화하는 항체에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후, D2-mdx 마우스의 비복근/족저근/비장근에서의 eGFP 발현에 대한 면역조직화학 염색을 보여준다. AAV9 야생형 입자는 D2-mdx 마우스의 비복근/족저근/비장근에 낮은 수준으로 형질도입될 수 있는 반면, AAV9 N272A 입자는 제한된 효율로 비복근/족저근/비장근에 형질도입될 수 있다. 무관한 항체(hASGR1)에 접합되었거나, 마우스 CACNG1에 결합하지 않는 인간 CACNG1에 특이적인 CACNG1-표적화 항체(mAb#1)에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 D2-mdx 마우스는 비복근/족저근/비장근에서 염색을 거의 나타내지 않는다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 비복근/족저근/비장근에서 매우 강한 GFP 염색을 나타낸다.

도 13은 야생형 AAV9, 탈표적화된 AAV9 N272A, 및 CACNG1을 표적화하는 항체에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후, D2-mdx 마우스의 전경골근에서의 eGFP 발현에 대한 면역조직화학 염색을 보여준다. AAV9 야생형 입자는 D2-mdx 마우스의 전경골근에 낮은 수준으로 형질도입될 수 있다. AAV9 N272A 입자만을 주입하였거나; 무관한 항체(hASGR1)에 접합되었거나, 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 CACNG1-표적화 항체(mAb#1)에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 D2-mdx 마우스는 전경

골근에서 염색을 거의 나타내지 않는다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 전경골근 주변에서 매우 강한 GFP 염색을 나타낸다.

도 14는 야생형 AAV9, 탈표적화된 AAV9 N272A, 및 CACNG1를 표적화하는 항체에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후, D2-mdx 마우스의 심장 및 허에서의 eGFP 발현에 대한 면역조직화학 염색을 보여준다. AAV9 야생형 입자는 D2-mdx 마우스의 허에 낮은 수준으로 형질도입될 수 있지만, 심장에는 효율적으로 형질도입될 수 있다. AAV9 N272A 입자만을 주입하였거나; 무관한 항체(hASGR1)에 접합되었거나, 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 CACNG1-표적화 항체(mAb#1)에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 D2-mdx 마우스는 허에서 형광을 거의 나타내지 않고, 심장에서 낮은 수준의 형광을 나타낸다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 허에서 매우 강한 GFP 염색을 나타내고, 심장에서는 낮지만 검출 가능한 수준의 형광을 나타낸다.

도 15는 야생형 AAV9, 탈표적화된 AAV9 N272A, 및 CACNG1를 표적화하는 항체에 접합되거나 비표적화 대조군으로서의 hASGR1에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후, D2-mdx 마우스의 비장 및 횡격막에서의 eGFP 발현에 대한 면역조직화학 염색을 보여준다. AAV9 야생형 입자는 D2-mdx 마우스의 횡격막에 낮은 수준으로 형질도입될 수 있다. AAV9 N272A 입자만을 주입하였거나, 무관한 항체(hASGR1, 또는 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 CACNG1-표적화 항체(mAb\$1))에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 D2-mdx 마우스는 횡격막에서 염색을 거의 나타내지 않는다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#2 및 mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 횡격막에서 매우 강한 GFP 염색을 나타낸다. 예상대로, 시험된 AAV 모두에서 비장의 형질도입은 거의 관찰되지 않는다.

도 16은 5'에서 3' 방향으로 다음을 포함하는 단일 가닥(ss) 바이러스 게놈의 예시적인 개략도(축척에 비례하지는 않음)를 제공한다: 141 염기쌍 역위 말단 반복(ITR), CAGG 프로모터, 강화된 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 서열, 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE, Woodchuck Hepatitis Virus Posttranscriptional Regulatory Element), 32 염기쌍 바코드, 인간(h) 성장 호르몬(GH) 폴리A 꼬리, 및 141 염기쌍 ITR.

도 17은 도 16에 도시된 바이러스 게놈을 포함하는 AAV9 바이러스 입자를 투여한 후 비인간 영장류(시노몰구스 원숭이)의 생체 내에서 다양한 근육으로의 형질도입이 강화되었음을 나타내는 막대 그래프를 제공하는데, 각각은 도 16에 도시된 바이러스 게놈을 포함하는 야생형 AAV9 바이러스 입자(AAV)와 비교하여 고유한 바코드를 가지며, 항-CACNG1 항체에 의해 재표적화된다. 각각의 후보 AAV를 도 16에 기술된 바와 같이 고유한 바코드화된 게놈으로 패키징하였다. 12개의 후보 바코드 풀을 IV 투여한 후, 표시된 조직을 채취하고, 각 조직으로부터 정제한 총 RNA 중 각 바코드의 상대 풍부도를 차세대 시퀀싱(NGS)을 사용하여 평가하였다. 다음의 여러 조직(x축)에서 각각의 바코드 및 연관된 캡시드에 맵핑된 NGS 판독(Y축)의 백분율이 도시되어 있다 (주입된 바이러스 풀에 대해 정규화됨): 간(좌측 엽) 및 골격근의 하위 집합(횡격막, 상완이두근, 대퇴이두근, 장지신근(EDL), 비복근, 늑간, 비장근, 전경골근, 복횡근, 삼두근, 외측광근, 요근, 허). 여기에 표시된 데이터는 임상시험 중 2마리의 동물의 평균이다. 간에서, AAV9 단독, 및 ASGR1 mAb에 접합된 AAV9 W503A 또는 N272A는 예상대로, 조직에 존재하는 모든 바코드의 대부분을 나타낸다. 골격근 조직에서, CACNG1 표적화 항체에 접합된 탈표적화된 AAV9(N272A 또는 W503A) 캡시드는 조직에 존재하는 모든 바코드의 대부분을 나타내고, 이는 총 바코드의 적은 백분율을 차지하는 AAV9 단독을 증가하였다.

도 18은 uDys5를 발현하는 벡터 게놈 작제물을 사용했을 때, 인간 골격 근관 및 C2C12 마우스 근관의 AAV9-기반 재표적화된 바이러스 형질도입을 보여준다. 그래프는 2E+5vg/세포의 AAV9 WT; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9(N272A)를 3일 동안 형질도입한 후, (a) 인간 근관 및 (b) C2C12 마우스 근관에서 uDys5 mRNA 상대 발현을 정량화함으로써 평가한 형질도입 효율을 제공한다. uDys5 발현은 Taqman-기반 qPCR 검정을 통해 정량화하고 내인성 대조군으로서의 Hprt에 대해 정규화하였다. uDys5 mRNA 발현은 각 세포 유형별로 WT AAV9에 대해 표시되어 있다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 인간 및 마우스 근관 모두에서의 AAV9 WT에 비해 더 높은 수준의 uDys5 mRNA를 생산한다.

도 19는 꼬리 정맥을 통해 1E+12 vg/마우스의 AAV9 WT; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9(N272A)를 주입한 후 5주차에 D2-mdx 마우스의 다수의 조직에서의 uDys5 유전자 발현을 도시한다. uDys5 mRNA 발현은 Taqman-기반 qPCR 검정을 통해 정량화하고 내인성 대조군으로서의 Rplp0에 대해 정규화하였다. uDys5 mRNA 발현은 각 조직별로 WT AAV9에 대해 표시되어 있

다. 인간 및 마우스 CACNG1모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 예상대로 AAV9 WT에 비해 감소된 간의 형질도입을 나타내고, 간에서 AAV9 WT에 비해 극단적으로 낮은 수준의 uDys5 mRNA를 생산한다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 심장에서 AAV9 WT에 비해 더 낮은 수준의 uDys5 mRNA를 생산하지만, 그 수준은 검출 가능하다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자는 조사한 모든 골격근에서 AAV9 WT에 비해 더 높은 수준의 uDys5 mRNA를 생산한다.

도 20은 꼬리 정맥을 통해 $1E+12$ vg/마우스의 야생형 AAV9; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입한 후 5주차에 야생형 DBA2/J 및 D2-mdx 마우스의 비복근 및 심장의 대표적인 면역형광 이미지를 나타낸다. WT AAV9를 주입한 D2-mdx 마우스는 비복근의 근섬유막에서 낮은 수준의 디스트로핀 발현을 나타내고, 심장에서 강력한 발현을 나타내는 반면; 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입한 마우스는 비복근의 근섬유막에서 강력한 디스트로핀 발현을 나타내고, 심장에서 경미한 발현을 나타낸다.

도 21은 꼬리 정맥을 통해 $1E+12$ vg/마우스의 야생형 AAV9; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입한 후 5주차에 D2-mdx 마우스의 대퇴사두근에서 uDys5의 단백질 풍부도를 보여준다. β -액틴을 단백질 로딩 대조군으로서 사용하였고, 단백질 풍부도를 정량화하고 임의의 밀도 단위(A.U.)로서 도표화하였다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입한 마우스는 야생형 AAV9를 주입한 마우스에 비해 실질적으로 더 많은 uDys5 단백질을 나타낸다.

도 22는 꼬리 정맥을 통해 $1E+12$ vg/마우스의 야생형 AAV9; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입하고 4주차에 D2-mdx 마우스에서 혈청 크레아틴 키나아제(CK) 수준을 보여준다. PBS로 치료한 마우스 및 야생형 AAV9로 치료한 마우스는 치료 후 혈청 CK의 감소를 나타내지 않은 반면, 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자로 치료한 모든 마우스는 혈청 CK의 감소를 나타냈는데, 이는 근육 손상의 감소를 나타낸다.

도 23은 꼬리 정맥을 통해 $1E+12$ vg/마우스의 야생형 AAV9; 또는 CK8 프로모터의 조절 하에 uDys5를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 탈표적화된 AAV9 N272A 입자를 주입하고 12주차에 D2-mdx 마우스에서 최대 앞다리 악력 측정치를 보여준다. 점선은 연령 일치 대조군 DBA/2J 마우스의 악력을 나타낸다. 인간 및 마우스 CACNG1 모두에 결합하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A 입자를 주입한 마우스는 WT AAV9 입자를 주입한 마우스에 비해 강화된 최대 악력을 나타낸다.

도 24는 야생형 AAV9; 또는 CAG 프로모터의 조절 하에 eGFP를 발현하는 CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A를 주입한 후 표시된 시점에 비인간 영장류(시노물구스 원숭이)에서 간 효소 및 보체 경로 바이오마커의 혈청 수준을 보여준다. AAV9 야생형 입자를 투여한 결과, 예상대로, 투여 후 48시간차에 (a) ALT, (b) AST, (c) Bb 및 (d) C3a가 상승한 반면, CACNG1을 표적화하는 항체(mAb#3)에 접합된 AAV9 N272A를 투여한 결과 이들 마커가 상승하지 않았는데, 이는 CACNG1을 표적화하는 항체에 접합된 간-표적화된 AAV9 N272A 입자가 간-향성 야생형 AAV 혈청형에 비해 안전성의 이점을 제공함을 시사한다.

전술한 도면 각각에서:

- "WT"는 야생형, 예를 들어 돌연변이 또는 변형이 없는 AAV 캡시드 단백질을 지칭한다.
- "HBM"은 R585A 및 R588A를 포함하는 캡시드 단백질을 지칭한다. 모든 "기준"/"비표적화된" AAV2 캡시드 단백질, 예를 들어 SpyTag 변형이 없는 AAV 캡시드 단백질은 R585A 및 R588A만을 포함한다. SpyCatcher 융합된 항체에 SpyTag가 결합된 것을 나타내는 전술한 도면에서의 모든 AAV2 캡시드 단백질은 R484A, R487A, R585A, R588A, 및 K532A 돌연변이를 추가로 포함한다.
- "N272A"는 N272A 돌연변이를 포함하는 캡시드를 지칭한다. 전술한 도면에서, 모든 "기준"/"표적화된" AAV9 캡시드 단백질, 예를 들어 SpyTag 변형이 없는 AAV9 캡시드 단백질은 N272A 돌연변이를 포함한다. 전술한 도면에서, SpyTag 변형을 갖는 모든 AAV9 캡시드 단백질은 W503A 돌연변이를 추가로 포함하지만 N272A 돌연변이는 포함하지 않는다.
- AAV와 연관된 "항 CACNG1", "CACNG1", 또는 "CACNG1 mAb"는, 10개 아미노산의 링커가 양측에 위치한 잔기 G453 바로 다음에 SpyTag 펩티드의 삽입을 포함하는 AAV 바이러스 캡시드를 지칭하며, 여기서 SpyTag 펩티드는 이소캡티드 결합에 의해, CACNG1에 특이적으로 결합하는 항-CACNG1 항체(또는 이의 Fab 단편)에 융합된

SpyCatcher에 결합된다.

전술한 도면에서, 이소펩티드 결합에 의해, CACNG1에 특이적으로 결합하는 항-CACNG1 항체(또는 이의 Fab 단편)에 융합된 SpyCatcher에 SpyTag 펩티드가 결합된 것을 나타내는 모든 AAV 입자는 SpyTag 변형된 바이러스 캡시드 단백질과 "탈표적화된" 바이러스 단백질을 1:7 비율로("1/8"로 표시됨) 포함하는 모자이크 바이러스 캡시드를 포함한다.

- "CACNG1 mAb#1"은 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 항-CACNG1 항체를 지칭한다.
- "CACNG1 mAb#2"는 인간, 원숭이, 및 마우스 CACNG1에 결합하는 항-CACNG1 항체를 지칭한다.
- "CACNG1 mAb#3"은 인간, 원숭이, 및 마우스 CACNG1에 결합하는 항-CACNG1 항체를 지칭한다.
- "CACNG1 mAb#4"는 인간, 원숭이, 및 마우스 CACNG1에 결합하는 항-CACNG1 항체를 지칭한다.
- "CACNG1 mAb#5"는 인간 및 원숭이 CACNG1에 결합하지만, 마우스 CACNG1에는 결합하지 않는 항-CACNG1 항체를 지칭한다.
- 293 세포 또는 마우스와 관련하여 "CACNG1"은 인간 CACNG1을 발현하도록 유전적으로 변형된 293 세포 또는 마우스를 각각 지칭한다.
- 내인성 *Cacng1* 서열이 *Cacng1* 서열로 동형접합 치환된 마우스는 "CACNG1^{hu/hu}"로서 지칭한다.
- 마우스와 관련하여 "50500"은 CACNG1 마우스에 대한 계통 일치 대조군을 지칭한다.
- AAV와 연관된 "항 ASGR1", "ASGR1", 또는 "ASGR1 mAb"는, 10개 아미노산의 링커가 양측에 위치한 잔기 G453 바로 다음에 SpyTag 펩티드의 삽입을 포함하는 AAV 바이러스 캡시드를 지칭하며, 여기서 SpyTag 펩티드는 이소펩티드 결합에 의해, ASGR1에 특이적으로 결합하는 항-ASGR1 항체 또는 이의 Fab 단편에 융합된 SpyCatcher에 결합된다.

전술한 도면에서, 이소펩티드 결합에 의해, ASGR1에 특이적으로 결합하는 항-ASGR1 항체(또는 이의 Fab 단편)에 융합된 SpyCatcher에 SpyTag 펩티드가 결합된 것을 나타내는 모든 AAV 입자는 SpyTag 변형된 바이러스 캡시드 단백질과 "탈표적화된" 바이러스 캡시드 단백질을 1:7 비율로("1/8"로 표시됨) 포함하는 모자이크 바이러스 캡시드를 포함한다.

- 293 세포 또는 마우스와 관련하여 "ASGR1"은 인간 ASGR1을 발현하도록 유전적으로 변형된 293 세포 또는 마우스를 각각 지칭한다.
- "h"는 "인간"을 지칭한다.
- "Vh"는 항체 중쇄를 지칭한다.
- "Vk"는 항체 경쇄를 지칭한다.
- "D2-mdx"는 뒤시엔느 근 이영양증에 대한 마우스 모델을 지칭한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 골격근은 신체에서 가장 큰 기관으로서, 총 체질량의 약 40%를 포함한다. 골격근은 인체에서 3개의 유의한 근육 조직 중 하나이다. 각각의 골격근은 결합 조직 외피에 의해 함께 랩핑된 수천 개의 근섬유로 구성된다.

[0018] 골격근의 주요 기능은 고유한 흥분-근수축 결합 과정을 통해 일어난다. 근육은 골 건(bone tendon)에 부착되어 있으므로, 근육의 수축은 해당 골의 운동으로 이어지고, 이는 특정 운동을 수행할 수 있게한다. 골격근은 또한 구조적 지지를 제공하고 신체의 자세를 유지하는 데 도움을 준다. 골격근은 기관 특이적 단백질을 합성하기 위해 신체의 상이한 기관에 의해 사용될 수 있는 아미노산에 대한 저장원으로서의 작용도 한다. 골격근은 포도당을 글리코겐 형태로 저장하는 저장원으로서의 작용도 한다. 골격근은 또한 체온항상성(thermostasis)을 유지하는 데 있어서 중심 역할을 하며, 배고플 때 에너지원의 역할을 한다. 따라서, 골격근은 운동, 체온 조절, 및 전신 대사 조절에 있어서 중요한 역할을 한다.

[0019] 많은 근육 질환에서 뿐만 아니라 정상적인 노화가 진행되는 동안, 골격근 조직의 크기와 기능이 감소되어 기능

적 이동성을 손상시키고; 중증 근육 질환의 경우, 장기적 장애 및 조기 사망을 초래한다.

- [0020] 근육 소모성 질환 및 유전적 근육 질환에 대한 치료는 일반적으로 다음과 같은 광범위한 작용 요법으로 이루어진다: 근육 소모성 질환에 대한 테스토스테론 요법, 근 이영양증에 대한 글루코코르티코이드, 및 근육 질환(예: X-연관 근관 근병증(XLMTM), 뒤시엔느 근 이영양증(DMD), 근긴장성 이영양증(DM1), 1형 관절낭상완근 이영양증(FSHD), 선천성 근육 이영양증 1A형(MDC1A), 지대근 이영양증, 및 디스트로글리칸병증, 등)의 치료를 위한 전신 AAV 전달. 이들 요법의 비표적화 전달은 특정 근육의 흡수 효율을 감소시키면서, 다른 기관에 상당히 유해한 표적외 효과(off-target effect)도 야기한다.
- [0021] 치료 페이로드의 근육 전달을 향상시키고 표적외 효과를 완화시키기 위해, 칼슘 전압-개폐식 보조 서브유닛 감마 1(CACNG1) 또는 포유류 카드헤린 15(CAD15)와 같은 근육 특이적 표면 단백질을 표적화하는 바이러스 입자, 예를 들어 AAV 바이러스 입자가 본원에 기술된다.
- [0022] 전압 의존적 칼슘 채널은 일반적으로 5개의 서브유닛으로 구성된다. CACNG1 유전자에 의해 암호화된 단백질은 이들 서브유닛 중 하나를 나타낸다. 또한, CACNG1 유전자에 의해 암호화된 단백질인 감마(gamma)는 2개의 알려진 감마 서브유닛 단백질 중 하나이다. 이러한 특정 감마 서브유닛은 골격근 1,4-디하이드로피리딘-민감성 칼슘 채널의 일부이고 흥분-근수축 결합에 역할을 하는 일체형 막 단백질이다. 이 유전자는 PMP-22/EMP/MP20 계열의 기능적으로 다양한 8원 단백질 하위계열의 일부이며, 막관통 AMPA 수용체 조절 단백질(TARP)로서 기능하는 2개의 계열 구성원과 함께 클러스터 내에 위치한다. CACNG1은 골격근에서 고도로 및 특이적으로 발현된다. 인간 CACNG1을 암호화하는 유전자(CACNG1)는 염색체 17의 긴 아암 상에 위치한다. CACNG1은 4개의 엑손을 포함하고 대략 12,244 염기의 길이이다. 인간 CACNG1 유전자에 대한 예시적인 서열에는 NCBI 수탁번호 NM_0007582.2(서열번호 241)가 부여되어 있다. 예시적인 인간 CACNG1 단백질에는 UniProt 수탁 번호 070578(서열번호 242)가 부여되어 있다.
- [0023] 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.
- [0024] 단수 형태(“a”, “an”, 및 “the”)는 문맥상 명시적으로 달리 언급하지 않는 한 복수의 참조를 포함한다. 따라서, 예를 들어, “방법”에 대한 참조는 하나 이상의 방법 및/또는 본 발명에서 설명 및/또는 본 명세서를 읽으면 당업자에게 명백해질 종류의 단계를 포함한다.
- [0025] “동일성 백분율(%)” 등은 단백질의 전장 또는 이의 일부에 걸쳐 아미노산 또는 뉴클레오티드 서열에 대해 쉽게 결정될 수 있다. “일부”는 각각 적어도 약 5개 아미노산 또는 24개 뉴클레오티드의 길이일 수 있고, 각각 최대 약 700개 아미노산 또는 2100개 뉴클레오티드의 길이일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 아테노-연관 바이러스 간의 “동일성”, “상동성” 또는 “유사성”을 지칭할 때, “동일성”, “상동성” 또는 “유사성”은 “정렬된” 서열을 참조하여 결정된다. “정렬된” 서열 또는 “정렬”은 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭하며, 종종 기준 서열과 비교하여 누락되거나 추가된 염기 또는 아미노산에 대한 보정을 함유한다.
- [0026] 정렬은 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다양한 다중 서열 정렬 프로그램 중 어느 하나를 사용하여 수행될 수 있다. “Clustal X”, “MAP”, “PIMA”, “MSA”, “BLOCKMAKER”, “MEME”, 및 “Match-Box” 프로그램과 같은 서열 정렬 프로그램을 아미노산 서열에 대해 이용할 수 있다. 일반적으로, 이들 프로그램 중 어느 하나가 기본 설정으로 사용되지만, 당업자는 필요에 따라 이러한 설정을 변경할 수 있다. 대안적으로, 당업자는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 것과 적어도 동일성 또는 정렬 수준이 같은 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어 J. D. Thomson 등의 문헌[Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999)] 참조.
- [0027] 핵산 서열에 대해 다수의 서열 정렬 프로그램을 이용할 수도 있다. 이러한 프로그램의 예는 “Clustal W”, “CAP Sequence Assembly”, “MAP”, 및 “MEME”를 포함하며, 이들은 인터넷 상의 웹 서버를 통해 액세스할 수 있다. 이러한 프로그램에 대한 다른 공급원은 당업자에게 알려져 있다. 대안적으로, 벡터 NTI 유틸리티(Vector NTI utilities)도 사용된다. 전술한 프로그램에 포함된 것들을 포함하여, 뉴클레오티드 서열 동일성을 측정하는데 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다수의 알고리즘이 또한 존재한다. 또 다른 예로서, GCG 버전 6.1 내의 프로그램인 FASTA™를 사용하여 폴리뉴클레오티드 서열을 비교할 수 있다. FASTA™는 쿼리 및 검색 서열 사이의 가장 중첩된 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다. 예를 들어, 본원에 참조로서 통합된 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같이, 핵산 서열들 간의 서열 동일성 백분율은 FASTA™를 이의 기본 파라미터(6의 단어 크기,

및 스코어링 매트릭스를 위한 NOPAM 인자)들과 함께 사용해 결정할 수 있다.

[0028] “상당한 동일성”은 적어도 90%, 예를 들어 적어도 93%, 예를 들어 적어도 95%, 예를 들어 적어도 96%, 예를 들어 적어도 97%, 예를 들어 적어도 98%, 예를 들어 적어도 99%, 또는 예를 들어 적어도 100% 동일한 아미노산 또는 핵산 서열 정렬을 포함한다.

[0029] 용어 “키메라”는 적어도 2개의 상이한 AAV 혈청형, 예를 들어 유전자의 일부 또는 적어도 제1 및 제2 AAV의 폴리펩티드의 일부로부터 유래된 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 각각 포함하는 기능적 유전자 또는 폴리펩티드를 포함하며, 여기서 적어도 제1 및 제2 부분은 작동 가능하게 연결되어 기능적 아미노산을 암호화하는 기능적 키메라 AAV 핵산을 형성한다. 키메라(chimeric)로서 명시되지 않는 한, 뉴클레오티드 서열, 유전자, 폴리펩티드, 및 아미노산은 뉴클레오티드 서열, 유전자, 폴리펩티드, 및 아미노산이 단일 AAV 혈청형의 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 각각 상당한 동일성을 갖는 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함한다는 점에서 비-키메라(non-chimeric)로서 간주된다.

[0030] 용어 “항체(antibody)”는 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 도메인(V_H) 및 중쇄 불변 영역(C_H)을 포함한다. 중쇄 불변 영역은 적어도 3개의 도메인 C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} 및 임의로 CH_4 를 포함한다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 도메인(C_H) 및 경쇄 불변 영역(C_L)을 포함한다. 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 프레임워크 영역(FR)으로 불리는 보다 보존적인 영역이 사이 사이에 배치되는 상보성 결정 영역(CDR)으로 불리는 초가변성 영역으로 다시 나뉘질 수 있다. 각각의 중쇄 및 경쇄 가변 도메인은 아미노 말단으로부터 카르복시 말단 방향으로 다음의 순서로 배열된 3개의 CDR과 4개의 FR을 포함한다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (중쇄 CDR은 HCDR1, HCDR2 및 HCDR3으로 약칭될 수 있고; 경쇄 CDR은 LCDR1, LCDR2 및 LCDR3으로 약칭될 수 있음). 전형적인 사량체 항체 구조는 2개의 동일한 항원 결합 도메인을 포함하며, 이들 각각은 V_H 및 V_L 도메인의 결합에 의해 형성되고, 이들 각각은 C_H 및 C_L 도메인 각각과 함께 항체 Fv 영역을 형성한다. 단일 도메인 항체는 단일 항원 결합 도메인, 예를 들어, V_H 또는 V_L 을 포함한다. 항체의 항원 결합 도메인, 예를 들어, 항원의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 인식하고 이에 결합하는 항체의 부분은 “파라토프”로도 지칭된다. 이는 항체의 Fv 영역의 작은 영역(5 내지 10개의 아미노산)으로서, 단편 항원 결합의 일부(Fab 영역)이며, 항체의 중쇄 및/또는 경쇄의 일부를 함유할 수 있다. 파라토프는, 파라토프가 높은 친화도로 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합할 때 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 특이적으로 결합한다. 용어 “고 친화도” 항체는, 특이적 결합 쌍의 표적 제1 구성원에 대해 약 10^{-9} M 이하(예를 들어, 약 1×10^{-9} M, 1×10^{-10} M, 1×10^{-11} M, 또는 약 1×10^{-12} M)의 K_D 를 갖는 항체를 지칭한다. 일 구현예에서, K_D 는 표면 플라즈몬 공명, 예를 들어, BIACORE™에 의해 측정되고; 다른 구현예에서, K_D 는 ELISA에 의해 측정된다.

[0031] 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. CDR은 체세포 돌연변이 (예를 들어, 동물의 생식선에서 암호화되는 서열에 따라 달라짐), 인간화, 및/또는 아미노산 치환, 부가, 또는 결실로 변형될 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.

[0032] “경쇄(light chain)”라는 문구는 임의의 유기체의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 인간 λ 및 μ 경쇄 및 VpreB, 및 대용(surrogate) 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 (V_L) 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 가변 도메인, 및 경쇄 불변 영역을 포함한다. 경쇄 가변 도메인은, 생식선에 존재하는 V 및 J 분절의 레파토리로부터 유래된 V_L 및 J_L 분절을 일반적으로 포함하는 경쇄 가변 영역 유전자 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V 및 J 경쇄 분절에 대한 서열, 위치 및 명명법은 IMGT 데이터베이스인 www.imgt.org에서 찾을 수 있다. 경쇄는 예를 들어 이들이 나타나는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 특이적 결합 쌍의 제1 또는 제2의

제1 구성원 중 어느 하나에 선택적으로 결합하지 않는 것을 포함한다. 경쇄는 또한 이들이 나타나는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것들을 포함하거나, 중쇄 또는 또 다른 경쇄가 상기 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것을 돕는다. 공통 경쇄 또는 범용 경쇄는 인간 V λ 1-39J λ 유전자 또는 인간 V λ 3-20J λ 유전자로부터 유래된 것들을 포함하고, 이들의 체세포 돌연변이된(예를 들어, 친화도 성숙된) 버전을 포함한다. 예시적인 인간 V κ 분절은 인간 V λ 1-39 유전자 분절, 인간 V λ 3-20 유전자 분절, 인간 V μ 1-40 유전자 분절, 인간 V μ 1-44 유전자 분절, 인간 V μ 2-8 유전자 분절, 인간 V μ 2-14 유전자 분절, 및 인간 V μ 3-21 유전자 분절을 포함하고, 이들의 체세포 돌연변이된(예를 들어, 친화도 성숙된) 버전을 포함한다. 하나의 유기체(예를 들어, 인간 또는 설치류, 예컨대 랫트 또는 마우스; 또는 조류, 예컨대 닭) 유래의 가변 도메인 및 동일하거나 상이한 유기체(예를 들어, 인간 또는 설치류, 예를 들어, 랫트 또는 마우스; 예컨대 닭) 유래의 불변 영역을 포함하는 경쇄를 제조할 수 있다.

[0033] 용어 “약(about)” 또는 “대략(approximately)”은 통계학적으로 유의미한 값의 범위 내에 있는 것을 포함한다. 이러한 범위는 주어진 값 또는 범위의 크기 몇 배 이내, 바람직하게는 50% 이내, 더 바람직하게는 20% 이내, 더욱 더 바람직하게는 10% 이내, 및 보다 더 바람직하게는 5% 이내일 수 있다. 용어 “약” 또는 “대략”에 의해 포함된 허용가능한 편차는 연구 중인 특정 시스템에 따라 달라지며, 당업자에 의해 쉽게 이해될 수 있다.

[0034] “중쇄” 또는 “면역글로불린 중쇄”라는 문구는 임의의 유기체의 면역글로불린 중쇄 불변 영역 서열을 포함하여, 면역글로불린 중쇄 서열을 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, 가변 도메인에 이어서 (N-말단에서 C-말단 방향으로) C μ 1 도메인, 힌지, C μ 2 도메인 및 C μ 3 도메인을 갖는다. 중쇄의 기능성 단편은 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 특이적으로 인식할 수 있고 (예, 마이크로몰, 나노몰 또는 피코몰 범위의 K $_D$ 로 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 인식함), 세포로부터 발현 및 분비가 가능하고, 적어도 하나의 CDR을 포함하는, 단편을 포함한다. 중쇄 가변 도메인은, 생식선에 존재하는 V H , D H , 및 J H 분절의 레파토리로부터 유래된 V H , D H , 및 J H 분절을 일반적으로 포함하는 가변 영역 유전자 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V, D 및 J 중쇄 분절에 대한 서열, 위치 및 명명법은 IMGT 데이터베이스에서 찾을 수 있으며, 인터넷을 통해 “www.imgt.org” URL에 접속할 수 있다.

[0035] 용어 “중쇄만의 항체(heavy chain only antibody)”, “중쇄만의 항원 결합 단백질(heavy chain only antigen binding protein)”, “단일 도메인 항원 결합 단백질(single domain antigen binding protein)”, “단일 도메인 결합 단백질(single domain binding protein)” 등은 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린-유사 사슬을 포함하는 단량체 또는 동종이량체 면역글로불린 분자를 지칭한다(상기 가변 도메인은 중쇄 불변 영역에 일반적으로 기능성 C μ 1 도메인이 없기 때문에 경쇄와 결합할 수 없음). 따라서, 용어 “중쇄만의 항체”, “중쇄만의 항원 결합 단백질”, “단일 도메인 항원 결합 단백질”, “단일 도메인 결합 단백질” 등은 기능성 C μ 1이 없는 중쇄 불변 영역에 작동가능하게 연결된 가변 도메인을 포함하는 면역글로불린 유사 사슬 중 하나를 포함하는 단량체 단일 도메인 항원 결합 단백질, 또는 (ii) 기능성 C μ 1이 없는 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 가변 도메인을 각각 포함하는 2개의 면역글로불린 유사 사슬을 포함하는 동종이량체 단일 도메인 항원 결합 단백질 모두를 포함한다. 다양한 양태에서, 동종이량체 단일 도메인 항원 결합 단백질은 2개의 동일한 면역글로불린 유사 사슬을 포함하며, 이들 각각은 기능성 C μ 1이 없는 동일한 중쇄 불변 영역에 작동 가능하게 연결된 동일한 가변 도메인을 포함한다. 추가적으로, 단일 도메인 항원 결합 단백질의 각 면역글로불린 유사 사슬은, 중쇄 가변 영역 유전자 분절(예: V H , D H , J H), 경쇄 유전자 분절 (예를 들어, V L , J L), 또는 이들의 조합으로부터 유래될 수 있고 중쇄 불변 영역 유전자, 예를 들어, IgG, IgA, IgE, IgD, 또는 이들의 조합의 C μ 1 암호화 서열(및 임의로는 힌지 영역)에서 결실 또는 불활성화 돌연변이를 포함하는 중쇄 불변 영역(C μ) 유전자 서열에 연결될 수 있는 가변 도메인을 포함한다. 중쇄 유전자 분절로부터 유래된 가변 도메인을 포함하는 단일 도메인 항원 결합 단백질은 “V H -단일 도메인 항체” 또는 “V H -단일 도메인 항원 결합 단백질”로서 지칭될 수 있으며, 이에 관해서는, 예를 들어, 미국 특허 제8,754,287호; 미국 특허 공개 제20140289876호; 제20150197553호; 제20150197554호; 제20150197555호; 제20150196015호; 제20150197556호 및 제20150197557호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 경쇄 유전자 분절로부터 유래된 가변 도메인을 포함하는 단

일 도메인 항원 결합 단백질은 “ V_L -단일 도메인 항원 결합 단백질”로서 지칭될 수 있으며, 이에 관해서는, 예를 들어, 미국 특허 공개 제20150289489호를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다.

[0036] “경쇄(light chain)”라는 문구는 임의의 유기체의 면역글로불린 경쇄 서열을 포함하며, 달리 명시되지 않는 한 인간 카파(κ) 및 람다(λ) 경쇄 및 VpreB, 및 대응 경쇄를 포함한다. 경쇄 가변 (V_L) 도메인은 달리 명시되지 않은 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 가변 도메인, 및 경쇄 불변 영역 아미노산 서열을 포함한다. 경쇄 가변 도메인은, 생식선에 존재하는 V 및 J 유전자 분절의 레파토리로부터 유래된 경쇄 V_L 및 J_L 유전자 분절을 일반적으로 포함하는, 경쇄 가변 영역 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된다. 다양한 유기체에 대한 V 및 J 유전자 분절에 대한 서열, 위치 및 명명법은 IMGT 데이터베이스에서 찾을 수 있으며, 인터넷을 통해 “www.imgt.org” URL에 접속할 수 있다. 경쇄는, 예를 들어, 이들이 나타나는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 특이적 결합 쌍의 제1 또는 제2의 제1 구성원 중 어느 하나에 선택적으로 결합하지 않는 것을 포함한다. 경쇄는 또한 이들이 나타나는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것들을 포함하거나, 중쇄가 상기 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것을 돕는다. 경쇄는 또한 이들이 나타나는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 결합 단백질에 의해 선택적으로 결합된 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것들을 포함하거나, 중쇄가 상기 하나 이상의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원에 결합하고 인식하는 것을 돕는다. 공통 경쇄 또는 범용 경쇄는 인간 $V\lambda 1$ -39J $\lambda 5$ 유전자 또는 인간 $V\lambda 3$ -20J $\lambda 1$ 유전자로부터 유래된 것들을 포함하고, 이들의 체세포 돌연변이된(예를 들어, 친화도 성숙된) 버전을 포함한다.

[0037] 본원에서 사용되는 바와 같이, “작동가능하게 연결된(operably linked)”이라는 어구는, 서로 직접적으로 또는 간접적으로 상호 작용하거나, 달리 서로 협력하여 생물학적 이벤트에 참여하는 구성 요소 또는 성분의 (예를 들어, 3차원 공간에서의) 물리적 병치를 포함하며, 이러한 이러한 상호 작용 및/또는 협력은 병치에 의해 달성하거나 허용된다. 예를 하나 들자면, 핵산 내의 조절 요소(예를 들어, 발현 조절 서열)은, 이 서열의 존재 또는 부재가 코딩 서열의 발현 및/또는 활성에 영향을 미치도록 코딩 서열에 대해 상대적으로 위치되는 경우, 코딩 서열에 “작동 가능하게 연결된” 것으로 일컬어진다. 많은 구현예에서, “작동 가능한 연결”은 관련 구성 요소 또는 성분들 서로 간의 공유 연결을 포함한다. 당업자는, 일부 구현예에서, 효과적인 작동 가능한 연결을 달성하는 데 공유 연결이 필요한 것은 아니라는 것을 쉽게 이해할 것이다. 예를 들어, 작동 가능하게 함께 연결된 단백질은, 예를 들어 공유 결합 또는 비공유 결합을 통해 서로 결합될 수 있다. 비제한적인 예로서, 본원에 기술된 바와 같은 캡시드 단백질은 표적화 리간드에 작동 가능하게 연결될 수 있으며, 여기서 캡시드 단백질은 표적화 리간드에 비공유 결합되거나, 표적화 리간드에 비공유 결합되며, 임의로 캡시드 단백질과 표적화 리간드 사이에는 스캐폴드 및/또는 어댑터가 있거나 없을 수 있다. 또 다른 예로서, 일부 구현예에서, 조절 대상 코딩 서열과 작동 가능하게 연결된 핵산 조절 요소는 관심 뉴클레오타이드와 인접한다. 대안적으로 또는 추가적으로, 일부 구현예에서, 하나 이상의 이러한 조절 요소는 트랜스에서 작용하거나 일정 거리를 두고 이격되어 작용하여 관심 코딩 서열을 조절한다. 일부 구현예에서, 본원에서 사용되는 바와 같은 용어 “조절 요소”는 발현 조절 서열이 연결되는 코딩 서열의 발현 및 프로세싱을 수행하는 데 필요하고/하거나 충분한 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일부 구현예에서, 조절 요소는 다음이거나 이를 포함할 수 있다: 적절한 전사 개시 서열, 종결 서열, 프로모터 서열 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 신호와 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증진하는 서열(예: Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 증진하는 서열; 및/또는, 일부 구현예에서는, 단백질 분비를 증진하는 서열. 일부 구현예에서, 하나 이상의 조절 요소는 특정 숙주 세포 또는 유기체, 또는 이들의 유형에서 우선적으로 또는 배타적으로 활성이다. 예를 하나 들자면, 원핵생물에서, 조절 요소는 일반적으로 프로모터, 리보솜 결합 부위, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있고; 진핵생물의 경우, 많은 구현예에서, 조절 요소는 일반적으로 프로모터, 인핸서, 및/또는 전사 종결 서열을 포함할 수 있다. 당업자는, 많은 구현예에서, “조절 요소”란 용어가 발현과 프로세싱에 필수적으로 존재해야 하는 성분을 지칭하고, 일부 구현예에서는, 존재하는 것이 발현에 유리한 성분(예를 들어, 리더 서열, 표적화 서열, 및/또는 융합 파트너 서열을 포함함)을 포함한다는 것을 맥락 상 이해할 것이다.

