

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2021-0054513
(43) 공개일자 2021년05월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 38/00* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
C12N 15/113 (2010.01) *C12N 9/24* (2006.01)

(52) CPC특허분류
C07K 16/2881 (2013.01)
A61K 38/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7005994
 (22) 출원일자(국제) 2019년08월02일
 심사청구일자 없음
 (85) 번역문제출일자 2021년02월26일
 (86) 국제출원번호 PCT/US2019/044960
 (87) 국제공개번호 WO 2020/028841
 국제공개일자 2020년02월06일
 (30) 우선권주장
 62/713,959 2018년08월02일 미국(US)

(71) 출원인
 다인 세라퓨틱스, 인크.
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스
 케어 400 텐스 플로어

(72) 발명자
 서브라마니안, 로메쉬, 알.
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스
 케어 400 텐스 플로어
 카타나니, 모하메드, 티.
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스
 케어 400 텐스 플로어
 위든, 티모시
 미국 02139 매사추세츠주 캠브리지 테크놀로지 스
 케어 400 텐스 플로어

(74) 대리인
 양영준, 이상남

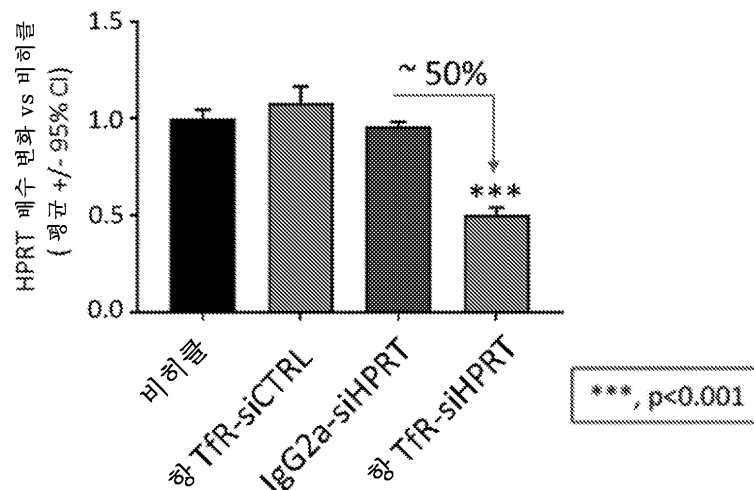
전체 청구항 수 : 총 65 항

(54) 발명의 명칭 근육 표적화 복합체 및 폼페병을 치료하기 위한 그의 용도

(57) 요약

본 개시내용의 측면은 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 근육 세포 상의 내재화 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시킨다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

C12N 15/113 (2013.01)

C12N 9/2402 (2013.01)

C12Y 302/0102 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/33 (2013.01)

C07K 2317/77 (2013.01)

C07K 2317/92 (2013.01)

C12N 2310/341 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키도록 구성된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체이며, 여기서 근육-표적화제는 근육 세포 상의 내재화 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 복합체.

청구항 2

제1항에 있어서, 근육-표적화제가 근육-표적화 항체인 복합체.

청구항 3

제2항에 있어서, 근육-표적화 항체가 트랜스페린 수용체의 세포외 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 복합체.

청구항 4

제3항에 있어서, 트랜스페린 수용체의 세포외 에피토프가 트랜스페린 수용체의 정단 도메인의 에피토프를 포함하는 것인 복합체.

청구항 5

제3항 또는 제4항에 있어서, 근육-표적화 항체가 서열식별번호: 1-3의 C89 내지 F760의 범위의 서열의 에피토프에 특이적으로 결합하는 것인 복합체.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스페린 수용체에 대한 근육-표적화 항체의 결합의 평형 해리 상수 (K_d)가 10^{-11} M 내지 10^{-6} M의 범위인 복합체.

청구항 7

제3항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 트랜스페린 수용체의 에피토프에의 특이적 결합에 대해 표 1에 열거된 항체와 경쟁하는 것인 복합체.

청구항 8

제7항에 있어서, 근육-표적화 항체가 트랜스페린 수용체의 에피토프에의 특이적 결합에 대해 10^{-6} M 이하의 K_d 로 경쟁하는 것인 복합체.

청구항 9

제8항에 있어서, K_d 가 10^{-11} M 내지 10^{-6} M의 범위인 복합체.

청구항 10

제3항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 트랜스페린 수용체의 트랜스페린 결합 부위에 특이적으로 결합하지 않고/거나, 근육-표적화 항체가 트랜스페린 수용체에 대한 트랜스페린의 결합을 억제하지 않는 것인 복합체.

청구항 11

제3항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 인간, 비-인간 영장류 및 설치류 트랜스페린

수용체 중 2종 이상의 세포의 에피토프와 교차-반응성인 복합체.

청구항 12

제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 근육 세포 내로의 분자 페이로드의 트랜스페린 수용체 매개된 내재화를 촉진하도록 구성된 복합체.

청구항 13

제2항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 키메라 항체이며, 임의로 여기서 키메라 항체는 인간화 모노클로날 항체인 복합체.

청구항 14

제2항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 ScFv, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편 또는 Fv 단편의 형태인 복합체.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 페이로드가 올리고뉴클레오타이드인 복합체.

청구항 16

제15항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 성숙 GAA mRNA 내 엑손 2의 포함을 촉진하는 것인 복합체.

청구항 17

제15항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 GYS1의 발현을 억제하는 것인 복합체.

청구항 18

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 분자 페이로드가 폴리펩티드인 복합체.

청구항 19

제17항에 있어서, 폴리펩티드가 재조합 야생형 산 알파 글루코시다제 (GAA)인 복합체.

청구항 20

제15항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함하는 것인 복합체.

청구항 21

제20항에 있어서, 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드간 연결이 포스포로티오에이트 연결인 복합체.

청구항 22

제21항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 Rp 입체화학적 입체형태 및/또는 Sp 입체화학적 입체형태의 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 것인 복합체.

청구항 23

제22항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 모두 Rp 입체화학적 입체형태 또는 모두 Sp 입체화학적 입체형태인 포스포로티오에이트 연결을 포함하는 것인 복합체.

청구항 24

제15항 내지 제17항 및 제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타이드가 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 것인 복합체.

청구항 25

제24항에 있어서, 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드가 2'-변형된 뉴클레오티드인 복합체.

청구항 26

제15항 및 제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 세포에서 GYS1 mRNA 전사체의 RNase H-매개된 절단을 지시하는 갭머 올리고뉴클레오티드인 복합체.

청구항 27

제26항에 있어서, 갭머 올리고뉴클레오티드가 2 내지 8개의 변형된 뉴클레오티드의 원이 플랭킹된 5 내지 15개의 데옥시리보뉴클레오티드의 중심 부분을 포함하는 것인 복합체.

청구항 28

제27항에 있어서, 원의 변형된 뉴클레오티드가 2'-변형된 뉴클레오티드인 복합체.

청구항 29

제15항 및 제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 믹스머 올리고뉴클레오티드인 복합체.

청구항 30

제29항에 있어서, 믹스머 올리고뉴클레오티드가 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체 내 엑손 2의 스플라이스 매개된 포함을 촉진하는 것인 복합체.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 믹스머 올리고뉴클레오티드가 2개 이상의 상이한 2' 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 복합체.

청구항 32

제15항 및 제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오티드가 GYS1 mRNA 전사체의 RNAi-매개된 절단을 촉진하는 RNAi 올리고뉴클레오티드인 복합체.

청구항 33

제32항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드가 19 내지 25개 뉴클레오티드 길이의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드인 복합체.

청구항 34

제32항 또는 제33항에 있어서, RNAi 올리고뉴클레오티드가 적어도 1개의 2' 변형된 뉴클레오티드를 포함하는 것인 복합체.

청구항 35

제25항, 제28항, 제31항 및 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 2' 변형된 뉴클레오티드가 2'-O-메틸, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE) 및 2',4'-가교된 뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 복합체.

청구항 36

제24항에 있어서, 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드가 가교된 뉴클레오티드인 복합체.

청구항 37

제25항, 제28항, 제31항 및 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 1개의 2' 변형된 뉴클레오티드가 2',4'-구속성 2'-O-에틸 (cEt) 및 잠금 핵산 (LNA) 뉴클레오티드로부터 선택된 2',4'-가교된 뉴클레오티드인 복합체.

청구항 38

제15항 및 제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타드가 게놈 편집 뉴클레아제를 위한 가이드 서열을 포함하는 것인 복합체.

청구항 39

제15항, 제16항 및 제20항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 올리고뉴클레오타드가 포스포로디아미다이트 모르폴리노 올리고머인 복합체.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화제가 절단가능한 링커를 통해 분자 페이로드에 공유 연결되는 것인 복합체.

청구항 41

제40항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제-감수성 링커, pH-감수성 링커 및 글루타티온-감수성 링커로부터 선택되는 것인 복합체.

청구항 42

제41항에 있어서, 절단가능한 링커가 프로테아제-감수성 링커인 복합체.

청구항 43

제42항에 있어서, 프로테아제-감수성 링커가 리소솜 프로테아제 및/또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단가능한 서열을 포함하는 것인 복합체.

청구항 44

제42항에 있어서, 프로테아제-감수성 링커가 발린-시트룰린 디펩티드 서열을 포함하는 것인 복합체.

청구항 45

제47항에 있어서, 링커가 4 내지 6의 범위의 pH에서 절단되는 pH-감수성 링커인 복합체.

청구항 46

제1항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화제가 비-절단가능한 링커를 통해 분자 페이로드에 공유 연결되는 것인 복합체.

청구항 47

제46항에 있어서, 비-절단가능한 링커가 알칸 링커인 복합체.

청구항 48

제2항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가, 올리고뉴클레오타드가 공유 연결되는 비-천연 아미노산을 포함하는 것인 복합체.

청구항 49

제2항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가 항체의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기에 대한 접합을 통해 올리고뉴클레오타드에 공유 연결되는 것인 복합체.

청구항 50

제49항에 있어서, 올리고뉴클레오타드가 말레이미드-함유 링커를 통해 항체의 시스테인에 접합되며, 임의로 여기서 말레이미드-함유 링커는 말레이미도카프로일 또는 말레이미도메틸 시클로헥산-1-카르복실레이트 기를 포함하는 것인 복합체.

청구항 51

제2항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 근육-표적화 항체가, 올리고뉴클레오타드가 공유 연결되는 적어도 1개의 당 모이어티를 포함하는 글리코실화 항체인 복합체.

청구항 52

제51항에 있어서, 당 모이어티가 분지형 만노스인 복합체.

청구항 53

제51항 또는 제52항에 있어서, 근육-표적화 항체가 별개의 올리고뉴클레오타드에 각각 공유 연결되는 1 내지 4 개의 당 모이어티를 포함하는 글리코실화 항체인 복합체.

청구항 54

제51항에 있어서, 근육-표적화 항체가 완전-글리코실화 항체인 복합체.