[0038] “재표적화(retargeting)” 또는 “재유도(redirecting)”는, 야생형 입자가 조직 내의 여러 개의 세포 및/또는 유기체 내의 여러 개의 기관을 표적화하는 시나리오를 포함할 수 있으며, 조직 또는 기관의 일반적인 표적화는 이중 아미노산의 삽입에 의해 감소 내지는 제거되며, 조직 내의 보다 특이적인 세포 또는 유기체 내의 특이적인 기관에 대한 재표적화는 특이적 세포에 의해 발현되는 마커에 결합하는 표적화 리간드로 (예를 들어, 표적

화 리간드를 통해) 달성된다. 이러한 재표적화 또는 재유도는, 야생형 입자가 조직을 표적화하는 시나리오를 포함할 수도 있으며, 조직의 표적화는 이중 아미노산의 삽입에 의해 감소 내지는 제거되고, 완전히 다른 조직에 대한 재표적화는 표적화 리간드로 달성된다.

[0039] “특이적 결합 쌍”, “결합 쌍”, “단백질:단백질 결합 쌍” 상호작용하여 결합(예를 들어 에피토프를 인식하는 항체의 제1 구성원인 에피토프와 제2 구성원인 항원 결합 부분 사이의 비공유 결합; 예를 들어 이소펩티드 결합을 형성할 수 있는 단백질들 간의 공유 결합; 서로를 인식하고, 단백질 트랜스-스플라이싱의 프로세스를 통해 측면에 위치한 단백질들의 결합을 매개하고 이들만을 제거하는 분할 인테인)을 형성하는 2개의 구성원(예: 제1 구성원(예: 제1 폴리펩티드) 및 제2 동족 구성원(예: 제2 폴리펩티드))을 포함한다. 일부 구현예에서, 용어 “동족(cognate)”은 함께 기능하는 성분을 지칭한다. 에피토프 및 이에 대한 동족 항체, 특히 검출 가능한 표지(예를 들어, c-myc)로서 작용할 수도 있는 에피토프는 당업계에 잘 알려져 있다. 공유 이소펩티드 결합을 형성하기 위해 상호 작용할 수 있는 특이적 단백질:단백질 결합 쌍은 Veggiani 등의 문헌[(2014) *Trends Biotechnol.* 32:506]에 검토되어 있고, SpyTag:SpyCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002; SpyTag:KTag; isopeptag:pilin C, SnoopTag:SnoopCatcher 등, 및 이들의 변이체와 같은 단백질:단백질 결합 쌍을 포함한다. 일반적으로, 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원은, 일반적으로 30개 미만의 아미노산 길이이고, 제2 동족 단백질과 자발적 공유 이소펩티드 결합을 형성하는 단백질:단백질 결합 쌍의 구성원을 지칭하며, 여기서 제2 동족 단백질은 일반적으로 크지만, SpyTag:KTag system에서와 같이 30개 미만의 아미노산 길이일 수도 있다.

[0040] 용어 “이소펩티드 결합”은 카르복실 또는 카르복사미드기 및 아미노기 사이의 아미드 결합을 지칭하며, 이들 중 적어도 하나는 단백질 주사슬로부터 유래되지 않거나 대안적으로 볼 때 단백질 골격의 일부가 아니다. 이소펩티드 결합은 단일 단백질 내에서 형성할 수 있거나 두 개 펩티드 또는 펩티드와 단백질 사이에서 생길 수 있다. 따라서, 이소펩티드 결합은 단일 단백질 내 분자 내에서 형성할 수 있거나, 분자 간에서, 즉, 두 펩티드/단백질 분자 사이에서, 예를 들어, 두 펩티드 링커 사이에서 형성할 수 있다. 통상적으로, 이소펩티드 결합은 리신 잔기와 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민, 또는 글루탐산 잔기 또는 단백질 또는 펩티드 사슬의 말단 카르복실기 사이에서 생길 수 있거나, 단백질 또는 펩티드 사슬의 알파-아미노 말단과 아스파라긴, 아스파르트산, 글루타민 또는 글루탐산 사이에서 생길 수 있다. 이소펩티드 결합에 관련된 쌍의 각각의 잔기는 본원에서 반응성 잔기로서 지칭된다. 본 발명의 바람직한 실시예에서, 이소펩티드 결합은 리신 잔기와 아스파라긴 잔기 사이 또는 리신 잔기와 아스파르트산 잔기 사이에 형성될 수 있다. 구체적으로, 이소펩티드 결합은 리신의 측쇄 아민과 아스파라긴의 카르복사아미드기 또는 아스파르트산염의 카르복실기 사이에서 생길 수 있다.

[0041] SpyTag:SpyCatcher 시스템은 각각이 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 미국 특허 제9,547,003호 및 Zaveri 등의 문헌[(2012) *PNAS* 109:E690-E697]에 기술되어 있고, 화농성연쇄구균(*Streptococcus pyogenes*) 피브로넥틴 결합 단백질인 FbaB의 CnaB2 도메인으로부터 유래한다. 도메인을 분할함으로써, Zakeri 등은 서열 AHIVMVDAYKPTK(서열번호 243)를 가진 펩티드 “SpyTag”를 수득하였는데, 이는 서열번호 244에 제시된 아미노산 서열을 가진 112개의 아미노산 폴리펩티드인 이의 동족 단백질 “SpyCatcher”에 대한 아미드 결합을 형성한다. (전술한 Zakeri 등의 (2012) 문헌 참조). CnaB2 도메인으로부터 유래된 추가의 특이적 결합 쌍은 SpyTag:KTag이며, SpyLigase의 존재 하에 이소펩티드 결합을 형성한다. (Fierer의 문헌[(2014) *PNAS* 111:E1176-1181]) SpyLigase는, 반응성 리신을 함유하는 SpyCatcher로부터 β 가닥을 잘라냄으로써 조작하여, 아미노산 서열 ATHIKFSKRD(서열번호 245)를 갖는 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원의 10개 잔기인 KTag를 생성하였다. SpyTag002:SpyCatcher002 시스템은 Keeble 등의 문헌[(2017) *Angew Chem Int Ed Engl* 56:16521-25]에 기술되어 있고, 그 전체는 본원에 참조로서 통합된다. SpyTag002는 서열번호 255로서 제시된 아미노산 서열 VPTIVMVDAYKRYK를 가지며, SpyCatcher002에 결합한다. SpyTag003은 서열번호 259로서 제시된 아미노산 서열 RGVPHIVMVDAYKRYK를 가지며, SpyCatcher003에 결합한다.

[0042] SnoopTag:SnoopCatcher 시스템은 Veggiani의 문헌[(2016) *PNAS* 113:1202-07]에 기술되어 있다. 폐렴구균(*Streptococcus pneumoniae*)의 접착부인 RrgA의 D4 Ig 유사 도메인을 분할하여 SnoopTag(잔기 734~745)와 SnoopCatcher(잔기 749~860)를 형성하였다. SnoopTag 및 SnoopCatcher를 인큐베이션하여 상보적 단백질들 사이에서 특이적인 자발적 이소펩티드 결합을 유도한다. 전술한 Veggiani의 (2016) 문헌 참조.

[0043] isopeptag:pilin-C 특이적 결합 쌍은 화농성 연쇄상구균(*Streptococcus pyogenes*)의 주요 필린 단백질 Spy0128로부터 유래되었다. (Zakeir 및 Howarth의 문헌[(2010) *J. Am. Chem. Soc.* 132:4526-27]). Isopeptag는 서열번호 254로서 제시된 아미노산 서열 TDKDMTITFTNKDAE를 가지며, pilin-C(Spy0128의 잔기 18-299)에 결합한다. SnoopTag 및 SnoopCatcher를 인큐베이션하여 상보적 단백질들 사이에서 특이적인 자발적 이소펩티드 결합을 유

도한다. 전술한 Zakeir 및 Howarth의 (2010) 문헌.

[0044] 용어 “검출 가능한 표지”는, 예를 들어 비공유 결합을 통해 높은 친화도로 다른 폴리펩티드 서열(예: 항체 파라토프)와 특이적으로 결합하는 특이적 결합 쌍의 구성원인 폴리펩티드 서열을 포함한다. 예시적이고 비제한적인 검출 가능한 표지는 헥사히스티딘 태그, FLAG 태그, 스트랩 II 태그, 스트랩트아비딘-결합 펩티드(SBP) 태그, 칼모듈린-결합 펩티드(CBP), 글루타티온 S-전이효소(GST), 말토오스-결합 단백질(MBP), S-태그, HA 태그, 및 c-myc의 myc 태그(서열번호 246)를 포함한다. (Zhao 등의 문헌[(2013) J. Analytical Meth. Chem. 1-8]에서 검토되었으며; 동 문헌은 참조로서 본원에 통합됨). 영장류 AAV에 대한 흔한 검출 가능한 표지는 B1 에피토프(서열번호 247)이다. B1 에피토프를 자연적으로 포함하지 않는, 본원에 기술된 일부 AAV 캡시드 단백질은 B1 에피토프를 포함하도록 본원에서 변형될 수 있다. 일반적으로, 본원에 기술된 AAV 캡시드 단백질은 캡시드 단백질의 마지막 10개 아미노산 이내에서 B1 에피토프에 대해 실질적인 상동성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 본 발명의 비영장류 AAV 캡시드 단백질은, AAV 캡시드 단백질이 B1 에피토프를 포함하도록, 캡시드 단백질의 마지막 10개 아미노산 이내에서 1개 내지 5개 미만의 점 돌연변이로 변형될 수 있다.

[0045] 용어 "표적 세포"는 관심 뉴클레오티드의 발현이 필요한 임의의 세포를 포함한다. 바람직하게는, 표적 세포는 그 표면에서 수용체를 나타내는데, 이는 후술하는 바와 같이, 표적화 리간드를 사용해 세포를 표적화할 수 있게 한다.

[0046] 용어 "형질도입" 또는 "감염" 등은 바이러스 입자에 의해 표적 세포 내로 핵산을 도입하는 것을 지칭한다. 형질도입 등과 관련된 용어 효율(efficiency), 예를 들어, "형질도입 효율(transduction efficiency)"은 관심 뉴클레오티드를 포함하는 설정된 개수의 바이러스 입자로 인큐베이션한 후 관심 뉴클레오티드를 발현하는 세포의 분획(예: 백분율)을 의미한다. 형질도입 효율을 결정하는 잘 알려진 방법은, 형광 리포터 유전자를 이용해 형질도입된 세포의 유세포 계측, 관심 뉴클레오티드의 발현에 대한 PR-PCR, 등을 포함한다.

[0047] 일반적으로, “기준” 바이러스 캡시드 단백질/캡시드/입자는 시험해야 할 효과에 대한 변화를 제외하고는 시험 바이러스 캡시드 단백질/캡시드/입자와 동일하다. 예를 들어, 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 시험 바이러스 입자에 삽입하는 것의 효과(예: 형질도입 효율)를 결정하기 위해, 특이적 결합 쌍의 제1 구성원이 존재하는 것 외에는 모든 경우(예컨대, 추가 돌연변이, 관심 뉴클레오티드, 바이러스 벡터 및 타겟 세포의 개수 등)에 있어서 시험 바이러스 입자와 동일한 기준 바이러스 입자(필요에 따라, 적절한 표적화 리간드가 존재하거나 부재할 수 있음)의 형질도입 효율과 시험 바이러스 입자(적절한 표적화 리간드가 존재하거나 부재할 수 있음)의 형질도입 효율을 비교할 수 있다. 일부 구현예에서, 기준 바이러스 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 적어도 제1 구성원을 포함하도록 변형된 제2 바이러스 캡시드 단백질과 함께 캡시드를 형성할 수 있고, 여기서 기준 바이러스 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하지 않으며, 바람직하게는, 기준 바이러스 캡시드 단백질 및 변형된 바이러스 캡시드 단백질에 의해 형성된 캡시드는 모자이크 캡시드이다.

[0048] **아데노-연관 바이러스 (AAV)**

[0049] “AAV”는 아데노-연관 바이러스에 대한 약어이며, 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하도록 사용될 수 있다. AAV는 작은 비외피형 단일-가닥 DNA 바이러스이다. 일반적으로, 야생형 AAV 게놈은 4.7 kb이고, 2개의 역위 말단 반복(ITR) 및 2개의 개방 해독 프레임(ORF), *rep* 및 *cap*을 특징으로 한다. 야생형 *rep* 해독 프레임은 분자량 78 kD(“Rep78”), 68 kD(“Rep68”), 52 kD(“Rep52”), 및 40 kD(“Rep 40”)의 4개의 단백질을 암호화한다. Rep78 및 Rep68은 p5 프로모터로부터 전사되고, Rep52 및 Rep40은 p19 프로모터로부터 전사된다. 이들 단백질은 주로 AAV 게놈의 전사 및 복제를 조절하는 작용을 한다. 야생형 *cap* 해독 프레임은 83~85 kD(VP1), 72~73 kD(VP2) 및 61~62 kD(VP3)의 분자량을 갖는 3개의 구조(캡시드) 바이러스 단백질(VP)을 암호화한다. AAV 비리온(캡시드) 내의 총 단백질 중 80%가 넘는 단백질이 VP3를 포함하고; 성숙한 비리온에서는 VP1, VP2 및 VP3이 1:1:8의 비율로 보고된 적이 있지만, 대략 1:1:10의 상대 존재비로 발견된다. Padron 등의 문헌[(2005) J. Virology 79:5047-58].

[0050] AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라, 천연 역위 말단 반복(ITR), Rep 단백질, 및 캡시드 서브유닛의 서열도 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌 또는 GenBank와 같은 공개 데이터베이스에서 확인할 수 있다. 예를 들어, GenBank 수탁 번호 NC_002077 (AAV1), AF063497 (AAV1), NC001401 (AAV-2), AF043303 (AAV2), NC_001729 (AAV3), NC_001829 (AAV4), U89790 (AAV4), NC_006152 (AAV5), AF513851 (AAV7), AF513852 (AAV8), 및 NC_006261 (AAV8)을 참조하고; 이들의 개시 내용은 AAV 핵산 및 아미노산 서열의 교지를 위해 참조로서 본원에 통합된다. 예를 들어, Srivistava 등의 문헌[(1983) J. Virology 45:555]; Chiorini 등의 문헌[(1998) J. Virology 71:6823]; Chiorini 등의 문헌[(1999) J. Virology 73: 1309]; Bantel-Schaal 등의 문헌[(1999) J.

Virology 73:939]; Xiao 등의 문헌[(1999) J. Virology 73:3994]; Muramatsu 등의 문헌[(1996) Virology 221:208]; Shade 등의 문헌[(1986) J. Virol. 58:921]; Gao 등의 문헌[(2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854]; Moris 등의 문헌[(2004) Virology 33:375-383]; 미국 특허 공개 20170130245; 국제 특허 공개 WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; 및 미국 특허 제6,156,303호를 또한 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본문에 통합된다. 본원의 표 2는 다양한 비영장류 AAV의 서열을 제공한다.

[0051] “AAV”는 모든 아형을 포함하고, 당업계에 잘 알려진 자연 발생 형태 및 변형된 형태 둘 다를 포함한다. AAV는 영장류 AAV(예: AAV 1형(AAV1), 영장류 AAV 2형(AAV2), 영장류 AAV 3형(AAV3B), 영장류 AAV 4형(AAV4), 영장류 AAV 5형(AAV5), 영장류 AAV 6형(AAV6), 영장류 AAV 7형(AAV7), 영장류 AAV 8형(AAV8), 영장류 AAV 9형(AAV9), AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVDJ, Anc80L65, AAV2G9, AAV-LK03, 영장류 AAV rh10형(AAV rh10), AAV h10형(AAV h10), AAV hu11형(AAV hu11), AAV rh32.33형(AAV rh32.33), AAV 레트로(AAV retro), AAV PHP.B, AAV PHP.eB, AAV PHP.S, AAV2/8, 등, 비영장류 동물 AAV(예: 조류 AAV(AAAV)), 및 다른 비영장류 동물 AAV, 예컨대 포유류 AAV(예: 박쥐 AAV, 바다사자 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 염소 AAV, 및 양 AAV 등), 유린류 AAV(예: 뱀 AAV, 턱수염 도마뱀 AAV), 등을 포함한다. “영장류 AAV”는 일반적으로 영장류로부터 단리된 AAV를 지칭한다. 유사하게, “비영장류 동물 AAV”는 비영장류 동물로부터 단리된 AAV를 지칭한다.

[0052] 본원에서 사용되는 바와 같이, 유전자(예: *rep*, *cap*, 등), 캡시드 단백질(예: VP1 캡시드 단백질, VP2 캡시드 단백질, VP3 캡시드 단백질, 등), 특정 AAV의 캡시드 단백질의 영역(예: PLA₂ 영역, VP1-u 영역, VP1/VP2 공통 영역, VP3 영역), 뉴클레오타이드 서열(예: ITR 서열)과 관련된 “[명시된] AAV의 ~”, 예를 들어 AAV의 *cap* 유전자 또는 캡시드 단백질 등은 특정 AAV에 대해 본원에서 제시된 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 각각 포함하는 유전자 또는 폴리펩티드에 추가하여, 하나 이상의 생물학적 기능을 유지하는 데 필요한 최소 수의 뉴클레오타이드 또는 아미노산을 포함하는 변이체를 포함하여, 유전자 또는 폴리펩티드의 변이체도 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 변이체 유전자 또는 변이체 폴리펩티드는 명시된 AAV의 유전자 또는 폴리펩티드에 대해 본원에 제시된 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 상이한 핵산 서열 또는 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 상이함(들)은, 예를 들어 상이함(들)이 유전자 코드의 퇴화, 단리된 변이체, 서열의 길이 등에 기인할 수 있는 경우, 유전자 또는 폴리펩티드의 적어도 하나의 생물학적 기능 및/또는 유전자 또는 폴리펩티드의 계통적 특징을 일반적으로 변경시키지 않는다. 예를 들어, 본원에서 사용되는 *rep* 유전자 및 *cap* 유전자는, 유전자가 하나 이상의 Rep 단백질 및 Cap 단백질을 각각 암호화할 수 있다는 면에서 야생형 유전자와 상이한 *rep* 유전자 및 *cap* 유전자를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, Rep 유전자는 적어도 Rep78 및/또는 Rep68을 암호화한다. 일부 구현예에서, *cap* 유전자는, *cap* 유전자가 하나의 Cap 단백질만을 암호화하도록 하나 이상의 대안적인 시작 코돈 또는 하나 이상의 대안적인 시작 코돈 사이의 서열이 제거된다는 점에서 야생형과 상이할 수 있으며, 예를 들어, 여기서 VP2 및/또는 VP3 시작 코돈은 *cap* 유전자가 기능적 VP1 캡시드 단백질을 암호화하지만 VP2 캡시드 단백질 또는 VP3 캡시드 단백질은 암호화하지 않도록, 제거되거나 치환된다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, *rep* 유전자는 기능적 Rep 단백질을 암호화하는 임의의 서열을 포함한다. *cap* 유전자는 적어도 하나의 기능적 *cap* 유전자를 암호화하는 임의의 서열을 포함한다.

[0053] 야생형 *cap* 유전자는 *rep* ORF에서 발견되는 p40 프로모터의 조절 하에 *cap* 유전자의 단일 개방 해독 프레임으로부터 3개의 VP1, VP2, 및 VP3 캡시드 단백질을 모두 발현한다는 것이 잘 알려져 있다. 용어 “캡시드 단백질(capsid protein)”, “Cap 단백질” 등은 바이러스의 캡시드의 일부인 단백질을 포함한다. 아데노-연관 바이러스의 경우, 캡시드 단백질은 일반적으로 VP1, VP2, 및/또는 VP3으로 지칭되며, 단일 *cap* 유전자에 의해 암호화될 수 있다. AAV의 경우, 3개의 단백질이 공통 종결 코돈을 사용함에도 불구하고, 대안적인 번역 시작 코돈의 사용을 통해 3개의 AAV 캡시드 단백질이 자연적으로 중첩하는 방식으로 *cap* ORF로부터 생산된다. 야생형 *cap* 유전자의 ORF는 5'에서 3' 방향으로 3개의 대안적인 시작 코돈: “VP1 시작 코돈”, “VP2 시작 코돈”, 및 “VP3 시작 코돈”; 및 하나의 “공통 종결 코돈”을 암호화한다. 가장 큰 바이러스 단백질인 VP1은 일반적으로 VP1 시작 코돈에서 “공통 종결 코돈”까지 암호화된다. VP2는 일반적으로 VP2 시작 코돈에서 공통 종결 코돈까지 암호화된다. VP3은 일반적으로 VP3 시작 코돈에서 공통 종결 코돈까지 암호화된다. 따라서, VP1은 이의 N-말단 서열에서 VP2 또는 VP3과 공유하지 않는, VP1 고유 영역(VP1-u)으로 지칭되는 영역을 포함한다. VP1-u 영역은 일반적으로 VP1 시작 코돈에서 시작해 “VP2 시작 코돈”으로 이어지는 야생형 *cap* 유전자의 서열에 의해 암호화된다. VP1-u는 감염에 중요할 수 있는 포스포리파아제 A2 도메인(PLA₂)을 비롯하여, 바이러스가 코팅 해제 및 게놈 방출을 위해 핵을 표적화하는 데 도움을 줄 수 있는 핵 국소화 신호도 포함한다. VP1, VP2, 및 VP3 캡시드 단백질은 VP3의 온전성을 구성하는 동일한 C-말단 서열을 공유하는데, 이는 본원에서 VP3 영역으로서 지칭될 수도 있다. VP3 영역은 일반적으로 VP3 시작 코돈에서 공통 종결 코돈까지 암호화된다. VP2는 VP1과 공유하

는 약 60개의 추가 아미노산을 갖는다. 이 영역을 VP1/VP2 공통 영역이라고 한다.

- [0054] 일부 구현예에서, 본 발명의 Cap 단백질 중 하나 이상은 하나 이상의 ORF를 갖는 하나 이상의 *cap* 유전자에 의해 암호화될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 VP 단백질은, 각각 본 발명의 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 중 하나 이상을 생산하는 포장 세포에서의 발현을 위해 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 별도의 뉴클레오티드 서열을 사용함으로써, VP1, VP2, 및/또는 VP3의 임의의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 둘 이상의 ORF로부터 발현될 수 있다. 일부 구현예에서, 본 발명의 VP 캡시드 단백질은, 각각 VP1, VP2, 또는 VP3 캡시드 단백질 중 단 하나만을 생산하는 바이러스 복제 세포에서의 발현을 위해 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 별도의 뉴클레오티드 서열을 사용함으로써, VP1, VP2, 또는 VP3 중 어느 하나를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 ORF로부터 개별적으로 발현될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 본 발명의 VP 단백질은, 각각 VP1, VP2, 및 VP3 캡시드 단백질을 생산하는 바이러스 복제 세포에서의 발현을 위해 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 VP1, VP2, 및 VP3 캡시드 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 ORF로부터 발현될 수 있다. 따라서, 본원에서 제공된 아미노산 위치가 기준 AAV의 VP1 캡시드 단백질과 관련하여 제공될 수 있지만, 당업자는 AAV의 VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 내에서 해당하는 동일한 아미노산의 위치 및 상이한 AAV 중 아미노산의 상응하는 위치를 각각 그리고 쉽게 결정할 수 있을 것이다.
- [0055] 문구 “역위 말단 반복(inverted terminal repeat)” 또는 “ITR”은 효율적인 복제에 요구되는 아데노-연관 바이러스의 게놈에서의 대칭 핵산 서열을 포함한다. ITR 서열은 AAV DNA 게놈의 각 말단에 위치한다. ITR은 바이러스 DNA 합성을 위한 복제 기원의 역할을 하며, AAV 입자를 생성하기 위한, 예를 들어 AAV 입자 내로 포장하기 위한 필수 시스(cis) 성분이다.
- [0056] AAV ITR은 복제 단백질 Rep78 또는 Rep68에 대한 인식 부위를 포함한다. ITR의 “D” 영역은 DNA 복제가 개시되고 핵산 복제 단계에 방향성을 제공하는 DNA Nick 부위를 포함한다. 포유류 세포에서의 AAV 복제는 일반적으로 2개의 ITR 서열을 포함한다.
- [0057] 단일 ITR은 “A” 영역의 양 가닥 상의 Rep 결합 부위 및 ITR 회문(palindrome)의 각 측에 있는 2개의 대칭 D 영역에 의해 조작될 수 있다. 이중-가닥 원형 DNA 템플릿 상의 이러한 조작된 작제물은 Rep78 또는 Rep68이 핵산 복제를 개시하도록 하는데, 이는 양 방향으로 진행된다. 단일 ITR은 원형 입자의 AAV 복제에 충분하다. 본 발명의 AAV 바이러스 입자를 생산하는 방법에서, *rep* 암호화 서열은 전달 플라스미드 상에 포함된 ITR에 결합할 수 있는 Rep 단백질 또는 Rep 단백질 등가물을 암호화한다.
- [0058] 본 발명의 Cap 단백질은, 포장 세포에 의해 적절한 Rep 단백질과 함께 발현될 때, 관심 뉴클레오티드 및 2개 이상의 짝수의 ITR 서열을 포함하는 전달 플라스미드를 캡시드화할 수 있다. 일부 구현예에서, 전달 플라스미드는 하나의 ITR 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 전달 플라스미드는 2개의 ITR 서열을 포함한다.
- [0059] Rep78 및/또는 Rep68은 ITR 헤어핀의 서열 상의 고유하고 알려진 부위에 결합하여, AAV 게놈의 단부에 있는 헤어핀 구조를 파괴하고 풀도록 작용하여, 바이러스 복제 세포의 복제 기계에 대한 액세스를 제공한다. 잘 알려진 바와 같이, Rep 단백질은, 각각 Rep78, Rep68, Rep 52, 및/또는 Rep40 Rep 단백질 중 하나 이상을 생산하는 바이러스 복제 세포에서의 발현을 위해 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 별도의 뉴클레오티드 서열을 사용함으로써, Rep78, Rep68, Rep 52, 및/또는 Rep40의 임의의 조합을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 둘 이상의 ORF로부터 발현될 수 있다. 대안적으로, Rep 단백질은, 각각 단 하나의 Rep78, Rep68, Rep 52, 및/또는 Rep40 Rep 단백질을 생산하는 포장 세포에서의 발현을 위해 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 별도의 뉴클레오티드 서열을 사용함으로써, Rep78, Rep68, Rep 52, 및/또는 Rep40 중 어느 하나를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 ORF로부터 개별적으로 발현될 수 있다. 또 다른 구현예에서, Rep 단백질은, 각각 Rep78 및 Rep52 Rep 단백질을 생산하는 바이러스 복제 세포에서의 발현을 위해 적어도 하나의 발현 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 Rep78 및 Rep52 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 하나의 ORF로부터 발현될 수 있다.
- [0060] 본 발명의 AAV 비리온, 예를 들어 바이러스 입자를 생산하는 방법에서, 본 발명의 *rep* 암호화 서열 및 *cap* 유전자가 단일 패키징 플라스미드로 제공될 수 있다. 그러나, 당업자는 이러한 단서가 필요하지 않다는 것을 인식할 것이다. 이러한 바이러스 입자는 게놈을 포함하거나 포함하지 않을 수 있다.
- [0061] “키메라 AAV 캡시드 단백질”은, 2개 이상의 상이한 AAV 유래의 아미노산 서열, 예를 들어 일부를 포함하고 AAV 바이러스 캡시드/바이러스 입자를 형성하고/하거나 형성할 수 있는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 키메라

AAV 캡시드 단백질은 예를 들어 복수의, 예를 들어, 적어도 2개의 핵산 서열을 포함하는 키메라 뉴클레오티드와 같은 키메라 AAV 캡시드 유전자에 의해 암호화되며, 상기 복수의 핵산 서열 각각은 구별되는 AAV의 캡시드 단백질을 암호화하는 캡시드 유전자의 일부분과 동일하며, 상기 복수의 핵산 서열은 기능성 키메라 AAV 캡시드 단백질을 함께 암호화한다. 특이적 AAV에 키메라 캡시드 단백질이 결합하는 것은, 캡시드 단백질이 해당 AAV의 캡시드 단백질 유래의 하나 이상의 부분 및 상이한 AAV의 캡시드 단백질 유래의 하나 이상의 부분을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 키메라 AAV2 캡시드 단백질은, AAV2의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질의 하나 이상의 부분 및 상이한 AAV의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질의 하나 이상의 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다.

[0062] 용어 “일부(portion)”는 일부가 유래되는 서열과 100% 동일성을 갖는 적어도 5개의 아미노산 또는 적어도 15개의 뉴클레오티드를 지칭하지만, 전장 폴리펩티드 또는 핵산 분자보다는 작다(Penzes의 문헌[(2015) *J. General Virol.* 2769] 참조). “일부”는 일부가 유래되는 폴리펩티드 또는 핵산 분자 형태가 “[명시된] AAV의 것”이거나, 특정 AAV, 예를 들어, 비영장류 동물 AAV 또는 원격 AAV에 대해 “상당한 동일성”을 갖는 다른 것을 결정하기에 충분한 아미노산 또는 뉴클레오티드의 임의의 연속 분절을 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 명시된 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 5개의 아미노산 또는 15개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 10개의 아미노산 또는 30개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 15개의 아미노산 또는 45개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 20개의 아미노산 또는 60개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 25개의 아미노산 또는 75개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 30개의 아미노산 또는 90개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 35개의 아미노산 또는 105개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 40개의 아미노산 또는 120개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 45개의 아미노산 또는 135개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 50개의 아미노산 또는 150개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 60개의 아미노산 또는 180개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 70개의 아미노산 또는 210개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 80개의 아미노산 또는 240개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 90개의 아미노산 또는 270개의 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 일부는 특정 AAV와 연관된 서열에 대해 100% 동일성을 갖는 적어도 100개의 아미노산 또는 300개의 뉴클레오티드를 포함한다.

[0063] **변형된 바이러스 캡시드 단백질, 바이러스 입자, 바이러스 핵산**

[0064] 일부 구현예에서, Cap 단백질, 예를 들어 본원에 기술된 것과 같은 VP1 캡시드 단백질, 본원에 기술된 것과 같은 VP2 캡시드 단백질, 및/또는 본원에 기술된 것과 같은 VP3 캡시드 단백질은, 예를 들어 표적화 리간드, 화학적 변형, 결합 쌍의 제1 구성원, 검출 가능한 표지, 점 돌연변이 등의 삽입 중 어느 하나 또는 이의 조합을 포함하도록 변형된다.

[0065] 일반적으로, 유전자 또는 명시된 AAV의 폴리펩티드, 또는 이들의 변이체가 변형되면, 명시된 AAV에 대해 본원에 제시된 핵산 서열 또는 아미노산 서열과 상이한 핵산 서열 또는 아미노산 서열이 생성하며, 여기서 변형은 하나 이상의 생물학적 기능을 변경, 부여, 또는 제거하지만, AAV 유전자 또는 AAV 폴리펩티드로서의 유전자 또는 폴리펩티드의 계통발생적 특성을 바꾸지는 않는다. 변형은 캡시드 단백질의 자연 향성이 감소 내지 제거되고, 캡시드 단백질의 향성이 보다 쉽게 재유도될 수 있고/있거나, 캡시드 단백질이 검출 가능한 표지를 포함할 수 있도록 다음 중 어느 하나 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다: 제1 AAV 혈청형의 서열을 제2 AAV 혈청형의 서열과 치환하여 키메라 현상을 생성하는 것; 화학적 변형; 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 점 돌연변이의 삽입; 등. 본원에 기술된 바와 같은 변형은 일반적으로, 또 다른 AAV로 감염시키는 과정에서, 예를 들어 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVDJ, Anc80L65, AAV2G9, AAV-LK03와 같은 혈청형, 이러한 혈청형에 기초한 비리온, 현재 사용되는 유전자 치료 방법에서의 비리온, 또는 이들의 조합으로 감염시키는 과정에서 생산되고, 일반 모집단에서 발견되는 기존 항체가 변형된 캡시드를 낮게 인

식하는 것 내지는 인식하지 못하는 것을 변경시키지 않고, 바람직하게는 감소시킨다.

[0066] 표적화 리간드

[0067] 본원에 기술된 변형은 표적화 리간드를 변형된 캡시드 단백질 및/또는 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드에 결합시키는 것(예: 디스플레이하는 것, 작동 가능하게 연결하는 것, 결합시키는 것)에 관한 것일 수 있다. 일반적으로, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 리간드는 포유류 근육 세포에 의해 발현된 표면 단백질, 예를 들어 포유류 근육 세포의 표면에서 발현된 단백질, 예를 들어 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합한다. 일부 구현예에서, 변형된 캡시드 단백질 및/또는 변형된 캡시드는 포유류 CACNG1, 예를 들어 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함한다.

[0068] 표 1은 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드를 재유도하는 데 사용될 수 있는 비제한적이고 예시적인 항-인간-CACNG1 단클론 항체(mAb ID)의 각 결합 부분(예: 중쇄 가변 도메인(HCVR), 경쇄 가변 도메인(LCVR), 및 CDR1, CDR2, 및 CDR3)에 대한 서열번호의 요약을 제공한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드는 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열 중 어느 하나와 각각 적어도 90% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열(들)의 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드는 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열(들)과 각각 적어도 95% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열의 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드는 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열(들)과 적어도 97% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열의 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드는 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열(들)과 적어도 98% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열(들)의 세트를 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 AAV 캡시드는 인간 CACNG1에 결합하는 표적화 리간드를 포함하며, 여기서 표적화 리간드는 서열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열과 99% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, CDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열의 세트를 포함한다. 표 1에 열거된 예시적인 항-hCACNG2 항체 중 어느 하나에 의해 정의된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 6개의 CDR 세트(즉, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3)를 포함하는 항체 또는 이의 항원 결합 단편이 또한 본원에 기술된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 표적화 리간드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍 내에 함유된 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 아미노산 서열 세트를 포함한다: 서열번호 2/10, 서열번호 18/26, 서열번호 34/42, 서열번호 50/58, 서열번호 66/74, 서열번호 82/90, 서열번호 98/106, 서열번호 114/122, 서열번호 130/138, 서열번호 146/154, 서열번호 162/170, 및 서열번호 178/186. 소정의 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 표적화 리간드는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 HCVR/LCVR 아미노산 서열 쌍을 포함한다: 서열번호 2/10, 서열번호 18/26, 서열번호 34/42, 서열번호 50/58, 서열번호 66/74, 서열번호 82/90, 서열번호 98/106, 서열번호 114/122, 서열번호 130/138, 서열번호 146/154, 서열번호 162/170, 및 서열번호 178/186.

표 1

[0069] AAV를 인간 CACNG1로 재표적화하는 데 사용될 수 있는 항체, 항원 결합 단편(예: Fab), 또는 scFv 분자에서의 도메인의 서열번호.

항체 명칭	HCVR NA (AA)	HCDR1 NA (AA)	HCDR2 NA (AA)	HCDR3 NA (AA)	LCVR NA (AA)	LCDR1 NA (AA)	LCDR2 NA (AA)	LCDR3 NA (AA)
1 31929/14647/10728	1 (2)	3 (4)	5 (6)	7 (8)	9 (10)	11 (12)	13 (14)	15 (16)
2 14570/10715	17 (18)	19 (20)	21 (22)	23 (24)	25 (26)	27 (28)	29 (30)	31 (32)
3 14572/10717	33 (34)	35 (36)	37 (38)	39 (40)	41 (42)	43 (44)	45 (46)	47 (48)
4 14571/10716	49 (50)	51 (52)	53 (54)	55 (56)	57 (58)	59 (60)	61 (62)	63 (64)
5 14574/10783	65 (66)	67 (68)	69 (70)	71 (72)	73 (74)	75 (76)	77 (78)	79 (80)
6 31944	81 (82)	83 (84)	85 (86)	87 (88)	89 (90)	91 (92)	93 (94)	95 (96)
7 31265/5972	97 (98)	99 (100)	101 (102)	103 (104)	105 (106)	107 (108)	109 (110)	111 (112)
8 31941	113 (114)	115 (116)	117 (118)	119 (120)	121 (122)	123 (124)	125 (126)	127 (128)
9 7660	129 (130)	131 (132)	133 (134)	135 (136)	137 (138)	139 (140)	141 (142)	143 (144)
10 9909	145 (146)	147 (148)	149 (150)	151 (152)	153 (154)	155 (156)	157 (158)	159 (160)
11 14573/10713	161 (162)	163 (164)	165 (166)	167 (168)	169 (170)	171 (172)	173 (174)	175 (176)

[0070] 31929/10728 (야생형 hIgG1)/14647 (hIgG1 N180Q)

[0071] HCVR 핵산 서열 (서열번호 1)

[0072] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGAATCACCTTCAGAAATTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTGGTATGATGGAAGTAATAAGTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTTC
ACCATCTCCGAGACAATTCCAAGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGGGGCACTATAAGAACA
GCTGCCCTTTTGTACTACTGGGGTCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0073] HCVR 아미노산 서열 (서열번호 2)

[0074] QQLVESGGGVVQPGRLRLSCTASGITFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNSKVYLQMNSLAEDTAVYYCARRGTIRT
AAPFDYWGQGLTVTVSS

[0075] HCDR1 핵산 서열 (서열번호 3)

[0076] GGA ATC ACC TTC AGA AAT TAT GGC

[0077] HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 4)

[0078] G I T F R N Y G

[0079] HCDR2 핵산 서열 (서열번호 5)

[0080] ATG TGG TAT GAT GGA AGT AAT AAG

[0081] HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 6)

- [0082] M W Y D G S N K
- [0083] *HCDR3* 핵산 서열 (서열번호 7)
- [0084] GCG AGA AGG GGC ACT ATA AGA ACA GCT GCC CCT TTT GAC TAC
- [0085] *HCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 8)
- [0086] A R R G T I R T A A P F D Y
- [0087] *LCVR* 핵산 서열 (서열번호 9)
- [0088] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAAA
- [0089] *LCVR* 아미노산 서열 (서열번호 10)
- [0090] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG
TRLEIK
- [0091] *LCDR1* 핵산 서열 (서열번호 11)
- [0092] CAG AGC ATT AGC AGC TAT
- [0093] *LCDR1* 아미노산 서열 (서열번호 12)
- [0094] Q S I S S Y
- [0095] *LCDR2* 핵산 서열 (서열번호 13)
- [0096] GCT GCA TCC
- [0097] *LCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 14)
- [0098] A A S
- [0099] *LCDR3* 핵산 서열 (서열번호 15)
- [0100] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC
- [0101] *LCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 16)
- [0102] Q Q S Y S T P P I T
- [0103] *HC* 핵산 서열 (서열번호 193)
- [0104] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGAATCACCTTCAGAAATTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGTGGAGTGGGTGGCAGTTATGTGGTATGATGGAAGTAATAAGTACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGTTC
ACCATCTCCGAGACAATTCCAAGGTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGAGAAGGGGCACTATAAGAACA
GCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGTCAGGGAACCCCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGGCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC
ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCAC
ACCTTCCCGGCTGTCTCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCGTGCCAGCACCAGGCGGTGGCGGACCATCAGTC
TTCCTGTTCCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAG
TTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTC
CTGCACCAGGACTGGCTGAACGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAG
CCCCGAGAGCCACAGGTGTA
- [0105] CACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAG
CAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
- [0106] TCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC

ACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0107] **HC 아미노산 서열 (서열번호 194)**

[0108] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCTASGITFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFTISGDNSKVYLMNSLRAEDTAVYYCARRGTIRT
AAPFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSL

[0109] GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPGGGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
GSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0110] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조

[0111] **LC 핵산 서열 (서열번호 195)**

[0112] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTGCAAAGTGGGTCCCGTCAAGGTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0113] **LC 아미노산 서열 (서열번호 196)**

[0114] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQSYSTPPIITFGQG
TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0115] 10715 (야생형 hIgG1) /14570 (IgG1 N180Q):

[0116] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 17)**

[0117] CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGCGACCCTGTCCCGCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCCTCAGTGGTTACTACTGG
AACTGGATCCGCCAGTCCCCAGGGAAGGGGTGGAATGGATTGGGGAATCCTTCATAGTGAAGAACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTACC
ATATCAGTAGACAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGGGAAGGATAGCAGCTCGT
CACGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0118] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 18)**

[0119] QVQLQQWAGLLKPSATLSRTCAVYGGSFSGYYWNWIRQSPGKLEWIGEILHSGRTNYPNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLTSVTAADTAVYYCAGRI AAR
HGWFDPPWGQGLTVTVSS

[0120] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 19)**

[0121] GGT GGG TCC TTC AGT GGT TAC TAC

[0122] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 20)**

[0123] G G S F S G Y Y

[0124] **HCDR2 핵산 서열 (서열번호 21)**

[0125] ATC CTT CAT AGT GGA AGA ACC

[0126] **HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 22)**

[0127] I L H S G R T

[0128] **HCDR3 핵산 서열 (서열번호 23)**

[0129] GCG GGA AGG ATA GCA GCT CGT CAC GGC TGG TTC GAC CCC

- [0130] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 24)*
- [0131] A G R I A A R H G W F D P
- [0132] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 25)*
- [0133] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTACATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTCTTGTCTGGGCGAGTCAGGATATTCGCAAGTGGTTAGCC
TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGCTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTTCACTTTTGGCCAGGGGACC
AAGCTGGAGATCAAA
- [0134] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 26)*
- [0135] DIQMTQSPSSVSTSVGDRVITISCRASQDIRKWLAWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQANSFPFTFGQGT
KLEIK
- [0136] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 27)*
- [0137] CAG GAT ATT CGC AAG TGG
- [0138] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 28)*
- [0139] Q D I R K W
- [0140] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 29)*
- [0141] GCT ACA TCC
- [0142] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 30)*
- [0143] A T S
- [0144] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 31)*
- [0145] CAA CAG GCT AAC AGT TTC CCG TTC ACT
- [0146] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 32)*
- [0147] Q Q A N S F P F T
- [0148] *HC 핵산 서열 (서열번호 197)*
- [0149] CAGGTGCAGCTACAGCAGTGGGGCGCAGGACTGTTGAAGCCTTCGGCGACCCGTGTCCTCCGCACCTGCGCTGTCTATGGTGGGTCCTTCAGTGGTTACTACTGG
AACTGGATCCGCCAGTCCCCAGGAAGGGCTGGAATGGATTGGGGAATCCTTCATAGTGAAGAACCAACTACAACCCGTCCTCAAGAGTCGAGTCACC
ATATCAGTAGACAGTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGACCTCTGTGACCGCCGCGGACACGGCTGTATATTACTGTGCGGGAAGGATAGCAGCTCGT
CACGGCTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCGTGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGC
ACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC
ACCTTCCCGGCTGTCTCAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCAGCTGAGTTCTGGGGGACCATCA
GTCTTCTGTTCCTCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTC
CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG
CAGCCCCGAGAGCCACAGT
- [0150] GTACACCCTGCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA
GAGCAATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAG
GTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAATGA
- [0151] *HC 아미노산 서열 (서열번호 198)*
- [0152] QVQLQQWAGLLKPSATLSRTCAVYGGSFSGYYWNWIRQSPGKLEWIGEILHSGRTNYPNPSLKSRTVTSVDTSKNQFSLKLTSTVTAADTAVYYCAGRIAR
HGWFDPWQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
- [0153] GTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN

TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0154] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조

[0155] **LC 핵산 서열 (서열번호 199)**

[0156] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTACATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCTCTTGTCTGGGCGAGTCAGGATATTCGCAAGTGGTTAGCC TGGTATCAACAGAAACCAGGAAAAGCCCCCTAACTCCTGATCTATGCTACATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCTTCAAGGTTACAGCGCAGTGGATCTGGG ACAGATTTCCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGAGGATTTTGCAACTTACTTTTGTCAACAGGCTAACAGTTTCCCGTTCACTTTTGGCCAGGGGACC AAGCTGGAGATCAACGAACCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCCTCTGTTGTGTGCTGTG AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC AGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0157] **LC 아미노산 서열 (서열번호 200)**

[0158] DIQMTQSPSSVSTSVGDRVITISCRASQDIRKWLAWYQQKPGKAPKLLIYATSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYFCQQANSFPFTFGQGT KLEIKRTVAAPSIVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC

[0159] 10717 (야생형 hIgG1)/ 14572 (hIgG1 N180Q)

[0160] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 33)**

[0161] CAGGTGCAGTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTACATATGGCATG CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGCATGATGGAAGTGATAAATATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC TCCATCGCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTTTATCTGCAATGAATAGTCTGAGAGTCGAGGACACGGGTATATATTACTGTGCGAGAAGGGGTATACGT GGAACCGTTTTTGACCACTGGGGCCTGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0162] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 34)**

[0163] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSTYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWHDGSDKYYVDSVKGRFSIARDNSKNTLYLQMNSLRVEDTGIYYCARRGIR GTVFDHWGLGTLVTYSS

[0164] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 35)**

[0165] GGA TTC ACC TTC AGT ACA TAT GGC

[0166] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 36)**

[0167] G F T F S T Y G

[0168] **HCDR2 핵산 서열 (서열번호 37)**

[0169] ATT TGG CAT GAT GGA AGT GAT AAA

[0170] **HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 38)**

[0171] I W H D G S D K

[0172] **HCDR3 핵산 서열 (서열번호 39)**

[0173] GCG AGA AGG GGT ATA CGT GGA ACC GTT TTT GAC CAC

[0174] **HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 40)**

[0175] A R R G I R G T V F D H

[0176] **LCVR 핵산 서열 (서열번호 41)**

[0177] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCTCACTTGTCTGGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACAAGTTGGCC TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAGCCCCCTAACCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAATTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGG ACAGAATTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCGTGGACGTTCCGGCCAAGGGACC

AAGGTGGAATCAAA

[0178] **LCVR 아미노산 서열 (서열번호 42)**

[0179] DIQMTQSPSTLSASVGDRTLTTCRASQSI SNKLAWYQQKPGKAPNLL IYKASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDDFATYYCQQYNSYSWTFGQGT
KVEIK

[0180] **LCDR1 핵산 서열 (서열번호 43)**

[0181] CAG AGT ATT AGT AAC AAG

[0182] **LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 44)**

[0183] Q S I S N K

[0184] **LCDR2 핵산 서열 (서열번호 45)**

[0185] AAG GCG TCT

[0186] **LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 46)**

[0187] K A S

[0188] **LCDR3 핵산 서열 (서열번호 47)**

[0189] CAA CAG TAT AAT AGT TAT TCG TGG ACG

[0190] **LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 48)**

[0191] Q Q Y N S Y S W T

[0192] **HC 핵산 서열 (서열번호 201)**

[0193] CAGGTGCAGTCTGGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTACATATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGCATGATGGAAGTGATAAATATTATGTAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTC
TCCATCGCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTTTATCTGCAAATGAATAGTCTGAGAGTCGAGGACACGGGTATATATTACTGTGCGAGAAGGGGTATACGT
GGAACCGTTTTTGACCACTGGGGCCTGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGTCTCAGGAGC
ACCTCCGAGAGCAGACCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCAC
ACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTA
GATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGACCATCA
GTCTTCTGTTCCTCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTC
CAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACC
GTCCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCAAGGG
CAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCTCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCAGC
GACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGAACTACAAGACCACGCTCCCGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGG
CTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTG
TCTCTGGGTAATGA

[0194] **HC 아미노산 서열 (서열번호 202)**

[0195] QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTSTYGMHWVRQAPGKLEWVAVIWHGSDKYYVDSVKGRFSIARDNSKNTLYLQMNSLRVEDTGIIYCCARRGIR
GTVFDHWGLGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL

[0196] GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0197] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조

[0198] **LC 핵산 서열 (서열번호 203)**

[0199] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCCTCACTTGTCCGGCCAGTCAGAGTATTAGTAACAAGTTGGCC
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAACCTCCTGATCTATAAGGCGTCTAATTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAAGGTTTCAGCGGCAGTGGATCTGGG

ACAGAATTCACCTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAACTTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCGTGGACGTTCCGCCAAGGGACC
AAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACCTGCTCTGTTGTGCCTGCTG
AATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGAC
AGCACCTACAGCCTCAGCAGACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC
GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0200] *LC 아미노산 서열 (서열번호 204)*

[0201] DIQMTQSPSTLSASVGDVTLTCRASQSI SNKLAWYQQKPGKAPNLL IYKASNLESGVPSRFSGSGSGTEFTLT ISSLQPDFFATYYCQQYNSYSWTFGQGT
KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGEC

[0202] 10716 (야생형 hIgG1)/ 14571 (hIgG1 N180Q)

[0203] *HCVR 핵산 서열 (서열번호 49)*

[0204] CAGGTGCAGTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCATCAATAATTACTACTGG
ACCTGGCTCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGTTATATCTATTACAGTGGGAGCGCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCACC
ATATCAGTAGACAGCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTAAATTCTGTGACCGCTGCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCGGTCAAGTAC
TTCCGGCATTGGGGCCAGGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0205] *HCVR 아미노산 서열 (서열번호 50)*

[0206] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSINNYWTWLRQPPGKLEWIGYIYSGSANYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSNVTAADTAVYYCARGAVKY
FRHWGQGTLVTVSS

[0207] *HCDR1 핵산 서열 (서열번호 51)*

[0208] GGT GAC TCC ATC AAT AAT TAC TAC

[0209] *HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 52)*

[0210] G D S I N N Y Y

[0211] *HCDR2 핵산 서열 (서열번호 53)*

[0212] ATC TAT TAC AGT GGG AGC GCC

[0213] *HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 54)*

[0214] I Y Y S G S A

[0215] *HCDR3 핵산 서열 (서열번호 55)*

[0216] GCG AGA GGG GCG GTC AAG TAC TTC CGG CAT

[0217] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 56)*

[0218] A R G A V K Y F R H

[0219] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 57)*

[0220] GAAATGTGTTGACGCAGTCTCCGGCACCCCTCTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCTGCAGGGCCAGTCAGACTATTAACCACAACAACCTTA
GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAACAGGGCCACTGCCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAAGTGATTTCTTGTCAGCAGTATGGTAGCTTGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAA

[0221] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 58)*

[0222] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTINHNLAWYQQRPGQAPRLLIYGASNRATAIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFEVYSCQYQYGLPLTFGGG
TKVEIK

[0223] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 59)*

[0224] CAG ACT ATT AAC CAC AAC AAC

- [0225] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 60)*
- [0226] Q T I N H N N
- [0227] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 61)*
- [0228] GGT GCA TCC
- [0229] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 62)*
- [0230] G A S
- [0231] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 63)*
- [0232] CAG CAG TAT GGT AGC TTG CCG CTC ACT
- [0233] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 64)*
- [0234] Q Q Y G S L P L T
- [0235] *HC 핵산 서열 (서열번호 205)*
- [0236] CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGCCAGGACTGGTGAAGCCTTCGGAGACCCTGTCCCTCACCTGCACTGTCTCTGGTGACTCCATCAATAATTACTACTGG
ACCTGGCTCCGGCAGCCCCAGGGAAGGACTGGAGTGGATTGGTTATATCTATTACAGTGGGAGCGCAACTACAACCCCTCCCTCAAGAGTCGAGTCAACC
ATATCAGTAGACAGCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTAAATTCTGTGACCGTGGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGAGGGGCGGTCAAGTAC
TTCCGGCATTTGGGGCCAGGGCACCTGGTCAACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAG
AGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCG
GCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCCACCTGCCCAGCACCTGAGTTCTGGGGGGACCATCAGTCTTCTCTG
TTCCCCCAAACCAAGGACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCGAGGTCCAGTTC AAC
TGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTACAGCTCCTCACCCTCTGCAC
CAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCGCTCCTCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGA
GAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCC
GTGGAGTGGGAGACAATGGGCAGCCGGAGAACATAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTCACCCTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGTCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGT
AAATGA
- [0237] *HC 아미노산 서열 (서열번호 206)*
- [0238] QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSINYYWTLRQPPGKLEWIGYIYSGSANYNPSLKSRTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARGAVKY
FRHWGGGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
- [0239] GTKTYTCNVNDHKPNSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHENHNTQKSLSLSLGK
- [0240] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조
- [0241] *LC 핵산 서열 (서열번호 207)*
- [0242] GAAATTTGTGTTGACGCAGTCTCCGGGCACCCTCTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGACTATTAACCACAACAACCTTA
GCCTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCAACAGGGCCACTGCCATCCCAGACAGGTTAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAAGTGATTCTTGTGACGAGTATGGTAGCTTGCCGCTCACTTTCGGCGGAGGG
ACCAAGGTGGAGATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGCGCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
- [0243] *LC 아미노산 서열 (서열번호 208)*
- [0244] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQTINHNLAWYQQRPGQAPRLLIYGASNRATAIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFEVYSCQYQYGLPLTFGGG

TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0245] 10783 (야생형 hIgG1)/14574 (hIgG1 N180Q)

[0246] *HCVR 핵산 서열 (서열번호 65)*

[0247] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACGTCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCAGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGATTGATGGAAGTAATAAATATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGGTATA
GTAGTAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0248] *HCVR 아미노산 서열 (서열번호 66)*

[0249] QVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIIDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGI
VVAAPFDYWGGQTLVTSS

[0250] *HCDR1 핵산 서열 (서열번호 67)*

[0251] GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC

[0252] *HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 68)*

[0253] G F T F S S Y G

[0254] *HCDR2 핵산 서열 (서열번호 69)*

[0255] ATA TGG ATT GAT GGA AGT AAT AAA

[0256] *HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 70)*

[0257] I W I D G S N K

[0258] *HCDR3 핵산 서열 (서열번호 71)*

[0259] GCG AGA AGG GGG GGT ATA GTA GTA GCT GCC CCC TTT GAC TAC

[0260] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 72)*

[0261] A R R G G I V V A A P F D Y

[0262] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 73)*

[0263] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAAA

[0264] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 74)*

[0265] DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG
TRLEIK

[0266] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 75)*

[0267] CAG AGC ATT AGC AGC TAT

[0268] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 76)*

[0269] Q S I S S Y

[0270] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 77)*

[0271] GCT GCA TCC

[0272] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 78)*

- [0273] A A S
- [0274] *LCDR3* **핵산 서열 (서열번호 79)**
- [0275] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC
- [0276] *LCDR3* **아미노산 서열 (서열번호 80)**
- [0277] Q Q S Y S T P P I T
- [0278] *HC* **핵산 서열 (서열번호 209)**
- [0279] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGACGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCAGGATTACCTTCAGTAGCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGATTGATGGAAGTAATAAATTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAAGGGGGGTATA
GTAGTAGCTGCCCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCTGTCTCC
AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGC
AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCA
- [0280] AGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCCCCAAAAC
CCAAGGACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATG
GCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCTGCACCAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGT
ACACCCTGCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGA
GCAATGGGCAGCCGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTACAGCAGGCTACCGTGGACAAGAGCAGGT
GGCAGAGGGGAATGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
- [0281] *HC* **아미노산 서열 (서열번호 210)**
- [0282] QVQLVESGGGVVQPGTSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIIDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGGI
VVAAPFDYWGGTLTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
- [0283] GTKTYTCNVDPKSPNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDITLMI SRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGEVHNAKTKPREEQFNS
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
- [0284] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조
- [0285] *LC* **핵산 서열 (서열번호 211)**
- [0286] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGCGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
- [0287] *LC* **아미노산 서열 (서열번호 212)**
- [0288] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQKPKGAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPIITFGQG
TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC
- [0289] 31944
- [0290] *HCVR* **핵산 서열 (서열번호 81)**
- [0291] cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gaa ggc tct

gga atc acc ttc aga aac tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt
atg tgg tat gat gga agt aat aaa tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc
aag aac acg gtg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gaa gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga cgg ggt
cat ata gca aca gct gct ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca

[0292] *HCVR 아미노산 서열 (서열번호 82)*

[0293] QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCEASGITFRNYGMHWVRQAPGKLEWVAVMWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTVY LQMNSLRAEDTAVYYCARRGHI
ATAAPFDYWGQGLTVTVSS

[0294] *HCDR1 핵산 서열 (서열번호 83)*

[0295] gga atc acc ttc aga aac tat ggc

[0296] *HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 84)*

[0297] GITFRNYG

[0298] *HCDR2 핵산 서열 (서열번호 85)*

[0299] atg tgg tat gat gga agt aat aaa

[0300] *HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 86)*

[0301] MWYDGSN

[0302] *HCDR3 핵산 서열 (서열번호 87)*

[0303] gcg aga cgg ggt cat ata gca aca gct gct ccc ttt gac tac

[0304] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 88)*

[0305] ARRGHIATAAPFD

[0306] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 89)*

[0307] gacatccagatgacccagctctccatcctccctgtctgcatccgtaggagacagagt caccatcagttgccgggcaagt cagagcat tagtagt tatt taaat
tggatatcagcagaaccagggaagccctaaaggtcctgatgtatgtctgcatccagtttgcaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctggg
acagatttctactctcaccatcagcagctctgcaacctgaggattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccctccgatcaccttcggccaaggg
acacgactggagattaaa

[0308] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 90)*

[0309] DIQMTQSPSSLASVGDRTVTSRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKVL MYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG
TRLEIK

[0310] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 91)*

[0311] cag agc att agt agt tat

[0312] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 92)*

[0313] QSISSY

[0314] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 93)*

[0315] gct gca tcc

[0316] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 94)*

[0317] AAS

[0318] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 95)*

[0319] caa cag agt tac agt acc cct ccg atc acc

[0320] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 96)*

- [0321] QQSYSTPPIT
- [0322] **HC 핵산 서열 (서열번호 213)**
- [0323] cag gtg cag ttg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gaa gcg tct
gga atc acc ttc aga aac tat ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt
atg tgg tat gat gga agt aat aaa tac tac gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc
aag aac acg gtg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gaa gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aga cgg ggt
cat ata gca aca gct gct ccc ttt gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca
gccccaaacaacagccccatcggtctatccactggccctgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgcctggtcaagggttat tccct
gagccagtgcaccttgacctggaactctggatccctgtccagtgggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagctctgacctctacacctcagcagctcagtg
actgtaacctcgagcacctggccagccagtcacacctgcaatgtggccaccggcaagcagcaccaggtggacaagaaaattgagccagagggccc
acaatcaagccctgtcctccatgcaaatgccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctccaagatcaaggatgtactcatgac
tccctgagcccatagtcacatgtgtgggtggatgtgagcgaggatgaccagatgtccagatcagctgggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagct
cagacacaaacccatagagaggattacaacagtactctcgggtggtcagtgccctcccatccagcaccaggactggatgagtggaaggagttcaaatgc
aaggtcaacaacaagacctccagcgccccatcgagagaacctctcaaaacccaaagggtcagtaagagctccacaggtatagtcttgcctccaccagaa
gaagagatgactaagaaacaggtcactctgacctgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagcta
aactacaagaacactgaaccagtcctggactctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtggaaagaaatagctac
tcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaatcaccacacgactaagagcttctccggactccgggtaaatga
- [0324] **HC 아미노산 서열 (서열번호 214)**
- [0325] QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCEASGITFR NYGMHWVRQA PGKGLEWVAV MWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTVY LQMNSLRAED
TAVYYCARRG HIATAAPFDY WGQGLVTVS S
AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTGLCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSI TCNVAHPASSTKVDDKIEPRGP
TIKPCPPCKCAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQQDWMMSGKEFKC
KVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSGYSFMYSKLRVEKKNWVERNSY
SCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK
- [0326] **LC 핵산 서열 (서열번호 215)**
- [0327] gacatccagatgacccagctctccatcctcctgtctgcatccgtaggagacagagtaccatcagttgccgggcaagt cagagcat tagtagt tat ttaaat
tggtatcagcagaaccagggaagccctaaaggtcctgatgtatgctgcatccagtttgcaaaagtggggtcccatcaaggttcagtggcagtggtatctggg
acagatttactctcaccatcagcagctctgcaacctgaggattttgcaacttactactgtcaacagagttacagtaccttccgatcaccttcggccaagg
acacgactggagattaaacagagctgatgctgccaacctgtatccatcttccaccatccagtgcagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttc
ttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaa
gacagcacctacagcatgagcagcacctcacgttgaccaaggacaggtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatcaacttca
cccatgtgcaagagcttcaacaggggagagtggtga
- [0328] **LC 아미노산 서열 (서열번호 216)**
- [0329] DIQMTQSPSS LSASVGRVT ISCRASQIS SYLNWYQKP GKAPKVLMYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ
SYSTPPI TFG QGTRLEIK
RADAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKDI NVKWKIDGSE RQNGVLNSWTDQDSK DSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHK TSTSPIVKS F
NRGEC
- [0330] **31265 (야생형 hIgG1) /5972 (hIgG1 N180Q)**
- [0331] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 97)**
- [0332] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCCGTTCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGTGGAGTGGGTGTCACTTATTTGGATTGATGGAAATAATATATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACGCTGTATCTGCAATGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAAGACTGGCTATA
ACATCAGCTGCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCTCTCA
- [0333] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 98)**
- [0334] QVQLVESGGGVVQPGRLRLSCTASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVSVIWDGNNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARRLAI

TSAAPFDYWQGTLTVSS

[0335] *HCDR1* 핵산 서열 (서열번호 99)

[0336] GGA TTC ACC TTC CGT TCC TAT GGC

[0337] *HCDR1* 아미노산 서열 (서열번호 100)

[0338] G F T F R S Y G

[0339] *HCDR2* 핵산 서열 (서열번호 101)

[0340] ATT TGG ATT GAT GGA AAT AAT ATA

[0341] *HCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 102)

[0342] I W I D G N N I

[0343] *HCDR3* 핵산 서열 (서열번호 103)

[0344] GCG AGA AGA CTG GCT ATA ACA TCA GCT GCC CCC TTT GAC TAC

[0345] *HCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 104)

[0346] A R R L A I T S A A P F D Y

[0347] *LCVR* 핵산 서열 (서열번호 105)

[0348] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACAGGGAAAGCCCTAAGCTCCTGATCTATGTGTCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCGTCAAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAAA

[0349] *LCVR* 아미노산 서열 (서열번호 106)

[0350] DIQMTQSPSSLASVGDRTITCRASQSISSYLNWYQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPITFGQG
TRLEIK

[0351] *LCDR1* 핵산 서열 (서열번호 107)

[0352] CAG AGC ATT AGC AGC TAT

[0353] *LCDR1* 아미노산 서열 (서열번호 108)

[0354] Q S I S S Y

[0355] *LCDR2* 핵산 서열 (서열번호 109)

[0356] GCT GCA TCC

[0357] *LCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 110)

[0358] A A S

[0359] *LCDR3* 핵산 서열 (서열번호 111)

[0360] CAA CAG AGT TAC AGT ACC CCT CCG ATC ACC

[0361] *LCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 112)

[0362] Q Q S Y S T P P I T

[0363] *HC* 핵산 서열 (서열번호 217)

[0364] CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTACAGCGTCTGGATTACCTTCCGTTCTATGGCATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGTGGAGTGGGTGTCAGTTATTTGGATTGATGGAAATAATATATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGATTTC
ACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGGACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTTTATTACTGTGCGAGAAGACTGGCTATA
ACATCAGCTGCCCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCTGCTCC

AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGC
AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCCTGCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGA
CCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCC
AAAGGGCAGCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACCTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTAC
AGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACAGAAGTCCCTC
TCCCTGTCTCTGGGTAAATGA

[0365] **HC 아미노산 서열 (서열번호 218)**

[0366] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCTASGFTFRSYGMHWVRQAPGKLEWVSVIWIIDGNIIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMDSLRAEDTAVYYCARRLAI
TSAAPFDYWGGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL

[0367] GTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLGLK

[0368] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조

[0369] **LC 핵산 서열 (서열번호 219)**

[0370] GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAAT
TGGTATCAGCAGAAACCAGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGTCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTTCCTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTCCGATCACCTTCGGCCAAGGG
ACACGACTGGAGATTAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAATGCCTCTGTTGTGTGCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

[0371] **LC 아미노산 서열 (서열번호 220)**

[0372] DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSYSTPPIITFGQG
TRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC

[0373] **31941**

[0374] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 113)**

[0375] caggttcagctgggtgcagctcggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggctcctcgaaggcttctggttacgccttcaccacctatggatc
acctgggtgcgacaggccctggacaaggacttgagtggatgggatggatcagcgcttacaatggaaatacaactatgcagagaaggtccagggcagattc
accatgaccacagacacatccacgaatacagcctacatggagctgaggagcctgagatccgacgacacggccgtgtatttctgtgcgagaaagggtcactat
ggttcggggacttattataaccctttggttttgatTTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

[0376] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 114)**

[0377] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAEKVQGRFTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHY
GSGTYYPFGFDWQGQTMVTSS

[0378] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 115)**

[0379] ggt tac gcc ttc acc acc tat ggt

[0380] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 116)**

[0381] GYAFTTYG

- [0382] *HCDR2* 핵산 서열 (서열번호 117)
- [0383] atc agc gct tac aat gga aat aca
- [0384] *HCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 118)
- [0385] ISAYNGN
- [0386] *HCDR3* 핵산 서열 (서열번호 119)
- [0387] gcg aga aag ggt cac tat ggt tgc ggg act tat tat aac ccc ttt ggt ttt gat ttt
- [0388] *HCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 120)
- [0389] CARKGHYGSGTYYNPFPGFD
- [0390] *LCVR* 핵산 서열 (서열번호 121)
- [0391] gaaattatgttgatgcagctctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagt cagagtgttagcagcagctactta
gcctggtagcaacagaaacctggccaggctcccaggctcctcatctatgggtgcatccagcagggccactgacatcccagacaggttcagtggcagtggtct
gggacagacttcactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtttatctctgtcagcagatttatggctcaccttggacgttcggccaaggg
accaaggtggaaatcaag
- [0392] *LCVR* 아미노산 서열 (서열번호 122)
- [0393] EIMLMQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATDIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQYYGSPWTFGQG
TKVEIK
- [0394] *LCDR1* 핵산 서열 (서열번호 123)
- [0395] cag agt gtt agc agc agc tac
- [0396] *LCDR1* 아미노산 서열 (서열번호 124)
- [0397] QSVSSSY
- [0398] *LCDR2* 핵산 서열 (서열번호 125)
- [0399] ggt gca tcc
- [0400] *LCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 126)
- [0401] GA
- [0402] *LCDR3* 핵산 서열 (서열번호 127)
- [0403] cag cag tat tat ggc tca cct tgg acg
- [0404] *LCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 128)
- [0405] CQQYYGSPW
- [0406] *HC* 핵산 서열 (서열번호 221)
- [0407] caggttcagctggtagcagctggagctgaggtgaagaagcctggggcctcagtgaggctctcctgcaaggcttctggttacgccttcaccacctatggatc
acctgggtgagcaggccctggacaaggacttgagtggatgggatggatcagcgcttacaatggaaatacaaaactatgcagagaaggtccagggcagattc
accatgaccacagacacatccacgaatacagcctacatggagctgaggagctgagatccgacgacacggccgtgtatctctgtgcgagaaagggtcactat
ggttcggggacttatataaccctttgggtttgatctttggggccaagggaacaatggtcacctgtctctcagccaaaacgacacccccatctgtctatcca
ctggccccctggatctgctgccccaaactaatccatggtagccctgggatgctggtcaagggtatctccctgagccagtgcagtgacctggaactctgga
tccctgtccagcggtgtgcacaccttccagctgtcctgcagctgacctctacactctgagcagctcagtgactgtccccctccagcacctggccagcgag
accgtcacctgcaacgttgccccccggccagcagcaccaagggtggacaagaaaattgtgccagggtattgtggttgtaaccttgcatatgtacagtccta
gaagtatcatctgtcttcatcttcccccaaggccaaggatgtgctcaccattactctgactcctaaagtcacgtgtgtgtggtagacatcagcaaggat
gatcccgaggtccagttcagctggtttgtagatgatgtggaggtgcacacagctcagacgcaacccgggaggagcagttcaacagcactttccgctcagtc
agtgaacttcccatcatgcaccaggactggctcaatggcaaggagtcaaatgcagggtcaacagtgacgcttccctgcccccatcgagaaaaccatctcc
aaaaccaaaggcagaccgaaggctccacaggtgtacacattccacctcccaaggagcagatggccaaggataaagttagctgtgacctgcatgataacagac

ttcttccctgaagacattactgtggagtggcagtggaatgggcagccagcggagaactacaagaacactcagcccatcatggacacagatggctcttacttc
gtctacagcaagctcaatgtgcagaagccaactgggaggcaggaaatactttcacctgctctgtgttacatgagggcctgcacaaccaccatactgagaag
tccctctcccactctcctggtaaatga

[0408] **HC 아미노산 서열 (서열번호 222)**

[0409] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAEKVQGRFTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHY
GSGTYYNPFQDFWGGQTMVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPVSSWTPSE
TVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSV
SELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPTPKQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYF
VYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0410] **LC 핵산 서열 (서열번호 223)**

[0411] gaaattatgttgatgcagctctccaggcaccctgtctttgtctccaggggaaagagccaccctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagcagctactta
gcctggtagcaacagaaacctggccaggtctccaggtctcctcatctatggatgcagcagggccactgacatcccagacaggttcagtggcagtggtct
gggacagacttactctcaccatcagcagactggagcctgaagattttgcagtttatcttctgcagcagatttatggctcaccttgagcgttcggccaaggg
accaaggtggaaatcaagcgagctgatgctgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggaggtgcctcagtcgtgtgcttc
ttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggagatgatggcagtgacgacaaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggacagcaaa
gacagcacctacagcatgagcagcacctcagttgaccaaggacagatgaacgacataaacagctatacctgtgagggcactcacaagacatcaacttca
cccatgtcaagagcttcaacaggggagagtggtga

[0412] **LC 아미노산 서열 (서열번호 224)**

[0413] EIMLMQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY GASSRATDIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYFCQ
QYYGSPWTFG QGTKVEIK
RADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQSKDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSPIVKSF
NRGEC

[0414] **7660**

[0415] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 129)**

[0416] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGGTTGACCCCTCAGTGA CTCTGCTATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATAAGAAATAAGGCTAATAGGTACGCGACAGAATATGCTGCGTCGGTGAAAGGC
AGGTTACCACTTTCAAGAGATGATTCAAGAACACGGCGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTACTAGAACTGG
AAGATTTTCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCTCA

[0417] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 130)**

[0418] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSTASGLTSLDSAMHWVRQASGKLEWVGRIRNKANRYATEYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRNV
KIFLFDYWGQGLVTVSS

[0419] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 131)**

[0420] GGG TTG ACC CTC AGT GAC TCT GCT

[0421] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 132)**

[0422] G L T L S D S A

[0423] **HCDR2 핵산 서열 (서열번호 133)**

[0424] ATA AGA AAT AAG GCT AAT AGG TAC GCG ACA

[0425] **HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 134)**

[0426] I R N K A N R Y A T

[0427] **HCDR3 핵산 서열 (서열번호 135)**

[0428] ACT AGA AAC TGG AAG ATT TTC CTC TTT GAC TAC

- [0429] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 136)*
- [0430] T R N W K I F L F D Y
- [0431] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 137)*
- [0432] GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCCTGACTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGCAAATACTTA
GCCTGGTTCCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGACCAGTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCA
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGAAGTTCACCCTGGACGTTCCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAAATCAAA
- [0433] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 138)*
- [0434] EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGSKYLAWFQQKRGQAPRLLIYGASSRTSGIPDRISGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG
TKVEIK
- [0435] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 139)*
- [0436] CAG AGT GTT GGC AGC AAA TAC
- [0437] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 140)*
- [0438] Q S V G S K Y
- [0439] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 141)*
- [0440] GGT GCA TCC
- [0441] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 142)*
- [0442] G A S
- [0443] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 143)*
- [0444] CAG CAG TAT GGA AGT TCA CCC TGG ACG
- [0445] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 144)*
- [0446] Q Q Y G S S P W T
- [0447] *HC 핵산 서열 (서열번호 225)*
- [0448] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTACAGCCTCTGGGTTGACCCTCAGTGACTCTGCTATG
CACTGGGTCCGCCAGGCTTCCGGGAAAGGGCTGGAGTGGGTGGCCGTATAAGAAATAAGGCTAATAGGTACGCGACAGAATATGCTGCGTCGGTGAAAGGC
AGGTTACCACTTTCAAGAGATGATTCAAGAACACGGCGTATCTACAAATGAACAGCCTGAAAACCGAGGACACGGCCGTGTATTATTGTACTAGAACTGG
AAGATTTTCTCTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGG
AGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGTGTGCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAAC
GTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCA
TCAGTCTTCTGTTCCTCCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACAGTGCCTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAG
GTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTC
ACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAA
GGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCC
AGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGGAGAACTACAAGACCAGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGC
AGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTCTCC
CTGTCTCTGGGTAATGA
- [0449] *HC 아미노산 서열 (서열번호 226)*
- [0450] EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCTASGLTSLDSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRNKANRYATEYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRNV
KIFLFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGKTKYTCN
VDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGPSV

- [0451] FLFPPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQ
PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLS
LGK
- [0452] **LC 핵산 서열 (서열번호 227)**
- [0453] GAAATTGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGACTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTGGCAGCAAATACTTA
GCCTGGTTCCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGACCAGTGGCATCCCCGACAGGATCAGTGGCAGTGGGTCA
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATGGAAGTTCACCCTGGACGTTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAATCAAACGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG
- [0454] **LC 아미노산 서열 (서열번호 228)**
- [0455] EIVLTQSPGTLTLSPGERATLSCRASQSVGSKYLAWFQQKRGQAPRLLIYGASSRTSGIPDRISGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSFPWTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC
- [0456] **9909**
- [0457] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 145)**
- [0458] gaggtgcagctgttgagctctgggggaggcttggtacagccgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttaacaactatggcatg
agctgggtccgccagggtccagggaaggggctggagtgggtctcatctattagtggtagtggtggtagccacattctacgcagactccgtgaagggccgggttc
accatctccagagacaattccaagaacagctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtggcaaaggaggatattgt
agtagtagcggtgccgtcactacggtagggacgtctggggccaagggaccaggtcaccgtctcctca
- [0459] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 146)**
- [0460] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNNGMSWVRQGPGLGLEWVSSI SGSGGTTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGKGGYC
SSSGCRHYGMDVWGQGTITVTVSS
- [0461] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 147)**
- [0462] gga ttc acc ttt aac aac tat ggc
- [0463] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 148)**
- [0464] GFTFNNG
- [0465] **HCDR2 핵산 서열 (서열번호 149)**
- [0466] att agt ggt agt ggt ggt acc aca
- [0467] **HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 150)**
- [0468] SGSGGT
- [0469] **HCDR3 핵산 서열 (서열번호 151)**
- [0470] ggc aaa gga gga tat tgt agt agt agc ggc tgc cgt cac tac ggt atg gac gtc
- [0471] **HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 152)**
- [0472] CGKGGYCSSSGCRH
- [0473] **LCVR 핵산 서열 (서열번호 153)**
- [0474] cagctctgtgctgactcagccaccctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaagcagctccaacatcggaataattatata
tactggtaccagcgggtcccaggaacgacccccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgattctctggtccaagctc
ggcacctcagcctccctggccatcagtggtgctccggtccgaggatgaggctgatattactgtgcagcatgggatgacaccctgagtggtgatgtcttcgga
actgggaccaaggtcaccgtccta

[0475] *LCVR* 아미노산 서열 (서열번호 154)

[0476] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYIYWYQRLPGTTPKLLIYRNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCAAWDDTL SGYVFG
TGTKVTVL

[0477] *LCDR1* 핵산 서열 (서열번호 155)

[0478] agc tcc aac atc gga aat aat tat

[0479] *LCDR1* 아미노산 서열 (서열번호 156)

[0480] SSNIGNNY

[0481] *LCDR2* 핵산 서열 (서열번호 157)

[0482] agg aat aat

[0483] *LCDR2* 아미노산 서열 (서열번호 158)

[0484] RN

[0485] *LCDR3* 핵산 서열 (서열번호 159)

[0486] gca gca tgg gat gac acc ctg agt ggg tat gtc

[0487] *LCDR3* 아미노산 서열 (서열번호 160)

[0488] CAAWDDTL SGY

[0489] *HC* 핵산 서열 (서열번호 229)

[0490] gaggtgcagctgttggagctctgggggaggcttggtagacccgggggggtccctgagactctcctgtgcagcctctggattcacctttaacaactatggcatg
agctgggtccgccagggtccagggaaggggctggagtggtctcatctattagtggtagtggtggtagccacattctacgcagactccgtgaaggccgggttc
accatctccagagacaattccaagaacacgctgtatctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggccgtatattactgtggcaaggaggatattgt
agtagtagcggctgccgtcactacgggtatggacgtctggggccaagggaaccaggtcaccgtctcctcagccaaaacaacagcccatcggtctatccactg
gccccgtgtgtggagatacaactggctcctcggtgactctaggatgcctggtaggggttatttcctgagccagtgaccttgacctggaactctggatcc
ctgtccagtggtgtgcacaccttcccagctgtcctgcagcttgacctctacacctcagcagctcagtgactgtaacctcgagcacctggcccagccagtc
atcacctgcaatgtggcccaccggcgaagcagcaccaagggtggacaagaaaattgagcccagaggggcccacaatcaagccctgtcctccatgcaaatgccc
gcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctccaaagatcaaggatgtactcatgatctccctgagcccatagtacatgtgtggtggtg
gatgtgagcgaggatgaccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtggaagtacacacagctcagacacaaacccatagagaggattacaacagt
actctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccaggactggatgagtggaaggagtcaaatgcaagggtcaacaacaagacctccagcgcccatc
gagagaacctctcaaaacccaagggtcagtaagagctccacaggtatattgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaaacaggtcactctgacc
tgcatggtcacagacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacactgaaccagtcctggactct
gatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaagaagaactgggtggaaagaaatagctactcctgttcagtggtccacgagggtctgcacaat
caccacagactaagagcttctcccggactccgggtaaatga

[0491] *HC* 아미노산 서열 (서열번호 230)

[0492] EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFNNGMSWVRQPGKGLEWVSSI SGSGGTTFYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCGKGGYC
SSSGCRHYGMDVWGQGTITVSSAKTTAPSVYPLAPVCGD TTGSSVTLGCLVKGYFPEPVLTWN SGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQS
ITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKPAPNLLGGPSVFI FPPKIKDVLMI SLSPITVCVVVDVSEDDPDVQISW FVNNVEVHTAQTQTHREDYNS
TLRVVSALPIQH QDWM SGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDS
DGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK

[0493] *LC* 핵산 서열 (서열번호 231)