청구항 55

제51항에 있어서, 근육-표적화 항체가 부분-글리코실화 항체인 복합체.

청구항 56

제55항에 있어서, 부분-글리코실화 항체가 화학적 또는 효소적 수단을 통해 생산되는 것인 복합체.

청구항 57

제55항에 있어서, 부분-글리코실화 항체가 N- 또는 O-글리코실화 경로 내의 효소가 결핍된 세포에서 생산되는 것인 복합체.

청구항 58

트랜스페린 수용체를 발현하는 세포를 제1항 내지 제57항 중 어느 한 항의 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 트랜스페린 수용체를 발현하는 세포로 분자 페이로드를 전달하는 방법.

청구항 59

제1항 내지 제57항 중 어느 한 항의 복합체를 폼페병 (PD)과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 근육 세포에 대한 분자 페이로드의 내재화를 촉진하는데 유효한 양으로 이러한 세포와 접촉시키는 것을 포함하는, 폼페병 (PD)과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키는 방법.

청구항 60

제59항에 있어서, 세포가 시험관내 세포인 방법.

청구항 61

제59항에 있어서, 세포가 대상체 내의 세포인 방법.

청구항 62

제61항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 63

제61항에 있어서, 돌연변이 GAA 대립유전자가 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체를 포함하는 것인 방법.

청구항 64

폼페병과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 대상체에게 유효량의 제1항 내지 제57항 중 어느 한 항의 복합체를 투여하는 것을 포함하는, 폼페병과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 대상체를 치료하는 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 돌연변이 GAA 대립유전자가 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체를 포함하는 것인 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 2018년 8월 2일에 출원된 "근육 표적화 복합체 및 폼페병을 치료하기 위한 그의 용도"라는 발명의 명칭의 미국 가출원 번호 62/713,959를 우선권 주장하며; 상기 가출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 본 출원은 세포로 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)를 전달하기 위한 표적화 복합체 및 그의 용도, 특히 질환의 치료와 관련된 용도에 관한 것이다.

[0005] 서열 목록에 대한 참조

[0006] 본 출원은 전자 포맷의 서열 목록과 함께 출원된다. 서열 목록은 2019년 7월 31일에 생성되었고 65 킬로바이트 크기인 파일명 D082470003W000-SEQ.txt의 파일로 제공된다. 전자 포맷의 서열 목록 내의 정보는 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0007] 리소솜 축적 질환은 리소솜 히드로리아제 또는 막횡단 단백질의 결핍에 의해 유발된 유전성 장애의 군이다. 이들 질환은 종종 다양한 소화되지 않은 기질의 점진적 축적 및 세포 트래픽킹 경로의 조절 이상을 특징으로 한다. 폼페병 (PD)은 근육 세포 내의 글리코겐의 축적을 특징으로 하는 상염색체 열성 리소솜 축적 장애이며, 이는 진행성 근육 약화, 감소된 근긴장도 (저긴장증), 심장 비대 및 호흡 곤란으로 이어진다. 증상은 종종 사례에서 종종 출생시에 존재하지만, 발병은 일생 동안 일어날 수 있고, 폼페병은 미국에서 40,000명의 사람 중 대략 1명에서 이환된다. 폼페병은 산 알파-글루코시다제 효소를 코딩하는 GAA 유전자 내의 돌연변이로부터 유발된다. GAA 효소는 리소솜에서 글리코겐을 글루코스로 분해한다. GAA 유전자 내의 특정 돌연변이는 감소된 효소 활성을 유발하여, 리소솜 내의 글리코겐의 독성 축적을 초래한다. 한 예에서, c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체는 pre-mRNA 스플라이싱 동안 엑손 2 스킵핑을 촉진하며, 소아기/성인 질환 형태에 대해 가장 흔한 변이체이다. 글리코겐은 글리코겐 신태제 1 (GYS1 유전자에 의해 코딩됨)을 포함한 수많은 효소에 의해 합성된다. 글리코겐 축적은 근육 세포에 대해 특히 독성이어서, PD의 진행성 근육 약화 증상을 일으킨다. PD에 대한 현행 치료는 재조합, 야생형 인간 GAA 단백질의 투여를 수반하는 효소 대체 요법을 포함한다.

발명의 내용

[0008] 일부 측면에 따라, 본 개시내용은 근육 세포로 분자 페이로드를 전달할 목적으로 근육 세포를 표적화하는 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 복합체는 대상체, 예를 들어 리소솜 효소인 산 알파 글루코시다제 (GAA)를 코딩하는 유전자에 c.-32-13T>G (IVS1) 변이체를 갖는 대상체의 세포에서 이상 스플라이싱을 교정하는 올리고뉴클레오타이드를 전달하는데 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 복합체는 또한, 예를 들어 폼페병을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에서 글리코겐 합성 경로 내의 효소, 예컨대 GYS1의 발현을 억제하는 분자 페이로드를 전달하여 글리코겐 합성을 감소시키는데 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 복합체는 대상체에게, 예를 들어 폼페병을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에게 야생형 GAA 단백질 또는 이를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 전달하는 분자 페이로드를 전달하는데 특히 유용하다. 일부 실시양태에서, 2종 이상의 복합체는 폼페병을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체를 치료하기 위해, 예를 들어 동시에 투여될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 복합체는 근육 세포로 분자 페이로드를 전달할 목적으로 근육 세포의 표면 상의 수용체에 특이적으로 결합하는 근육-표적화체 (예를 들어, 근육 표적화 항체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 복합체는 수용체 매개된 내재화를 통해 세포 내로 흡수되고, 이 후 분자 페이로드가 방출되어 세포 내부에서 기능을 수행할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 전달하도록 조작된 복합체는 올리고뉴클레오타이드가 스플라이스 변이체를 교정하거나 (예를 들어, GAA 내의 엑손 2 스킵핑을

교정하거나) 또는 유전자 발현 (예를 들어, 근육 세포 내의 GYS1의 발현)을 억제할 수 있도록 올리고뉴클레오티드를 방출할 수 있다. 일부 실시양태에서, 야생형 GAA 단백질을 전달하도록 조작된 복합체는 야생형 GAA 단백질 또는 이를 코딩하는 재조합 핵산을 방출하여 세포 GAA 활성을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 복합체의 근육-표적화제와 올리고뉴클레오티드를 연결하는 공유 링커의 엔도솜 절단에 의해 방출된다.

[0009] 본 개시내용의 일부 측면은 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키도록 구성된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체이며, 여기서 근육-표적화제는 근육 세포 상의 내재화 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하는 것인 복합체를 포함한다.

[0010] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 근육-표적화 항체이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 트랜스페린 수용체의 세포외 에피토프 (예를 들어, 트랜스페린 수용체의 정단 도메인의 에피토프)에 특이적으로 결합하는 항체이다. 근육-표적화 항체는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-3의 C89 내지 F760의 범위의 서열의 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체에 대한 근육-표적화 항체의 결합의 평형 해리 상수 (Kd)는 10^{-11} M 내지 10^{-6} M의 범위이다.

[0011] 일부 실시양태에서, 복합체의 근육-표적화 항체는 트랜스페린 수용체의 에피토프에의 특이적 결합에 대해 표 1에 열거된 항체와 경쟁한다 (예를 들어, 트랜스페린 수용체의 에피토프에의 특이적 결합에 대해 10^{-6} M 이하, 예를 들어 10^{-11} M 내지 10^{-6} M의 범위의 Kd로 경쟁함).

[0012] 일부 실시양태에서, 복합체의 근육-표적화 항체는 트랜스페린 수용체의 트랜스페린 결합 부위에 특이적으로 결합하지 않고/거나 트랜스페린 수용체에 대한 트랜스페린의 결합을 억제하지 않는다. 일부 실시양태에서, 복합체의 근육-표적화 항체는 인간, 비-인간 영장류 및 설치류 트랜스페린 수용체 중 2종 이상의 세포외 에피토프와 교차-반응성이다. 일부 실시양태에서, 복합체의 근육-표적화 항체는 근육 세포 내로의 분자 페이로드의 트랜스페린 수용체 매개된 내재화를 촉진하도록 구성된다.

[0013] 근육-표적화 항체 (예를 들어, 근육-표적화 항체는 트랜스페린 수용체의 세포외 에피토프에 특이적으로 결합하는 항체임)는 키메라 항체이며, 여기서 임의로 키메라 항체는 인간화 모노클로날 항체이다. 근육-표적화 항체는 ScFv, Fab 단편, Fab' 단편, F(ab')₂ 단편 또는 Fv 단편의 형태일 수 있다.

[0014] 일부 실시양태에서, 복합체의 분자 페이로드는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 성숙 GAA mRNA 내 엑손 2의 포함을 촉진한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 GYS1의 발현을 억제한다.

[0015] 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오티드간 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트 연결)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 Rp 입체화학적 입체형태 및/또는 Sp 입체화학적 입체형태의 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 모두 Rp 입체화학적 입체형태인 포스포로티오에이트 연결을 포함한다. 다른 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 모두 Sp 입체화학적 입체형태인 포스포로티오에이트 연결을 포함한다.

[0016] 본 개시내용의 올리고뉴클레오티드는 1개 이상의 변형된 뉴클레오티드 (예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오티드)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 2'-O-메틸, 2'-플루오로 (2'-F), 2'-O-메톡시에틸 (2'-MOE) 또는 2',4'-가교된 뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 변형된 뉴클레오티드는 가교된 뉴클레오티드이다 (예를 들어, 2',4'-구속성 2'-O-에틸 (cEt) 및 잠금 핵산 (LNA) 뉴클레오티드로부터 선택됨).

[0017] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 세포에서 GYS1 mRNA 전사체의 RNase H-매개된 절단을 지시하는 갭머 올리고뉴클레오티드이다. 갭머 올리고뉴클레오티드는 2 내지 8개의 변형된 뉴클레오티드 (예를 들어, 2'-변형된 뉴클레오티드)의 윙이 플랭킹된 5 내지 15개의 데옥시리보뉴클레오티드의 중심 부분을 포함할 수 있다.

[0018] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 믹스머 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 믹스머 올리고뉴클레오티드는 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체 내 엑손 2의 스플라이스 매개된 포함을 촉진한다. 믹스머 올리고뉴클레오티드는 2개 이상의 상이한 2' 변형된 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0019] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 GYS1 mRNA 전사체의 RNAi-매개된 절단을 촉진하는 RNAi 올리고뉴클레오티드이다. RNAi 올리고뉴클레오티드는 19 내지 25개 뉴클레오티드 길이의 이중 가닥 올리고뉴클레오티드일 수 있다. 일부 실시양태에서, RNAi 올리고뉴클레오티드는 적어도 1개의 2' 변형된 뉴클레오티드를 포함한다.