[0494] cagctctgtgctgactcagccacctcagcgtctgggacccccgggcagagggtcaccatctctgttctggaagcagctccaacatcggaataattatata
tactggtaccagcggctcccaggaacgacccccaaactcctcatctataggaataatcagcggccctcaggggtccctgaccgatctctggtccaagtct
ggcacctcagcctccctggccatcagtggtgctccgtccaggatgaggctgatattactgtgcagcatgggatgacacctgagtggtgatgtcttcgga
actgggaccaagggtcaccgtcctacgagctgatgtgcaccaactgtatccatcttcccaccatccagtgagcagttaacatctggagggtccctcagtcgtg
tgcttcttgaacaacttctaccccaaagacatcaatgtcaagtggaagattgatggcagtgaaacgacaaaatggcgtcctgaacagttggactgatcaggac
agcaaagacagcacctacagcatgagcagcaccctcaggttgaccaaggacaggtatgaacgacataacagctatacctgtgaggccactcacaagacatca

acttcacccattgtcaagagcttcaacaggggagagtgttga

[0495] **LC 아미노산 서열 (서열번호 232)**

[0496] QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNYIYWYQRLPGTTPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDTLSGYVFG
TGTKVTVLRADAAPTIVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPYKIDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTS
TSPIVKSFNRGEC

[0497] 10713 (야생형 hIgG1)/14573 (hIgG1 N180Q)

[0498] **HCVR 핵산 서열 (서열번호 161)**

[0499] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAGCCATGCCATG
AACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGGTCTCAGTTATTACTGGTAGAGGTTTGACACACACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC
ACCATCTCCAGAGACATTTCAAAAACAGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAAAGGTCTCTATGAT
TCGGGGAATTATTATATCGATTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCA

[0500] **HCVR 아미노산 서열 (서열번호 162)**

[0501] EVQLVESGGNLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSHAMNWVRQAPGKGLEWVSIVITGRGFDTHYADSVKGRFTISRDI SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLYD
SGNYYIDYWGQGLTVTVSS

[0502] **HCDR1 핵산 서열 (서열번호 163)**

[0503] GGA TTC ACC TTT ACC AGC CAT GCC

[0504] **HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 164)**

[0505] G F T F T S H A

[0506] **HCDR2 핵산 서열 (서열번호 165)**

[0507] ATT ACT GGT AGA GGT TTT GAC ACA

[0508] **HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 166)**

[0509] I T G R G F D T

[0510] **HCDR3 핵산 서열 (서열번호 167)**

[0511] GCG AAA GGT CTC TAT GAT TCG GGG AAT TAT TAT ATC GAT TAC

[0512] **HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 168)**

[0513] A K G L Y D S G N Y Y I D Y

[0514] **LCVR 핵산 서열 (서열번호 169)**

[0515] CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTT
TCCTGGTACCAGCAGCTCCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT
GGCACGTCAGCCACCCTGGGCATCACCAGGACTCCAGACTGGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATCTCAGCCTGAGTTTCAATTGGGTGTTC
GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTA

[0516] **LCVR 아미노산 서열 (서열번호 170)**

[0517] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNIGNNYSWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDLSLSFNWVF
GGGTKLTVL

[0518] **LCDR1 핵산 서열 (서열번호 171)**

[0519] AGC TCC AAC ATT GGG AAT AAT TAT

[0520] **LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 172)**

[0521] S S N I G N N Y

[0522] **LCDR2 핵산 서열 (서열번호 173)**

- [0523] GAC AAT AAT
- [0524] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 174)*
- [0525] D N N
- [0526] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 175)*
- [0527] GGA ACA TGG GAT CTC AGC CTG AGT TTC AAT TGG GTG
- [0528] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 176)*
- [0529] G T W D L S L S F N W V
- [0530] *HC 핵산 서열 (서열번호 233)*
- [0531] GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAACTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAGCCATGCCATG
AACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGTGGAGTGGGTCTCAGTTATTACTGGTAGAGGTTTGTACACACTACGCTGACTCCGTGAAGGGCCGGTTC
ACCATCTCCAGAGACATTCCAAAAACACGCTGTATCTGCAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTTTATTACTGTGCGAAAGGTCTCTATGAT
TCGGGGAATTATTATATCGATTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCTGGCGCCCTGCTCC
AGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTGCTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGC
GTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGC
AACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCTGAGTTCTTGGGGGA
CCATCAGTCTTCTGTTCCTCCCAAAACCAAGGACACTCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACGTGCGTGGTGGTGGAGCTGAGCCAGGAAGACCCC
GAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTC
CTCACCCTCTGCACCAGGACTGGTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCGTCTCCATCGAGAAAACCTCTCCAAAGCC
AAAGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAC
CCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC
AGCAGGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACACAGAAGTCCCTC
TCCCTGTCTCTGGGTAAATGA
- [0532] *HC 아미노산 서열 (서열번호 234)*
- [0533] EVQLVESGGNLVPGGSLRLSCAASGFTFTSHAMNWRQAPGKLEWVSVITGRGFDTHYADSVKGRFTISRDI SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLYD
SGNYY IDYWQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSL
- [0534] GTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVEISKYPPCPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLD
DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
- [0535] *밑줄과 굵은 글씨로 표시된 아스파라긴(N)은 트랜스글루타미나제에 의한 접합을 위해 글루타민(Q)으로 돌연변
이될 수 있다. 예를 들어, 서열번호 269 참조
- [0536] *LC 핵산 서열 (서열번호 235)*
- [0537] CAGTCTGTGTTGACGCAGCCGCCCTCAGTGTCTGCGGCCCCAGGACAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCAGCTCCAACATTGGGAATAATTATGTT
TCCTGGTACCAGCAGCTCCAGGAACAGCCCCAACTCCTCATTTATGACAATAATAAGCGACCCTCAGGGATTCTCTGACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCT
GGCACGTACGCCACCCTGGGCATCACCAGACTCCAGACTGGGACGAGGCCGATTATTACTGCGGAACATGGGATCTCAGCCTGAGTTCAATTGGGTGTTT
GGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCTAGGCCAGCCCAAGGCCGCCCCCTCCGTGACCCTGTTCCCCCCTCCTCCGAGGAGCTGCAGGCCAACAAGGCCACC
CTGGTGTGCCTGATCTCCGACTTCTACCCCGGCGCGGTGACCGTGGCCTGGAAGGCCGACTCCTCCCCGTGAAGGCCGGCGTGGAGACCACCACCCCTCC
AAGCAGTCCAACAACAAGTACGCCGCTCCTCTACCTGTCCCTGACCCCGAGCAGTGGAAGTCCCACCGGTCTACTCTGCCAGGTGACCCACGAGGGC
TCCACCGTGGAGAAGACCGTGGCCCCA
- [0538] CCGAGTGCTCCTGA
- [0539] *LC 아미노산 서열 (서열번호 236)*
- [0540] QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGSSSNI GNNYVSWYQQLPGTAPKLL IYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDL SLSFNWVF
GGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEG
STVEKTVAPTECS

- [0541] 7854
- [0542] *HCVR 핵산 서열 (서열번호 177)*
- [0543] CAGGTTCACTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCTGCAAGGCTTCTGGTTACGCCTTCACCACCTATGGTATC
ACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGATGGATCAGCGCTTACAATGGAAATACAACTATGCAGAGAAGGTCCAGGGCAGATTC
ACCATGACCACAGACACATCCACGAATACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCCGACGACACGGCCGTGTATTTCTGTGCAGAAAGGGTCACTAT
GGTTCGGGGACTTATTATAACCCCTTTGGTTTTGATTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA
- [0544] *HCVR 아미노산 서열 (서열번호 178)*
- [0545] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWI SAYNGNTNYAEKVQGRFTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHY
GSGTYYNPFGFDFWGQGMVTSS
- [0546] *HCDR1 핵산 서열 (서열번호 179)*
- [0547] GGT TAC GCC TTC ACC ACC TAT GGT
- [0548] *HCDR1 아미노산 서열 (서열번호 180)*
- [0549] G Y A F T T Y G
- [0550] *HCDR2 핵산 서열 (서열번호 181)*
- [0551] ATC AGC GCT TAC AAT GGA AAT ACA
- [0552] *HCDR2 아미노산 서열 (서열번호 182)*
- [0553] I S A Y N G N T
- [0554] *HCDR3 핵산 서열 (서열번호 183)*
- [0555] GCG AGA AAG GGT CAC TAT GGT TCG GGG ACT TAT TAT AAC CCC TTT GGT TTT GAT TTT
- [0556] *HCDR3 아미노산 서열 (서열번호 184)*
- [0557] A R K G H Y G S G T Y Y N P F G F D F
- [0558] *LCVR 핵산 서열 (서열번호 185)*
- [0559] GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA
GCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCTTTGTATTTCTGTGTCAGCAGTATTATGGCTCACCTTGGACGTTTCGGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAATCAAA
- [0560] *LCVR 아미노산 서열 (서열번호 186)*
- [0561] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFALYFCQQYYGSPWTFGQG
TKVEIK
- [0562] *LCDR1 핵산 서열 (서열번호 187)*
- [0563] CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC
- [0564] *LCDR1 아미노산 서열 (서열번호 188)*
- [0565] Q S V S S S Y
- [0566] *LCDR2 핵산 서열 (서열번호 189)*
- [0567] GGT GCA TCC
- [0568] *LCDR2 아미노산 서열 (서열번호 190)*
- [0569] G A S
- [0570] *LCDR3 핵산 서열 (서열번호 191)*

- [0571] CAG CAG TAT TAT GGC TCA CCT TGG ACG
- [0572] *LCDR3 아미노산 서열 (서열번호 192)*
- [0573] Q Q Y Y G S P W T
- [0574] *HC 핵산 서열 (서열번호 237)*
- [0575] CAGGTTACAGCTGGTGAGTCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGTTACGCCTTCACCACTATGGTATC
ACCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGACTTGAGTGGATGGGATGGATCAGCGCTTACAATGGAATACAACTATGCAGAGAAGGTCCAGGGCAGATT
ACCATGACCACAGACACATCCACGAATACAGCCTACATGGAGCTGAGGAGCCTGAGATCCGACGACACGGCCGTGATTTCTGTGCGAGAAAGGGTCACTAT
GGTTCGGGGACTTATTATAACCCCTTTGGTTTGTATTTTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCC
CTGGCGCCCTGTCTCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGC
GCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACG
AAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCATGCCACCCTGCCAGCACCT
GAGTTCTGGGGGACCATCAGTCTTCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGTTCCTGT
AGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTAC
CGTGTGGTACAGCTCCTACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAAAGGCGCTCCCGTCTCCATCGAGAAA
ACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACCTGCCCTCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGAGCCGAGGAGCAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACTCCGACGGC
TCCTTCTCTCTACAGCAGGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGAATGTCTTCTCATGTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACACAGAAGTCCCTCTCCTGTCTCTGGGTAATGA
- [0576] *HC 아미노산 서열 (서열번호 238)*
- [0577] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTTYGITWVRQAPGQGLEWMGWISAYNGNTNYAEKVQGRFTMTTDTSTNTAYMELRSLRSDDTAVYFCARKGHY
GSGTYYPNPFDFWQGTMVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGT
KITYTCNVDHKPSNTKVKDRVESKYGPPCPPPAPEF
- [0578] LGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSLGK
- [0579] *LC 핵산 서열 (서열번호 239)*
- [0580] GAAATGTGTGACGCAGTCTCCAGGCACCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTAGCAGCAGCTACTTA
GCCTGGTACCAACAGAACTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTCT
GGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGTCTTGTATTCTGTGCAGCAGTATTATGGCTCACCTTGGACGTTCCGCCAAGGG
ACCAAGGTGGAATCAAACGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCTCATCTTCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTG
CTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAAGTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAG
GACAGACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAACCATCAGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG
- [0581] *LC 아미노산 서열 (서열번호 240)*
- [0582] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFALYFCQQYYGSPWTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC
- [0583] CACNG1에 결합하는 표적화 리간드의 비제한적 예는 다음을 포함한다: (i) Fab 단편; (ii) F(ab')₂ 단편; (iii) Fd 단편; (iv) Fv 단편; (v) 단쇄 Fv(scFv) 분자; (vi) dAb 단편; 및 (vii) 항체의 추가변 영역(예: CDR3 펩티드와 같은 단리된 상보성 결정 영역(CDR))을 모방하는 아미노산 잔기, 또는 구속된 FR3-CDR3-FR4 펩티드로 이루어진 최소 인식 단위. 도메인 특이적 항체, 단일 도메인 항체, 도메인-결합된 항체, 키메라 항체, CDR-이식된 항체, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 미니바디, 나노바디(예: 1가 나노바디, 2가 나노바디 등), 작은 모듈형 면역치료제(SMIP), 및 상여 가변 IgNAR 도메인과 같은 다른 조작된 분자도 본원에서 사용되는 “항원 결합 단편”이란 표현에 포함된다. 비제한적인 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 바이러스 캡시드를 재표적화하는 데 유용한 CACNG1에 결합하는 항-CACNG1 표적화 리간드는 scFv를 포함한다. 비제한적인 예로서, 본원에 기술된 것과 같은 바이러스 캡시드를 재표적화하는 데 유용한 VL-(Gly4Ser)₃-VH 포맷의 scFv 서열은 서

열번호 1~240 중 어느 하나에 제시된 것과 같은 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트의 아미노산 서열 중 어느 하나와 각각 90%, 95%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한 중쇄 가변 도메인, 경쇄 가변 도메인, 중쇄 가변 도메인/경쇄 가변 도메인 쌍, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, 및/또는 HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 세트를 포함할 수 있다.

[0584] 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드는 잘 알려진 방법, 예를 들어 (예: 재조합적 방법을 사용해) 표적화 리간드가 직접 삽입되는 잘 알려진 방법에 따른 직접 접근법에 따라 변형된 AAV 캡시드 단백질 및 생성된 AAV 캡시드와 연관될 수 (예를 들어 이에 의해 디스플레이되거나, 작동 가능하게 연결되거나, 이에 결합될 수) 있다. 예를 들어 Stachler 등의 전술한 (2006) 문헌; White 등의 전술한 (2004) 문헌; Girod 등의 전술한 (1999) 문헌; Grifman 등의 전술한 (2001) 문헌; Shi 등의 전술한 (2001) 문헌; Shi 및 Bartlett 등의 전술한 (2003) 문헌 참조. 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드는 잘 알려진 화학적 링커를 사용하여 변형된 AAV 캡시드 단백질 및 생성된 AAV 캡시드에 결합될 수 있고, 예를 들어 여기서, AAV 캡시드 단백질은 디벤조시클로옥틴기 또는 아지드기를 포함하도록 화학적으로 변형될 수 있고, 임의로 여기서 본원에 기술된 바와 같은 표적화 리간드는 디벤조시클로옥틴기 또는 아지드기에 부착되고(예를 들어 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 U.S. 2022/028234 참조); 표적화 리간드는 예를 들어 -CSNH- 결합 등을 통해 AAV 캡시드 단백질의 일차 아미노산기에 공유 연결된다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 캡시드는 잘 알려진 직접 재조합 방법에 따라 직접 삽입되었거나 결합된 표적화 리간드, 예를 들어 항-CACNG1 항체 또는 이의 결합 부분을 포함한다.

[0585] 결합 쌍

[0586] 일부 구현예에서, 포유류 근육 세포 특이적 표면 단백질에 결합하는 표적화 리간드는 간접 재조합 접근법에 따라 변형된 AAV 캡시드 단백질 및 생성된 AAV 캡시드와 연관될 수 있고 (예를 들어 이에 의해 표시될 수 있고, 이에 작동 가능하게 연결될 수 있고, 결합될 수 있음), 여기서 AAV 캡시드 단백질은 결합 쌍의 제1 구성원(예를 들어, 이중 스캐폴드)를 포함하도록 변형되고, 임의로 결합 쌍의 제1 구성원은 결합 쌍(예를 들어 어댑터)의 제2 동족 구성원에 연결되고 (예를 들어 공유적으로 또는 비-공유적으로 결합됨), 추가로 임의로 여기서 결합 쌍의 제2 동족 구성원은 표적화 리간드에 융합된다. 비제한적이고 예시적인 결합 쌍은 Buning 및 Srivastava의 문헌[(2019) *Mol. Ther. Methods Clin Dev* 12:248-265]에 열거되어 있다.

[0587] 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 캡시드 단백질의 변형은 Cap 단백질에 의한 디스플레이를 위한 유전적 수준에서의 변형에 일반적으로 기인하는 것들, 예를 들어 *cap* 유전자의 변형, 예컨대 결합 쌍의 제1 구성원(예를 들어, 단백질:단백질 결합 쌍, 단백질:핵산 결합 쌍), 검출 가능한 표지 등을 삽입하는 변형을 통해 기인하는 것들을 포함한다.

[0588] 일부 구현예에서, 제1 구성원은 면역글로불린 불변 도메인과 결합 쌍을 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 금속 이온, 예를 들어 Ni^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} 등과 결합 쌍을 형성한다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 스트렙타비딘, 스트렙 II, HA, L14, 4C-RGD, LH, 및 단백질 A로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0589] 일부 구현예에서, 결합 쌍은 효소:핵산 결합 쌍을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 HUH-엔도뉴클레아제 또는 HUH-태그를 포함하고, 제2 구성원은 핵산 결합 도메인을 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 HUH 태그를 포함한다. 예를 들어, U.S. 2021/0180082를 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다.

[0590] 일부 구현예에서, 본 발명의 캡시드 단백질은 펩티드:펩티드 결합 쌍의 적어도 제1 구성원을 포함한다.

[0591] 일부 구현예에서, 펩티드:펩티드 결합 쌍의 제1 구성원 및 제2 구성원 각각은 인테인을 포함한다. 예를 들어, Wagner 등의 문헌[(2021) *Adv. Sci.* 8: 2004018 (22 중 1)]; Muik 등의 문헌[(2017) *Biomaterials* 144: 84]을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0592] 일부 구현예에서, 제1 구성원은 B 세포 에피토프이고, 예를 들어 약 1개 아미노산 내지 약 35개 아미노산의 길이이며, 항체 파라토프, 예를 들어, 면역글로불린 가변 도메인과 결합 쌍을 형성한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 캡시드 단백질은 결합 쌍의 제1 구성원으로서 검출 가능한 표지를 포함하도록 변형될 수 있다. 많은 검출 가능한 표지가 당업계에 공지되어 있다. (예를 들어, Nilsson 등의 문헌[(1997) "Affinity fusion strategies for detection, purification, and immobilization of modified proteins" *Protein Expression and Purification* 11: 1-16], Terpe 등의 문헌[(2003) "Overview of tag protein fusions: From molecular and biochemical fundamentals to commercial systems" *Applied Microbiology and Biotechnology* 60:523-533], 및

이들 문헌 중의 참조 문헌을 참조한다). 검출 가능한 표지는 다음을 포함하되 이들로 한정되지는 않는다: 고정된 2가 양이온(예: Ni^{2+})에 결합하는 폴리히스티딘 검출 가능한 표지(예를 들어, His-6, His-8, 또는 His-10); 고정된 아비딘에 결합하는 (예를 들어, 생체 내에서 비오틴화된 폴리펩티드 서열 상의) 비오틴 모이어티; 고정된 글루타티온에 결합하는 GST(글루타티온 S-트랜스퍼라제) 서열; 고정된 S 단백질에 결합하는 S 태그; 고정된 항체 또는 이의 도메인 또는 단편에 결합에 결합하는 항원(예를 들어, 상응하는 항체에 결합하는 T7, myc, FLAG 및 B 태그 포함); FLASH 태그(특이적 아르신계 모이어티에 결합하는 고도로 검출 가능한 표지); 고정된 리간드에 결합하는 수용체 또는 수용체 도메인(그 반대도 동일함), 고정된 IgG에 결합하는 단백질 A 또는 이의 유도체(예: Z); 고정된 아밀로오스에 결합하는 말토오스 결합 단백질(MBP); 고정된 알부민에 결합하는 알부민 결합 단백질; 고정된 키틴에 결합하는 키틴 결합 단백질; 고정된 칼모듈린에 결합하는 칼모듈린 결합 펩티드; 및 고정된 셀룰로오스에 결합하는 셀룰로오스 결합 도메인. 또 다른 검출 가능한 표지는 SNAP-태그이며, Covalys(www.covalys.com)로부터 상업적으로 입수 가능하다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 검출 가능한 표지는 항체 파라토프에 의해 인식되는 검출 가능한 표지를 포함하며, 상기 검출 가능한 표지와 항체 파라토프는 단백질:단백질 결합 쌍을 형성한다.

[0593] 일부 구현예에서, 본 발명의 캡시드 단백질은 검출 가능한 표지를 포함하는 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하며, 상기 검출 가능한 표지는 Cap 단백질의 검출 및/또는 단리에도 사용될 수 있고/있거나 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원으로서도 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 검출 가능한 표지는, 관심 세포에 의해 발현된 표적 및 검출 가능한 표지 둘 다에 결합할 수 있는 다중특이적 결합 단백질을 포함하는 표적화 리간드의 결합을 위한 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원으로서 작용한다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Cap 단백질은 c-myc(서열번호 246)를 포함하는 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함한다. 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원으로서 검출 가능한 표지의 용도는, 예를 들어 W02019006043에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0594] 일부 구현예에서, 제1 구성원은 B1 에피토프(서열번호 247)를 포함한다. 일부 구현예에서, 캡시드 단백질은 VP3 영역에서 B1 에피토프를 포함하도록 변형된다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 FLAG, HA, 및 c-myc(EQKLISEEDL; 서열번호 246)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0595] 일부 구현예에서, 캡시드 단백질은 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하되, 단백질:단백질 결합 쌍은 공유 이소펩티드 결합을 형성한다. 일부 구현예에서, 펩티드:펩티드 결합 쌍의 제1 구성원은 이소펩티드 결합을 통해 펩티드:펩티드 결합 쌍의 동족 제2 구성원에 공유 결합되고, 임의로 펩티드:펩티드 결합 쌍의 동족 제2 구성원은 표적화 리간드와 융합되며, 표적화 리간드는 관심 세포에 의해 발현된 표적에 결합한다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍은 SpyTag:SpyCatcher, SpyTag002:SpyCatcher002, SpyTag003:SpyCatcher003, SpyTag:KTag, Isopeptag:pilin-C, 및 SnoopTag:SnoopCatcher로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 SpyTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 SpyCatcher(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 SpyTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 KTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 KTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 SpyTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 SnoopTag(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 SnoopCatcher(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 Isopeptag(또는 이의 생물학적 활성 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 Pilin-C(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 SpyTag002(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 SpyCatcher002(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 제1 구성원은 SpyTag003(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이고 단백질(제2 동족 구성원)은 SpyCatcher003(또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체)이다. 일부 구현예에서, 본 발명의 Cap 단백질은 SpyTag, 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 또는 변이체를 포함한다. 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원의 용도는 W02019006046에 기술되어 있으며, 동 문헌은 그 전체가 본원에 통합된다.

[0596] 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 검출 가능한 표지는 제1 또는 제2 링커(예를 들어, 적어도 1개의 아미노산 길이인 아미노산 스페이서)를 통해 본 발명의 Cap 단백질에 작동 가능하게 연결된다 (Cap 단백질과 함께 프레임 내 번역되고/되거나, Cap 단백질에 화학적으로 부착되고/되거나 Cap 단백질에 의해 표시된다). 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원은 그 측면에 제1 및/또는 제2 링커(예를 들

어, 제1 및/또는 제2 아미노산 스페이서; 스페이서 각각은 적어도 1개 아미노산의 길이임)가 위치한다.

[0597]

일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 동일하지 않다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1 또는 2개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 또는 3개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 또는 4개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 또는 6개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 또는 9개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및/또는 제2 링커는 각각 독립적으로 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 이상의 아미노산 길이이다.

[0598]

일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 서열 및/또는 길이가 동일하고, 각각 1개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 1개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 2개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 3개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 4개의 아미노산 길이이며, 예를 들어, 링커는 GLSG(서열번호 248)이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 5개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 5개의 아미노산 길이이며, 예를 들어, 제1 및 제2 링커는 GLSGSG(서열번호 249)의 서열을 각각 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 7개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 8개의 아미노산 길이이며, 예를 들어, 제1 및 제2 링커는 GLSGLSGS(서열번호 250)의 서열을 각각 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 9개의 아미노산 길이이다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 10개의 아미노산 길이이며, 예를 들어, 제1 및 제2 링커는 GLSGLSGLSG(서열번호 251) 또는 GLSGSGLSG(서열번호 252)의 서열을 각각 포함한다. 일부 구현예에서, 제1 및 제2 링커는 길이가 동일하고, 각각 10개 초과 아미노산 길이이다.

[0599]

일반적으로, (예를 들어, 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 그 자체를 포함하거나 하나 이상의 링커와의 조합으로 포함하는 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는) 본원에 기술된 바와 같은 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 약 5개 아미노산 내지 약 50개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 적어도 5개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 6개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 7개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 8개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 9개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 10개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 11개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 12개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 13개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 14개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 15개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 16개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 17개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 18개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 19개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 20개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 21개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 22개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 23개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 24개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 25개 아미노산의 길이이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 26개 아미노산의 길이이다. 일부

구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 27개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 28개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 29개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 30개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 31개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 32개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 33개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 34개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 35개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 36개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 37개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 38개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 39개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 40개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 41개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 42개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 43개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 44개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 45개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 46개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 47개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 48개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 49개 아미노산의 길이다. 일부 구현예에서, 단백질:단백질 결합 쌍 아미노산 서열의 제1 구성원은 50개 아미노산의 길이다.

[0600] 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 변형된 캡시드

[0601] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 모자이크 캡시드이며, 예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 단백질의 적어도 2개의 세트를 포함하며, 이들 각각의 세트는 상이한 *cap* 유전자에 의해 암호화된다. 본원의 모자이크 캡시드는 일반적으로 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 변형된 제1 바이러스 캡시드 단백질 및 결합 쌍의 제1 구성원이 결합된 상응하는 제2 바이러스 캡시드 단백질의 모자이크를 지칭한다. 모자이크 캡시드와 관련하여, 결합 쌍의 제1 구성원이 결합된 제2 바이러스 캡시드 단백질은 기준 *cap* 유전자에 의해 암호화된 기준 캡시드 단백질로서 지칭될 수 있다. 모자이크 캡시드의 일부 구현예에서, 바람직하게는 단백질:단백질 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질이 키메라 캡시드 단백질이 아닌 경우, VP1, VP2, 및/또는 VP3 기준 캡시드 단백질은, 기준 캡시드 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있다는 것을 제외하고는, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 바이러스 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 동일한 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 모자이크 캡시드의 일부 구현예에서, VP1, VP2, 및/또는 VP3 기준 캡시드 단백질은, 기준 캡시드 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있다는 것을 제외하고는, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 바이러스 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질에 상응한다. 일부 구현예에서, VP1 기준 캡시드 단백질은, 기준 캡시드 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있다는 것을 제외하고는, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 바이러스 VP1 캡시드 단백질에 상응한다. 일부 구현예에서, VP2 기준 캡시드 단백질은, 기준 캡시드 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있다는 것을 제외하고는, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 바이러스 VP2 캡시드 단백질에 상응한다. 일부 구현예에서, VP3 기준 캡시드 단백질은, 기준 캡시드 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있다는 것을 제외하고는, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 바이러스 VP3 캡시드 단백질에 상응한다. 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 추가로 변형된 키메라 VP1, VP2, 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함하는 모자이크 캡시드의 일부 구현예에서, 기준 단백질은, 일부가 키메라 캡시드 단백질의 일부를 형성하는 상응하는 캡시드 단백질일 수 있다. 비제한적인 예로서, 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 변형된 키메라 AAV2/AAAV VP1 캡시드 단백질을 포함하는 모자이크 캡시드는 다음을 기준 캡시드 단백질로서 추가로 포함할 수 있다: 제1 구성원이 결합된 AAV2 VP1 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 AAAV VP1 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 키메라 AAV2/AAAV VP1 캡시드 단백질. 유사하게, 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 변형된 키메라 AAV2/AAAV VP2 캡시드 단백질을 포함하는 모자이크 캡시드는 다음을 기준 캡시드 단백질로서

추가로 포함할 수 있다: 제1 구성원이 결합된 AAV2 VP2 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 AAV VP2 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 키메라 AAV2/AAV VP2 캡시드 단백질. 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 변형된 키메라 AAV2/AAV VP3 캡시드 단백질을 포함하는 모자이크 캡시드는 다음을 기준 캡시드 단백질로서 추가로 포함할 수 있다: 제1 구성원이 결합된 AAV2 VP2 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 AAV VP1 캡시드 단백질; 제1 구성원이 결합된 키메라 AAV2/AAV VP3 캡시드 단백질. 모자이크 캡시드의 일부 구현예에서, 기준 캡시드 단백질은, 이 단백질에 결합 쌍의 제1 구성원이 결합되어 있고, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 제1 캡시드 단백질과 함께 캡시드를 형성할 수 있는 한, 임의의 캡시드 단백질일 수 있다.

[0602]

일반적으로, 모자이크 입자는 변형된 *Cap* 유전자와 기준 *Cap* 유전자의 혼합물을 표시된 비율로 생산 세포 내로 형질감염시킴으로써 생성될 수 있다. 단백질 서브유닛 비율, 예를 들어, 입자 내의 변형된 VP 단백질:미변형 VP 단백질 비율은, 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된 제1 캡시드 단백질을 암호화하는 *cap* 유전자 및 하나 이상의 기준 *cap* 유전자로 이루어진 적어도 2개의 종(예를 들어, 포장 세포 내로 형질감염된 변형된 *cap* 유전자:기준 *cap* 유전자(들))의 비율을 화학량론적으로 반영할 수 있지만, 반드시 그런 것은 아니다. 일부 구현예에서, 입자 내의 단백질 서브유닛 비율은 포장 세포 내로 형질감염된 변형된 *cap* 유전자:기준 *cap* 유전자(들) 비율을 화학량론적으로 반영하지는 않는다.

[0603]

모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:59 내지 약 59:1의 범위이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 30개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 30개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:2이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 20개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 40개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 3:5이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:3이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 15개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 45개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:4이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 12개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 48개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:5이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 10개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 50개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:6이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:7이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:8이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:9이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 6개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 54개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:10이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:11이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 5개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 55개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:12이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:13이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:14이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 4개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 56개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:15이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:19이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 3개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 57개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 1:29이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 2개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 58개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 1:59이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 2:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 40개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 20개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 5:3이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 3:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 45개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 15개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 4:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 48개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 12개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 5:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 50개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 10개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 6:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 7:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛

비율은 약 8:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 9:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 54개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 6개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 10:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 11:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 55개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 5개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 12:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 13:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 14:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 56개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 4개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 15:1이다. 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 19:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 57개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 3개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛은 적어도 약 29:1이다(예를 들어, 모자이크 바이러스 입자는 약 58개의 변형된 캡시드 단백질 및 약 2개의 기준 캡시드 단백질을 포함함). 모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 약 59:1이다.

[0604] 비모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 1:0일 수 있으며, 여기서 비모자이크 바이러스 입자의 각각의 캡시드 단백질은 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형된다. 비모자이크 바이러스 입자의 일부 구현예에서, 단백질 서브유닛 비율은 0:1일 수 있으며, 여기서 비모자이크 바이러스 입자의 각각의 캡시드 단백질은 결합 쌍의 제1 구성원에 의해 변형되지 않는다.

[0605] 삽입 부위

[0606] 적어도 큰 신장부 및 밀접하게 관련된 계열 구성원의 큰 구성원이 고도로 보존되므로, 열거된 AAV를 이외의 AAV를 위한 상응하는 삽입 부위는 아미노산 정렬을 수행하거나 캡시드 구조를 비교함으로써 식별될 수 있다. 상이한 캡시드 단백질의 예시적인 정렬에 대해서는 예를 들어 Rutledge 등의 문헌[(1998) *J. Virol.* 72:309-19]; Mietzsch 등의 문헌[2019) *Viruses* 11, 362, 1-34], 및 미국 특허 제9,624,274호를 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 예를 들어, Mietzsch 등의 (2019) 문헌은 가변 영역 VR I 내지 VR IX를 도시한 도 7에서 상이한 테펜도파보바이러스로부터의 리본의 오버레이를 제공한다. 해당 문헌에 기술된 것과 같은 이러한 구조 분석과 서열 분석을 사용하여, 당업자는 가변 영역 내의 어떤 아미노산이, 예를 들어 본원에 기술된 것과 같은 표적화 리간드, 결합 쌍의 제1 구성원, 및/또는 검출 가능한 표지의 삽입을 수용할 수 있는 AAV의 아미노산 서열에 상응하는지 결정할 수 있다.

[0607] 일반적으로, 표적화 리간드, 결합 쌍의 제1 구성원, 및/또는 검출 가능한 표지는 AAV 캡시드 단백질의 가변 영역 또는 가변 루프, AAV 캡시드 단백질의 GH 루프 등의 내에 삽입될 수 있다.

[0608] 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 검출 가능한 표지는 AAV2 캡시드 단백질 VP1의 G453, AAV2 캡시드 단백질 VP1의 N587, AAV9 캡시드 단백질 VP1의 G453, 및 AAV9 캡시드 단백질 VP1의 A589로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치와 상응하는 아미노산 위치 다음에 있는 비영장류 동물 AAV의 VP1 캡시드 단백질에 삽입된다. 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 검출 가능한 표지는 AAV2 VP1 캡시드의 N587 및 R588에 상응하는 아미노산들 사이에서 비영장류 동물 AAV의 VP1 캡시드 단백질에 삽입된다. 비영장류 동물 VP1 캡시드 단백질의 추가의 적절한 삽입 부위는 AAV2의 VP1 캡시드 단백질의 I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713, 및 I-716에 상응하는 것들을 포함한다(Wu 등의 문헌[(2000) *J. Virol.* 74:8635-8647]). 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질은 I-1, I-34, I-138, I-139, I-161, I-261, I-266, I-381, I-447, I-448, I-459, I-471, I-520, I-534, I-570, I-573, I-584, I-587, I-588, I-591, I-657, I-664, I-713, I-716, 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 AAV2 캡시드 단백질의 위치와 상응하는 위치에 삽입된 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 검출 가능한 표지를 포함하는 비영장류 동물 캡시드 단백질일 수 있다. 비영장류 동물 AAV의 추가의 적절한 삽입 부위는 AAV1의 I-587 또는 I-590, AAV1의 I-589, AAV3의 I-585, AAV4의 I-584 또는 I-585, 및 AAV5의 I-575 또는 I-585에 상응하는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질은 I-587(AAV1), I-589(AAV1), I-585(AAV3), I-585(AAV4), I-585(AAV5), 및 이들의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된 위치와 상응하는 위치 내에 삽입된 표적화 리간드, 결합 쌍의 제1 구성원, 및/또는 검출 가능한 표지를 포함하는 비영장류 동물 캡시드 단백질일 수 있다.

[0609] 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 구성원 및/또는 검출 가능한 표지는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 아미노산 위치와 상응하는 아미노산 위치 다음의 비영장류 동물 AAV의 VP1 캡시드 단백질 내에 삽입된다: 조류

AAV 캡시드 단백질 VP1의 I444, 조류 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I580, 턱수염 도마뱀 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I573, 턱수염 도마뱀 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I436, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I429, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I430, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I431, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I432, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I433, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I434, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I436, 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I437, 및 바다 사자 AAV 캡시드 단백질 VP1의 I565.

[0610] 본원에서의 명명법 I-###, I# 등은 삽입 부위(I)를 지칭하고, ###은 AAV 캡시드 단백질의 VP1 단백질에 대한 아미노산 번호를 명명하는 것이지만, 이러한 삽입은 바로 N-말단 또는 C-말단에 위치할 수 있고, 바람직하게는 주어진 아미노산의 N-말단 또는 C-말단에 있는 5개의 아미노산의 서열 중 하나의 아미노산의 C-말단에 위치할 수 있고, 바람직하게는 주어진 아미노산의 N-말단 또는 C-말단에 있는 3개, 더 바람직하게는 2개 중 하나의 아미노산, 특히 1개의 아미노산의 C-말단에 위치할 수 있다. 또한, 본원에서 언급되는 위치는 AAV 캡시드 유전자에 의해 암호화된 VP1 단백질에 상대적인 것이며, 상응하는 위치(및 이의 점 돌연변이)는 적절한 AAV 캡시드 유전자에 의해 암호화되는 VP1, VP2, 및 VP3 단백질의 서열 정렬을 수행함으로써 캡시드 유전자에 의해 암호화되는 VP2 및 VP3 캡시드 단백질에 대해 쉽게 식별될 수 있다.

[0611] 따라서, cap 유전자를 이들 부위 중 하나의 코딩 핵산의 상응하는 위치에 삽입하는 것은 VP1, VP2, 및/또는 VP3에 삽입하는 결과를 초래하는데, 이는 캡시드 단백질이 엇갈린 시작 코돈과 동일한 유전자의 중첩 해독 프레임에 의해 암호화되기 때문이다. 그러므로, 예를 들어 본 명명법에 따른 AAV2의 경우, 아미노산 1과 138 사이에서의 삽입은 VP1에만 삽입되고, 138과 203 사이에서의 삽입은 VP1 및 VP2에 삽입되며, 203과 C-말단 사이에서의 삽입은 VP1, VP2, 및 VP3에 삽입되는데, 이는 삽입 부위 I-587에도 당연히 적용되는 경우이다. 따라서, 본 발명은 VP1, VP2 및/또는 VP3 단백질에 상응하는 삽입을 갖는 AAV의 구조적 유전자를 포함한다.

[0612] 또한, 본 발명의 VP3 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산이 본원에 제공된다. AAV 캡시드 단백질은, 시차를 둔 시작 코돈과 중첩되는 동일한 유전자의 중첩 관독 프레임에 의해 암호화될 수 있지만, 반드시 그렇지 않다. 일부 구현예에서, 본 발명의 VP3 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산은 본 발명의 VP2 캡시드 단백질 또는 VP1 캡시드 단백질도 암호화하지는 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 VP3 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산은 본 발명의 VP2 캡시드 단백질을 암호화할 수도 있지만 본 발명의 VP1 캡시드 단백질도 암호화하지는 않는다. 일부 구현예에서, 본 발명의 VP3 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산은 본 발명의 VP2 캡시드 단백질 및 본 발명의 VP1 캡시드 단백질도 암호화할 수 있다.

[0613] 일부 구현예에서, 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원을 포함하는 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드(예를 들어, 여기서 제2 구성원은 표적화 리간드에 작동 가능하게 연결되고, 다중 특이적 결합 단백질을 포함함)는 특정 세포를 감염시킬 수 있으며; 예를 들어, 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원 중 어느 하나 또는 둘 다가 결합된 것을 제외하면 변형된 바이러스 캡시드 단백질과 동일한 (예를 들어 대조군 캡시드 단백질을 포함하는) 대조군 바이러스 캡시드의 능력과 비교했을 때, 특이적 세포를 표적화하고 이에 결합하는 강화된 능력을 갖는다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율을 검출할 수 없는 것과 비교했을 때 검출 가능한 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 10% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 20% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 적절한 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 30% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 적절한 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 40% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 적절한 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 50% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 표적화 리간드에 연결된 결합 쌍의 적절한 제1 및 제2 구성원에 결합된 본원에 기술된 것과 같은 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 캡시드는 대조군 바이러스 캡시드의 형질도입 효율보다 60% 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현

[illegible]

다 적어도 100배 더 큰 형질도입 효율을 나타낸다. 일부 구현예에서, 비영장류 동물 AAV, 원격 AAV, 또는 이들의 조합의 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 바이러스 캡시드 단백질을 포함하고, 임의로 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원을 포함하는(예를 들어, 제2 구성원은 다중특이적 결합 단백질을 포함하는 표적화 리간드에 작동 가능하게 연결됨) 본 발명의 바이러스 입자는, 임의로 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원을 또한 포함하는(예를 들어, 제2 구성원은 다중특이적 결합 단백질을 포함하는 표적화 리간드에 작동 가능하게 연결됨) 적절한 대조군 바이러스 입자(예를 들어, 본 발명의 바이러스 캡시드에 일부가 포함된 AAV 혈청형의 바이러스 캡시드를, 예를 들어, 비영장류 동물 AAV, 원격 AAV, 또는 이들의 조합의 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 바이러스 캡시드 단백질의 일부로서 포함함)와 비교해, 인간 환자로부터 단리한 기존 항체에 의한 중화를 더 잘 회피할 수 있다. 일부 구현예에서, 비영장류 동물 AAV, 원격 AAV, 또는 이들의 조합의 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 포함하는 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 본 발명의 바이러스 입자는, 적절한 대조군 바이러스 입자(예를 들어, 본 발명의 바이러스 입자는 대조군 바이러스 입자의 IC50 값의 적어도 2배인 IC50 값을 가짐)와 비교해 중화를 위해 적어도 2배 더 많은 총 IVIG 또는 IgG(예를 들어, 50% 이상의 감염 억제)를 필요로 한다.

[0615] 검출 가능한 표지를 포함하는 본 발명의 일부 구현예에서, 표적화 리간드는, (i) 검출 가능한 표지에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프 및 (ii) (예를 들어, 정제를 위해) 비드의 표면에 접합되거나 표적 세포에 의해 발현될 수 있는 수용체에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 결합 분자를 포함한다. 따라서, (i) 검출 가능한 표지에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프 및 (ii) 수용체에 특이적으로 결합하는 제2 결합 도메인을 포함하는 다중특이적 결합 분자는 바이러스 입자를 표적화한다. 이러한 “표적화(targeting)” 또는 “유도(directing)”는, 야생형 바이러스 입자가 조직 내의 여러 개의 세포 및/또는 유기체 내의 여러 개의 기관을 표적화하고, 조직 또는 기관의 광범위한 표적화는 검출 가능한 표지의 삽입에 의해 감소 내지는 제거되며, 조직 내의 보다 특이적인 세포 또는 유기체 내의 보다 특이적인 기관에 대한 재 표적화는 다중특이적 결합 분자로 달성된다는 시나리오를 포함할 수 있다. 이러한 재표적화 또는 재유도는, 야생형 바이러스 입자가 조직을 표적화하고, 조직을 표적화하는 것은 검출 가능한 표지의 삽입에 의해 감소 내지는 제거되고, 완전히 다른 조직에 대한 재표적화는 다중특이적 결합 분자로 달성된다는 시나리오를 포함할 수도 있다. 본원에 기술된 바와 같은 항체 파라토프는 일반적으로 검출 가능한 표지를 특이적으로 인식하는 상보성 결정 영역(CDR), 예를 들어, 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인의 CDR3 영역을 최소한으로 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 결합 분자는 검출 가능한 표지에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프를 포함하는 항체(또는 이의 일부분)를 포함한다. 예를 들어, 다중특이적 결합 분자는 단일 도메인 중쇄 가변 영역 또는 단일 도메인 경쇄 가변 영역을 포함할 수 있으며, 여기서 단일 도메인 중쇄 가변 영역 또는 단일 도메인 경쇄 가변 영역은 검출 가능한 표지에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프를 포함한다. 일부 구현예에서, 다중특이적 결합 분자는 Fv 영역을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 다중특이적 결합 분자는 검출 가능한 표지에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프를 포함하는 scFv를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 다중특이적 결합 분자는 c-myc(서열번호 246)에 특이적으로 결합하는 항체 파라토프를 포함한다.

[0616] 본 발명의 일 구현예는 본 발명의 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 다량체 구조이다. 다량체 구조는 본원에 기술된 바와 같은 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 적어도 5개, 바람직하게는 적어도 10개, 더 바람직하게는 적어도 30개, 가장 바람직하게는 적어도 60개의 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함한다. 이들은 규칙적인 바이러스 캡시드(공 바이러스 입자) 또는 바이러스 입자(관심 뉴클레오티드를 캡시드화하는 캡시드)를 형성할 수 있다. 바이러스 계놈을 포함하는 바이러스 입자의 형성은 본원에 기술된 변형된 바이러스 캡시드의 사용에 매우 바람직한 특징이다.

[0617] 본 발명의 추가 구현예는 적어도 하나의 변형된 바이러스 캡시드 단백질 및/또는 이를 암호화하는 핵산의 용도, 바람직하게는 관심 뉴클레오티드의 제조, 및 관심 뉴클레오티드를 표적 세포에 전달하는 데 사용하기 위한 적어도 하나의 다량체 구조(예를 들어, 바이러스 입자)의 용도이다.

[0618] 사용 방법 및 제조 방법

[0619] 본원에 기술된 변형된 바이러스 캡시드의 추가 구현예는, 관심 뉴클레오티드(예: 리포터 유전자 또는 치료 유전자)를 표적 세포에 전달하기 위한 이들의 용도이다. 일반적으로, 관심 뉴클레오티드를 패키징하는 것은 AAV ITR 서열 사이에 있는 AAV 계놈을 관심 유전자로 대체하여 전달 플라스미드를 생성한 다음, 잘 알려진 방법에 따라 AAV 캡시드에 캡슐화하는 것을 포함한다. 따라서, 본원에 기술된 바와 같은 변형된 바이러스 캡시드는, 관심 유전자, 예를 들어 리포터 유전자(들) 또는 치료 유전자(들), 또는 관심 유전자의 일부(바이러스 또는 비-바이러스 프로모터에 의해 조절될 수 있음)의 측면에 위치하는 5' 및 3' 역위 말단 반복(ITR) 서열을 일반적으로 포

함할 수 있는 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드를 캡슐화할 수 있다. AAV 바이러스 입자를 패키징하는 잘 알려진 방법에 따르면, 변형된 바이러스 캡시드, 5' ITR, 및 3' ITR은 동일한 AAV 혈청형일 필요는 없다. 일 구현예에서, 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드는 5' 에서 3' 방향으로 다음을 포함한다: 5' ITR, 프로모터, 유전자(예: 리포터 및/또는 치료 유전자), 및 3' ITR.

[0620] AAV 전달 플라스미드 설계를 위한 고려 사항은 야생형 AAV 게놈이 약 4.7 kb라는 것이다. 따라서, 개별 AAV의 패키징 용량을 초과하는 관심 뉴클레오티드를 패키징을 가능하게 하는 잘 알려진 전략이 본원에 포함된다. 이러한 전략은 2개의 상보성 벡터 게놈으로부터의 분자간 재조합된 ITR에 걸친 전사 스플라이싱, 상동성에 의한 벡터 재조합, RNA 트랜스-스플라이싱, 및/또는 분할된 인테인 설계를 통한 단백질 “트랜스-스플라이싱”을 통해 야생형 AAV 게놈보다 큰 관심 유전자를 발현하기 위한 ITR 매개 재조합을 이용하는 이중 벡터 전략을 포함하지만 이에 한정되지는 않는다. 예를 들어 Nakai, H. 등의 문헌[(2000) *Nat. Biotechnol.* 18:527-532]; Sun, L.의 문헌[(2000) *Nat. Med.* 6: 599-602 (2000)]; Ghosh, A. 등의 문헌[(2008) *Mol. Ther.* 16:124-130 (2008)]; Lai, Y의 문헌[(2005) *Nat. Biotechnol.* 23:1435-1439]; Chew, W. L. 등의 문헌[(2016) *Nat. Methods* 13:868-874]; Li, J.의 문헌[(2008) *Hum. Ther.* 22:1605-13]을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0621] 큰 유전자를 표적 세포 내로 전달하기 위한 이중 AAV 벡터 전략이 기술되었는데, 이는 상이한 메커니즘에 의존하며, 여기에는 이중 벡터 내의 중첩 영역을 포함하는 트랜스 스플라이싱, 및 이 두가지의 하이브리드가 포함되지만 이에 한정되지는 않는다. Tornabene 및 Trapani의 문헌[(2020) *Human Gene Ther.* 31:47-56]; 미국 특허 제8,236,557호도 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다.

[0622] 트랜스-스플라이싱 접근법은 전장 게놈을 재구성하도록 연쇄체화된 AAV ITR 서열의 능력을 활용하며, 여기서 2개 이상의 바이러스 캡시드 각각은 2개 이상의 전달 플라스미드 중 하나를 각각 캡슐화하고, 전달 플라스미드 각각은 관심 유전자의 일부를 포함한다. 예를 들어, 이중 벡터 접근법에서, 2개의 전달 플라스미드는 다음과 같이 설계될 수 있다: 5' -전달 플라스미드는 프로모터, 관심 유전자의 코딩 서열의 5' 부분, 및 스플라이싱 공여자(SD) 신호를 포함하고; 3' -전달 플라스미드는 스플라이싱 수용체(SA) 신호, 관심 유전자의 3' 부분, 및 polyA 신호를 포함한다. 2개의 AAV 게놈의 꼬리-머리가 ITR 매개 연쇄체화한 후, SD 및 SA 신호는 재조합된 게놈의 스플라이싱을 허용하게 된다.

[0623] 중첩 영역 접근법을 선택하는 경우 큰 관심 유전자도 분할된다. 중첩 영역 접근법에서, 5' 및 3' 부분(따라서 5' 전달 플라스미드 및 3' 전달 플라스미드)은 재조합 서열, 예를 들어 상동성 영역을 공유하며, 예를 들어 각각의 부분은 중첩 서열을 포함한다. 관심 유전자는 재조합원성 서열, 예를 들어 상동성/중첩 영역에 의해 매개되는 상동성 재조합을 통해 표적화된 세포에서 전체적으로 만들어진다.

[0624] 하이브리드 접근법에서, 5' -전달 플라스미드 및 3' -전달 플라스미드는 고도로 재조합원성인 서열을 각각 포함하며, 여기서 재조합원성 서열은 관심 유전자의 코딩 서열의 5' 부분의 SD 신호의 하류 및 관심 유전자의 코딩 서열의 3' 부분의 SA 신호의 상류에 위치한다. 이러한 하이브리드 시스템에서, 관심 유전자는 ITR 매개 연결 및 스플라이싱을 통해 및/또는 상동성 재조합에 의해 전체적으로 만들어질 수 있다.

[0625] RNA 또는 단백질 수준에서의 트랜스 스플라이싱이 사용될 수도 있다. RNA 트랜스 스플라이싱 접근법에서, 2개의 전달 플라스미드는 큰 유전자의 pre-mRNA의 5' 및 3' 단편을 각각 암호화하고, 트랜스 스플라이싱에 유리할 수 있는 인트론 혼성화 도메인을 공유함으로써, 2개의 절반 전사체를 온전한 전장 mRNA로 결합시킬 수 있다.

[0626] 단백질 트랜스 스플라이싱은 번역 후에 일어나며, 분할-인테인으로 불리는 개재 단백질에 의해 촉매된다. 분할-인테인은 2개의 숙주 단백질의 가장 말단에서 2개의 독립적인 폴리펩티드(N-인테인 및 C-인테인)로서 발현된다. N-인테인 및 C-인테인 폴리펩티드는 서로 마주칠 때까지 촉매적으로 비활성인 상태로 유지된다. 서로 마주친 후, 각각의 인테인은 펩티드 결합을 통해 N- 및 C- 숙주 폴리펩티드의 연결을 매개하면서 숙주 단백질로부터 자신을 정확하게 절제한다. 분할-인테인의 용도는 근육, 간, 및 망막 질환에서 관심 치료 유전자의 AAV 기반 전달에 사용되어 왔다. 예를 들어, N- 및 C-인테인 코딩 서열에 융합된 미니-디스트로핀 cDNA의 2개의 절반을 공동 전달할 때, 2개의 폴리펩티드의 효율적인 생산이 나타났다. Li 등의 문헌[(2008) *Hum Gene Ther* 19:958-64]. 유사하게, AAV-분할-인테인은 주기적 간격으로 분포하는 짧은 회문 반복(CRISPR)-Cas9 뉴클레아제의 발현 및 결합에 널리 사용되어 왔다.

[0627] 상기 이중 벡터 접근법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, Tornabene 및 Trapani의 전술한 (2020) 문헌; 미국 특허 제8,236,557호 참조. 따라서, 일부 구현예에서, 본원에 기술된 변형된 바이러스 캡시드는 관심 유전

자의 일부를 포함하는 관심 뉴클레오티드를 캡슐화한다. 일부 구현예에서, 관심 유전자의 일부를 포함하는 관심 뉴클레오티드는 스플라이싱 공여자 신호 또는 스플라이싱 수용자 신호 및/또는 재조합 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 유전자의 일부를 포함하는 관심 뉴클레오티드는 인트론 혼성화 도메인 암호화 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 관심 유전자의 일부를 포함하는 관심 뉴클레오티드는 N-인테인 또는 C-인테인 암호화 서열을 포함한다.

[0628] 전달 플라스미드/관심 뉴클레오티드의 설계는 관심 유전자의 발현을 조절할 하나 이상의 조절 요소, 예를 들어 프로모터 및/또는 인핸서 요소를 포함하는 것을 포함한다. 유용한 프로모터의 비-제한적인 예는, 예를 들어, 사이토메갈로바이러스(CMV)-프로모터, 비장 병소 형성 바이러스(SFFV)-프로모터, 전사 신장 인자 1 알파(EF1a)-프로모터(1.2 kb EF1a-프로모터 또는 0.2 kb EF1a-프로모터), 키메라 EF 1 a/IF4-프로모터, 및 포스포-글리세린 산 키나아제(PGK)-프로모터를 포함한다. 관심 유전자의 발현을 증가시키기 위해 바이러스 작제물 내에 내부 인핸서가 존재할 수도 있다. 예를 들어, CMV 인핸서(Karasuyama 등의 문헌[1989. J. Exp. Med. 169:13]을 참조하고; 그 전체는 참조로서 본원에 통합됨)가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, CMV 인핸서는 닭 β -액틴 프로모터와 조합하여 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 조직 특이적 조절 요소, 예를 들어 근육 특이적 프로모터 및/또는 조절 요소가 관심 유전자의 발현을 유도하는 데 사용될 수 있다. 예를 들어, 근육 크레아틴 키나아제 유전자에 기초한 근육 특이적 조절 요소의 사용은 뒤시엔느 근 이영양증(DMD) 및 지대근 이영양증(LGMD)과 같은 근육 유전자 요법 치료에 사용되어 왔다. 예를 들어, Salva, M. Z. 등의 문헌[(2007) *Mol. Ther.* 15: 320-329]을 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 본원의 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드는 근육 크레아틴 키나아제(MCK)의 인핸서 및/또는 프로모터를 포함하되, MCK의 인핸서 및/또는 프로모터는 관심 유전자의 발현을 유도한다. 일부 구현예에서, 본원의 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드는 RNA 중합효소 II를 동원하는 인핸서 및/또는 프로모터 요소를 포함하되, MCK의 인핸서 및/또는 프로모터는 관심 유전자의 발현을 유도한다. 일부 구현예에서, 본원의 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드는 RNA 중합효소 III를 동원하는 인핸서 및/또는 프로모터 요소를 포함하되, MCK의 인핸서 및/또는 프로모터는 관심 유전자의 발현을 유도한다.

[0629] 일부 구현예에서, 양방향 프로모터 벡터도 이중 치료 유전자 카세트를 전달하는 데 사용되어 왔다. 이의 일례는 HexA 효소의 핵소사미니다아제 α - 및 β -서브유닛의 동시 발현을 유도하는 양방향 닭 β -액틴 유비퀴틴스 프로모터이며, 이들 2개의 유전자 각각은 테이삭스병(Tay-Sachs disease) 및 샌드호프병(Sandhoff disease)에 관여한다. Lahey 등의 문헌[(2020) *Mol. Ther.* 28: 2150-2160]을 참조하고, 그 전체는 참조로서 본원에 통합된다. 일부 구현예에서, 본원의 전달 플라스미드 및/또는 관심 뉴클레오티드는 양방향 프로모터를 포함하고, 여기서 양방향 프로모터는 2개의 상이한 관심 유전자의 발현을 유도한다.

[0630] 다양한 리포터 유전자(또는 검출 가능한 모이어티)는 본원에 기술된 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 다량체 구조 내에 캡슐화될 수 있다. 예시적인 리포터 유전자는, 예를 들어, b-갈락토시다아제(암호화된 *lacZ* 유전자), 녹색 형광 단백질(Green Fluorescent Protein; GFP), 강화된 녹색 형광 단백질(eGFP), MmGFP, 청색 형광 단백질(BFP), 강화된 청색 형광 단백질(eBFP), mPlum, mCherry, tdTomato, mStrawberry, J-Red, DsRed, mOrange, mKO, mCitrine, Venus, YPet, 황색 형광 단백질(YFP), 강화된 황색 형광 단백질(eYFP), 에머랄드(Emerald), CyPet, 홍색 형광 단백질(CFP), 진청색(Cerulean), T-Sapphire, 루시페라제(luciferase), 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 또는 이들의 조합을 포함한다. 본원에 기술된 방법은, 녹색 형광 단백질을 암호화하는 리포터 유전자를 사용해 표적화 입자를 작제하는 것을 보여주지만, 본 개시를 읽음으로써 당업자는 본원에 기술된 바이러스 캡시드가 리포터 유전자 없이 또는 당업계에 알려진 임의의 리포터 유전자를 사용해 생성될 수 있다는 것을 이해할 것이다.

[0631] 다양한 치료 유전자가 본원에 기술된 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 포함하는 다량체 구조에, 예를 들어 전달 입자의 일부로서 캡슐화될 수도 있다. 치료 유전자의 비-제한적인 실시예는 독소(예를 들어, 자살 유전자), 치료 항체 또는 이의 단편, CRISPR/Cas 시스템 또는 이의 일부분(들), 안티센스 RNA, siRNA, shRNA 등을 암호화하는 것들을 포함한다.

[0632] 본 발명의 추가 구현예는 변형된 캡시드 단백질의 제조 방법으로서, 상기 방법은:

[0633] a) 적절한 조건 하에서 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산을 발현시키는 단계, 및

[0634] b) 단계 a)의 발현된 캡시드 단백질을 단리하는 단계를 포함한다.

[0635] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 바이러스 입자는 모자이크 캡시드, 예를 들어, 본원에 기술된 바와

같이 유전적으로 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 캡시드를 (표적화 리간드와 공유 결합의 부재 또는 존재 시) 기준 캡시드 단백질과 함께 특정 비율로 포함한다. 이러한 모자이크 바이러스 입자를 제조하는 방법은:

[0636] a) 적절한 조건 하에서, 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 및 기준 캡시드 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드를 적어도 약 60:1 내지 약 1:60, 예를 들어, 2:1, 1:1, 3:5, 1:2, 1:3 등의 비율(wt/wt)로 발현시키는 단계, 및

[0637] b) 단계 a)의 발현된 캡시드 단백질을 분리하는 단계를 포함한다.

[0638] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 조성물, 또는 본원에 기술된 방법은 변형된 *cap* 유전자:기준 *cap* 유전자(또는 기준 *cap* 유전자의 조합)를 적어도 약 1:60 내지 약 60:1의 범위의 비율로, 예를 들어, 2:1, 1:1, 3:5, 1:2, 1:3 등의 비율로 조합한다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:2이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:3이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:4이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:5이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:6이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:7이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:8이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:9이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:10이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:11이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:12이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:13이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:14이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:15이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:16이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:17이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:18이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:19이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:20이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:25이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:30이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:35이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:40이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:45이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:50이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:55이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 1:60이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 2:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 3:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 4:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 5:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 6:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 7:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 8:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 9:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 10:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 11:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 12:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 13:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 14:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 15:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 16:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 17:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 18:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 19:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 20:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 25:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 30:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 35:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 40:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 45:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 50:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 55:1이다. 일부 구현예에서, 비율은 적어도 약 60:1이다.

[0639] 일부 구현예에서, 모자이크 바이러스 입자 내의 VP 단백질 서브유닛 비율은, 변형된 *cap* 유전자:기준 *cap* 유전자의 비율을 화학량론적으로 반영할 수 있지만, 반드시 그렇지 않다. 비제한적인 예시적인 구현예로서, 상기 방법에 따라 형성된 모자이크 캡시드는 모자이크 캡시드를 생산하는 데 사용된 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산의 비율(wt:wt)과 유사한 변형된 캡시드 단백질:기준 캡시드 단백질 비율을 갖는 것으로 간주될 수 있지만, 반드시 그렇지 않다. 일부 구현예에서, 모자이크 캡시드는 약 1:59 내지 약 59:1의 단백질 서브유닛 비율을 포함한다.

[0640] 본 발명의 추가 구현예는 바이러스의 형성을 변경시키는 방법으로서, 상기 방법은: (a) 아미노산 서열을 암호화하는 핵산을 바이러스 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 삽입하여 아미노산 서열을 포함하는 유전적으로 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 형성하는 단계 및/또는 (b) 바이러스 입자를 생산하기에 충분한 조건에서 포장 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하며, 여기서 포장 세포는 핵산을 포함한다. 본 발명의 추가 구현예는 캡시드 단백질의 표면에 표적 리간드를 제시하는 방법으로서, 상기 방법은: (a) 적합한 조건 하에서 본원에 기술된 바와 같이 변형된 바이러스 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산(및 임의로는 기준 캡시드 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드)을 발현시키는 단계(여기서 핵산은 특이적 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하는 캡시드 단백질을 암호화함), (b) 단계 (a)의 특이적 결합 쌍의 제1 구성원 또는 그를 포함하는 캡시드를 포함하는 발현된 캡시드 단백질을 분리하는 단계, 및 (c) 제1 및 제2 구성원 사이에 이소펩티드 결합의 형성을 허용하는 적절한 조건 하에서 특이적 결합 쌍의 제2 동족 구성원을 가진 캡시드 단백질 또는 캡시드를 인큐베이션

팅하는 단계를 포함하며, 여기서 특이적 결합 쌍의 제2 동족 구성원은 표적화 리간드와 융합된다.

[0641] 일부 구현예에서, 포장 세포는 관심 뉴클레오티드를 포함하는 헬퍼 플라스미드 및/또는 전달 플라스미드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 배양 상청액으로부터 자기-상보성 아데노-연관 바이러스 입자를 단리시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 포장 세포를 용해시키고 세포 용해물로부터 단일-가닥 아데노-연관 바이러스 입자를 단리하는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 (a) 세포 찌꺼기를 제거하는 단계, (b) 바이러스 입자를 함유하는 상청액을 핵산 분해 효소(예를 들어, DNase I) 및 $MgCl_2$ 로 처리하는 단계, (c) 바이러스 입자를 농축시키는 단계, (d) 바이러스 입자를 정제하는 단계, 및 (e) (a) 내지 (d)의 임의의 조합을 추가로 포함한다.

[0642] 본원에 기술된 바이러스 입자의 생산에 유용한 포장 세포는, 예를 들어, 바이러스를 허용하는 동물 세포, 또는 바이러스를 허용하도록 변형된 세포; 또는, 예를 들어, 인간칼슘과 같은 형질전환제를 사용하는 포장 세포 작제물을 포함한다. 본원에 기술된 바이러스 입자를 생산하는 데 유용한 포장 세포주의 비제한적인 예는, 예를 들어, 인간 배아 신장 293(HEK-293) 세포(예를 들어, American Type Culture Collection(ATCC) 번호 CRL-1573), SV40 큰 T-항원을 함유하는 HEK-293 세포(HEK-293T 또는 293T), HEK293T/17 세포, 인간 육종 세포주 HT-1080(CCL-121), 림프아세포-유사 세포주 Raji(CCL-86), 교아세포종-정상세포종 상피-유사 세포주 U87-MG(HTB-14), T-림프종 세포주 HuT78(TIB-161), NIH/3T3 세포, 차이니즈 햄스터 난소 세포(CHO)(예: ATCC 번호 CRL9618, CCL61, CRL9096), HeLa 세포(예: ATCC 번호 CCL-2), 배로 세포, NIH 3T3 세포(예: ATCC 번호 CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포(예: ATCC 번호 CCL10), PC12 세포(ATCC 번호 CRL1721), COS 세포, COS-7 세포(ATCC 번호 CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포(ATCC 번호 CCL1.3), HLHepG2 세포, CAP 세포, CAP-T 세포 등을 포함한다.

[0643] Cosset 등의 (1995) J Virol 69,7430-7436에서 개략적으로 서술된 FLY 바이러스 포장 세포 시스템인 L929 세포는 NSO (쥐 골수종) 세포, 인간 양수 세포(예: CAP, CAP-T), 효모 세포(S. 세레비시애, 피히시아 파스토스), 식물 세포(예를 들어, 이에 한정되지 않지만, S. 세레비시애, 피치아 파스토리스를 포함하되 이들로 한정되지 않음), 식물 세포(담배 NTI, BY-2를 포함하되 이들로 한정되지 않음), 곤충 세포(SF9, S2, SF21, Tni (예: High 5)를 포함하되 이들로 한정되지 않음), 또는 박테리아 세포(대장균을 포함하되 이들로 한정되지 않음)를 포함한다.

[0644] 추가적인 포장 세포 및 시스템, 핵산 계능을 위형화된 바이러스 입자 내에 포장하기 위한 포장 기술 및 입자에 대해서는, 예를 들어, Polo 등의 문헌[Proc Natl Acad Sci USA, (1999) 96:4598-4603]을 참조한다. 포장 방법은 바이러스 성분을 영구적으로 발현하는 포장 세포를 사용하는 단계, 또는 세포를 플라스미드로 일시적으로 형질감염시키는 단계를 포함한다.

[0645] 추가의 구현예는 본원에 기술된 바와 같은 변형된 Cap 단백질을 표적화 벡터와 작동 가능하게 연결하기에 충분한 조건에서, 예를 들어 특이적 결합 쌍의 제1 및 제2 구성원의 화학적 연결 및/또는 결합을 통해, 예를 들어 변형된 Cap 단백질과 표적화 벡터의 결합을 촉진하기에 충분한 조건에서, Cap 단백질을 표적화 벡터와 접촉시키는 단계를 포함하는 방법을 포함하며, 여기서 제1 구성원은 변형된 Cap 단백질 내로 삽입되고, 제1 구성원과 표적화 벡터는 특이적 결합 쌍의 제2 구성원에 융합된다.

[0646] 추가의 구현예는 표적 세포에 바이러스를 재유도하고/하거나 리포터 또는 치료 유전자를 표적 세포에 전달하는 방법을 포함하며, 상기 방법은 세포를 시험관 내에서 (예를 들어, 생체 외에서) 또는 생체 내에서 형질도입하는 방법을 포함하고, 상기 방법은: 본원에 기술된 캡시드를 포함하는 바이러스 입자와 표적 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 여기서 캡시드는 표적 세포에 의해 발현된 수용체에 특이적으로 결합하는 표적화 리간드를 포함한다. 일부 구현예에서, 표적 세포는 시험관 내(예를 들어, 생체 외)에 있다. 다른 구현예에서, 표적 세포는 대상체, 예를 들어, 인간의 생체 내에 있다.

[0647] 표적 세포

[0648] 매우 다양한 세포가 본원에 개시된 바와 같은 변형된 바이러스 입자를 사용해 관심 뉴클레오티드를 전달하도록 표적화될 수 있다. 표적 세포는 일반적으로 관심 뉴클레오티드 및 원하는 효과를 기준으로 선택되게 된다.

[0649] 일부 구현예에서, 관심 뉴클레오티드가 전달되어 표적 세포가 효소 결핍이나 면역 결핍(예: X-염색체 관련 중증 복합 면역결핍)과 같은 결핍을 보전하기 위한 단백질을 유기체에서 생산하게 할 수 있다. 따라서, 일부 구현예에서, 동물에서 단백질을 정상적으로 생산하게 되는 세포가 표적화된다. 다른 구현예에서, 단백질이 가장 유

익한 영역 내의 세포가 표적화된다.

- [0650] 다른 구현예에서, siRNA를 암호화하는 유전자와 같은 관심 뉴클레오티드는 표적 세포에서 특정 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 관심 뉴클레오티드는, 예를 들어, 병원체 수명 주기에 관여하는 유전자의 발현을 억제할 수 있다. 따라서, 병원균에 쉽게 감염될 수 있는 세포 또는 병원균에 감염된 세포가 표적화될 수 있다. 다른 구현예에서, 관심 뉴클레오티드는 표적 세포에서 독소의 생산을 담당하는 유전자의 발현을 억제할 수 있다.
- [0651] 다른 구현예에서, 관심 뉴클레오티드는 독성 단백질을 발현한 세포를 죽이는 독성 단백질을 암호화할 수 있다. 이 경우, 종양 세포 또는 다른 원하지 않는 세포가 표적화될 수 있다.
- [0652] 또 다른 실시예에서, 치료 단백질을 암호화하는 관심 뉴클레오티드가 있다.
- [0653] 관심 뉴클레오티드의 발현이 요구되는 표적 세포의 특정 집단이 식별된 경우, 표적 세포의 해당 집단에서 특이적으로 발현되는 표적 수용체가 선택된다. 표적 수용체는 해당 세포 집단에서만 배타적으로 발현되거나, 다른 세포 집단에서보다 더 큰 정도로 해당 세포에서 발현될 수 있다. 발현이 더 특이적일수록, 더 특이적인 전달이 표적 세포로 유도될 수 있다. 상황에 따라, 마커의 원하는 특이성의 양(따라서, 원하는 유전자 전달의 양)은 달라질 수 있다. 예를 들어, 독성 유전자를 도입하는 경우, 비-표적화된 세포를 죽이지 않도록 높은 특이성이 가장 바람직하다. 전체적인 충격이 요구되는 수확용 단백질의 발현 또는 분비 산물의 발현의 경우, 더 낮은 마커 특이성이 필요할 수 있다.
- [0654] 위에서 논의된 바와 같이, 표적 수용체는 표적화 리간드가 식별되거나 생성될 수 있는 임의의 수용체일 수 있다. 바람직하게는 표적 수용체는 수용체와 같은 펩티드 또는 폴리펩티드이다. 그러나, 다른 구현예에서, 표적 수용체는 결합 파트너에 의해 인식될 수 있는 탄수화물 또는 다른 분자일 수 있다. 표적 수용체의 결합 파트너(예: 리간드)가 이미 알려져 있는 경우, 이를 친화도 분자로서 사용할 수 있다. 그러나, 결합 분자가 알려지지 않은 경우, 표준 절차를 사용해 표적 수용체에 대한 항체를 생성할 수 있다. 이어서, 항체는 표적화 리간드로서 사용될 수 있다.
- [0655] 따라서, 표적 세포는, 예를 들어, (1) 응용 분야(예: 치료, 수집될 단백질의 발현, 및 질병 내성의 부여) 및 (2) 원하는 양의 특이성을 갖는 마커의 발현을 포함하는 다양한 인자에 기초하여 선택될 수 있다.
- [0656] 표적 세포는 어떤 식으로도 제한되지 않으며, 생식선 세포와 세포주 및 체세포와 세포주 둘 다를 포함한다. 표적 세포가 생식선 세포인 경우, 표적 세포는 바람직하게는 단일 세포 배아 및 배아 줄기 세포(ES)로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0657] **약학적 조성물, 투여 형태, 및 투여**
- [0658] 추가적인 실시예는 본 발명에 따른 적어도 하나의 변형된 바이러스 캡시드 단백질 및 적절한 표적화 리간드 및/또는 본 발명에 따른 핵산을 포함하는 의약을 제공한다. 바람직하게는, 이러한 의약은 유전자 전달 입자로서 유용하다.
- [0659] 본원에 기술된 바이러스 입자를 포함하는 약학적 조성물 및 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제가 또한 본원에 개시된다. 또한, 본원에 기술된 바이러스 입자를 포함하는 약학적 투여 형태가 본원에 개시된다.
- [0660] 본원에서 논의된 바와 같이, 본원에 기술된 바이러스 입자는 다양한 치료 용도(생체 내 및 생체 외)에 사용될 수 있고 연구 도구로서 사용될 수 있다.
- [0661] 본원에 개시된 바이러스 입자에 기초한 약학적 조성물은 하나 이상의 생리학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제를 사용해 임의의 통상적인 방식으로 제형화될 수 있다. 바이러스 입자는, 예를 들어, 주입, 흡입 또는 (입이나 코를 통한) 흡인 투여용으로 제형화되거나, 경구, 구강, 비경구, 또는 직장 투여용으로 제형화되거나, 종양에 대한 직접 투여용으로 제형화될 수 있다.
- [0662] 약학적 조성물은 전신, 국소 또는 국지화 투여를 포함하는 다양한 투여 모드에 맞게 제형화될 수 있다. 기술 및 제형에 대해서는, 예를 들어 Remrning's Pharmaceutical Sciences, Meade Publishing Co., Easton, Pa에서 확인할 수 있다. 전신 투여의 경우, 근육 내, 정맥 내, 복강 내, 및 피하 주사를 포함하는 주사가 바람직하다. 주사의 목적으로, 약학적 조성물은 액체 용액으로, 바람직하게는 생리학적으로 양립 가능한 완충액, 예컨대 헵크 액(Hank's solution) 또는 링거액(Ringer's solution)으로 제형화될 수 있다. 또한, 약학적 조성물은 고형분 형태로 제형화되어 사용 직전에 재용해하거나 현탁할 수 있다. 약학적 조성물의 동결건조된 형태도 적합하다.
- [0663] 경구 투여의 경우, 약학적 조성물은, 예를 들어, 결합제(예: 미리 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐피롤리돈,

또는 히드록시프로필 메틸셀룰로오스); 필러(예: 락토오스, 미정질 셀룰로오스 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예: 스테아린산마그네슘, 탈크 또는 실리카); 봉해제(예: 감자 전분 또는 전분 글리콜산나트륨); 또는 습윤제(예: 라우릴황산나트륨)와 같은 약학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 종래 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐의 형태를 취할 수 있다. 정제는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 코팅될 수도 있다. 경구 투여용 액체 제제는, 예를 들어, 용액, 시럽, 또는 현탁액의 형태를 취할 수 있거나, 사용 전에 물이나 다른 적합한 비히클과 섞을 수 있도록 건조 제품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약제학적으로 허용 가능한 첨가제, 예컨대 현탁제(예: 소르비톨 시럽, 셀룰로오스 유도체, 또는 수소화 식물성 지방); 유화제(예: 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예: 오일, 유성 에스테르, 에틸 알코올, 또는 분획된 식물성 오일); 및 보존제(예: 메틸 또는 프로필-p-히드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 함께 종래 수단에 의해 제조될 수 있다. 상기 제제는 적당량의 완충염, 향미제, 착색제, 및 감미제를 함유할 수도 있다.

[0664] 약학적 조성물은 주사에 의한 비경구 투여, 예를 들어, 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제형은 단위 투약 형태로, 예를 들어 앰플로 제공되거나 임의로 첨가되는 보존제와 함께 다중 투약 용기에 제공될 수 있다. 약학적 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액, 또는 유화액으로서 추가로 제형화될 수 있고, 현탁제, 안정화제 및/또는 분산제를 포함하는 다른 제제를 함유할 수 있다.

[0665] 또한, 약학적 조성물은 데포 제제로서 제형화될 수도 있다. 이러한 장기 작용성 제형은 이식(예: 피하 이식 또는 근육 내 이식)에 의하거나 근육내 주사에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 화합물은 적절한 중합체 또는 소수성 물질(예를 들어, 허용 가능한 오일 내의 유화액), 또는 이온 교환 수지와 함께 제형화되거나, 난용성(sparingly soluble) 유도체로서, 예를 들어, 난용성 염으로서 제형화될 수 있다. 다른 적절한 전달 시스템은 연장된 기간에 걸쳐 약물의 비침습적 국소 전달을 가능하게 하는 미소구체를 포함한다. 이러한 기술은 전도 세관 크기를 갖는 미소구체를 포함할 수 있는데, 이는 염증이나 허혈을 일으키지 않고 관상 동맥 카테터를 통해 기관의 임의의 선택된 부분 내에 주입될 수 있다. 투여된 치료제는 미소구체로부터 서방출되어 선택된 조직에 존재하는 주변 세포에 의해 흡수된다.

[0666] 전신 투여는 또한 점막 또는 경피 수단에 의한 것일 수 있다. 점막 또는 경피 투여의 경우, 침투 대상 장벽에 적합한 침투제가 제제에 사용한다. 이러한 침투제는 당업계에 일반적으로 알려져 있으며, 예를 들어, 점막 투여의 경우, 담즙염 및 푸시딘산 유도체를 포함한다. 또한, 투과를 용이하게 하는 세제가 사용될 수 있다. 점막 투여는 비강 분무나 좌제를 사용하여 이뤄질 수 있다. 국소 투여의 경우, 본원에 기술된 바이러스 입자는 당업계에 일반적으로 공지된 바와 같은 연고, 고약, 겔, 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 치유를 가속화하기 위해 부상이나 염증을 치료하기 위한 세척액이 국소적으로 사용될 수 있다.

[0667] 주사용으로 적합한 약학적 형태는: 멸균 수용액이나 분산액; 참기름, 땅콩유, 또는 수성 프로필렌 글리콜을 포함하는 제형; 및 멸균 주사 용액이나 분산액을 즉석에서 제조하기 위한 멸균 분말을 포함할 수 있다. 모든 경우에, 이러한 형태는 반드시 멸균 상태여야 하고 반드시 유체여야 한다. 이는 제조 및 특정 저장 파라미터(예: 냉장 및 냉동)의 조건 하에서 반드시 안정적이어야 하며, 박테리아 및 곰팡이와 같은 미생물의 오염 작용에 대항하도록 보존되어야만 한다.

[0668] 본원에 개시된 제형이 대상체에서 면역 반응을 증가시키는 치료제로서 사용되는 경우, 치료제는 중성 또는 염 형태의 조성물로 제형화될 수 있다. 약학적으로 허용 가능한 염은 산 부가염(단백질의 유리 아미노기와 함께 형성됨)을 포함하고, 예를 들어, 염산이나 인산과 같은 무기산과 함께 형성되거나, 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기산과 함께 형성된다. 유리 카복실기와 함께 형성된 염은, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제이철과 같은 무기 염기로부터 유도될 수도 되고, 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등과 같은 유기 염기로부터 유도될 수도 있다.

[0669] 담체는 용매일 수도 있고, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예: 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이의 적절한 혼합물, 및 식물성 오일을 함유하는 분산 매질일 수도 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제를 사용함으로써, 분산액의 경우 요구되는 입자의 크기를 유지함으로써, 및 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다. 미생물의 작용을 방지하는 것은 당업계에 공지된 다양한 항박테리아제 및 항진균제에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 당이나 염화나트륨과 같은 등장화제를 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사식 조성물의 장시간 흡수는 스테아린산 알루미늄 및 젤라틴과 같은 흡수 지연제를 조성물에 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0670] 멸균 주사액은, 필요량의 활성 화합물 또는 작제물을, 필요에 따라, 위에서 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적절한 용매에 혼합한 다음, 멸균 여과함으로써 제조할 수 있다.