- [0020] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 게놈 편집 뉴클레아제를 위한 가이드 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로디아미다이트 모르폴리노 올리고머 (PMO)이다.
- [0022] 다른 실시양태에서, 분자 페이로드스는 폴리펩티드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드스는 재조합 야생형 산알파 글루코시다제 (GAA) 폴리펩티드이다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 절단가능한 링커 (예를 들어, 프로테아제-감수성 링커, pH-감수성 링커 또는 글루타티온-감수성 링커)를 통해 분자 페이로드에 공유 연결된다. 프로테아제-감수성 링커는 리소솜 프로테아제 및/또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단가능한 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-감수성 링커는 발린-시트룰린 디펩티드 서열을 포함한다. pH-감수성 링커는 4 내지 6의 범위의 pH에서 절단될 수 있다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 비-절단가능한 링커 (예를 들어, 알칸 링커)를 통해 분자 페이로드에 공유 연결된다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 올리고뉴클레오타이드가 공유 연결될 수 있는 비-천연 아미노산을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 항체의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기에 대한 접합을 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 말레이미드-함유 링커를 통해 항체의 시스테인 잔기에 접합되며, 임의로 여기서 말레이미드-함유 링커는 말레이미도카프로일 또는 말레이미도메틸 시클로헥산-1-카르복실레이트 기를 포함한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 올리고뉴클레오타이드가 공유 연결되는 적어도 1개의 당 모이어티를 포함하는 글리코실화 항체이다. 일부 실시양태에서, 글리코실화 항체는 분지형 만노스인 적어도 1개의 당 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 별개의 올리고뉴클레오타이드에 각각 공유 연결되는 1 내지 4개의 당 모이어티를 포함하는 글리코실화 항체이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 완전-글리코실화 항체 또는 부분-글리코실화 항체이다. 부분-글리코실화 항체는 화학적 또는 효소적 수단을 통해 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 부분-글리코실화 항체는 N- 또는 O-글리코실화 경로 내의 효소가 결핍된 세포에서 생산된다.
- [0027] 본 개시내용의 일부 측면은 트랜스페린 수용체를 발현하는 세포를 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키도록 구성된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체와 접촉시키는 것을 포함하는, 트랜스페린 수용체를 발현하는 세포로 분자 페이로드를 전달하는 방법을 포함한다.
- [0028] 본 개시내용의 일부 측면은 폼페병 (PD)과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키는 방법을 포함하며, 이 방법은 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키도록 구성된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 세포에 대한 분자 페이로드의 내재화를 촉진하기에 유효한 양으로 세포와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 시험관내 세포이다. 일부 실시양태에서, 세포는 대상체 내의 세포이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 GAA 대립유전자는 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체를 포함한다.
- [0029] 본 개시내용의 일부 측면은 폼페병과 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 대상체를 치료하는 방법을 포함하며, 이 방법은 대상체에게 근육 세포 내의 글리코겐 수준을 감소시키도록 구성된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체의 유효량을 투여하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이 GAA 대립유전자는 c.-32-13T>G (IVS1) GAA 변이체를 포함한다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1은 세포를 siRNA로 형질감염시킨 효과를 보여주는 비제한적 개략도를 도시한다.
- 도 2는 siRNA를 포함하는 근육 표적화 복합체의 활성을 보여주는 비제한적 개략도를 도시한다.
- 도 3a-3b는 대조군 실험에 비해 생체내 마우스 근육 조직 (비복근 및 심장)에서 siRNA를 포함하는 근육 표적화 복합체의 활성을 보여주는 비제한적 개략도를 도시한다. (N=4마리 C57BL/6마리 WT 마우스)
- 도 4a-4e는 siRNA를 포함하는 근육 표적화 복합체의 조직 선택성을 보여주는 비제한적 개략도를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 개시내용의 측면은 특정 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드, 펩티드, 소분자)가 근육 세포에서 유익한 효과를 가질 수 있지만, 이러한 세포를 효과적으로 표적화하는 것이 어려운 것으로 입증되었다는 인식에 관한 것이다. 본원에 기재된 바와 같이, 본 개시내용은 이러한 난제를 극복하기 위해 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 복합체는, 예를 들어 회귀 근육 질환을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 대상체에서 근육 세포에 표적 유전자의 발현 또는 활성을 억제하는 분자 페이로드를 전달하는데 특히 유용하다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 대상체가 GAA mRNA의 엑손 2의 스킵핑을 촉진하는 적어도 1개의 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는, 폼페병을 갖는 대상체를 치료하기 위한 복합체가 제공된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 복합체는 GAA의 이러한 이상 스플라이싱을 교정할 수 있는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 야생형 GAA 단백질 또는 이를 코딩하는 합성 핵산을 전달하기 위한 복합체가 제공된다. 다른 실시양태에서, 폼페병을 갖는 대상체를 치료하기 위해 GYS1을 하향조절하기 위한 복합체가 제공된다.
- [0032] 또한, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 복합체는 GAA 내의 질환-연관 돌연변이 (예를 들어, GAA 촉매 활성을 감소시키는 돌연변이 또는 mRNA 스플라이싱을 변경시키는 돌연변이)에 또는 그 근처에 있는 서열에 핵산 프로그램가능한 뉴클레아제 (예를 들어, Cas9)를 표적화할 수 있는 분자 페이로드, 예컨대 가이드 분자 (예를 들어, 가이드 RNA)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 핵산 프로그램가능한 뉴클레아제, 예를 들어 Cas9 단백질을 포함하는 염기 편집제는 PD-연관 GAA 대립유전자 내의 1개 이상의 돌연변이를 교정하는데 사용될 수 있다.
- [0033] 정의된 용어의 기재를 비롯하여 본 개시내용의 추가의 측면이 하기에 제공된다.
- [0034] I. 정의
- [0035] 투여: 본원에 사용된 용어 "투여하는" 또는 "투여"는 생리학상 및/또는 약리학상 유용한 (예를 들어, 대상체에서 상태를 치료하기 위한) 방식으로 대상체에게 복합체를 제공하는 것을 의미한다.
- [0036] 대략: 본원에 사용된 용어 "대략" 또는 "약"은 1개 이상의 관심 값에 적용되는 경우에 기재된 언급 값에 유사한 값을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "대략" 또는 "약"은 달리 언급되지 않거나 또는 달리 문맥으로부터 명백하지 않는 한 기재된 언급 값의 어느 방향으로 (초과 또는 미만) 15%, 14%, 13%, 12%, 11%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% 또는 그 미만 내에 속하는 값의 범위를 지칭한다 (이러한 수가 가능한 값의 100%를 초과하는 경우는 제외함).
- [0037] 항체: 본원에 사용된 용어 "항체"는 적어도 1개의 이뮤노글로불린 가변 도메인 또는 적어도 1개의 항원 결정기, 예를 들어 항원에 특이적으로 결합하는 파라토프를 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항체는 전장 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 키메라 항체이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간화 항체이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 항체는 Fab 단편, F(ab')₂ 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편이다. 일부 실시양태에서, 항체는 낙타류 항체로부터 유래된 나노바디 또는 상어 항체로부터 유래된 나노바디이다. 일부 실시양태에서, 항체는 디아바디이다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 배선 서열을 갖는 프레임워크를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 항체는 IgG, IgG1, IgG2, IgG2A, IgG2B, IgG2C, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgD, IgM 및 IgE 불변 도메인으로 이루어진 군으로부터 선택된 중쇄 불변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 중쇄 (H) 가변 영역 (본원에서 VH로 약칭됨) 및/또는 경쇄 (L) 가변 영역 (본원에서 VL로 약칭됨)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 불변 도메인, 예를 들어 Fc 영역을 포함한다. 이뮤노글로불린 불변 도메인은 중쇄 또는 경쇄 불변 도메인을 지칭한다. 인간 IgG 중쇄 및 경쇄 불변 도메인 아미노산 서열 및 그의 기능적 변이는 공지되어 있다. 중쇄와 관련하여, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄는 알파 (α), 델타 (Δ), 엡실론 (ϵ), 감마 (γ) 또는 뮤 (μ) 중쇄일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 중쇄는 인간 알파 (α), 델타 (Δ), 엡실론 (ϵ), 감마 (γ) 또는 뮤 (μ) 중쇄를 포함할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 항체는 인간 감마 1 CH1, CH2 및/또는 CH3 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, VH 도메인의 아미노산 서열은 인간 감마 (γ) 중쇄 불변 영역, 예컨대 관련 기술분야에 공지된 임의의 것의 아미노산 서열을 포함한다. 인간 불변 영역 서열의 비제한적 예는 관련 기술분야에 기재되었으며, 예를 들어 미국 특허 번호 5,693,780 및 상기 문헌 [Kabat E A et al., (1991)]을 참조한다. 일부 실시양태에서, VH 도메인은 본원에 제공된 임의의 가변 쇄 불변 영역에 대해 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 변형되고, 예를 들어 글리코실화, 인산화, SUMO화 및/또는 메틸화를 통해 변형된다. 일부 실시양태에서, 항체는 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자에 접합된 글리코실화 항체이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 N-글리코실화, O-글리코

실화, C-글리코실화, GPI화 (GPI 앵커 부착) 및/또는 포스포글리코실화를 통해 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 모노사카라이드, 디사카라이드, 올리고사카라이드 또는 글리칸이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 분지형 올리고사카라이드 또는 분지형 글리칸이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 만노스 단위, 글루코스 단위, N-아세틸글루코사민 단위, N-아세틸갈락토사민 단위, 갈락토스 단위, 푸코스 단위 또는 인지질 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 링커 폴리펩티드 또는 이류노글로불린 불변 도메인에 연결된 본 개시내용의 1개 이상의 항원 결합 단편을 포함하는 폴리펩티드를 포함하는 구조물이다. 링커 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 연결된 2개 이상의 아미노산 잔기를 포함하고, 1개 이상의 항원 결합 부분을 연결하는데 사용된다. 링커 폴리펩티드의 예가 보고되었다 (예를 들어, 문헌 [Holliger, P., et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448; Poljak, R. J., et al. (1994) *Structure* 2:1121-1123] 참조). 추가로, 항체는 항체 또는 항체 부분과 1종 이상의 다른 단백질 또는 펩티드와의 공유 또는 비공유 결합에 의해 형성된 보다 큰 면역부착 분자의 일부일 수 있다. 이러한 면역부착 분자의 예는 사랑체 scFv 분자를 제조하기 위한 스트랩타비딘 코어 영역의 사용 (Kipriyanov, S. M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) 및 2가 및 비오틴화 scFv 분자를 제조하기 위한 시스테인 잔기, 마커 펩티드 및 C-말단 폴리히스티딘 태그의 사용 (Kipriyanov, S. M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058)을 포함한다.