- [0671] 제형화 시, 용액은 투약식 제형과 비슷한 방식으로, 및 치료적으로 유효한 양으로 투여될 수 있다. 제형은 전술한 주사액의 유형과 같은 다양한 투약 형태로 쉽게 투여되지만, 서방성 캡슐이나 극미립자 및 미소구체 등도 사용될 수 있다.
- [0672] 예를 들어, 수용액을 비경구 투여하는 경우, 필요 시, 용액을 적절히 완충해야만 하고, 액체 희석제는 먼저 충분한 식염수 또는 포도당으로 등장화시켜야 한다. 이들 특정 수용액은 정맥 내, 종양 내, 근육 내, 피하, 및 복강 내 투여에 특히 적합하다. 이러한 맥락에서, 사용할 수 있는 멸균 수성 매질은 본 개시에 비추어 당업자에게 공지될 것이다. 예를 들어, 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 1회 투약량을 용해시킨 다음, 1000 ml의 피하주입용 유체에 첨가하거나 제안된 주입 부위에 주입할 수 있다.
- [0673] 모든 경우에 있어서, 개별 대상체에게 적절한 투여량은 투여 담당자가 결정하게 된다. 예를 들어, 병원성 유기체에 대한 노출의 필요성 또는 대상체의 병태(예를 들어 암)에 따라, 대상체에게는 본원에 기술된 바이러스 입자가 일정 기간 동안 매일, 주별로 투여되거나, 월별로 투여되거나, 2년에 한 번 또는 매년 투여될 수 있다.
- [0674] 정맥 내, 종양 내, 피 내, 또는 근육 내 주사와 같은 비경구 투여용으로 제형화된 화합물 이외에, 약학적으로 허용 가능한 다른 형태는, 예를 들어, 경구 투여용 정제 또는 기타 고형분; 리포솜 제형; 지속 방출 캡슐; 생분해성 형태 및 현재 사용되는 임의의 다른 형태를 포함한다.
- [0675] 비강내 투약식 또는 흡입식 용액이나 분무제, 에어로졸 또는 흡입제를 사용할 수도 있다. 비강 용액은 비강 통로에 점적 또는 분무에 의해 투여되도록 설계된 수용액일 수 있다. 비강 용액은 많은 부분에서 비강 분비물과 유사하도록 제조될 수 있다. 따라서, 수성 비강 용액은 일반적으로 등장성이며 5.5 내지 7.5의 pH를 유지하도록 약간 완충된다. 또한, 안과 제제에 사용되는 것들과 유사한 항균 보존제, 및 필요에 따라 적절한 약물 안정화제가 제형에 포함될 수 있다. 다양한 상업적 비강 제제가 알려져 있고, 예를 들어, 항생제 및 항히스타민제를 포함할 수 있으며, 이들은 천식 예방에 사용된다.
- [0676] 경구 제형은 부형제를, 예를 들어, 약학 등급의 만니톨, 락토오스, 전분, 스테아르산 마그네슘, 사카린나트륨, 셀룰로오스, 탄산마그네슘 등으로서 포함할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 정제, 알약, 캡슐, 서방성 제형, 또는 분말의 형태를 취한다. 정의된 특정 구현예에서, 경구용 약학적 조성물은 불활성 희석제 또는 동화성 식용 담체를 포함하게 되거나, 경질 또는 연질-젤의 젤라틴 캡슐에 둘러싸이거나, 압착되어 정제로 만들어지거나, 식단의 음식과 함께 직접 혼입될 수 있다. 경구 치료제의 투여를 위해, 활성 화합물을 부형제와 혼입하여 섭취 가능한 정제, 구강용 정제, 트로키, 캡슐, 엘릭서, 현탁액, 시럽, 웨이퍼 등의 형태로 사용할 수 있다.
- [0677] 정제, 트로키, 알약, 캡슐 등은 다음을 함유할 수도 있다: 검 트라가칸트, 아카시아, 옥수수 전분, 또는 젤라틴과 같은 결합제; 인산이칼슘과 같은 부형제; 옥수수 전분, 감자 전분, 알긴산 등과 같은 붕해제; 스테아린산 마그네슘과 같은 윤활제; 및 수크로오스, 락토오스 또는 사카린과 같은 감미제. 이 외에도 페페민트, 윈터그린 오일 또는 체리향과 같은 향미제를 첨가할 수도 있다. 투약 단위 형태가 캡슐일 때, 전술한 유형의 물질에 추가로 액체 담체를 함유할 수 있다. 다양한 다른 물질이 코팅제로서 존재하거나, 투약 단위의 물리적 형태를 달리 변경할 수 있다. 예를 들어, 정제, 알약 또는 캡슐은 셀락, 당 또는 둘 모두로 코팅될 수 있다. 엘릭서 시럽은 활성 화합물을 함유할 수 있는데, 예를 들어, 감미제로서 수크로오스, 보존제로서 메틸 및 프로필파라벤, 체리향 또는 오렌지향과 같은 염색 및 향미제를 함유할 수 있다.
- [0678] 본원에 개시된 추가 구현예는 방법 및 조성물과 함께 사용하기 위한 키트를 포함할 수 있다. 키트는 적절한 용기, 예를 들어, 바이알, 튜브, 미니- 또는 마이크로피지 튜브, 시험 튜브, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기를 포함할 수도 있다. 추가의 성분이나 제제가 제공되는 경우, 키트는 이러한 제제 또는 성분이 배치될 수 있는 하나 이상의 추가 용기를 포함할 수 있다. 본원의 키트는 또한 일반적으로 바이러스 입자를 담기 위한 수단 및 상업적 판매를 위한 밀폐식 시약 용기를 포함할 것이다. 이러한 용기는 원하는 바이알이 유지되는 사출식 용기 또는 취입 성형식 용기를 포함할 수 있다. 임의로는, 예를 들어, 항염증제, 항바이러스제, 항진균제나 항세균제, 또는 항-종양제와 같은 하나 이상의 추가 활성제가 기술된 조성물에 필요할 수도 있다.
- [0679] 본원에 개시된 조성물은 당업계에 공지된 임의의 수단에 의해 투여될 수 있다. 예를 들어, 조성물은 정맥 내, 종양 내, 피 내, 동맥 내, 복강 내, 병소 내, 두개 내, 관절 내, 전립선 내, 흉막 내, 기관 내, 비강 내, 유리체 내, 질 내, 직장 내, 국부적으로, 종양 내, 근육 내, 경막 내, 피하, 결막 하, 소포 내, 점막, 심막 내, 배꼽 내, 안구 내, 경구, 국소적으로, 흡입에 의해, 주사에 의해, 주입에 의해, 연속 주입에 의해, 국소 관류에 의해, 카테터를 통해, 세척을 통해, 크립으로, 또는 지질 조성물로 대상체에게 투여되는 것을 포함할 수 있다.
- [0680] 당업자에게 공지된 임의의 방법이 본원에 기술된 바이러스 입자, 포장 세포 및 입자 작제물의 대규모 생산에 사

용될 수 있다. 예를 들어, 마스터 시드 스톱 및 작업용 시드 스톱은 GMP 조건 하에, 검정된 일차 CEF에서 제조되거나 다른 방법에 의해 제조될 수 있다. 포장 세포는 큰 표면적의 플라스크에 도말되어, 증식에 가깝게 성장될 수 있고, 바이러스 입자가 정제될 수 있다. 세포를 수확하여, 바이러스 입자를 단리되고 정제된 배양 배지 내로 방출할 수 있거나, 세포 내 바이러스 입자를 기계적으로 파괴하여 방출할 수 있다(세포 찌꺼기는 큰 기공 심층 여과(large-pore depth filtration)로 제거하고, 숙주 세포 DNA는 엔도뉴클레아제로 소화함). 바이러스 입자를 후속하여 정제하고, 접선 유동 여과에 이어서 투석 여과에 의해 농축할 수 있다. 생성된 농축된 벌크를 안정화제가 포함된 완충액으로 희석시켜 제형화하고, 바이알로 채우고, 동결 건조시킬 수 있다. 조성물 및 제형은 추후 사용을 위해 저장할 수 있다. 사용하기 위해, 동결 건조된 바이러스 입자에 희석제를 첨가하여 이를 재구성할 수 있다.

[0681] 병용 요법에 사용되는 특정 추가 제제를 당업계에 알려진 임의의 수단에 의해 제형화하여 투여할 수 있다.

[0682] 본원에 개시된 바와 같은 조성물은 알루미늄염 및 기타 광물 보조제, 텐소액티브제(tensoactive agent), 박테리아 유도제, 비히클 및 사이토카인과 같은 보조제를 포함할 수 있다. 보조제는 길항성 면역 조절 특성을 가질 수도 있다. 예를 들어, 보조제는 Th1 또는 Th2 면역성을 자극할 수 있다. 본원에 개시된 바와 같은 조성물 및 방법은 보조제 요법을 포함할 수도 있다.

[0683] **골격근 관련 장애**

[0684] 또한, 골격근 관련 장애, 예를 들어 근육 소모성 질환 및/또는 유전적 근육 질환, 예를 들어, X-연관 근관 근병증(XLMTM), 뒤시엔느 근 이영양증(DMD), 근긴장성 이영양증(DM1), 근시상완근 이영양증 1형(FSHD), 선천성 근 이영양증 1A형(MDC1A), 지대근 이영양증, 디스트로글리칸증, 근육 위축증, 대사 질환 등을 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일반적으로, 이러한 방법은 이러한 골격 관련 장애를 앓고 있거나 이러한 장애에 걸릴 위험이 있는 환자에게 본원에 기술된 바와 같은 바이러스 입자 또는 약학적 조성물을 투여하는 단계를 포함하되, 바이러스 입자는 다음을 포함한다:

[0685] (i) 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원을 포함하도록 변형된 바이러스 캡시드,

[0686] (ii) 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원 (여기서, 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 근육 세포의 표면에 서 발현되는 근육 특이적 표면 단백질(예: CACNG1)에 결합하는 표적화 리간드를 포함하고,

[0687] 단백질:단백질 결합 쌍의 제1 구성원 및 단백질:단백질 결합 쌍의 제2 구성원은 바이러스 캡시드의 향성을 환자의 근육 세포로 유도하도록 결합됨), 및

[0688] (iii) 바이러스 캡시드 내에 캡슐화된 관심 뉴클레오티드.

[0689] 일부 구현예에서, 관심 뉴클레오티드는 치료 단백질, 자살 유전자, 항체 또는 이의 단편, CRISPR/Cas 시스템 또는 이의 일부(들), 안티센스 올리고뉴클레오티드, 리보자임, RNAi 분자, 또는 shRNA 분자를 암호화한다. 예를 들어, 일부 구현예에서, 관심 뉴클레오티드는 성장 인자, 신경영양 인자, 질환 변형 근육 단백질, 예를 들어 근육 위축증 또는 대사 질환에 대한 대사 단백질을 암호화할 수 있다.

표 2

[0690]

설명	수탁 번호/GI 번호	ITR	비구조적 단백질/rep 단백질을 암호화하는 영역(단백질의 수탁 번호/GI 번호)	캡시드 단백질을 암호화하는 영역(단백질의 수탁 번호/GI 번호)
조류 아데노-연관 바이러스				
조류 아데노-연관 바이러스 단리물 YZ-1, 완전 게놈	GQ368252.1/ GI: 255710032		243-2237 (ACU30841.1/ GI:255710033)	2255-4471 (ACU30842.1/ GI:255710034)
조류 아데노-연관 바이러스 단리물 ZN1, 완전 게놈	KF937794.1/ GI: 588284633	1-1424540-46 82	244-2235 (AHK22792.1/ GI: 588284634)	2253-4469 (AHK22793.1/ GI: 588284635)
조류 아데노-연관 바이러스 ATCC VR-865				
조류 아데노-연관 바이러스 ATCC VR-865, 완전 게놈	AY186198.1/ GI:31414777	1-142 4552-4694	244-2232 (AA032086.1/ GI:31414778)	2250-4481 (AA032087.1/ GI:31414779)

조류 아테노-연관 바이러스 ATCC VR-865, 완전 계놈	NC_004828.1 /GI:31543992	1-1424552-4694	244-2232 (NP_852780.1 /GI:31543993)	2250-4481 (NP_852781.1 /GI:31543994)
조류 아테노-연관 바이러스 ATCC VR-865, 완전 계놈	AY629582.1 /GI:48996102	1-1424552-4694	244-2232 (AAT48612.1 /GI:48996103)	2250-4481 (AAT48613.1 /GI:48996104)
조류 아테노-연관 바이러스 균주 DA-1				
조류 아테노-연관 바이러스 균주 DA-1, 완전 계놈	AY629583.1 /GI: 48996105	1-1424540-4682	244-2235 (AAT48614.1 /GI:48996106)	2253-4469 (AAT48615.1 /GI:48996107)
조류 아테노-연관 바이러스 균주 DA-1, 완전 계놈	NC_006263.1 /GI:51949968	1-1424540-4682	244-2235 (YP_077182.1 /GI:51949969)	2253-4469 (YP_077183.1 /GI:51949970)
박쥐 아테노-연관 바이러스 YNM				
박쥐 아테노-연관 바이러스 YNM, 완전 서열	GU226971.1 /GI:289719008		200-2041 (ADD17085.1 /GI:289719009)	2059-4233 (ADD17086.1 /GI:289719010)
박쥐 아테노-연관 바이러스 YNM, 완전 계놈	NC_014468.1 /GI:304422916		200-2041 (YP_003858571.1 /GI:304422917)	2059-4233 (YP_003858572.1 /GI:304422918)
소 아테노-연관 바이러스				
소 아테노-연관 바이러스, 완전 계놈	AY388617.1 /GI:38679253		368-2200 (AAR26464.1 /GI:38679254)	2216-4426 (AAR26465.1 /GI:38679255)
소 아테노-연관 바이러스, 완전 계놈	NC_005889.1 /GI:48696557		368-2200 (YP_024970.1 /GI:48696558)	2216-4426 (YP_024971.1 /GI:48696559)
소 파보바이러스-2				
소 파보바이러스 2의 추정 비구조적 단백질 및 추정 캡시드 단백질 유전자, 완전 cds.	AF406966.1 /GI: 15825370		306-1919 (AAL09671.1 /GI:15825371)	2268-5384 (AAL09672.1 /GI:15825372)
소 파보바이러스 2, 완전 계놈	NC_006259.1 /GI:51949957		306-1919 (YP_077175.1 /GI:51949958)	2268-5384 (YP_077176.1 /GI:51949959)
캘리포니아 바다 사자 아테노-연관 바이러스 1				
캘리포니아 바다 사자 아테노-연관 바이러스 1 단백질 1136 Rep78 및 VP1 유전자, 완전 cds.	JN420371.1 /GI:343458966		284-2086 (AEM37641.1 /GI:343458967)	2117-4273 (AEM37642.1 /GI:343458968)
캘리포니아 바다 사자 아테노-연관 바이러스 1 단백질 1187 Rep78 및 VP1 유전자, 완전 cds.	JN420372.1 /GI:343458969		291-2093(AEM37643.1 /GI:343458970)	2124-4280 (AEM37644.1 /GI:343458971)
거위 파보바이러스				
거위 파보바이러스 독성 B 균주, 완전 계놈	(U25749.1/GI: 1113795)	1-444663-5106	537-2420 (AAA83229.1 /GI:1113796)	2439-4637 (AAA83230.1 /GI:1113797)
				2874-4637 (AAA83231.1 /GI:1113798)3033-4637 (AAA83232.1 /GI:1113799)

거위 파보바이러스, 완전 계놈	(NC_001701.1/GI:9628649)	1-444663-5106	537-2420 (NP_043514.1/GI: 9628650)	2439-4637 (NP_043515.1/GI: 9628651) 2874-4637 (NP_043516.1/GI: 9628652) 3033-4637 (NP_043517.1/GI: 9628653)
거위 파보바이러스 균주 82-0321V, 완전 계놈	(EU583389.1/GI:190888188)	1-3814600-4980	474-2357 (ACE95848.1/GI:190888189)	2376-4574 (ACE95849.1/GI:190888190)
거위 파보바이러스 균주 82-0321, 완전 계놈	(EU583390.1/GI:190888191)	1-4164635-5050	509-2392 (ACE95850.1/GI:190888192)	2411-4609 (ACE95851.1/GI:190888193)
거위 파보바이러스 균주 06-0329, 완전 계놈	(EU583391.1/GI:190888194)	1-4184637-5054	511-2394 (ACE95852.1/GI:190888195)	2413-4611 (ACE95853.1/GI:190888196)
거위 파보바이러스 균주 VG32/1, 완전 계놈	(EU 583392.1/GI:190888197)	1-4434662-5104	536-2419 (ACE95854.1/GI:190888198)	2438-4636 (ACE95855.1/GI:190888199)
거위 파보바이러스 균주 SH, 완전 계놈	(JF333590.1/GI:343113618)	1-4446663-5106	537-2420 (AEL87777.1/GI:343113619)	2439-4637 (AEL87778.1/GI:343113620) 2874-4637 (AEL87779.1/GI:343113621) 3033-4637 (AEL87780.1/GI:343113622)
거위 파보바이러스 균주 GDaGPV, 완전 계놈	(HQ891825.1/GI:359843307)	1-4444663-5106	537-2420 (AEV89789.1/GI:359843308)	2439-4637 (AEV89790.1/GI:359843309) 2874-4637 (AEV89791.1/GI:359843310) 3033-4637 (AEV89792.1/GI:359843311)
거위 파보바이러스 균주 SHFX1201, 완전 계놈	(KC478066.1/GI:459360514)	1-416	509-2392 (AGG56527.1/GI:459360515)	2411-4609 (AGG56528.1/GI:459360516)
거위 파보바이러스 균주 Y, 완전 계놈	(KC1785711/GI:513129761)	1-444	537-2420 (AG017637.1/GI:513129762)	2439-4637 (AG017638.1/GI:513129763)
거위 파보바이러스 균주 E, 완전 계놈	(KC 184133.1/GI:513129764)	1-443	536-2419 (AG017639.1/GI:513129765)	2438-4636 (AG017640.1/GI:513129766)
거위 파보바이러스 균주 SYG61v, 완전 계놈	(KC996729.1/GI:53199721)	1-442	535-2418 (AGT62580.1/GI:531997218)	2437-4635 (AGT62581.1/GI:531997219)
거위 파보바이러스 균주 YZ99-6, 완전 계놈	(KC996730.1/GI:531997220)	1-414	507-2390 (AGT62582.1/GI:531997221)	2409-4607 (AGT62583.1/GI:531997222)

거위 파보바이러스 비구조적 단백질 NS (ns) 및 캡시드 단백질 VP (vp) 유전자, 완전 cds.	(AF416726.1/GI:17226299)		1-1884 (AAL37721.1/GI:17226300)529-1884 (ABP93843.1/GI:145694447)	1903-4101 (AAL37722.1/GI:17226301)
거위 파보바이러스 균주 DY NS 1 (NS1), NS2 (NS2), VP1 (VP1), VP2 (VP2), 및 VP3 (VP3) 유전자, 완전 cds.	(EF515837.1/GI:145694445)		1-1884 (ABP93842.1/GI:145694446)	1903-4101 (ABP82770.1/GI:145573169) 2338-4101 (ABP93844.1/GI:145694448) 2497-4101 (ABP93845.1/GI:145694449)
거위 파보바이러스 균주 PT NS1 단백질 및 VP1 단백질 유전자, 완전 cds.	(JF926695.1/GI:354463162)		9-1892 (AER25356.1/GI:354463163)	1911-4109 (AER25357.1/GI:354463164)
거위 파보바이러스 균주 D NS1 단백질 및 VP1 단백질 유전자, 완전 cds.	(JF926696.1/GI:354463165)		6-1889 (AER25358.1/GI:354463166)	1908-4106 (AER25359.1/GI:354463167)
마우스 아데노-연관 바이러스 1				
마우스 아데노-연관 바이러스 1 rep 유전자, 부분 cds; 및 VP1 캡시드, VP2 캡시드, 및 VP3 캡시드 유전자, 완전 cds.	DQ 100362.1/GI:73665994		1-327 (AAZ79671.1/GI:73665995)	344-2485 (AAZ79672.1/GI:73665996) 731-2485 (AAZ79673.1/GI:73665997) 911-2485 (AAZ79674.1/GI:73665998)
머스코비 오리 파보바이러스				
야생 오리 파보바이러스 REP 단백질 (rep) 및 3개의 캡시드 단백질 VP (vp) 유전자, 완전 cds	U22967.1/GI:1113784	1-457 467 8-5132	548-2431 (AAA83224.1/GI:1113785)	2450-4648 (AAA83225.1/GI:1113786) 2885-4648 (AAA83226.1/GI:1113787) 3044-4648 (AAA83227.1/GI:1113788)
머스코비 오리 파보바이러스, 완전 게놈	NC_006147.2/GI:51593841	1-4574 678-5132	548-2431 (YP_068410.1/GI: 51593842)	2450-4648 (YP_068411.1/GI: 51593843) 2885-4648 (YP_068412.1/GI: 51593844) 3044-4648 (YP_068413.1/GI: 51593845)
머스코비 오리 파보바이러스 균주 P REP 단백질 및 VP1 단백질 유전자, 완전 cds.	JF926697.1/GI:354463168		61-1944 (AER25360.1/GI:354463169)	1963-4161 (AER25361.1/GI:354463170)
머스코비 오리 파보바이러스 균주 P1 REP 단백질 및 VP1 단백질 유전자, 완전 cds.	JF926698.1/GI:354463171		61-1944 (AER25362.1/GI:354463172)	1963-4161 (AER25363.1/GI:354463173)

머스코비 오리 파코바이러스 단리물 SAAS-SHNH, 완 전 게놈	KC171936.1/ GI:459256867	1-3 81 468 1-5 061	512-2395 (AGG53766.1/ GI:459256868)	2414-4612 (AGG53768.1/ GI:459256870) 2849-4612 (AGG53769.1/ GI:459256871) 3008-4612 (AGG53767.1/ GI:459256869)
큰뱀 아데노-연관 바이러스 2				
큰뱀 아데노-연관 바이러스 2 비구조적 단백질 1 및 캡시드 단백질 유전자, 부분 cds	EU872429.1/ GI:215401981		1-642 (ACJ66590.1/ GI:215401982)	661-1297 (ACJ66591.1/ GI:215401983)
뱀 파코바이러스 1				
뱀 파코바이러스 1 비구조 적 단백질 1 (NS1) 및 캡 시드 단백질 (VP1) 유전자, 완전 cds.	AY349010.1/ GI:38017148		324-2012 (AAR07954.1/ GI:38017149)	2030-4210 (AAR07955.1/ GI:38017150)
뱀 파코바이러스 1, 완전 게놈	NC_006148.1 /GI:51555744		324-2012 (YP_068093.1/ GI: 51555745)	2030-4210 (YP_068094.1/ GI: 51555746)

표 3

서열 목록 내 서열에 대한 간단한 설명

서열번호	간단한 설명
1-240	항-인간 CACNG1 항체 또는 이의 결합 부분
241	인간 CACNG1 CDS
242	인간 CACNG1 단백질
243	SpyTag 단백질
244	SpyCatcher 단백질
245	KTag 단백질
246	c-myc 단백질
247	B1 에피토프 단백질
248	GLSG 단백질 링커
249	GLSGSG 단백질 링커
250	GLSGLSGS 단백질 링커
251	GLSGLSGLSG 단백질 링커
252	GLSGGSGLSG 단백질 링커
253	GSGESG 단백질 링커
254	이소헵티드 단백질
255	SpyTag002
256	인공 hGH pA-특이적 프라이머
257	인공 5' 바코드 프라이머
258	인공 3' 바코드 프라이머
259	SpyTag003

실시예

하기 실시예는 단지 예시를 위해 제공되며 본 발명의 범위를 한정하도록 의도되지 않는다.

방법

하기 실시예는 단지 예시를 위해 제공되며 본 발명의 범위를 한정하도록 의도되지 않는다.

AAV 바이러스 벡터의 제조

바이러스를 다음의 플라스미드(항체의 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 추가적인 플라스미드와 함께 또는 플라스미드

없이 pAd Helper, 리포터 단백질을 암호화하는 AAV2 ITR 함유 게놈 플라스미드, 및 AAV Rep와 Cap 유전자를 암호화하는 pAAV-CAP 플라스미드)로 PEI Pro를 사용한 293T 포장 세포를 형질감염시킴으로써 만들어냈다. 항체 중쇄 작제물은, 그 전체가 참조로서 본원에 통합된 WO2019006046에 기술된 바와 같이, SpyCatcher의 C 말단에서 SpyCatcher에 융합된다. 형질감염 복합체를 불완전한 DMEM(추가 보충제 없음)에서 제조하고 실온에서 10분 동안 인큐베이션하였다.

[0698]	각각의 바이러스는 다음의 플라스미드와 다음의 양으로 293T 패키징 세포의 15 cm 플레이트를 형질감염시켜 생성하였다:		
[0699]	<u>WT AAV2/ HBM GFP</u>		
[0700]	pAd 헬퍼	8 ug	
[0701]	pAAV-CAG-eGFP	8ug	
[0702]	pAAV2-CAP WT 또는 pAAV2 R585A R588A HBM	8 ug	
[0703]	<u>AAV2 항-인간 ASGR1/ 항-인간 CACNG1 GFP</u>		
[0704]	pAd 헬퍼	16ug	
[0705]	pAAV-CAG-eGFP	8ug	
[0706]	pAAV2 CAP G453 링커 10 SpyTag HBM	1 ug	
[0707]	pAAV2-CAP R585A R588A HBM		7 ug
[0708]	및		
[0709]	p항-ASGR1 또는 항-CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh	1.5ug	
[0710]	ULC 1-39 Vk	3ug	
[0711]	<u>WT AAV2/ HBM 루시퍼라아제</u>		
[0712]	pAd 헬퍼	16ug	
[0713]	pAAV-UbC-반딧불이 루시퍼라아제	8ug	
[0714]	pAAV2-CAP WT 또는 pAAV2 R585A R588A HBM	8 ug	
[0715]	<u>AAV2 항-인간 ASGR1/ 항-인간 CACNG1 루시퍼라아제</u>		
[0716]	pAd 헬퍼	8 ug	
[0717]	pAAV-UbC-반딧불이 루시퍼라아제	8ug	
[0718]	pAAV2 CAP G453 링커 10 SpyTag HBM	1 ug	
[0719]	pAAV2-CAP R585A R588A HBM		7 ug
[0720]	및		
[0721]	p항-ASGR1 또는 항-CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh	1.5ug	
[0722]	ULC 1-39 Vk	3ug	
[0723]	<u>WT AAV9/ N272A GFP</u>		
[0724]	pAd 헬퍼	16ug	
[0725]	pAAV-CAG-eGFP	8ug	
[0726]	pAAV9-CAP 또는 pAAV9 N272A		8 ug
[0727]	<u>AAV9 항-인간 ASGR1/ 항-인간 CACNG1 GFP</u>		
[0728]	pAd 헬퍼	16ug	

[0729]	pAAV-CAG-eGFP	8ug	
[0730]	pAAV9 CAP G453 링커 10 SpyTag W503A		1 ug
[0731]	pAAV9-CAP N272A	7 ug	
[0732]	및		
[0733]	p항-ASGR1 또는 항-CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh	1.5ug	
[0734]	ULC 1-39 Vk	3ug	
[0735]	<u>WT AAV9/ N297A 루시퍼라아제</u>		
[0736]	pAd 헬퍼	16ug	
[0737]	pAAV-UbC-반딧불이 루시퍼라아제	8ug	
[0738]	pAAV9-CAP 또는 pAAV9 N272A		8 ug
[0739]	<u>AAV9 항-인간 ASGR1/ 항-인간 CACNG1 루시퍼라아제</u>		
[0740]	pAd 헬퍼	8 ug	
[0741]	pAAV-UbC-반딧불이 루시퍼라아제	8ug	
[0742]	pAAV9-CAP G453 링커 10 SpyTag W503A		1ug
[0743]	pAAV9-CAP N272A	7 ug	
[0744]	및		
[0745]	p항-ASGR1 또는 항-CACNG1 hIgG4US SpyCatcher Vh (또는 SpyCatcher Fab)	1.5ug	
[0746]	ULC 1-39 Vk	3ug	
[0747]	<u>WT AAV9-uDys5</u>		
[0748]	pAd 헬퍼	16ug	
[0749]	pAAV-CK8-uDys5	8ug	
[0750]	pAAV9-CAP	8ug	
[0751]	<u>AAV9 항-인간 CACNG1 uDys5</u>		
[0752]	pAd 헬퍼	16ug	
[0753]	pAAV-CK8-uDys5	8ug	
[0754]	pAAV9 CAP G453 링커 10 SpyTag		1 ug
[0755]	pAAV9-CAP N272A		7 ug
[0756]	및		
[0757]	p항-CACNG1 10717 SpyCatcher Vh	1.5 ug	
[0758]	p항-CACNG1 10717 Vk	3.0 ug	
[0759]	CK8-uDys5는 그 전체가 참조로서 본원에 통합되는 US10479821B2에 기술되어 있다.		
[0760]	인큐베이션 후, 10% FBS, 1XNEAA, 1% Pen/Strep, 및 1% L-글루타민이 보충된 DMEM에 복합체를 첨가한다.		
[0761]	형질감염된 포장 세포를 3일 동안 37℃에서 인큐베이션한 다음, 표준 동결-융해 프로토콜을 사용해 세포 용해물로부터 수집하였다. 간략하게, 포장 세포를 긁어서 들어 올리고 펠릿화하였다. 상청액을 제거하고, 세포를 50mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 및 2 mM MgCl2[pH 8.0]의 용액에 재현탁시켰다. 3회의 연속 동결-융해 사이클을 통해 세포 용해를 유도함으로써 세포 내 바이러스 입자들을 방출시켰으며, 상기 동결-융해 사이클은 세포 현탁액을 드라이 아이스/에탄올 조와 37℃ 수조 사이를 옮겨가며 격렬하게 와동시키는 것으로 이루어진다. 60분 동안 37		

℃에서, 간헐적으로 혼합하며 EMD Millipore Benzonase(세포 용해물 50 U/ml)로 용해물을 처리함으로써 점성을 감소시켰다. 그런 다음, 잔해를 원심분리에 의해 펠릿화하고, 생성된 상청액을 0.22 μm PVDF Millex-GV 필터를 통해 여과하였다. 시험관 내에서 시험할 미정제 바이러스의 경우, 여과된 용해물을 Ultracel-100 멤브레인(100 kDa MWCO) 필터 카트리지가 구비된 Amicon Ultra-15 원심 분리 필터 유닛에 직접 첨가한다. 필터 유닛을 상부 챔버에서 원하는 부피가 될 때까지 5~10분 간격으로 원심분리하였고, 그런 다음 농축된 조(crude) 바이러스를 저 단백질 결합 튜브 내로 피펫팅하고, 4℃에서 보관하였다. 생체 내에서 시험될 바이러스의 경우, 정화된 용해물을 4단계 요오딕사놀(iodixanol) 밀도 구배를 사용하여 추가로 정제한다. 구배를 Beckman 70Ti 로터에 로딩하고 최대 가속 및 감속을 사용하여 10℃에서 1.5시간 동안 66,100 rpm으로 회전시킨다. 초원심분리 후, 요오딕사놀 정제된 비리온을 40~60% 계면으로부터 추출한다. 요오딕사놀의 농도가 1% 미만인 되도록 요오딕사놀 용액 중의 AAV를 DPBS+/+ .001% 플루로닉 F68에 희석한다. 그런 다음, 정제된 바이러스를 100kDa MWCO Amicon 한외여과 유닛을 사용해 원하는 부피로 농축시킨다.

[0762] 알려진 농도의 바이러스의 표준 곡선을 사용하여 qPCR에 의해 역가(밀리리터당 바이러스 게놈 또는 vg/mL)를 결정하였다.

[0763] 세포주:

[0764] 모든 293 세포주를 10% FBS, 1xNEAA, 1% Pen/Strep, 및 1% L-글루타민으로 보충된 DMEM에 유지시켰다. 293 hASGR1/2 및 293hCACNG1 세포주는 상응하는 cDNA를 발현하는 벡터를 렌티 바이러스로 부모 293 세포주에 형질도입하여 생성하였다. 모든 세포주는 Regeneron TC core facility로부터 구입하였다.

[0765] 인간 골격 근아세포를 Cook Myosite(SkMDC; Lot # P01059-14M)로부터 구입하고, MyoTonic 성장 보충제(MS-3333)가 보충된 MyoTonic 기초 배지(MB-2222)에 유지시키고, 5% CO₂가 포함된 37℃ 인큐베이터에서 성장시켰다.

[0766] C2C12 마우스 근아세포를 ATCC로부터 구입하고, 10% FBS 및 페니실린-스트렙토마이신 보충제가 포함된 DMEM에서 유지시키고, 5% CO₂가 포함된 37℃ 인큐베이터에서 성장시켰다.

[0767] AAV 캡시드 단백질 작제물

[0768] 링커 아미노산 및 추가 돌연변이의 측면에 위치하는 원하는 SpyTag 삽입을 암호화하는 GeneBlock을 IDT로부터 구입하고, Gibson 어셈블리를 제조업자의 프로토콜(NEB)에 따라 사용하여 BsiWI 및 XcmI-분해된 pAAV9-CAP wt 내로 클로닝하였다.

[0769] 항체에 SpyCatcher 클로닝하기

[0770] 항체 중쇄 가변 영역을 암호화하는 GeneBlock을 IDT로부터 구입하고, Gibson 어셈블리를 사용하여 CMV hIgG4US SapI SpyCatcher 백본 내로 클로닝하였다.

[0771] 세포 감염/형질도입 및 유세포 측정 분석.

[0772] 세포를 감염시키기 위해, 배양 중인 세포 배지에 바이러스 입자를 직접 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 인큐베이션하였다. 감염 후 3일차에, 세포를 트립신 처리하고, 2% FBS가 포함된 PBS에 재현탁시키고, GFP+ 세포의 백분율을 BD FACSCanto 유세포 측정기에서 수집하고, FlowJo 소프트웨어를 사용하여 분석하였다.

[0773] 세포 감염/형질도입 및 루시페라아제 검정 관독

[0774] 세포를 감염시키기 위해, 배양 중인 세포 배지에 바이러스 입자를 직접 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 인큐베이션하였다. 감염 후 3일차에, 배지를 제거하고, Promega Glo Lysis 완충액을 사용하여 세포를 용해시켰다. 루시페린 기질(Promega Bright Glo 키트)을 용해된 세포에 첨가하고 발광측정기를 사용하여 발광을 측정하였다.

[0775] 근관 형질도입

[0776] 투명한 바닥과 검은색 벽을 가진, 콜라겐 코팅된 96 웰 플레이트에 인간 골격 근아세포를 8500개 세포/웰로 시딩하였다. 24시간 후, 성장 배지를 MyoTonic 분화 배지(MD-5555)로 바꾸고 2일마다 교체하였다. 4일의 분화 후, 근관이 형성되면, 바이러스 분취물로 보충된 분화 배지를 각각의 웰에 첨가하였다. 3일 후, 근관을 후속 GFP 검출을 위해 4% PFA로 고정시키거나, uDys5 mRNA의 검출을 위해 트리졸(Trizol)로 용해시켰다.

[0777] 투명한 바닥과 검은색 벽을 가진, 콜라겐 코팅된 96 웰 플레이트에 C2C12 세포를 10,000개 세포/웰로 시딩하였다. 24시간 후, 성장 배지를 분화 배지(2% 말 혈청이 포함된 DMEM)로 교체하고, 7.5% CO₂가 포함된 37℃ 인큐베

이터에 넣었다. 24시간의 분화 후, 분화 배지에서 희석한 바이러스 분취물을 사용하여 세포를 형질도입하였다. 3일 후, 근관을 후속 GFP 검출을 위해 4% PFA로 고정시키거나, uDys5 mRNA의 검출을 위해 트리졸로 용해시켰다.

[0778] 근관 형질도입 분석

[0779] 실온에서 15분 동안 고정시킨 후, 세포를 PBS로 세척한 다음, 0.3% Triton-X가 포함된 PBS에서 20% 염소 혈청으로 실온에서 1시간 동안 차단하였다. 미오신 중쇄(MF20-c, Developmental Studies Hybridoma Bank)에 대한 일차 항체를 차단 완충액에서 1:200으로 희석하고, 모든 웰에 첨가하여 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 그런 다음, 웰을 PBS로 3회 부드럽게 세척하고, Alexa 647 접합된 항-마우스 이차 항체를 차단 완충액에서 1:500으로 희석하고, 실온에서 1시간 동안 모든 웰에 첨가하였다. 그런 다음, 세포를 PBS로 세척하고, DAPI로 염색한 후, Axio Observer 현미경(Ziess)을 사용하여 이미지를 촬영하였다. 미오신 중쇄 양성 영역 내에서의 GFP 강도를 HALO 소프트웨어(Indica Labs)를 사용하여 분석하였다.

[0780] uDys5의 형질도입을 분석하기 위해, RNeasy 미니 키트(Qiagen)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 RNA를 분리하였다. 제조사의 프로토콜에 따라 RNA 정제를 완료하고, RNA의 양과 품질은 NanoDrop 2000으로 검증하였다. 동일한 양의 RNA를 SuperScript VILO cDNA 합성 마스터믹스(ThermoFisher)를 사용하여 역전사하고 뉴클레아제 가 없는 물로 10X 희석하였다. Taqman 프라이머/프로브를 사용하여 유전자 발현을 평가하였다: AGGGTAGCTAGCATGGAAAAACA (uDys5 정방향), GGGCTGTGAGACATGAGTGAT (uDys5 역방향), ATTTACATTCTTATGTCCT (uDys5 프로브), 인간 및 마우스 Hprt에 대한 내인성 대조군: 각각 Hs02800695_m1 및 Mm03024075_m1 (Thermo Fisher)

[0781] 마우스 세포주

[0782] 인간화 CACNG1 마우스(CACNG1^{hu/hu})는 코딩 엑손 1, 인트론 1, 코딩 엑손 2~4(및 개재 인트론), 및 82 bp의 3' 미번역 영역(UTR) 마우스 *Cacng1*의 일부를 이중상동성 부분 코딩 엑손 1 서열, 인트론 1, 코딩 엑손 2~4(및 개재 인트론), 완전한 3' UTR, 및 인간 CACNG1의 3' UTR 다음의 추가 158 bp로 치환함으로써 생성하였다. 인간화 ASGR1 마우스는 WO/2019006034에 기술된 방법에 따라 생성하였다. 계통 일치(50500) 마우스를 대조군으로서 사용하고, 자체 교배시켰다. 야생형 C57BL/6, DBA/2J, 및 이영양증 D2-mdx 마우스(MDX)를 Jackson Laboratory로부터 구입하였다(각각 Stock # 000664, 000671, 및 013141).