[0038] CDR: 본원에 사용된 용어 "CDR"은 항체 가변 서열 내의 상보성 결정 영역을 지칭한다. 중쇄 및 경쇄의 각각의 가변 영역에 3개의 CDR이 존재하며, 이는 각각의 가변 영역에 대해 CDR1, CDR2 및 CDR3으로 지정된다. 본원에 사용된 용어 "CDR 세트"는 항원에 결합할 수 있는 단일 가변 영역에서 발생하는 3개의 CDR의 군을 지칭한다. 이들 CDR의 정확한 경계는 상이한 시스템에 따라 상이하게 정의되었다. 카바트에 의해 기재된 시스템 (Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987) 및 (1991))은 항체의 임의의 가변 영역에 적용가능한 분명한 잔기 넘버링 시스템을 제공할 뿐만 아니라 3개의 CDR을 정의하는 정확한 잔기 경계를 제공한다. 이들 CDR은 카바트 CDR로 지칭될 수 있다. CDR의 하위-부분은 L1, L2 및 L3 또는 H1, H2 및 H3으로 지정될 수 있으며, 여기서 "L" 및 "H"는 각각 경쇄 및 중쇄 영역을 지칭한다. 이들 영역은 코티아 CDR로 지칭될 수 있으며, 이는 카바트 CDR과 중첩되는 경계를 갖는다. 카바트 CDR과 중첩되는 CDR을 정의하는 다른 경계는 문헌 [Padlan (FASEB J. 9:133-139 (1995)) 및 MacCallum (*J Mol Biol* 262(5):732-45 (1996))]에 기재되었다. 또 다른 CDR 경계 정의는 상기 시스템 중 하나를 엄격히 따르지 않을 수 있으나 그럼에도 불구하고 카바트 CDR과 중첩될 것이며, 다만 특정한 잔기 또는 잔기의 군 또는 심지어 전체 CDR이 항원 결합에 유의하게 영향을 미치지 않는다는 예측 또는 실험적 발견에 비추어 보다 짧아지거나 보다 길어질 수 있다. 본원에 사용된 방법은 이들 시스템 중 임의의 것에 따라 정의된 CDR을 이용할 수 있지만, 바람직한 실시양태는 카바트 또는 코티아 정의된 CDR을 사용한다.

[0039] CDR-그래프트된 항체: 용어 "CDR-그래프트된 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함 하나, VH 및/또는 VL의 CDR 영역 중 1개 이상의 서열이 또 다른 종의 CDR 서열로 대체된 항체, 예컨대 무린 CDR 중 1개 이상 (예를 들어, CDR3)이 인간 CDR 서열로 대체된 무린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0040] 키메라 항체: 용어 "키메라 항체"는 하나의 종으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열 및 또 다른 종으로부터의 불변 영역 서열을 포함하는 항체, 예컨대 인간 불변 영역에 연결된 무린 중쇄 및 경쇄 가변 영역을 갖는 항체를 지칭한다.

[0041] 상보적: 본원에 사용된 용어 "상보적"은 2개 뉴클레오타이드 또는 2개 세트의 뉴클레오타이드 사이의 정확한 쌍형성 능력을 지칭한다. 특히, 상보적은 2개 뉴클레오타이드 또는 2개 세트의 뉴클레오타이드 사이의 결합을 가져오는 수소 결합 쌍형성의 정도를 특징화하는 용어이다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드의 한 위치에서의 염기가 표적 핵산 (예를 들어, mRNA)의 상응하는 위치에서의 염기와 수소 결합할 수 있으면, 염기들이 그 위치에서 서로에 대해 상보적인 것으로 간주된다. 염기 쌍형성은 정규 왓슨-크릭 염기 쌍형성 및 비-왓슨-크릭 염기 쌍형성 (예를 들어, 위블 염기 쌍형성 및 후그스틴 염기 쌍형성) 둘 다를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 상보적 염기 쌍형성의 경우, 아데노신-유형 염기 (A)는 티미딘-유형 염기 (T) 또는 우라실-유형 염기 (U)에 대해 상보적이고, 시토신-유형 염기 (C)는 구아노신-유형 염기 (G)에 대해 상보적이고, 범용 염기, 예컨대 3-니트로피롤 또는 5-니트로인들은 임의의 A, C, U 또는 T에 혼성화할 수 있고 그에 대해 상보적인 것으로 간주된다. 이노신 (I)은 또한 관련 기술분야에서 범용 염기인 것으로 간주되어 왔고, 임의의 A, C, U 또는 T에 대해 상보적인 것으로 간주된다.

[0042] 보존적 아미노산 치환: 본원에 사용된 "보존적 아미노산 치환"은 아미노산 치환이 이루어지는 단백질의 상대 전

하 또는 크기 특징을 변경시키지 않는 아미노산 치환을 지칭한다. 변이체는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 폴리펩티드 서열을 변경시키는 방법에 따라 제조될 수 있으며, 예컨대 이러한 방법을 편집해 놓은 참고문헌, 예를 들어 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook, et al., eds., Fourth Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012, 또는 Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel, et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., New York]에서 발견된다. 아미노산의 보존적 치환은 하기 군 내의 아미노산들 사이에 이루어진 치환을 포함한다: (a) M, I, L, V; (b) F, Y, W; (c) K, R, H; (d) A, G; (e) S, T; (f) Q, N; 및 (g) E, D.

[0043] 공유 연결된: 본원에 사용된 용어 "공유 연결된"은 2개 이상의 분자가 적어도 1개의 공유 결합을 통해 함께 연결된 특징을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 2개의 분자는 분자들 사이의 링커로서의 역할을 하는 단일 결합, 예를 들어 디설피드 결합 또는 디설피드 가교에 의해 함께 공유 연결될 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 2개 이상의 분자는 다중 공유 결합을 통해 2개 이상의 분자를 함께 연결하는 링커로서의 역할을 하는 분자를 통해 함께 공유 연결될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능한 링커일 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 링커는 비-절단가능한 링커일 수 있다.

[0044] 교차-반응성: 본원에서 표적화제 (예를 들어, 항체)와 관련하여 사용된 용어 "교차-반응성"은 유사한 친화도 또는 결합력으로 유사한 유형 또는 부류의 1종 초과 항원 (예를 들어, 다수의 상동체, 파라로그 또는 오르토로그의 항원)에 특이적으로 결합할 수 있는 작용제의 특성을 지칭한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 유사한 유형 또는 부류의 인간 및 비-인간 영장류 항원 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체 및 비-인간 영장류 전달 수용체)에 대해 교차-반응성인 항체는 유사한 친화도 또는 결합력으로 인간 항원 및 비-인간 영장류 항원에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 유사한 유형 또는 부류의 인간 항원 및 설치류 항원에 대해 교차-반응성이다. 일부 실시양태에서, 항체는 유사한 유형 또는 부류의 설치류 항원 및 비-인간 영장류 항원에 대해 교차-반응성이다. 일부 실시양태에서, 항체는 유사한 유형 또는 부류의 인간 항원, 비-인간 영장류 항원 및 설치류 항원에 대해 교차-반응성이다.

[0045] 프레임워크: 본원에 사용된 용어 "프레임워크" 또는 "프레임워크 서열"은 CDR을 제외한 가변 영역의 나머지 서열을 지칭한다. CDR 서열의 정확한 정의는 상이한 시스템에 의해 결정될 수 있기 때문에, 프레임워크 서열의 의미는 상응하는 상이한 해석에 따른다. 6개의 CDR (경쇄의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3 및 중쇄의 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3)은 또한 경쇄 및 중쇄 상의 프레임워크 영역을 각각의 쇠 상에서 4개의 하위-영역 (FR1, FR2, FR3 및 FR4)으로 분류하며, 여기서 CDR1은 FR1과 FR2 사이에, CDR2는 FR2와 FR3 사이에, CDR3은 FR3과 FR4 사이에 위치한다. 특정한 하위-영역을 FR1, FR2, FR3 또는 FR4로서 명시하지 않으면서, 다른 것으로 지칭되는 프레임워크 영역은 단일의 자연 발생 이뮤노글로불린 쇠의 가변 영역 내의 복합 FR을 나타낸다. 본원에 사용된 FR은 4개의 하위-영역 중 1개를 나타내고, FR들은 프레임워크 영역을 구성하는 4개의 하위-영역 중 2개 이상을 나타낸다. 인간 중쇄 및 경쇄 수용자 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 한 실시양태에서, 관련 기술분야에 공지된 수용자 서열은 본원에 개시된 항체에 사용될 수 있다.

[0046] GAA: 본원에 사용된 용어 "GAA"는 리소솜에서 글리코젠을 분해하는 단백질인 산 알파-글루코시다제를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, GAA는 인간 (진(Gene) ID: 2548), 비-인간 영장류 (예를 들어, 진 ID: 712054, 진 ID: 454940) 또는 설치류 유전자 (예를 들어, 진 ID: 14387, 진 ID: 367562)일 수 있다. 인간에서, 돌연변이 GAA 단백질의 발현은 폼페병을 유발한다. 추가로, 상이한 단백질 이소형을 코딩하는 다수의 인간 전사체 변이체 (예를 들어, 진뱅크(GenBank) RefSeq 수탁 번호: NM_000152.4, NM_001079803.2 및 NM_001079804.2) 하에 주석달린 바와 같음)가 특징화되었다.

[0047] GAA 대립유전자: 본원에 사용된 용어 "GAA 대립유전자"는 GAA 유전자의 대안적 형태 (예를 들어, 야생형 또는 돌연변이 형태) 중 어느 하나를 지칭한다. 일부 실시양태에서, GAA 대립유전자는 그의 정상적 및 전형적 기능을 보유하는 야생형 산 알파-글루코시다제를 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, GAA 대립유전자는 폼페병과 연관된 1개 이상의 돌연변이를 포함할 수 있으며, 이는 예컨대, 예를 들어 문헌 [Moravej, et al. "A New Mutation Causing Severe Infantile-Onset Pompe Disease Responsive to Enzyme Replacement Therapy," Iran J Med Sci, 2018; 및 van der Wal E., et al., "GAA Deficiency in Pompe Disease Is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells" Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Jun 16; 7: 101-115] (이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 개시되어 있다.

[0048] GYS1: 본원에 사용된 용어 "GYS1"은 글리코젠의 합성에서 기능하는 단백질인 글리코젠 신타제를 코딩하는 유전자를 지칭한다. 일부 실시양태에서, GYS1은 인간 (진 ID: 2997), 비-인간 영장류 (예를 들어, 진 ID: 574233,

진 ID: 456196) 또는 설치류 유전자 (예를 들어, 진 ID: 14936, 진 ID: 690987)일 수 있다. 인간에서, 돌연변이 GYS1 단백질의 발현은 감소된 글리코겐 합성을 유발한다. 추가로, 상이한 단백질 이소형을 코딩하는 다수의 인간 전사체 변이체 (예를 들어, 진뱅크 RefSeq 수탁 번호: NM_001161587.1 및 NM_002103.4 하에 주석달린 바와 같음)가 특징화되었다.