[0783] AAV2 루시페라아제 벡터의 생체 내 분석

[0784] 3~4개월령 범위의 수컷 50500 및 인간화 CACNG1 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 PBS를 정맥내 주입하거나, 루시페라아제 리포터를 가진 5E11 vg의 야생형 AAV2, AAV2 HBM 항-ASGR1, 또는 AAV2 HBM 항-CACNG1 mAb#1을 정맥내 주입하였다. IV 주입 후 5주차에, 이소플루란을 사용하여 마우스를 마취시키고, 루시페린 기질을 주입하고, 7~10분 후에 안락사시켰다. 간, 허, 횡격막, 및 사두근을 채취하고 IVIS 스펙트럼 생체 내 이미징 시스템을 사용하여 생체 외에서 이미지를 촬영하였다. 리빙 이미지 소프트웨어(living image software)를 사용해 원시 데이터를 분석하여 평균 방사휘도(광자/초/cm2/sr)를 결정하였다.

[0785] AAV9 루시페라아제 벡터의 생체 내 분석

[0786] 10주령의 암컷 인간화 CACNG1 및 인간화 ASGR1 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 PBS를 정맥내 주입하거나, 루시페라아제 리포터를 가진 5E10 vg의 야생형 AAV9, AAV9 N272A, AAV9 N272A 항 ASGR1 mAb, AAV9 항 ASGR1 Fab, AAV9 N272A 항 CACNG1 mAb#1, 또는 AAV9 N272A 항 CACNG1 Fab를 정맥내 주입하였다. 주입 후 3주차에, 이소플루란을 사용하여 마우스를 마취시키고, 루시페린 기질을 주사하고, 7~10분 후에 안락사시켰다. 간, 뒷다리, 사두근, 및 허를 채취하고 IVIS 스펙트럼 생체 내 이미징 시스템을 사용하여 생체 외에서 이미지를 촬영하였다. 리빙 이미지 소프트웨어(living image software)를 사용해 원시 데이터를 분석하여 평균 방사휘도(광자/초/cm2/sr)를 결정하였다.

[0787] AAV9 GFP 벡터의 생체 내 분석

[0788] 성체(3~7개월령) 수컷 CACNG1^{hu/hu}, WT C57BL/6, 및 D2-mdx 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 1E+11 vg/마우스의 AAV9(WT AAV9, AAV9 N272A, AAV9 N272A 항-ASGR1 mAb, 및 AAV9 N272A 항-CACNG1 mAb “#1” 및 “#2” 및 “#3”)를 주입하였다. 주입 후 3주차에 마우스를 희생시키고, 면역조직화학을 위해 다음 기관을 채취하였다: 간, 비장, 심장, 허, 횡격막, 사두근, 비복근/발바닥/비장근 복합체, 및 전경골.

[0789] 시노물구스 원숭이를 대상으로 한 종합적인 AAV 특성분석 실험을 위해, 표시된 항체에 접합된 대조군 AAV 및

AAV9 변이체를 전술한 방법을 사용하여 개별적으로 생산하되, 바코드화된 pITR-CAG-GFP-hGHpA 플라스미드를 바이러스 게놈 플라스미드로서 사용해 생산하였으며; 폴에 존재하는 12가지 바이러스 각각은, 해당 캡시드 변이체에 의한 이식유전자 발현을 정량화하는 데 사용된 고유한 32 뉴클레오티드 길이의 바코드를 갖는 pITR-CAG-GFP-hGHpA의 버전으로 패키징하였다. 2마리의 수컷 시노물구스 원숭이에게 3E+13 vg/kg의 폴링된 바이러스 혼합물을 정맥내 볼루스 주입하였다. 주입 후 2주차에, 동물을 안락사시키고, 바코드 분석을 위해 일단의 조직 및 기관을 채취하였다. 예를 들어, W02018144813; Stoeckius 등의 문헌[(2018) *Genome Biol.* 19:224]; Stoeckius 등의 문헌[(2017) *Nat. Method* 9:2579-10]을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 참조로서 본원에 통합된다. 표 4는 상이한 바이러스 입자와 연관된 바코드 번호(BC#)(예: 해당되는 경우, AAV9 cap 돌연변이 및 상응하는 항체 번호)를 제공한다.

표 4

[0790]

BC#	AAV
1	AAV9
2	AAV9 W503A + 비표적화 mAb
3	AAV9 W503A + ASGR1 mAb
4	AAV9 W503A + CACNG1 mAb #3
5	AAV9 W503A + CACNG1 mAb #2
6	AAV9 N272A + 비표적화 mAb
7	AAV9 N272A + ASGR1 mAb
8	AAV9 N272A + CACNG1 mAb #3
9	AAV9 N272A + CACNG1 mAb #2
10	AAV9 N272A + CACNG1 mAb #4
11	AAV9 N272A + CACNG1 mAb #5
12	AAV9 N272A + CACNG1 mAb #1

[0791]

야생형 및 재표적화된 AAV의 투여 후 간 건강 및 보체 활성화(ALT, AST, Bb, 및 C3a)의 혈청 판독치를 평가하기 위해, 전술한 방법에 따라 AAV9 및 AAV9 N272A 항-CACNG1 mAb#3을 생산하고 pAAV CAG eGFP로 패키징하였다. 수컷 시노물구스 원숭이에게 3E+13 vg/kg의 AAV9 wt(2마리) 또는 AAV9 N272A 항-CACNG1 mAb#3(2마리) 또는 대조군으로서 식염수(1마리)를 정맥내 볼루스 주입하였다. ALT, AST, Bb, 및 C3a의 혈청 판독치를 베이스라인(투여 10일 전) 시점뿐만 아니라 투여 후 30분, 6시간, 24시간, 및 48시간차에도 수집하였다. 주입 후 2주차에, 동물을 안락사시키고, 바코드 분석을 위해 일단의 조직 및 기관을 채취하였다.

[0792]

면역조직화학 염색을 위해, 조직을 중성으로 완충된 포르말린 용액에서 고정시키고, 24시간 후에 70% 에탄올로 옮겼다. 기관을 파라핀 포매 전에 실온의 70% 에탄올에 보관하였다. 5 µm 두께의 표준화된 평면 절편화를 사용하여 조직을 절편화하였다. eGFP 발현에 대한 항-GFP IHC 염색은 Benchmark ULTRA Ventana IHC/ISH 시스템을 사용하여 수행하였다. 이미지 분석은 HALO 분석 소프트웨어를 사용하여 수행하였다.

[0793]

면역형광 염색을 위해, 근육 조직을 OCT 포매 배지에 침지시키고, 액체 질소로 냉각시간 이소펜탄에서 동결시켰다. 조직을 12 µm 두께로 동결 절편화하고, 이어서 4% PFA로 고정시키고, 라미닌(Sigma-Aldrich)에 대해 염색한 다음, Alexa 647-접합된 항-토끼 이차 항체 및 DAPI(Thermo Fisher Scientific)에 대해 염색하였다. 슬라이드에 Fluoromount(Thermo Fisher Scientific)를 장착하고, Axioscan 슬라이드 스캐너(Zeiss)로 이미지를 촬영하였다.

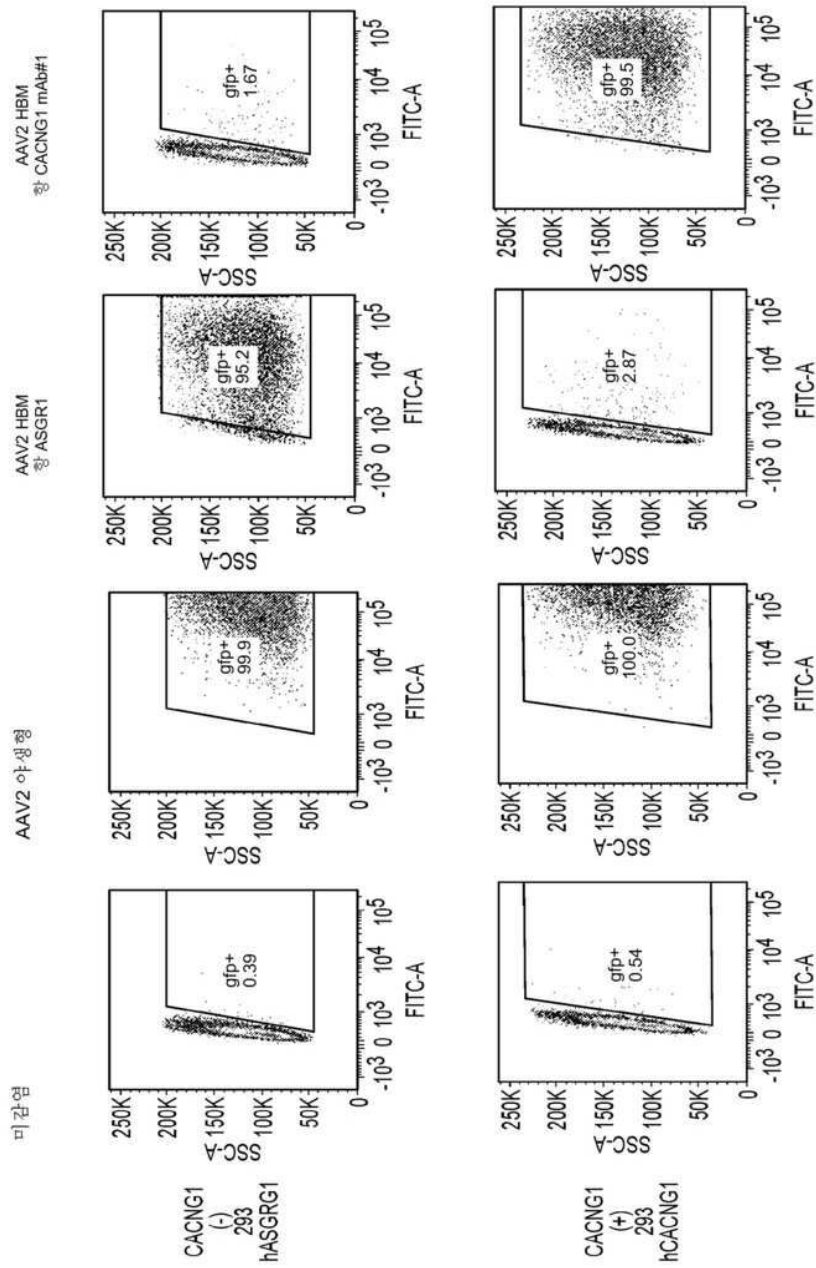
[0794]

바코드 분석을 위해, 시노물구스 원숭이 조직 및 기관으로부터 단리한 총 RNA를 마이크로어레이 총 RNA 단리 키트용 MagMAX-96을 제조사의 사양에 따라 사용하여 정제하였다. 그런 다음, RNA를 Turbo DNase로 처리하고, SuperScript IV 역전사효소 및 hGH pA-특이적 프라이머(5' -GTCATGCATGCCTGGAATC-3' ; 서열번호 256)를 사용하여 cDNA 합성을 수행하였다. Q5 고 충실도 2x 마스터믹스를 사용하여 바코드의 상류(5' -TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCGAGCGTCTCGAGAG-3' ; 서열번호 257) 및 하류(5' -GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGGGTCAGGGATGCCAC-3' ; 서열번호 258)에 결합하는 프라이머를 이용해, cDNA 샘플로부터 바코드화된 GFP 전사체를 증폭시켰다. 합쳐진 바이러스 혼합물을 샘플 사이에 포함시켰다. 각 샘플은 라이브러리 제조 기간 동안 3개의 기술적 복제물로 제조하였다. Illumina 어댑터 및 고유 이중 인덱스(UDI- Illumina)를 함유하는 애플리콘을 Qubit 및 Tapestation을 사용하여 정량화하고, 등분비로 풀링하고, 300 사이클 고효율 키트를 사용하여 Nextseq550 상에서 시퀀싱하였다.

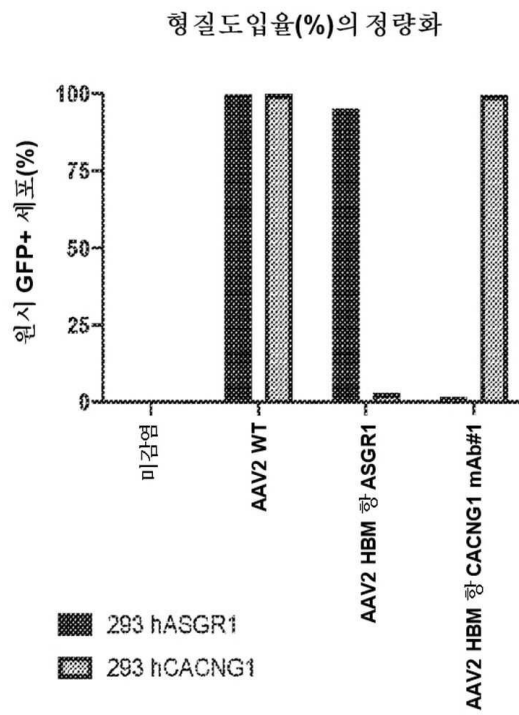
- [0795] AAV9 uDys5 벡터의 생체 내 분석
- [0796] 6주령 수컷 D2-mdx 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 WT AAV9를 주입하거나, CK8 프로모터 하에 uDys5를 발현하는 AAV9 N272A 항-CACNG1 mAb #3을 주입하였다. 주입 후 5주차에 마우스를 희생시키고, qPCR 분석을 위해 다음 기관을 수확하고 RNAlater(Thermo Fisher)에 보관하였다: 간, 심장, 사두근, 비복근, 전경골, 비장근, 혀, 및 횡격막. 그런 다음, 조직을 트리졸에서 균질화시키고, MagMAX-96 총 RNA 단리 키트(Life Technologies)를 사용하여 수성상을 정제하고, RNase-무함유 Dnase 세트(Qiagen)를 사용하여 gDNA를 제거하였다. SuperScript VILO 마스터믹스(Life Technologies)를 사용하여 mRNA를 cDNA로 역전사하고, 다음의 Taqman 프라이머/프로브를 사용하여 qPCR을 수행하였다: AGGGTAGCTAGCATGGA AAAACA (uDys5 정방향), GGGCTGTGAGACATGAGTGAT (uDys5 역방향), ATTTACATTCTTATGTGCCT (uDys5 프로브), 내인성 대조군: AAGCCGTGGTGCTGATG (Rplp0 정방향), TCTCCAGAGCTGGGTGTTCT (Rplp0 역방향), AAGAACACCATGATGCGCAAGGC (프로브).
- [0797] uDys5 근섬유 막의 국소화를 검출하기 위해, 비복근 및 심장의 동결절편을 4% PFA로 고정시키고 디스트로핀 (Developmental Studies Hybridoma Bank)에 대해 염색한 다음, Alexa 546-접합된 항-마우스 이차 항체에 대해 염색하였다. 슬라이드에 Fluoromount(Thermo Fisher Scientific)를 장착하고, Axioscan 슬라이드 스캐너 (Zeiss)로 이미지를 촬영하였다.
- [0798] uDys5 단백질의 검출을 위해, 사두근을 액체 질소에서 급속 냉동시킨 다음, Fast Prep-24 5G 균질화기(MP Biomedicals)의 마우스 다리 근육 설정을 사용하여 균질화시켰다. 그런 다음, 프로테아제 및 인산분해효소 억제제(Sigma)가 포함된 용해 완충액(50 mM 트리스 HCl, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA 이수화물, 1% 트리톤 100x)과 함께 근육을 용해 매트릭스 튜브(MP Biomedicals)에 첨가하였다. BCA 검정(Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 단백질을 정량화한 후, 용해물을 샘플 완충액 및 환원제(Thermo Fisher Scientific)와 함께 70°C에서 10분 동안 가열하였다. 동일한 양의 단백질을 4~20% 트리스-글리신 겔(Bio-Rad) 상에 로딩하여 용해시킨 다음, TurboTransfer 시스템(BioRad)을 사용하여 PVDF 멤브레인(BioRad)으로 옮겼다. 멤브레인을 5% 무지방 우유 (Cell Signaling)로 차단한 후, 다음 일차 항체와 함께 밤새 인큐베이션하였다: 디스트로핀(Developmental Studies Hybridoma Bank, MANHNGE1A), 베타 액틴(Abcam, ab8224). 세척 후, 멤브레인을 적절한 HRP-접합된 이차 항체(Cell Signaling)와 함께 인큐베이션하였다. 멤브레인을 ECL 시약(Cell Signaling)에서 인큐베이션하고 시각화하였다(Amersham Imager 600). 블롯 이미지는 ImageJ를 사용하여 정량화하였다.
- [0799] uDys5의 근육 형질도입이 근육 손상의 순환하는 바이오마커에 미치는 효과를 평가하기 위해, 투여 전 및 투여 후 4주차에 혈액을 1.1 mL Z-Gel 마이크로튜브(Sarstedt) 내에 채취하고, 최소 2시간 동안 혈청을 응고시켰다. 혈액을 4°C에서 12,000 RPM으로 10분 동안 회전시켰다. 그런 다음, 상청액을 수집하고 -80°C에서 동결시켰다. 모든 샘플을 수집한 후, 이들을 모두 해동한 다음 탈이온수로 1:4로 희석하였다. 혈청은 ADVIA® Chemistry XPT 시스템 상에서 ADVIA® Chemistry 크레아틴 키나아제(CK_L) 시약(REF 10729780)을 사용하여 분석하였다.
- [0800] uDys5의 근육 형질도입의 기능적 효과를 평가하기 위해, 6주령 수컷 D2-mdx 마우스에게 꼬리 정맥을 통해 1E+12 vg/마우스의 WT AAV9를 주입하거나, CK8 프로모터 하에 uDys5를 발현하는 AAV9 N272A 항-CACNG1 mAb #3을 주입하고, 주입 후 12주차에 최대 악력을 평가하였다. 앞다리의 악력은, 마우스가 당김 막대를 파지할 때까지 꼬리를 잡고 수직 방향 아래로 내림으로써 연산화된 악력 측정기(Bioseb, BIO-GS3)로 평가하였다. 그런 다음, 마우스가 막대를 놓칠 때까지 천천히 위로 들어올렸다. 생성된 최대 악력(그램)은 5회 당긴 후에 기록하되, 회차 사이에 3분의 휴식 시간을 두었다. 3회차 후, 최대 악력을 회차별로 평균화하고 최대 악력으로서 기록하였다.
- [0801] 본 발명은 다수의 구현예를 참조하여 특히 도시되고 기술되었지만, 당업자는 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않고도 본원에 개시된 다양한 구현예에 대한 형태 및 세부 사항에 있어서의 변경이 이루어질 수 있고, 본원에 개시된 다양한 구현예들이 청구범위의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다는 것을 이해할 것이다. 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 참조로서 본원에 통합된다. 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.