[0049] 인간 항체: 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 본 개시내용의 인간 항체는, 예를 들어 CDR, 특히 CDR3 내에, 인간 배선 이뮤노글로불린 서열에 의해 코딩되지 않는 아미노산 잔기 (예를 들어, 시험관내에서 무작위 또는 부위-특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내에서 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에 사용된 용어 "인간 항체"는 또 다른 포유동물 중, 예컨대 마우스의 배선으로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열 상에 그래프트된 항체를 포함하는 것으로 의도되지 않는다.

[0050] 인간화 항체: 용어 "인간화 항체"는 비-인간 종 (예를 들어, 마우스)으로부터의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열을 포함하지만, VH 및/또는 VL 서열의 적어도 한 부분이 보다 "인간-유사"하도록, 즉 인간 배선 가변 서열과 보다 유사하도록 변경된 항체를 지칭한다. 인간화 항체의 한 유형은 인간 CDR 서열이 상응하는 비인간 CDR 서열을 대체하기 위해 비-인간 VH 및 VL 서열 내로 도입된 CDR-그래프트된 항체이다. 한 실시양태에서, 인간화 항-트랜스페린 수용체 항체 및 항원 결합 부분이 제공된다. 이러한 항체는 전통적인 하이브리도마 기술을 사용하여 유린 항-트랜스페린 수용체 모노클로날 항체를 수득하고, 이어서 시험관내 유전자 조작, 예컨대 PCT 공개 번호 WO 2005/123126 A2 (Kasaian et al.)에 개시된 것을 사용하여 인간화함으로써 생성될 수 있다.

[0051] 내재화 세포 표면 수용체: 본원에 사용된 용어 "내재화 세포 표면 수용체"는, 예를 들어 외부 자극, 예를 들어 수용체에 대한 리간드 결합시 세포에 의해 내재화되는 세포 표면 수용체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 내재화 세포 표면 수용체는 세포내이입에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, 내재화 세포 표면 수용체는 클라트린-매개된 세포내이입에 의해 내재화된다. 그러나, 일부 실시양태에서, 내재화 세포 표면 수용체는 클라트린-비의존성 경로, 예컨대, 예를 들어 식세포작용, 거대음세포작용, 카베올라- 및 라프트-매개된 흡수 또는 구성적 클라트린-비의존성 세포내이입에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, 내재화 세포 표면 수용체는 세포내 도메인, 막횡단 도메인 및/또는 세포외 도메인을 포함하고, 이는 임의로 리간드-결합 도메인을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포 표면 수용체는 리간드 결합 후 세포에 의해 내재화된다. 일부 실시양태에서, 리간드는 근육-표적화제 또는 근육-표적화 항체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 내재화 세포 표면 수용체는 트랜스페린 수용체이다.

[0052] 단리된 항체: 본원에 사용된 "단리된 항체"는 상이한 항원 특이성을 갖는 다른 항체가 실질적으로 없는 항체를 지칭한다 (예를 들어, 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 트랜스페린 수용체 이외의 항원에 특이적으로 결합하는 항체가 실질적으로 없음). 그러나, 트랜스페린 수용체 복합체에 특이적으로 결합하는 단리된 항체는 다른 항원, 예컨대 다른 종으로부터의 트랜스페린 수용체 분자에 대해 교차-반응성을 가질 수 있다. 더욱이, 단리된 항체는 다른 세포 물질 및/또는 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다.

[0053] 카바트 넘버링: 용어 "카바트 넘버링", "카바트 정의" 및 "카바트 라벨링"은 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 관련 기술분야에서 인식되는 이들 용어는 항체 또는 그의 항원 결합 부분의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 내의 다른 아미노산 잔기보다 더 가변적인 (초가변적인) 아미노산 잔기를 넘버링하는 시스템을 지칭한다 (Kabat et al. (1971) Ann. NY Acad. Sci. 190:382-391 및 Kabat, E. A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242). 중쇄 가변 영역에서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 31 내지 35, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 65, 및 CDR3의 경우 아미노산 위치 95 내지 102 범위이다. 경쇄 가변 영역에서, 초가변 영역은 CDR1의 경우 아미노산 위치 24 내지 34, CDR2의 경우 아미노산 위치 50 내지 56, 및 CDR3의 경우 아미노산 위치 89 내지 97 범위이다.

[0054] 분자 페이로드: 본원에 사용된 용어 "분자 페이로드"는 생물학적 결과를 조정하는 기능을 하는 분자 또는 종을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 근육-표적화제에 연결되거나 또는 달리 그와 회합된다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산 또는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 DNA 서열의 전사를 조정하거나, 단백질의 발현을 조정하거나 또는 단백질의 활성을 조정하는 기능을 한다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 표적 유전자에 대한 상보성 영역을 갖는 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다.

[0055] 근육-표적화제: 본원에 사용된 용어 "근육-표적화제"는 근육 세포 상에서 발현된 항원에 특이적으로 결합하는

분자를 지칭한다. 근육 세포 내의 또는 상의 항원은 막 단백질, 예를 들어 내재성 막 단백질 또는 말초 막 단백질일 수 있다. 전형적으로, 근육-표적화제는 근육 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하여 근육-표적화제 (및 임의의 회합된 분자 페이로드)의 근육 세포 내로의 내재화를 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 근육 상의 내재화 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합하고, 수용체 매개된 내재화를 통해 근육 세포 내로 내재화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 소분자, 단백질, 펩티드, 핵산 (예를 들어, 압타머) 또는 항체이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 분자 페이로드에 연결된다.

[0056] 근육-표적화 항체: 본원에 사용된 용어 "근육-표적화 항체"는 근육 세포 내에서 또는 상에서 발견된 항원에 특이적으로 결합하는 항체인 근육-표적화제를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 근육 세포 상의 항원에 특이적으로 결합하여 근육-표적화 항체 (및 임의의 회합된 분자 페이로드)의 근육 세포 내로의 내재화를 용이하게 한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 근육 세포 상에 존재하는 내재화 세포 표면 수용체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 항체이다.

[0057] 올리고뉴클레오타이드: 본원에 사용된 용어 "올리고뉴클레오타이드"는 최대 200개 뉴클레오타이드 길이의 올리고머 핵산 화합물을 지칭한다. 올리고뉴클레오타이드의 예는 RNAi 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, siRNA, shRNA), 마이크로RNA, 갭머, 믹스머, 포스포로디아미다이트 모르폴리노, 펩티드 핵산, 압타머, 가이드 핵산 (예를 들어, Cas9 가이드 RNA) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 올리고뉴클레오타이드는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 (예를 들어 2'-O-메틸 당 변형, 퓨린 또는 피리미딘 변형)를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 Rp 또는 Sp 입체화학적 입체형태일 수 있는 1개 이상의 포스포로티오에이트 연결을 포함할 수 있다.

[0058] 폼페병 (PD): 본원에 사용된 용어 "폼페병 (PD)"은 근육 약화, 호흡 곤란, 저긴장증 및 극단적인 경우에, 심부전으로 이어지는 심장 비대를 특징으로 하는 것과 연관된 유전 질환을 지칭한다. 증상이 나타날 경우에 일어나는 3가지 카테고리의 PD가 기재되었다. 전형적 영아-발병 PD는 생후 수개월 이내에 시작되며, 환자는 근육 약화, 저긴장증, 비대 간 및 심장 결손을 경험한다. 치료되지 않으면, 전형적 영아 PD는 일반적으로 생후 1년 이내에 사망으로 이어진다. 비-전형적 영아 PD는 통상적으로 약 1세에 나타나며, 지연된 운동 기술 및 진행성 근육 약화를 특징으로 한다. 이러한 약화는 심각한 호흡 문제로 이어지고, 비-전형적 영아 PD를 갖는 대부분의 환자는 초기 소아기에 사망한다. 후기-발병 PD는 후기 소아기, 청소년기 또는 성인기까지 나타나지 않을 수 있으며, 통상적으로 영아 PD보다 더 경도이다. 후기-발병 PD를 갖는 대부분의 환자는 진행성 근육 약화를 경험하며, 이는 호흡 문제 및 호흡 부전으로 이어질 수 있다. 폼페병 (PD)은 OMIM 엔트리 #232300과 연관된다. 폼페병, 이 질환에 대한 유전적 기초 및 관련 증상은 관련 기술분야에 기재되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Lim, et al., "Pompe disease: from pathophysiology to therapy and back again" *Frontiers in Aging: Neuroscience*. (2014); 및 Ferreira, et al. "Lysosomal storage diseases" *Transl Sci Rare Dis*. (2017), 5: 1-71] 참조).

[0059] 재조합 항체: 본원에 사용된 용어 "재조합 인간 항체"는 재조합 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 모든 인간 항체, 예컨대 숙주 세포 내로 형질감염된 재조합 발현 벡터를 사용하여 발현된 항체 (본 개시내용에 보다 상세히 기재됨), 재조합 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체 (Hoogenboom H. R., (1997) *TIB Tech*. 15:62-70; Azzazy H., and Highsmith W. E., (2002) *Clin. Biochem*. 35:425-445; Gavilondo J. V., and Larrick J. W. (2002) *BioTechniques* 29:128-145; Hoogenboom H., and Chames P. (2000) *Immunology Today* 21:371-378), 인간 이뮤노글로불린 유전자에 대해 트랜스제닉인 동물 (예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체 (예를 들어, 문헌 [Taylor, L. D., et al. (1992) *Nucl. Acids Res*. 20:6287-6295; Kellermann S-A., and Green L. L. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13:593-597; Little M. et al. (2000) *Immunology Today* 21:364-370] 참조) 또는 인간 이뮤노글로불린 유전자 서열의 다른 DNA 서열로의 스플라이싱을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성 또는 단리된 항체를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 재조합 인간 항체는 인간 배선 이뮤노글로불린 서열로부터 유래된 가변 및 불변 영역을 갖는다. 그러나, 특정 실시양태에서, 이러한 재조합 인간 항체는 시험관내 돌연변이유발 (또는 인간 Ig 서열에 대해 트랜스제닉인 동물이 사용되는 경우에, 생체내 체세포 돌연변이유발)에 적용되고, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 배선 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 그와 관련되지만 생체내 인간 항체 배선 레퍼토리 내에 자연적으로 존재할 수 없는 서열이다. 본 개시내용의 한 실시양태는 인간 트랜스페린 수용체에 결합할 수 있는 완전 인간 항체를 제공하며, 이는 관련 기술분야에 널리 공지된 기술, 예컨대, 비제한적으로 인간 Ig 파지 라이브러리, 예컨대 PCT 공개 번호 WO 2005/007699 A2 (Jermutus et al.)에 개시된 것을 사용하여 생성될 수 있다.

- [0060] 상보성 영역: 본원에 사용된 용어 "상보성 영역"은 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 올리고뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열이 동족 뉴클레오티드 서열, 예를 들어 표적 핵산의 동족 뉴클레오티드 서열에 대해, 2개 뉴클레오티드 서열이 생리학적 조건 하에 (예를 들어, 세포에서) 서로 어닐링될 수 있도록 하기에 충분히 상보적인 것을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 표적 핵산의 동족 뉴클레오티드 서열에 대해 완전히 상보적이다. 그러나, 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 표적 핵산의 동족 뉴클레오티드 서열에 대해 부분적으로 상보적이다 (예를 들어, 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99% 상보성). 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 표적 핵산의 동족 뉴클레오티드 서열과 비교하여 1, 2, 3 또는 4개의 미스매치를 함유한다.
- [0061] 특이적으로 결합한다: 본원에 사용된 용어 "특이적으로 결합한다"는 분자가 결합 검정 또는 다른 결합 상황에서 결합 파트너를 적절한 대조군과 구별하는데 사용될 수 있게 하는 친화도 또는 결합력의 정도로 분자가 결합 파트너에 결합하는 능력을 지칭한다. 항체와 관련하여, 용어 "특이적으로 결합한다"는 적절한 참조 항원 또는 항원들과 비교하여, 항체가 특이적 항원을 다른 것과 구별하는데, 예를 들어 본원에 기재된 바와 같이 항원에 대한 결합을 통해 특정 세포, 예를 들어 근육 세포에 대한 우선적 표적화를 허용하는 정도로 사용될 수 있게 하는 친화도 또는 결합력의 정도로 항체가 특이적 항원에 결합하는 능력을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항체가 표적에 결합하기 위한 K_D 적어도 약 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M 또는 그 미만을 갖는 경우에, 항체는 표적에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항체는 트랜스페린 수용체, 예를 들어 트랜스페린 수용체의 정단 도메인의 에피토프에 특이적으로 결합한다.
- [0062] 대상체: 본원에 사용된 용어 "대상체"는 포유동물을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 영장류 또는 설치류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 환자, 예를 들어 질환을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 인간 환자이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 폼페병 (PD)을 갖거나 갖는 것으로 의심되는 인간 환자이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 PD와 연관된 1개 이상의 돌연변이 GAA 대립유전자를 갖는 인간 환자이다.
- [0063] 트랜스페린 수용체: 본원에 사용된 용어 "트랜스페린 수용체" (TFRC, CD71, p90 또는 TFR1로도 공지됨)는 트랜스페린에 결합하여 세포내이입에 의한 철 흡수를 용이하게 하는 내재화 세포 표면 수용체를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체는 인간 (NCBI 진 ID 7037), 비-인간 영장류 (예를 들어, NCBI 진 ID 711568 또는 NCBI 진 ID 102136007) 또는 설치류 (예를 들어, NCBI 진 ID 22042) 기원의 것일 수 있다. 추가로, 수용체의 상이한 이소형을 코딩하는 다수의 인간 전사체 변이체 (예를 들어, 진뱅크 RefSeq 수탁 번호: NP_001121620.1, NP_003225.2, NP_001300894.1 및 NP_001300895.1 하에 주석달린 바와 같음)가 특징화되었다.
- [0064] II. 복합체
- [0065] 분자 페이로드에 공유 연결된 표적화제, 예를 들어 항체를 포함하는 복합체가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 복합체는 올리고뉴클레오티드에 공유 연결된 근육-표적화 항체를 포함한다. 복합체는 단일 항원 부위에 특이적으로 결합하거나 또는 동일하거나 상이한 항원 상에 존재할 수 있는 적어도 2개의 항원 부위에 결합하는 항체를 포함할 수 있다.
- [0066] 복합체는 적어도 1종의 유전자, 단백질 및/또는 핵산의 활성 또는 기능을 조정하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합체에 존재하는 분자 페이로드는 유전자, 단백질 및/또는 핵산의 조정을 담당한다. 분자 페이로드는 소분자, 단백질, 핵산, 올리고뉴클레오티드, 또는 세포 내의 유전자, 단백질 및/또는 핵산의 활성 또는 기능을 조정할 수 있는 임의의 분자 개체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 PD와 연관된 돌연변이 GAA 대립유전자를 표적화하는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 GYS1을 표적화하는 올리고뉴클레오티드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 GAA 단백질을 포함하거나 코딩한다.
- [0067] 일부 실시양태에서, 복합체는 분자 페이로드, 예를 들어 PD와 연관된 GAA 대립유전자를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오티드에 공유 연결된 근육-표적화제, 예를 들어 항-트랜스페린 수용체 항체를 포함한다.
- [0068] A. 근육-표적화제
- [0069] 본 개시내용의 일부 측면은, 예를 들어 분자 페이로드를 근육 세포로 전달하기 위한 근육-표적화제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 이러한 근육-표적화제는, 예를 들어 근육 세포 상의 항원에 특이적으로 결합함으로써 근육 세포에 결합하고, 회합된 분자 페이로드를 근육 세포로 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 근육 표적화제에 결합 (예를 들어, 공유 결합)되고, 근육 세포 상의 항원에 대한 근육 표적화제의 결합시, 예를 들어 세포내이입을 통해 근육 세포 내로 내재화된다. 다양한 유형의 근육-표적화제가 본 개시내용에 따라 사용

될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 예를 들어, 근육-표적화제는 핵산 (예를 들어, DNA 또는 RNA), 펩티드 (예를 들어, 항체), 지질 (예를 들어, 미세소포) 또는 당 모이어티 (예를 들어, 폴리사카라이드)를 포함하거나 또는 그로 이루어질 수 있다. 예시적인 근육-표적화제는 본원에 추가로 상세히 기재되어 있지만, 본원에 제공된 예시적인 근육-표적화제는 제한적인 것으로 의도되지 않는다는 것이 인지되어야 한다.

[0070] 본 개시내용의 일부 측면은 근육, 예컨대 골격근, 평활근 또는 심장 근육 상의 항원에 특이적으로 결합하는 근육-표적화제를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 근육-표적화제는 골격근 세포, 평활근 세포 및/또는 심장 근육 세포 상의 항원에 결합한다 (예를 들어, 특이적으로 결합함).

[0071] 근육-특이적 세포 표면 인식 요소 (예를 들어, 세포 막 단백질)와 상호작용함으로써, 조직 국재화 및 근육 세포 내로의 선택적 흡수 둘 다 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육 흡수 수송체에 대한 기질인 분자는 분자 페이로드를 근육 조직 내로 전달하는데 유용하다. 근육 표면 인식 요소에 대한 결합 후 세포내이입은 심지어 대형 분자, 예컨대 항체도 근육 세포에 진입하게 할 수 있다. 또 다른 예로서 트랜스페린 또는 항-트랜스페린 수용체 항체에 결합된 분자 페이로드는 트랜스페린 수용체에 대한 결합을 통해 근육 세포에 의해 흡수될 수 있고, 이는 이어서, 예를 들어 클라트린-매개된 세포내이입을 통해 세포내이입될 수 있다.

[0072] 근육-표적화제의 사용은 다른 조직에서 효과와 연관된 독성을 감소시키면서 근육에서 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)를 농축시키는데 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 결합된 분자 페이로드를 대상체 내의 또 다른 세포 유형과 비교하여 근육 세포에서 농축시킨다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 결합된 분자 페이로드를 비-근육 세포 (예를 들어, 간, 뉴런, 혈액 또는 지방 세포)에서의 양보다 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 또는 100배 더 큰 양으로 근육 세포 (예를 들어, 골격, 평활근 또는 심장 근육 세포)에서 농축시킨다. 일부 실시양태에서, 대상체에서의 분자 페이로드의 독성은 그것이 근육-표적화제에 결합된 경우에 대상체에게 전달되었을 때 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 90% 또는 95%만큼 감소된다.

[0073] 일부 실시양태에서, 근육 선택성을 달성하기 위해, 근육 인식 요소 (예를 들어, 근육 세포 항원)가 요구될 수 있다. 한 예로서, 근육-표적화제는 근육-특이적 흡수 수송체에 대한 기질인 소분자일 수 있다. 또 다른 예로서, 근육-표적화제는 수송체-매개된 세포내이입을 통해 근육 세포에 진입하는 항체일 수 있다. 또 다른 예로서, 근육 표적화제는 근육 세포 상의 세포 표면 수용체에 결합하는 리간드일 수 있다. 수송체-기반 접근법이 세포 진입을 위한 직접 경로를 제공하지만, 수용체-기반 표적화는 목적하는 작용 부위에 도달하도록 자극된 세포내이입을 수반할 수 있다는 것이 인지되어야 한다.

[0074] i. 근육-표적화 항체

[0075] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 항체이다. 일반적으로, 표적 항원에 대한 항체의 높은 특이성은 근육 세포 (예를 들어, 골격근, 평활근 및/또는 심장 근육 세포)를 선택적으로 표적화하는 잠재력을 제공한다. 이러한 특이성은 또한 오프-타겟 독성을 제한할 수 있다. 근육 세포의 표면 항원을 표적화할 수 있는 항체의 예는 보고되었고, 본 개시내용의 범주 내에 있다. 예를 들어, 근육 세포의 표면을 표적화하는 항체는 문헌 [Arahata K., et al. "Immunostaining of skeletal and cardiac muscle surface membrane with antibody against Duchenne muscular dystrophy peptide" Nature 1988; 333: 861-3; Song K.S., et al. "Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins" J Biol Chem 1996; 271: 15160-5; 및 Weisbart R.H. et al., "Cell type specific targeted intracellular delivery into muscle of a monoclonal antibody that binds myosin IIb" Mol Immunol. 2003 Mar, 39(13):78309] (이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0076] a. 항-트랜스페린 수용체 항체

[0077] 본 개시내용의 일부 측면은 트랜스페린 수용체에 결합하는 작용제, 예를 들어 항-트랜스페린-수용체 항체가 근육 세포를 표적화할 수 있다는 인식에 기초한다. 트랜스페린 수용체는 세포 막을 가로질러 트랜스페린을 수송하고 세포내 철 수준의 조절 및 항상성에 참여하는 내재화 세포 표면 수용체이다. 본 개시내용의 일부 측면은 트랜스페린 수용체에 결합할 수 있는 트랜스페린 수용체 결합 단백질을 제공한다. 따라서, 본 개시내용의 측면은 트랜스페린 수용체에 결합하는 결합 단백질 (예를 들어, 항체)을 제공한다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체에 결합하는 결합 단백질은 임의의 결합된 분자 페이로드와 함께 근육 세포 내로 내재화된다. 본원에 사

용된 바와 같이, 트랜스페린 수용체에 결합하는 항체는 항-트랜스페린 수용체 항체로 지칭될 수 있다. 트랜스페린 수용체에 결합하는, 예를 들어 특이적으로 결합하는 항체는 트랜스페린 수용체에 결합시, 예를 들어 수용체-매개된 세포내이입을 통해 세포 내로 내재화될 수 있다.