도면

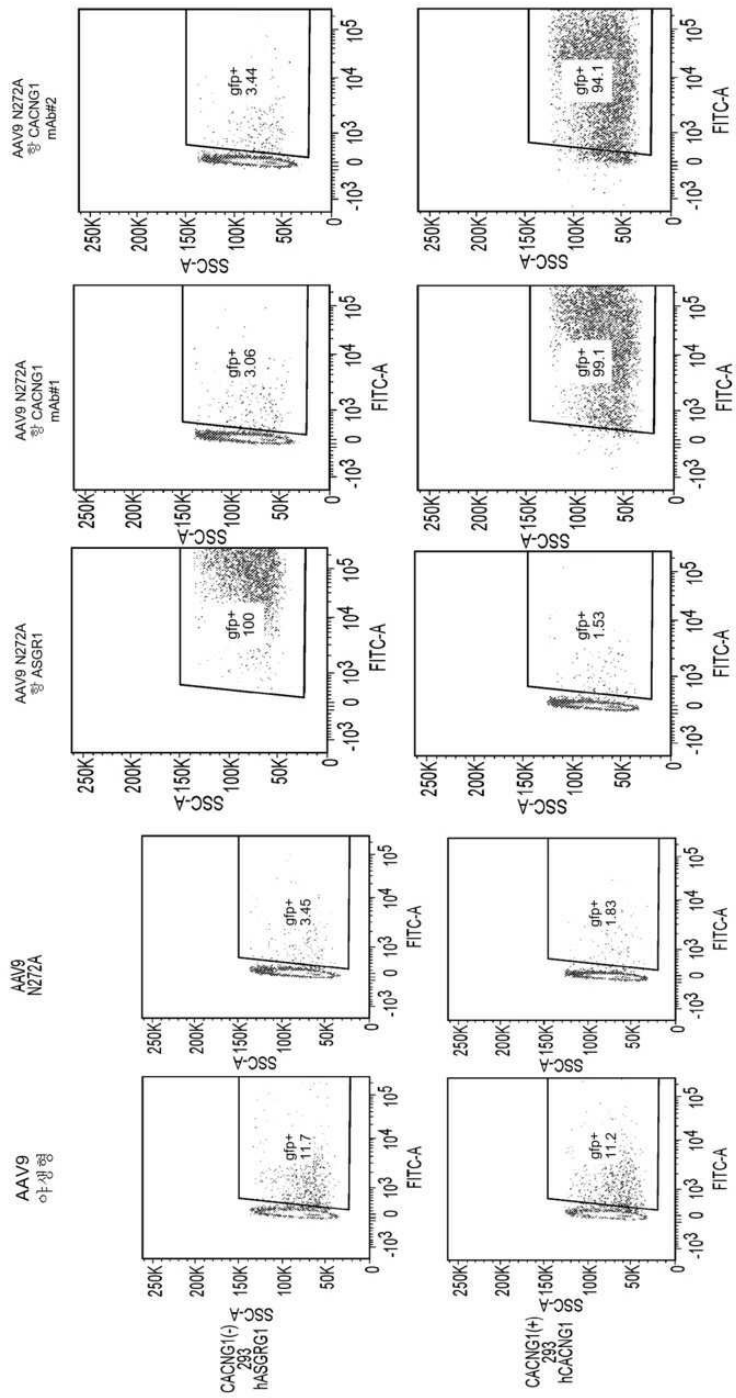
도면1a



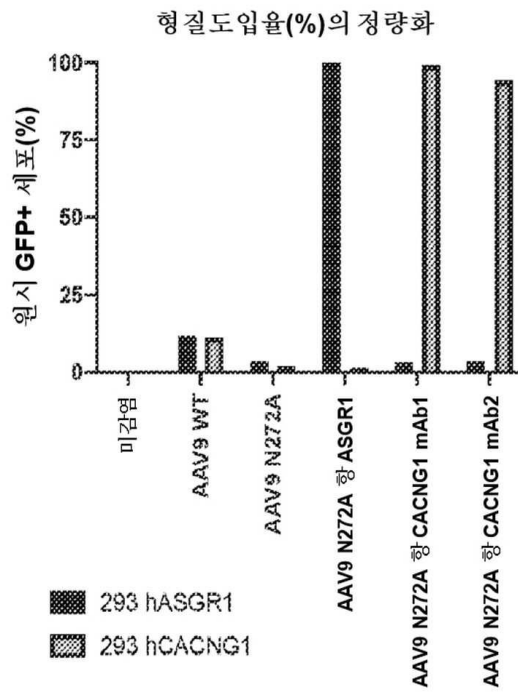
도면1b



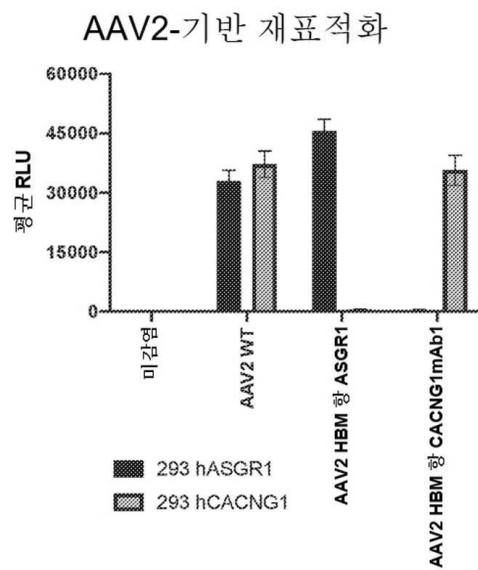
도면2a



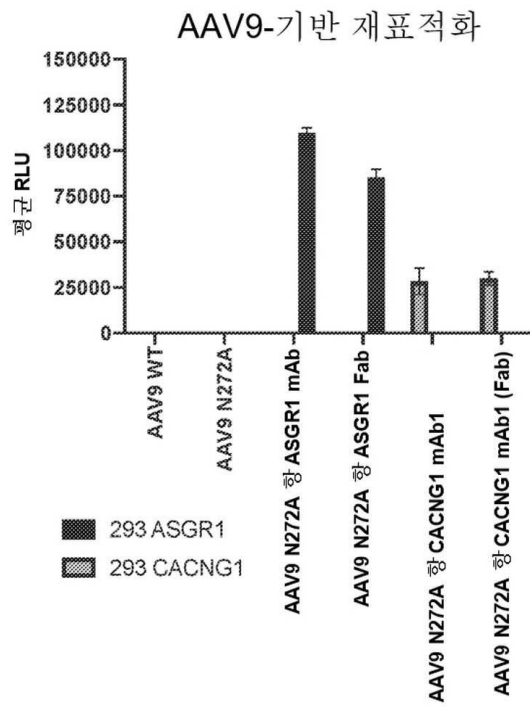
도면2b



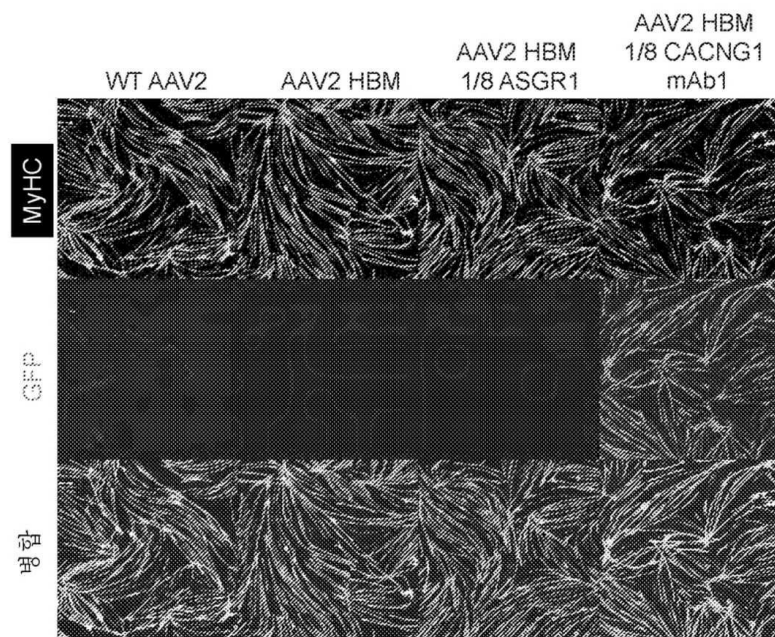
도면3a



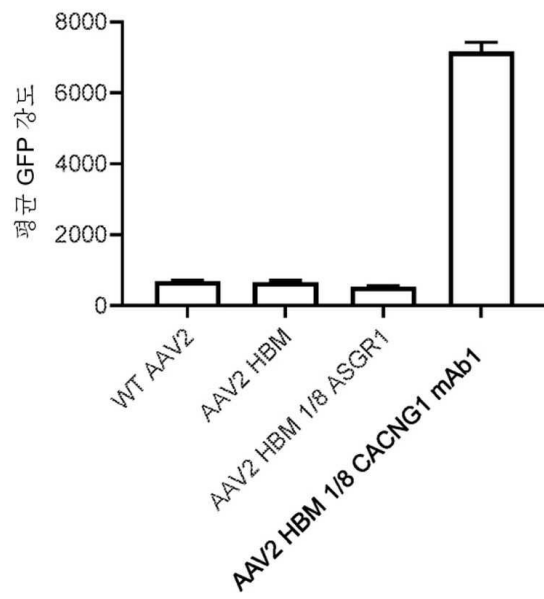
도면3b



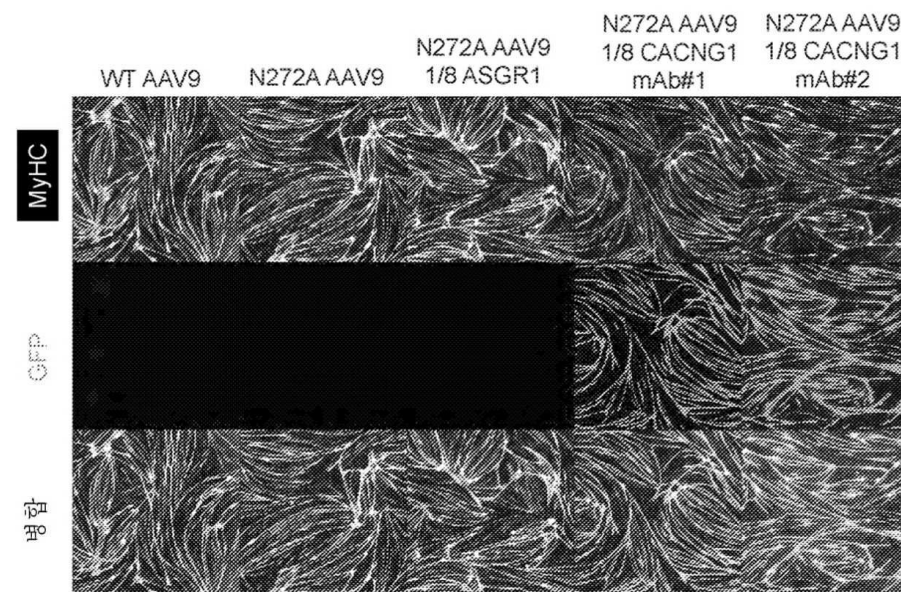
도면4a



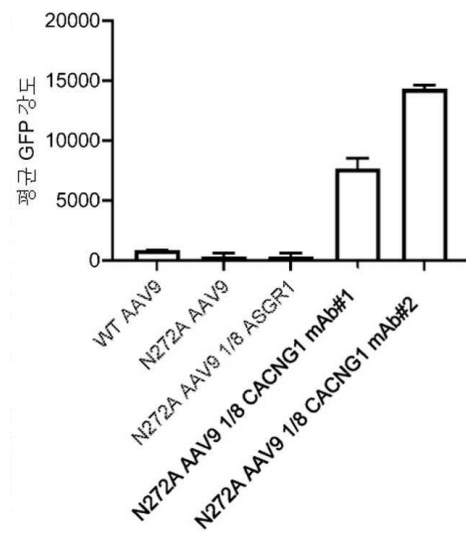
도면4b



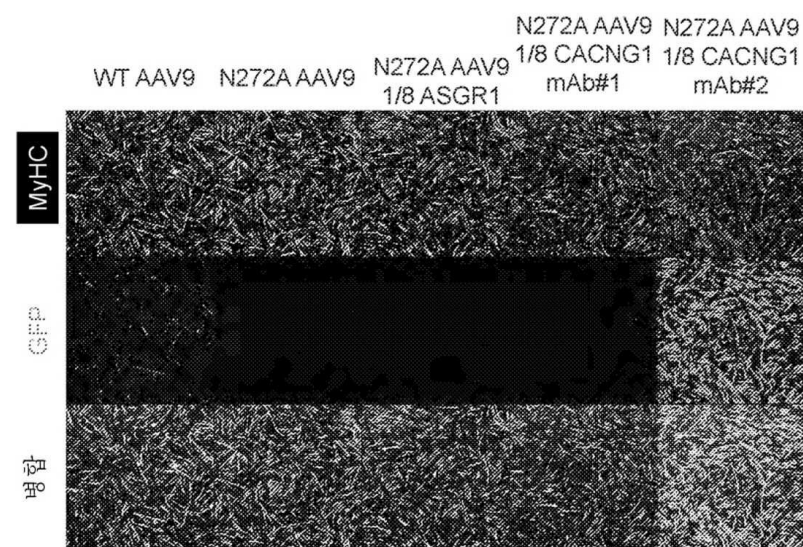
도면5a



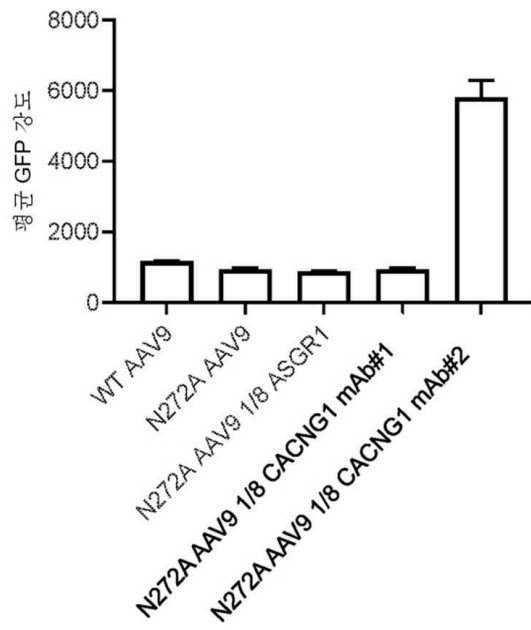
도면5b



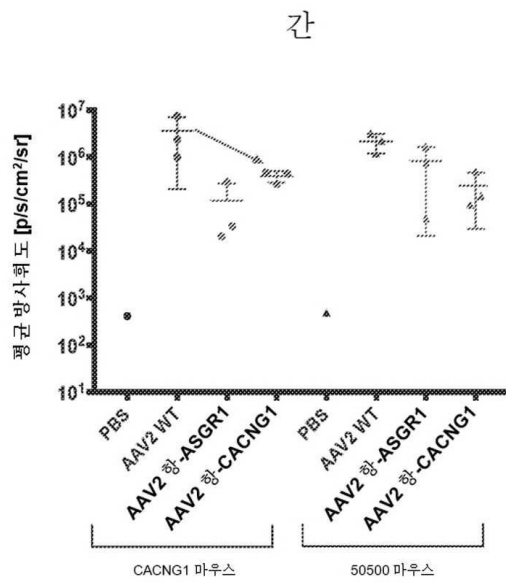
도면6a



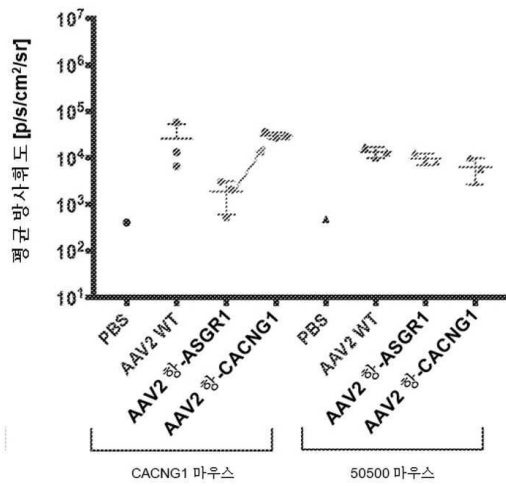
도면6b



도면7a

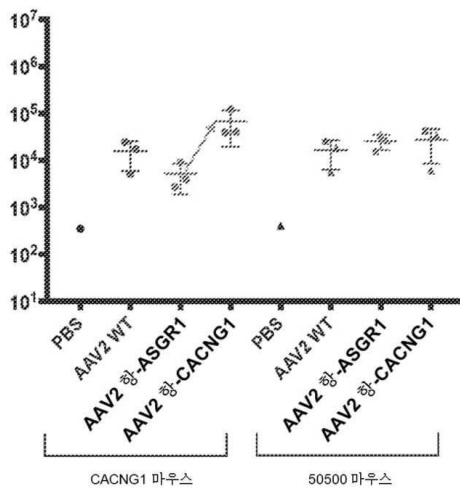


도면7b

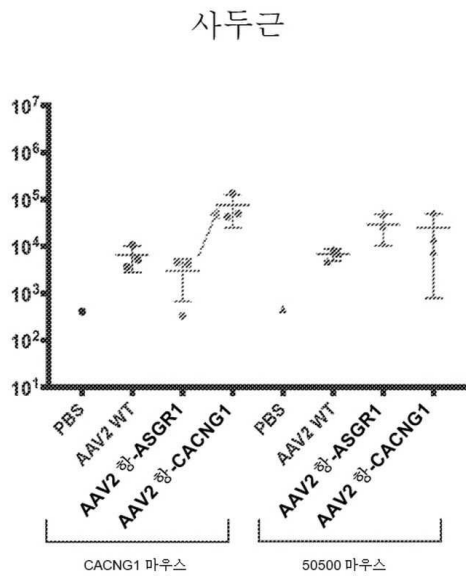


도면7c

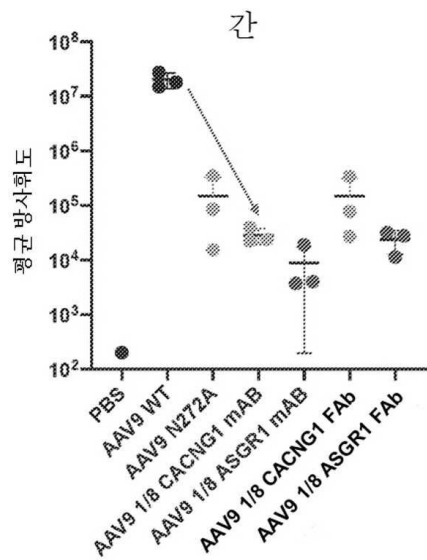
황격막



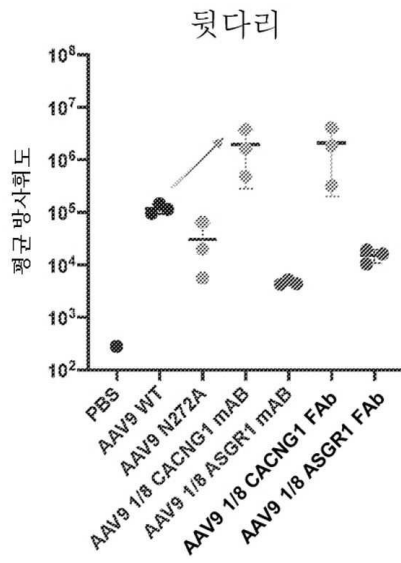
도면7d



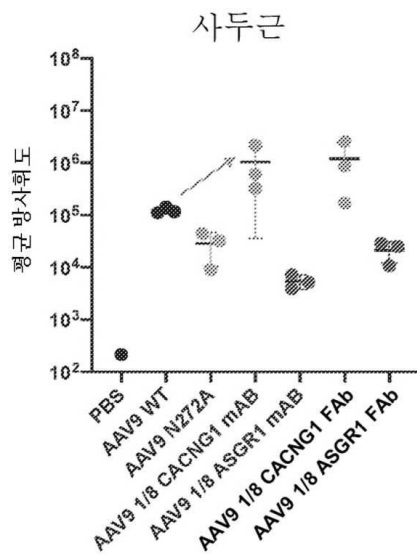
도면8a



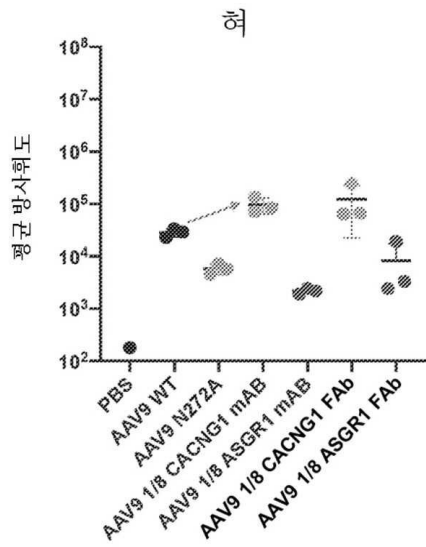
도면8b



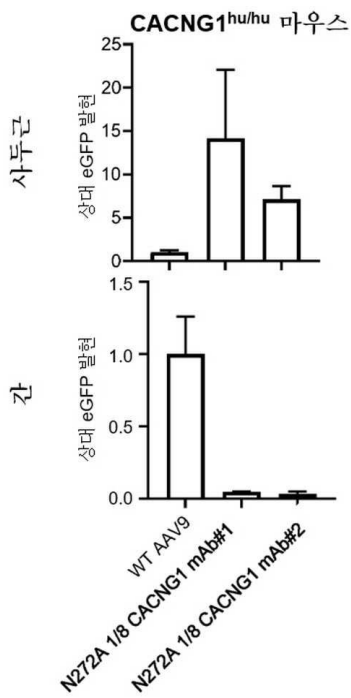
도면8c



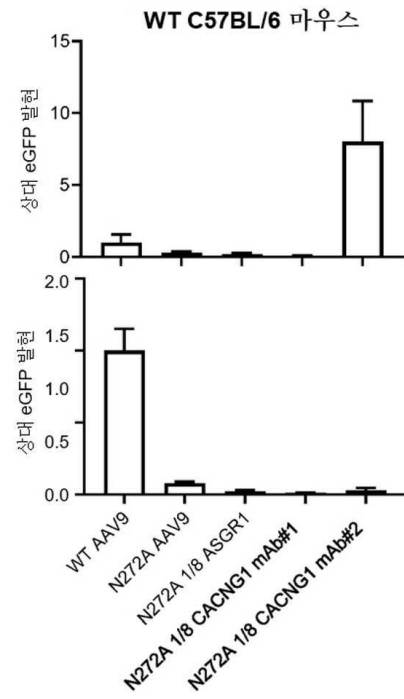
도면8d



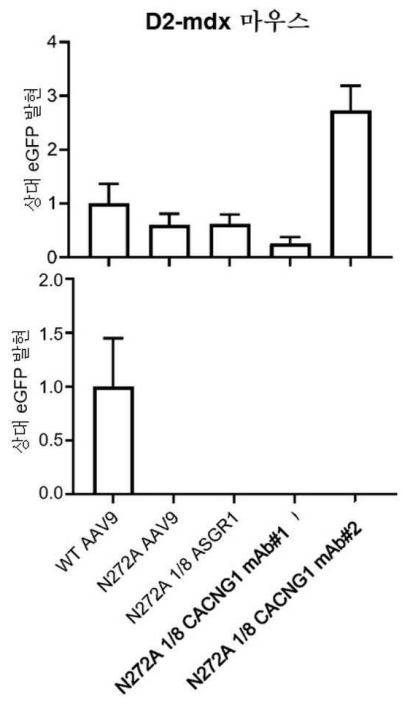
도면9a



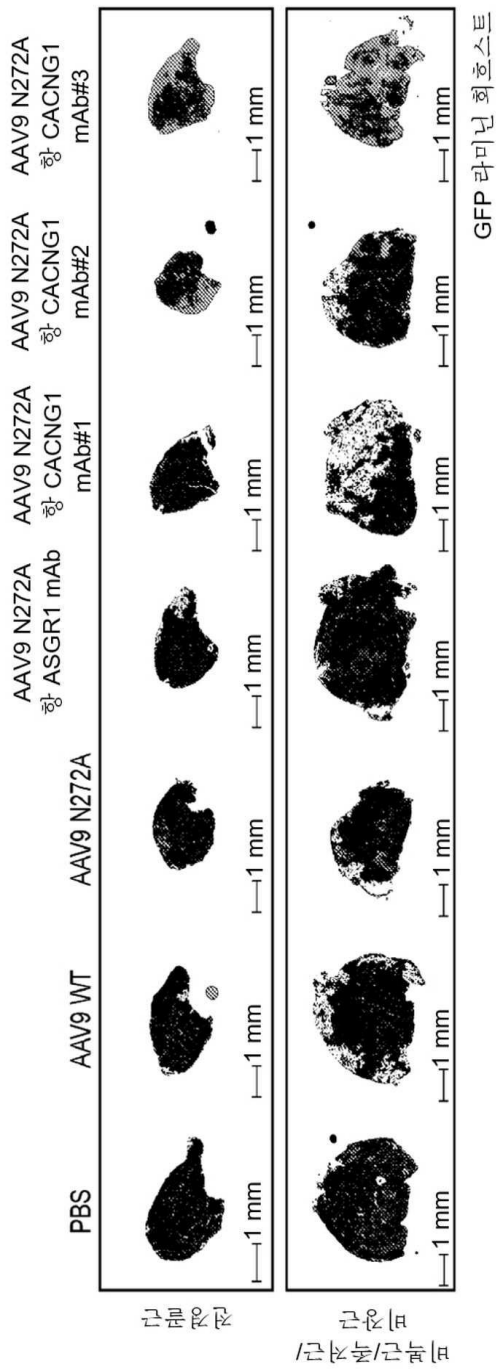
도면9b



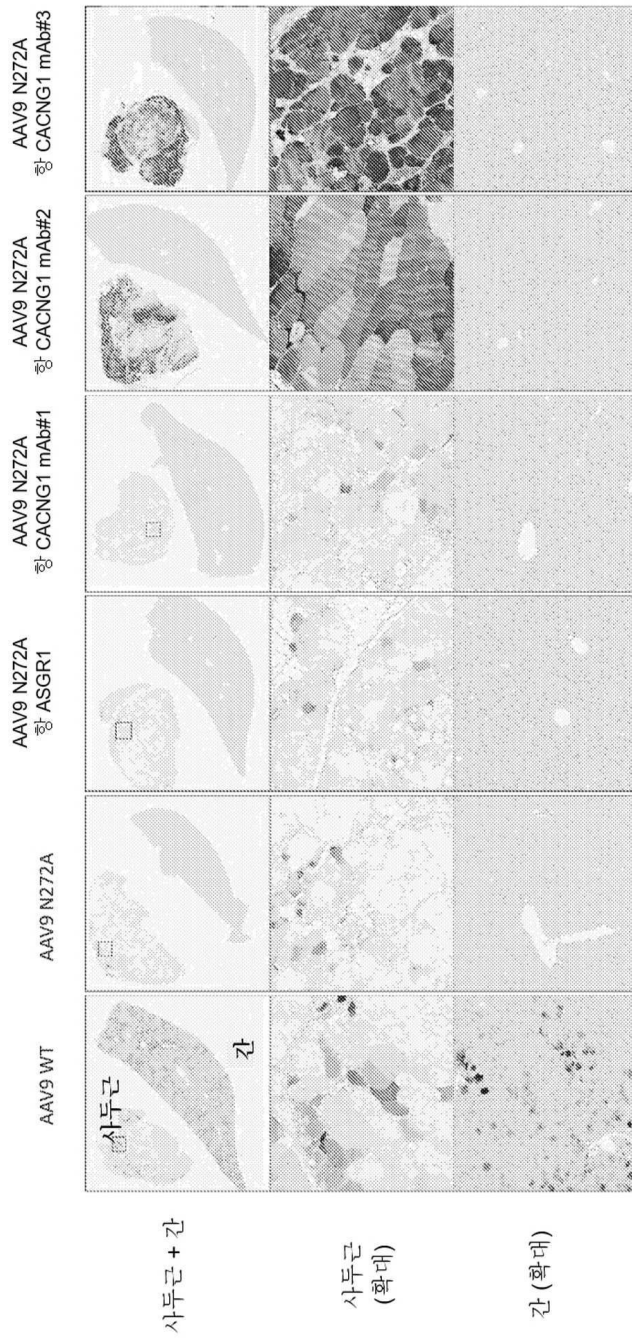
도면9c



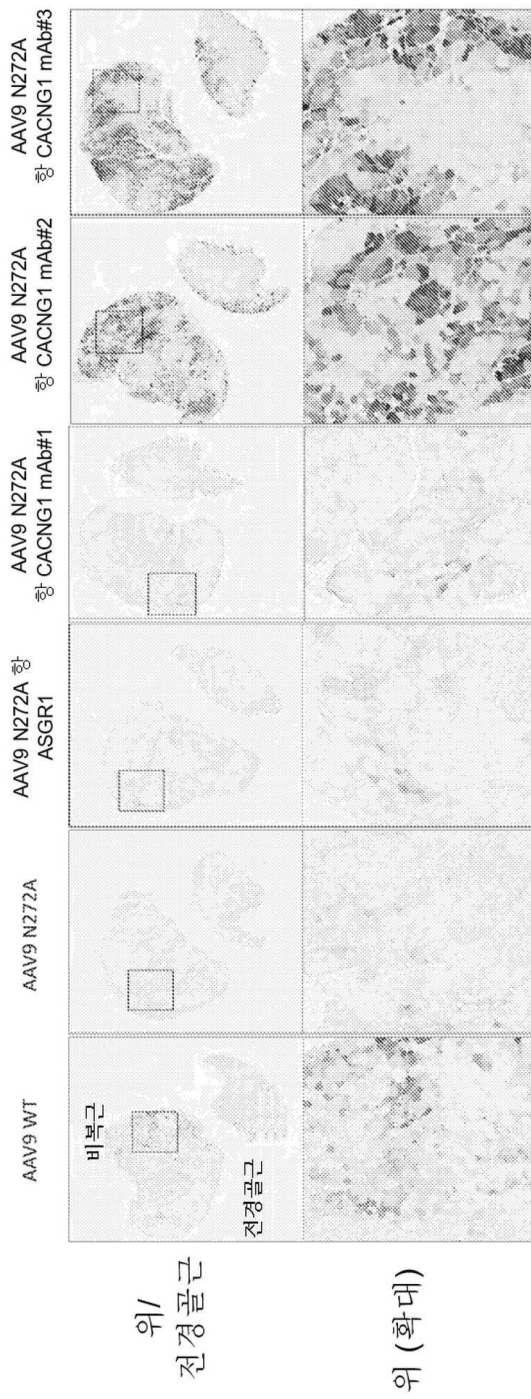
도면10



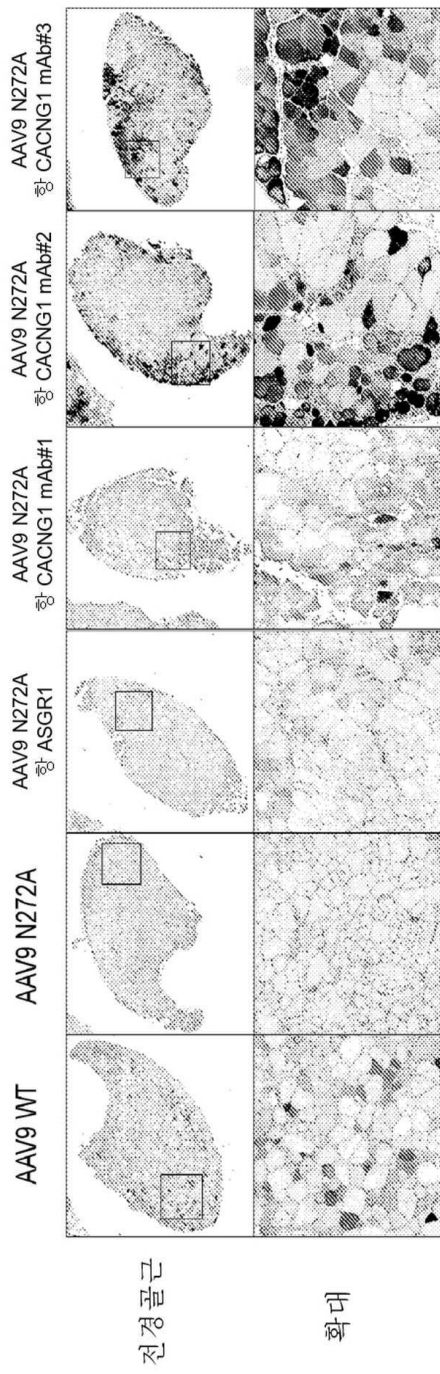
도면11



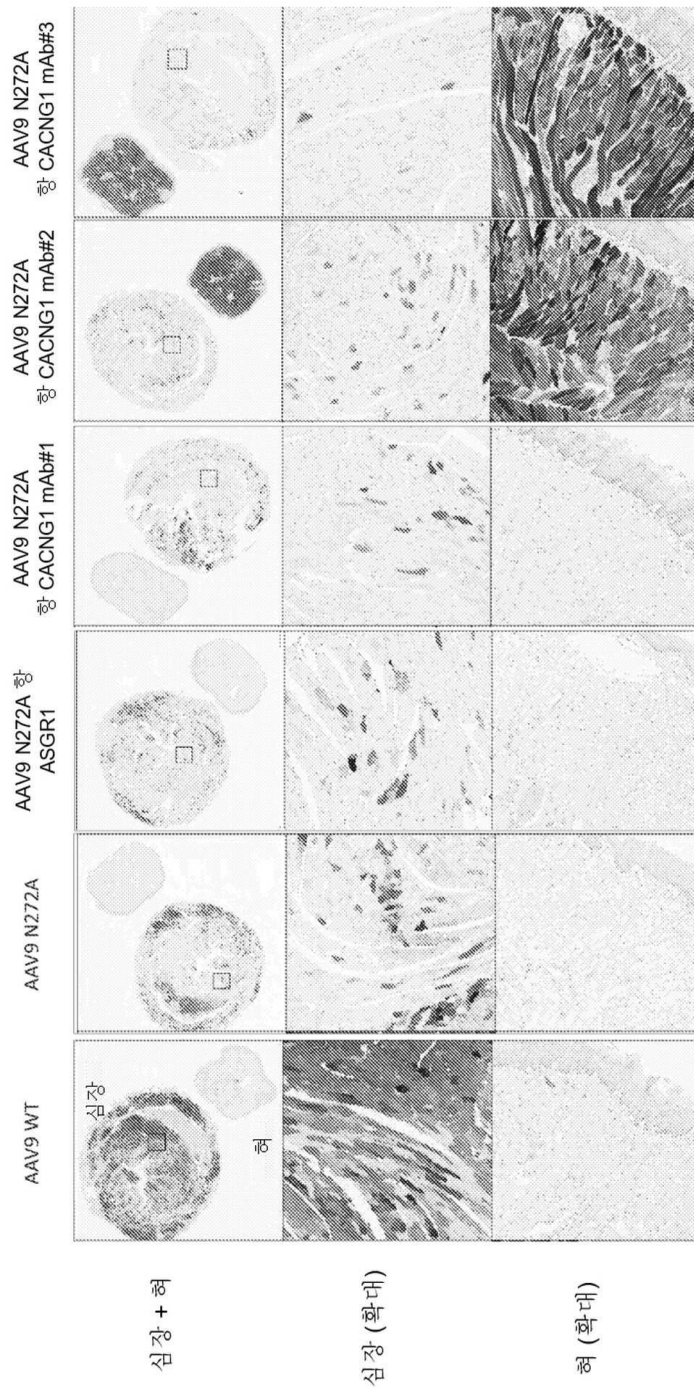
도면12



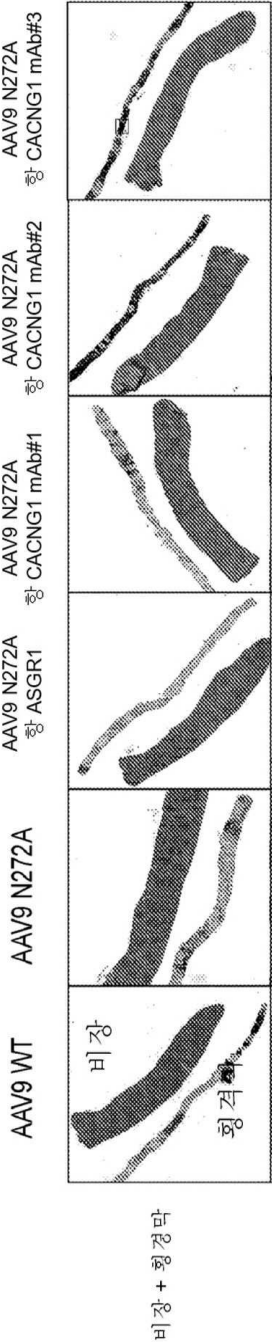
도면13



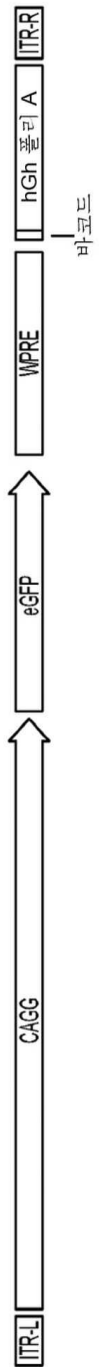
도면14



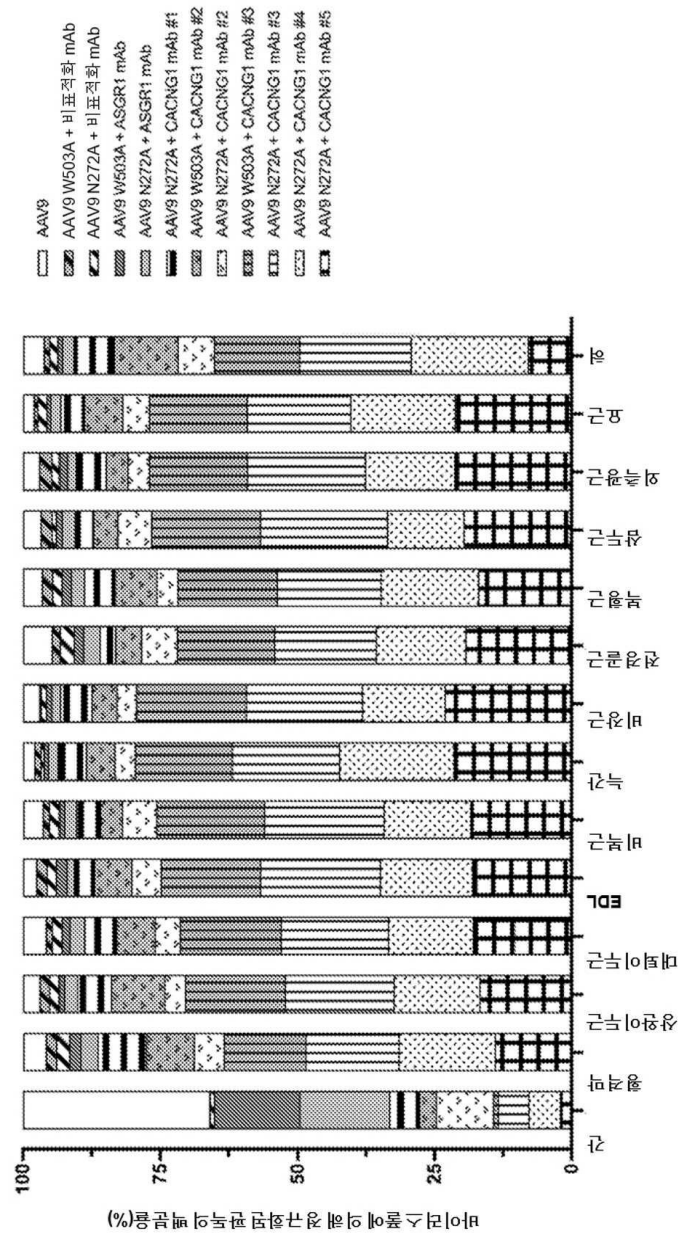
도면15



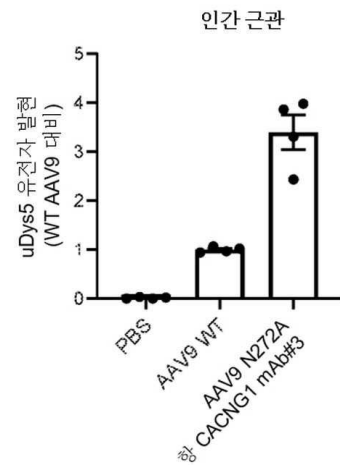
도면16



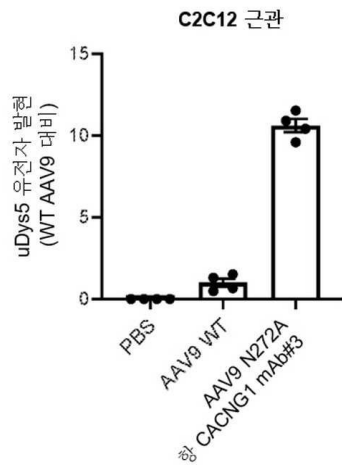
도면17



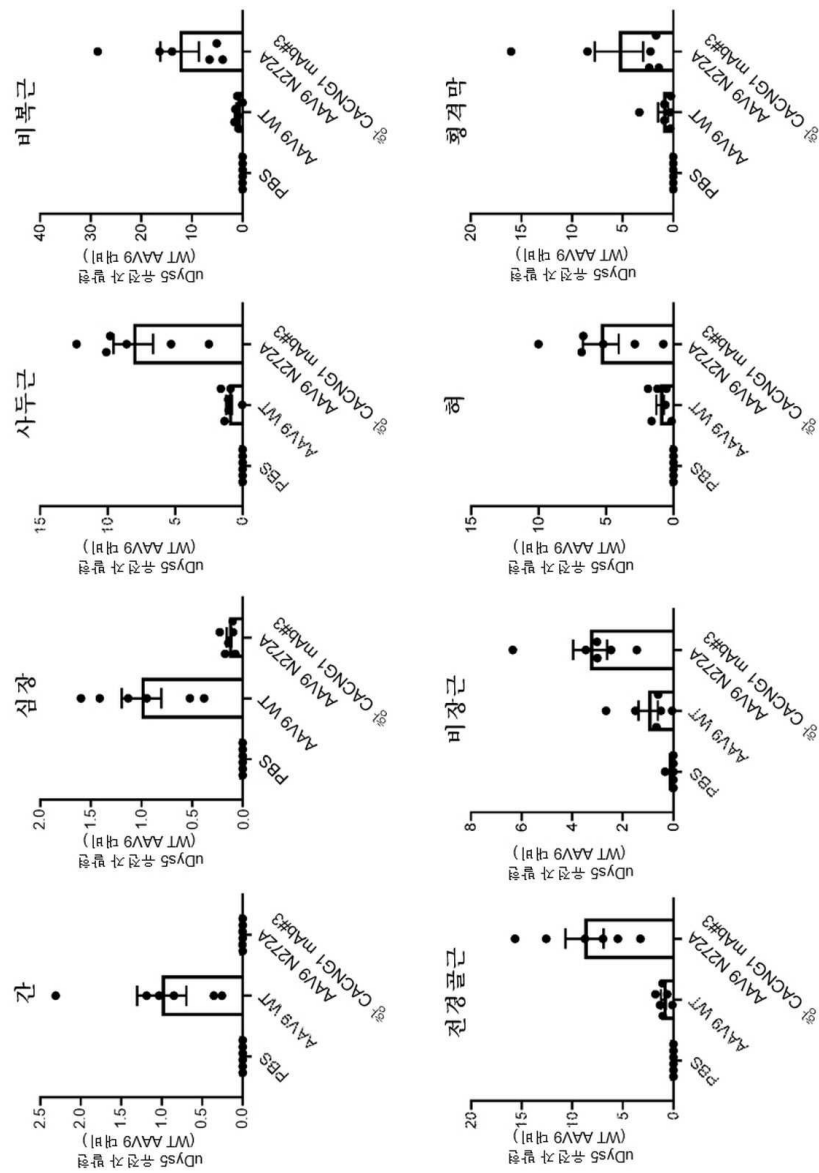
도면18a



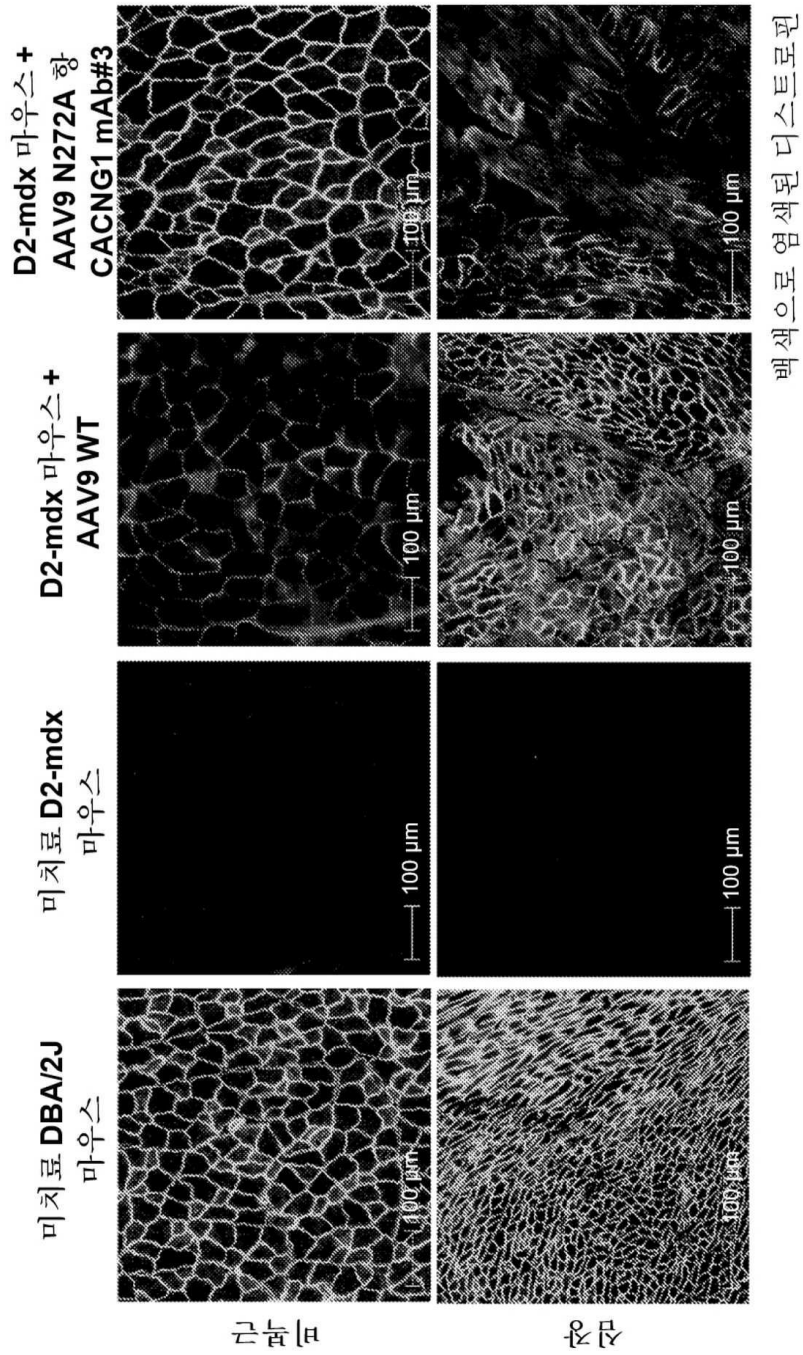
도면18b



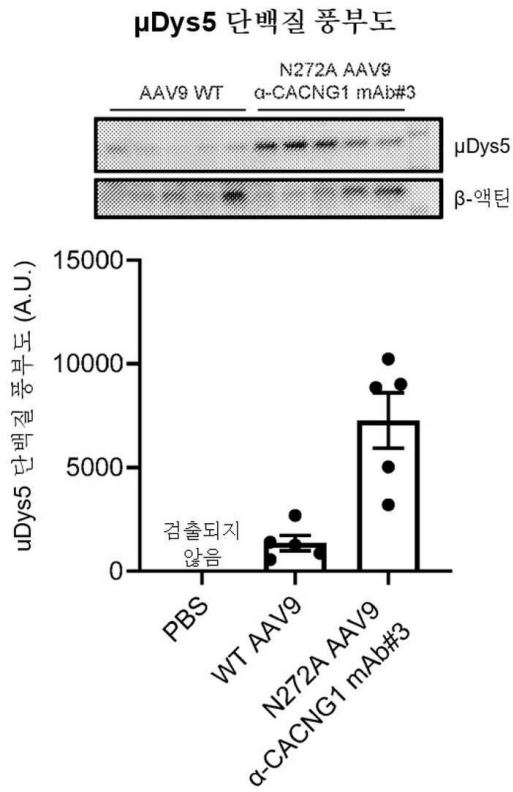
도면19



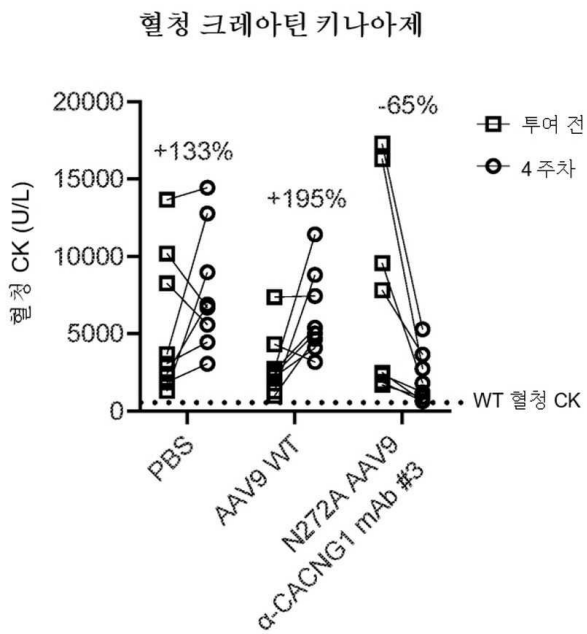
도면20



도면21

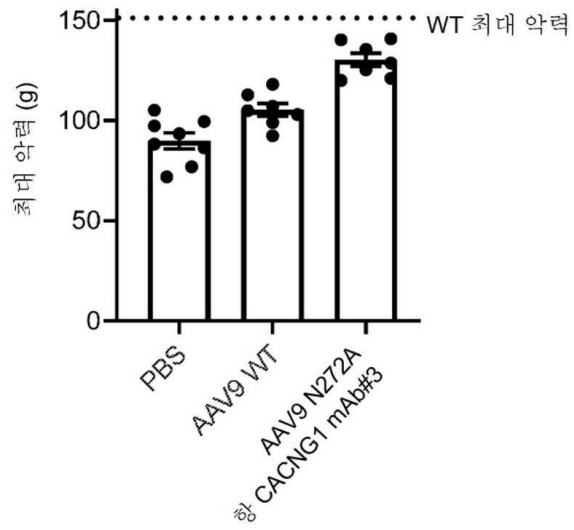


도면22

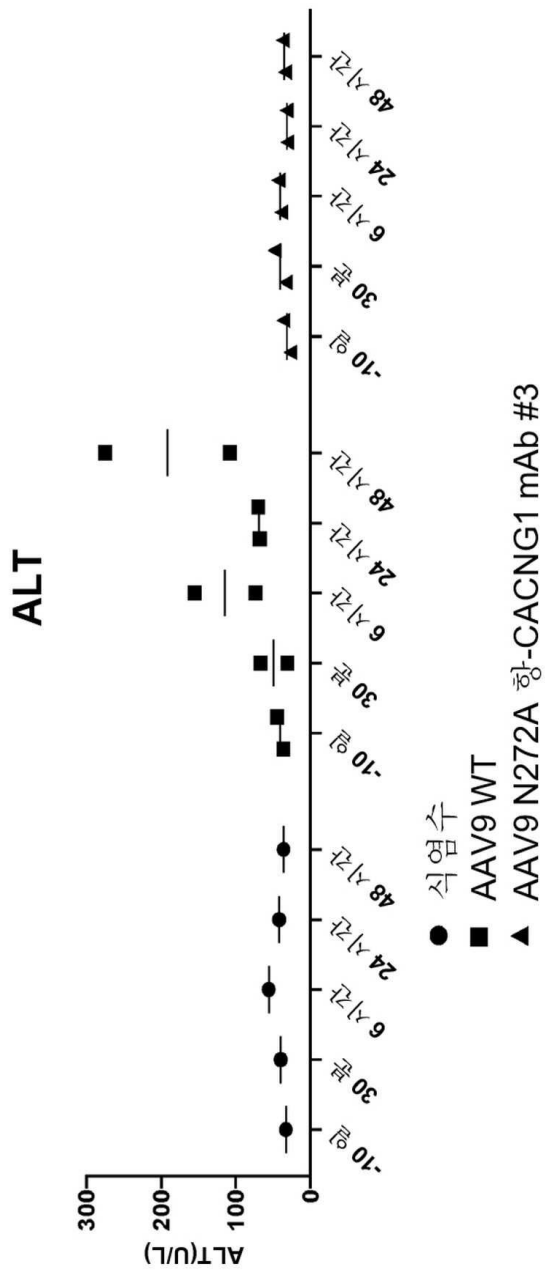


도면23

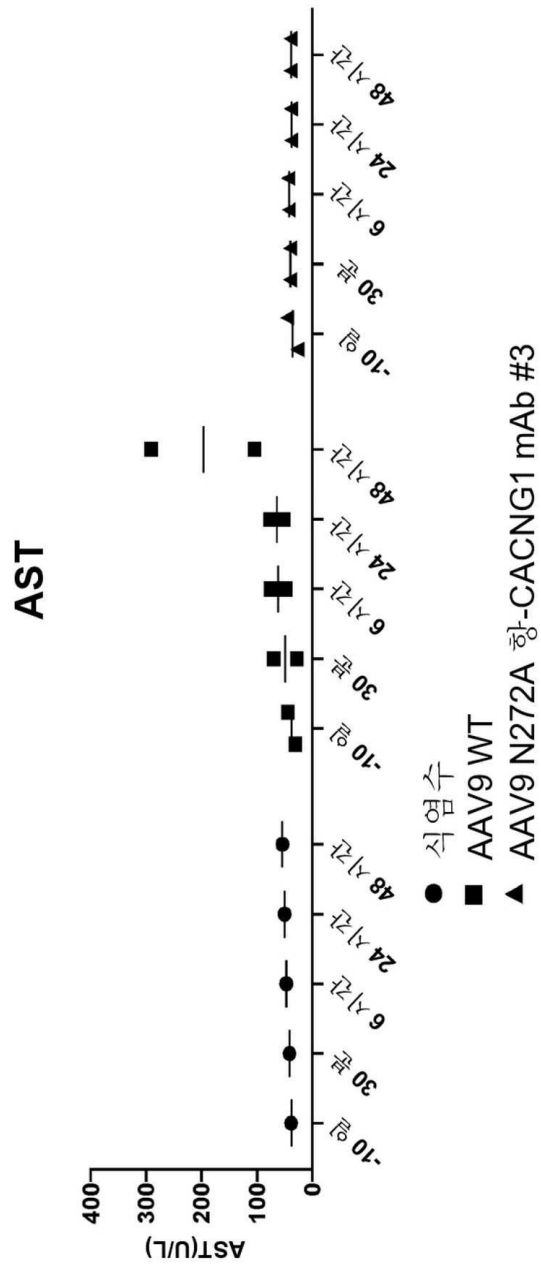
앞다리 악력



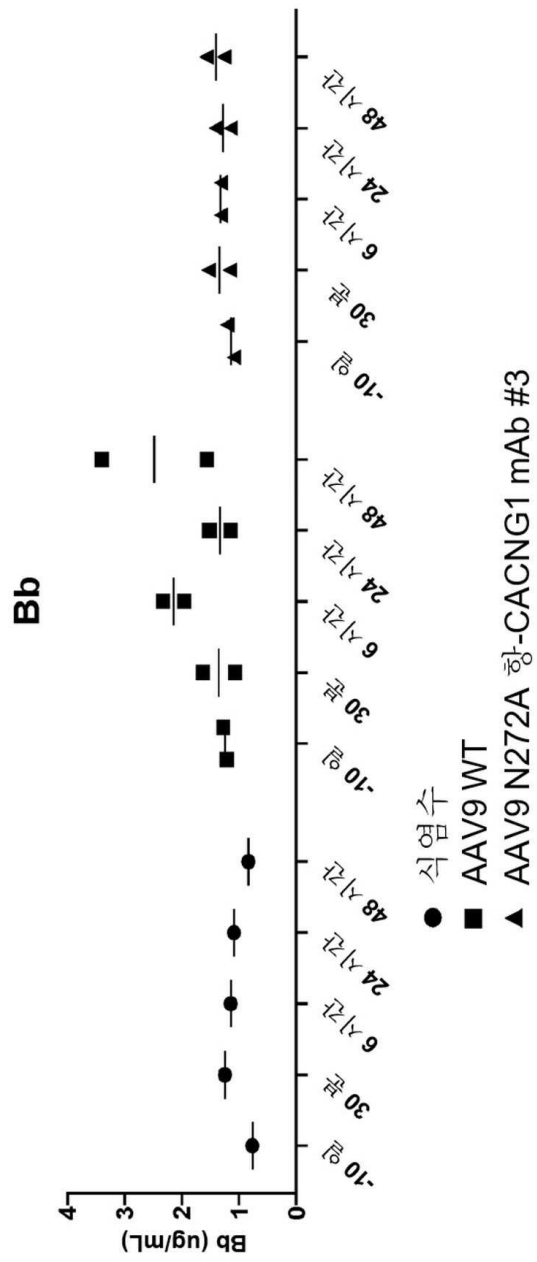
도면24a



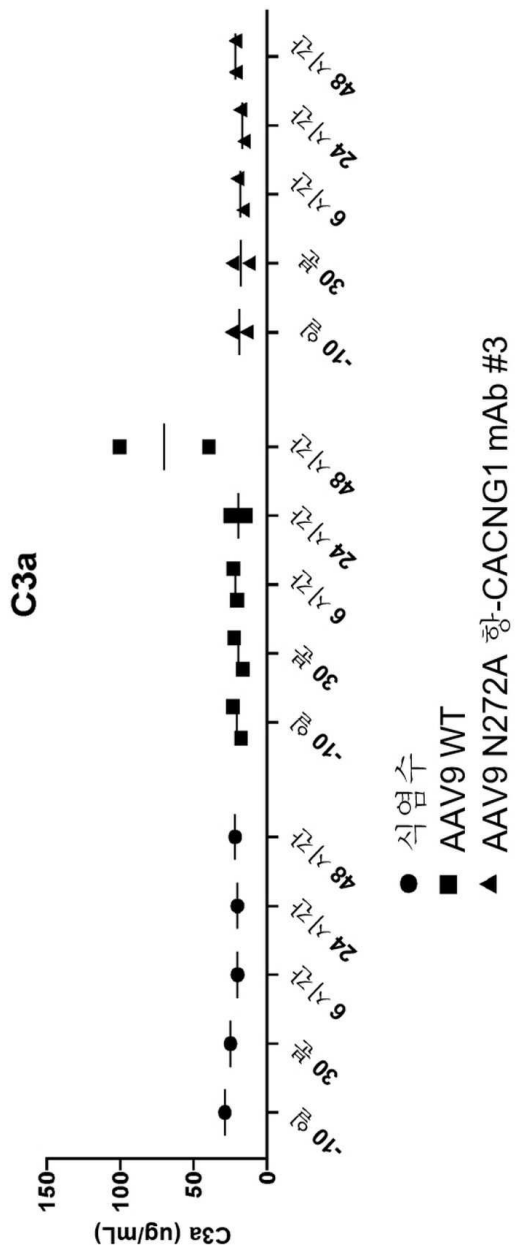
도면24b



도면24c



도면24d



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.