[0078] 항-트랜스페린 수용체 항체가 여러 공지된 방법론, 예를 들어 파지 디스플레이를 사용하는 라이브러리 설계를 사용하여 생산, 합성 및/또는 유도체화될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 예시적인 방법론은 관련 기술분야에서 특징화되어 있고, 참조로 포함된다 (Diez, P. et al. "High-throughput phage-display screening in array format", Enzyme and microbial technology, 2015, 79, 34-41.; Christoph M. H. and Stanley, J.R. "Antibody Phage Display: Technique and Applications" J Invest Dermatol. 2014, 134:2.; Engleman, Edgar (Ed.) "Human Hybridomas and Monoclonal Antibodies." 1985, Springer.). 다른 실시양태에서, 항-트랜스페린 항체는 이전에 특징화되거나 개시되었다. 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 항체는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 4,364,934, 출원일 12/4/1979, "Monoclonal antibody to a human early thymocyte antigen and methods for preparing same"; 미국 특허 번호 8,409,573, 출원일 6/14/2006, "Anti-CD71 monoclonal antibodies and uses thereof for treating malignant tumor cells"; 미국 특허 번호 9,708,406, 출원일 5/20/2014, "Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use"; US 9,611,323, 출원일 12/19/2014, "Low affinity blood brain barrier receptor antibodies and uses therefor"; WO 2015/098989, 출원일 12/24/2014, "Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier"; 문헌 [Schneider C. et al. "Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9." J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.; Lee et al. "Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse" 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052.] 참조).

[0079] 임의의 적절한 항-트랜스페린 수용체 항체가 본원에 개시된 복합체에 사용될 수 있다. 연관된 참고문헌 및 결합 에피토프를 포함한 항-트랜스페린 수용체 항체의 예가 표 1에 열거되어 있다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 본원에 제공된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예를 들어 표 1에 열거된 항-트랜스페린 수용체 항체의 상보성 결정 영역 (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3)을 포함한다.

[0080]

표 1 - 연관된 참고문헌 및 결합 에피토프 정보를 포함한 항-트랜스페린 수용체 항체 클론의 목록.

항체 클론 명칭	참고문헌(들)	에피토프 / 설명
OKT9	- 미국 특허 번호 4,364,934, 출원일 12/4/1979, 발명의 명칭 “MONOCLONAL ANTIBODY TO A HUMAN EARLY THYMOCYTE ANTIGEN AND METHODS FOR PREPARING SAME” - Schneider C. et al. “Structural features of the cell surface receptor for transferrin that is recognized by the monoclonal antibody OKT9.” J Biol Chem. 1982, 257:14, 8516-8522.	TfR의 정단 도메인 (진뱅크에서 입수가 가능한 인간 TfR 서열 XM_052730.3의 잔기 305-366)
(JCR로부터) 클론 M11 클론 M23 클론 M27 클론 B84	- WO 2015/098989, 출원일 12/24/2014, “Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier” - 미국 특허 번호 9,994,641, 출원일 12/24/2014, “Novel anti-Transferrin receptor antibody that passes through blood-brain barrier”	정단 도메인 (TfR의 잔기 230-244 및 326-347) 및 프로테아제-유사 도메인 (잔기 461-473)
(제넨테크로부터) 7A4, 8A2, 15D2, 10D11, 7B10, 15G11, 16G5, 13C3, 16G4, 16F6, 7G7, 4C2, 1B12, 및 13D4	- WO 2016/081643, 출원일 5/26/2016, 발명의 명칭 “ANTI-TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES AND METHODS OF USE” - 미국 특허 번호 9,708,406, 출원일 5/20/2014, “Anti-transferrin receptor antibodies and methods of use”	정단 도메인 및 비-정단 영역
(아마젠으로부터) 8D3	- Lee et al. “Targeting Rat Anti-Mouse Transferrin Receptor Monoclonal Antibodies through Blood-Brain Barrier in Mouse” 2000, J Pharmacol. Exp. Ther., 292: 1048-1052. - 미국 특허 출원 2010/077498, 출원일 9/11/2008, 발명의 명칭 “COMPOSITIONS AND METHODS FOR BLOOD-BRAIN BARRIER DELIVERY IN THE MOUSE”	
OX26	Haobam, B. et al. 2014. Rab17-mediated recycling endosomes contribute to autophagosome formation in response to Group A Streptococcus invasion. Cellular microbiology. 16: 1806-21.	

[0081]

DF1513	Ortiz-Zapater E et al. Trafficking of the human transferrin receptor in plant cells: effects of tyrphostin A23 and brefeldin A. <i>Plant J</i> 48:757-70 (2006).	
1A1B2, 66IG10, MEM-189, JF0956, 29806, 1A1B2, TFRC/1818, 1E6, 66Ig10, TFRC/1059, Q1/71, 23D10, 13E4, TFRC/1149, ER-MP21, YTA74.4, BU54, 2B6, RI7 217	상업적으로 입수가 가능한 항-트랜스페린 수용체 항체.	노부스 마이올로지칼스, 미국 80120 콜로라도주 리틀톤 A-8 사우스파크 웨이 8100
(INSERM 으로부터) BA120g	미국 특허 출원 2011/0311544A1, 출원일 6/15/2005, 발명의 명칭 “ANTI-CD71 MONOCLONAL ANTIBODIES AND USES THEREOF FOR TREATING MALIGNANT TUMOR CELLS”	OKT9 와 경쟁하지 않음
LUCA31	미국 특허 번호 7,572,895, 출원일 6/7/2004, 발명의 명칭 “TRANSFERRIN RECEPTOR ANTIBODIES”	“LUCA31 에피토프”
(슐크 인스티튜트) B3/25 T58/30	Trowbridge, I.S. et al. “Anti-transferrin receptor monoclonal antibody and toxin-antibody conjugates affect growth of human tumour cells.” <i>Nature</i>, 1981, volume 294, pages 171-173	
R17 217.1.3, 5E9C11, OKT9 (BE0023 클론)	상업적으로 입수가 가능한 항-트랜스페린 수용체 항체.	바이오엑셀, 미국 03784-1671 뉴햄프셔주 웨스트 레마논 스위트 2B 테크놀로지 드라이브 10
BK19.9, B3/25, T56/14 및 T58/1	Gatter, K.C. et al. “Transferrin receptors in human tissues: their distribution and possible clinical relevance.” <i>J Clin Pathol</i>. 1983 May;36(5):539-45.	

[0082]

[0083]

일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 항-트랜스페린 수용체 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 본원에 개시된 바와 같은 아미노산 서열을 갖는 트랜스페린 단백질에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 정단 도메인, 트랜스페린 결합 도메인 및 프로테아제-유사 도메인을 포함한, 트랜스페린 수용체의 임의의 세포의 에피토프 또는 항체에 노출되는 에피토프에 특이적으로 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 1-3에 아미노산 C89 내지 F760의 범위에서 제공된 바와 같은 인간 또는 비-인간 영양류 트랜스페린 수용체의 아미노산 절편에 결합한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 적어도 약 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, 10^{-12} M, 10^{-13} M 또는 그 미만의 결합 친화도로 특이적으로 결합한다. 본원에 사용된 항-트랜스페린 수용체 항체는 트랜스페린 수용체에 10^{-3} M, 10^{-4} M, 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M 또는 그 미만으로 결합하는 다른 항-트랜스페린 수용체 항체, 예를 들어 OKT9, 8D3과 결합에 대해 경쟁할 수 있다.

[0084]

NCBI 서열 NP_003225.2 (트랜스페린 수용체 단백질 1 이소형 1, 호모 사피엔스(homo sapiens))에 상응하는 인간 트랜스페린 수용체 아미노산 서열의 예는 하기와 같다:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLA VDEEENADNNT
KANVT KPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPG
EDFPAARRLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQKDENLALYVEN
QFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDS AQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVT
GKLVHANFGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKF
PIVNAELSSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSPRSSGLPNIPVQTISR AAAEKLFGNM
EGDCPSDWKTDSTCRMVTSSESKNVKLT VSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQ
RDAWGPGAAGSGVGTALLLKL AQMFSDMV LKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGV GATE
WLEGYLSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQFLYQ
DSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELN
KVARAAAEVAGQFVIKLT HDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQW
LYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRVMRVEYHFLSPYVSPKESPRFH
VFWGSGSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDI
DNEF (SEQ ID NO: 1).

[0085]

[0086]

NCBI 서열 NP_001244232.1 (트랜스페린 수용체 단백질 1, 마카카 물라타(*Macaca mulatta*))에 상응하는 비-인간
영장류 트랜스페린 수용체 아미노산 서열의 예는 하기와 같다:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDN SHVEMKLG VDEEENTDNNTKPNGT
KPKRCGGNICYGTIAVIVFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPA
APRLYWDDLKRKLSEKLDTTDFSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFK
LSKVWRDQHFVKIQVKDS AQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKLVH
ANFGTKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPVKAD
LSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLPNIPVQTISR AAAEKLFGNMEGDCPS
DWKTDSTCKMVTSENKSVKLT VSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW
GPGAAGSSVGTALLLKL AQMFSDMV LKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGV GATEWLEGY
LSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWA
SKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVAR
AAAEVAGQFVIKLT HDTELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWL YSA
RGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPRFHVFWG
SGSHTLSALLESKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 2)

[0087]

[0088]

NCBI 서열 XP_005545315.1 (트랜스페린 수용체 단백질 1, 마카카 파시쿨라리스(*Macaca fascicularis*))에 상응
하는 비-인간 영장류 트랜스페린 수용체 아미노산 서열의 예는 하기와 같다:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHSHVEMKLGVDDEENTDNNTKANGT
KPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIGFMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPA
APRLYWDDLKRKLSEKLDTTDTSTIKLLNENLYVPREAGSQKDENLALYIENQFREFK
LSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVH
ANFGTKKDFEDLSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVKAD
LSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPS
DWKTDSTCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDHYVVVGAQRDAW
GPGAAKSSVGTALLKLAQMFSDMVLKDGFPQRSIIFASWSAGDFGSGVATEWLEGY
LSSLHLKAFTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVTGRSLYQDSNWA
SKVEKLTLDNAAPFLAYSGIPAVSFCFCEDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVAR
AAAEVAGQFVIKLTHTDELNDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMGLSLQWL YSA
RGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMMKLNDRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRRHVFVG
SGSHTLSALLESLKLRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDNEF
(SEQ ID NO: 3).

[0089]

[0090]

NCBI 서열 NP_001344227.1 (트랜스페린 수용체 단백질 1, 무스 무스쿨루스(mus musculus))에 상응하는 마우스 트랜스페린 수용체 아미노산 서열의 예는 하기와 같다:

MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNHSHVEMKLAADDEENADNNMKASV
RKPKRFNGRLCFAAIALVIFFLIGFMSGYLG YCKRVEQKEECVLAETEETDKSETMETE
DVPTSSRLYWADLKTLLSEKLSNIEFADTIKQLSQNTYTPREAGSQKDESLAYYIENQFH
EFKFSKVWRDEHYVKIQVKSSIGQNMVTIVQSNGLDPVESPEGYVAFSKPTEVSGKL
HANFGTKKDFEELSYVNGSLVIVRAGEITFAEKVANAQSFNAIGVLIYMDKNKFPVVE
ADLALFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQFPSSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGKMEGS
CPARWNIDSSCKLELSQNQNVKLIVKNVLKERRILNIFGVIKGYEEPDRYVVVGAQRDA
LGAGVAAKSSVGTGLLLKLAQVFSMDISKDGFPRPSRSIIFASWTAGDFGAVGATEWLEG
YLSSLHLKAFTYINLDKVVLTGTSNFKVSASPLLYTLMGKIMQDVKHPVDGKSLYRDSN
WISKVEKLSFDNAAYPFLAYSGIPAVSFCFCEDADYPYLGTRLDTYEALTQKVPQLNQ
MVRTAAEVAGQLIKLTHTDELNDYEMYSKLLSFMKDLNQFKTDIRDMGLSLQWL YS
ARGDYFRATSRLTTDFHNAEKTNRVFMREINDRIMKVEYHFLSPYVSPRESPFRHIFVG
SGSHTLSALVENLKLKRNITAFNETLFRNQLALATWTIQGVANALSGDIWNIDNEF
(SEQ ID NO: 4)

[0091]

[0092]

일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 하기와 같은 수용체의 아미노산 절편에 결합하고:

FVKIQVKDSAQNSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTKKDFE
DLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLIYMDQTKFPIVNAELSSFFGHAHLG
TGDPYTPGFPSFNHTQFPSSRSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDSTCR
MVTSESKNVKLTVSNVLKE (SEQ ID NO: 5)

[0093]

, 트랜스페린 수용체와 트랜스페린 및/또는 인간 혈색소증 단백질 (HFE로도 공지됨) 사이의 결합 상호작용을 억제하지 않는다.

[0094]

적절한 방법론을 사용하여, 예를 들어 재조합 DNA 프로토콜의 사용을 통해 항체, 항체 단편 또는 항원-결합체를 수득하고/거나 생산할 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체는 또한 하이브리도마의 생성을 통해 생산될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kohler, G and Milstein, C. "Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity" Nature, 1975, 256: 495-497] 참조). 관심 항원은 임의의 형태 또는 개체, 예를 들어 재조합 또는 자연 발생 형태 또는 개체의 면역원으로서 사용될 수 있다. 하이브리도마는 표준 방법, 예를 들어 ELISA 스크리닝을 사용하여 스크리닝되어, 특정한 항원을 표적화하는 항체를 생산하는 적어도 1종의 하이브리도마를 발견한다. 항체는 또한 항체를 발현하는 단백질 발현 라이브러리, 예를 들어 파지 디스플레이 라이브러리의 스크리닝을 통해 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 파지 디스플레이 라이브러리 설계가 또한 사용될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 번호 5,223,409, 출원일 3/1/1991, "Directed evolution of novel binding

proteins"; WO 1992/18619, 출원일 4/10/1992, "Heterodimeric receptor libraries using phagemids"; WO 1991/17271, 출원일 5/1/1991, "Recombinant library screening methods"; WO 1992/20791, 출원일 5/15/1992, "Methods for producing members of specific binding pairs"; 및 WO 1992/15679, 출원일 2/28/1992, "Improved epitope displaying phage" 참조). 일부 실시양태에서, 관심 항원이 비-인간 동물, 예를 들어 설치류 또는 염소를 면역화하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항체가 이어서 비-인간 동물로부터 수득되고, 다수의 방법론을 사용하여, 예를 들어 재조합 DNA 기술을 사용하여 임의로 변형될 수 있다. 항체 생산 및 방법론의 추가의 예는 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Harlow et al. "Antibodies: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, 1988.] 참조).

[0095] 일부 실시양태에서, 항체는 변형되고, 예를 들어 글리코실화, 인산화, SUMO화 및/또는 메틸화를 통해 변형된다. 일부 실시양태에서, 항체는 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자에 접합된 글리코실화 항체이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 N-글리코실화, O-글리코실화, C-글리코실화, GPI화 (GPI 앵커 부착) 및/또는 포스포글리코실화를 통해 항체에 접합된다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 모노사카라이드, 디사카라이드, 올리고사카라이드 또는 글리칸이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 분지형 올리고사카라이드 또는 분지형 글리칸이다. 일부 실시양태에서, 1종 이상의 당 또는 탄수화물 분자는 만노스 단위, 글루코스 단위, N-아세틸글루코사민 단위, N-아세틸갈락토사민 단위, 갈락토스 단위, 푸코스 단위 또는 인지질 단위를 포함한다. 일부 실시양태에서, 약 1-10, 약 1-5, 약 5-10, 약 1-4, 약 1-3 또는 약 2개의 당 분자가 존재한다. 일부 실시양태에서, 글리코실화 항체는 완전히 또는 부분적으로 글리코실화된다. 일부 실시양태에서, 항체는 화학 반응 또는 효소적 수단에 의해 글리코실화된다. 일부 실시양태에서, 항체는 시험관내에서 또는 임의로 N- 또는 O-글리코실화 경로 내의 효소, 예를 들어 글리코실트랜스퍼라제가 결핍될 수 있는 세포 내부에서 글리코실화된다. 일부 실시양태에서, 항체는 2014년 5월 1일에 공개된 국제 특허 출원 공개 W02014065661 (발명의 명칭: "Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof")에 기재된 바와 같이 당 또는 탄수화물 분자로 관능화된다.

[0096] 본 개시내용의 일부 측면은 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 트랜스페린 수용체의 세포외 부분)에 결합하는 단백질을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 특이적으로 결합한다. 트랜스페린 수용체는 세포 막을 가로질러 트랜스페린을 수송하고 세포내 철 수준의 조절 및 항상성에 참여하는 내재화 세포 표면 수용체이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 인간, 비-인간 영장류, 마우스, 래트 등으로부터의 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 인간 트랜스페린 수용체에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 인간 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 인간 트랜스페린 수용체의 정단 도메인에 결합한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 트랜스페린 수용체 항체는 인간 트랜스페린 수용체의 정단 도메인에 특이적으로 결합한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나로부터의 CDR-H (예를 들어, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3) 아미노산 서열 중 1개 이상을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다. 본 개시내용은 또한 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 대해 제공된 바와 같은 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3을 포함하는 분자를 코딩하는 임의의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체 중쇄 및 경쇄 CDR3 도메인은 항원에 대한 항체의 결합 특이성/친화도에서 특히 중요한 역할을 할 수 있다. 따라서, 본 개시내용의 항-트랜스페린 수용체 항체는 적어도 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 중쇄 및/또는 경쇄 CDR3을 포함할 수 있다.

[0098] 일부 예에서, 본 개시내용의 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 하나로부터의 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및/또는 CDR-L3 서열 중 임의의 것과 실질적으로 유사한 1개 이상의 CDR (예를 들어, CDR-H 또는 CDR-L) 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 VH (예를 들어, CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3) 및/또는 VL (예를 들어, CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3) 영역에 따른 1개 이상의 CDR의 위치는, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적

결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산 위치만큼 달라질 수 있다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 항체의 CDR을 정의하는 위치는, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 항체 중 어느 하나의 CDR 위치에 비해 CDR의 N-말단 및/또는 C-말단 경계를 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개의 아미노산만큼 이동시킴으로써 달라질 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 VH (예를 들어, CDR-H1, CDR-H2 또는 CDR-H3) 및/또는 VL (예를 들어, CDR-L1, CDR-L2 또는 CDR-L3) 영역에 따른 1개 이상의 CDR의 길이는, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산만큼 달라질 수 있다 (예를 들어, 더 짧거나 더 길 수 있음).

[0099]

따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3은, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 1개 이상보다 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산 더 짧을 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3은, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 1개 이상보다 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산 더 길 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3의 아미노 부분은, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 1개 이상과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산만큼 연장될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3의 카르복시 부분은, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 1개 이상과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산만큼 단축될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 및/또는 CDR-H3의 아미노 부분은, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 기재된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 1개 이상과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 아미노산만큼 단축될 수 있다. 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이, 예를 들어 관련 기술분야에 기재된 결합 검정 및 조건을 사용하여 유지되는지 여부를 확인하기 위해 임의의 방법이 사용될 수 있다.

[0100]

일부 예에서, 본 개시내용의 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나와 실질적으로 유사한 1개 이상의 CDR (예를 들어, CDR-H 또는 CDR-L) 서열을 갖는다. 예를 들어, 항체는 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 대한 면역특이적 결합이 유지되는 (예를 들어, 그것이 유래된 원래 항체의 결합의 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%가 실질적으로 유지되는) 한, 본원에 제공된 CDR (예를 들어, 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 CDR) 중 어느 1개에서의 상응하는 CDR 영역과 비교하여 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미

노산 잔기 변이를 함유하는 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체로부터의 1개 이상의 CDR 서열 (들)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 CDR 내 임의의 아미노산 변이는 보존적 변이일 수 있다. 보존적 변이는, 예를 들어 결정 구조에 기초하여 결정된 바와 같이, 잔기가 트랜스페린 수용체 단백질 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체 단백질)과 상호작용하는데 수반될 가능성이 없는 위치에서 CDR 내로 도입될 수 있다. 본 개시내용의 일부 측면은 본원에 제공된 중쇄 가변 (VH) 및/또는 경쇄 가변 (VL) 도메인 중 1개 이상을 포함하는 트랜스페린 수용체 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 VH 도메인은 본원에 제공된 CDR-H 서열 (예를 들어, CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3) 중 1개 이상, 예를 들어 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 제공된 CDR-H 서열 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 VL 도메인은 본원에 제공된 CDR-L 서열 (예를 들어, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3) 중 1개 이상, 예를 들어 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나에 제공된 CDR-L 서열 중 임의의 것을 포함한다.

[0101] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 중쇄 가변 도메인 및/또는 경쇄 가변 도메인을 포함하는 임의의 항체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 중쇄 가변 및 경쇄 가변 쌍을 포함하는 임의의 항체를 포함한다.

[0102] 본 개시내용의 측면은 본원에 기재된 것 중 임의의 것에 상동인 중쇄 가변 (VH) 및/또는 경쇄 가변 (VL) 도메인 아미노산 서열을 갖는 항-트랜스페린 수용체 항체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 중쇄 가변 서열 및/또는 임의의 경쇄 가변 서열에 대해 적어도 75% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%) 동일한 중쇄 가변 서열 또는 경쇄 가변 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 상동 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 아미노산 서열은 본원에 제공된 임의의 CDR 서열 내에서 달라지지 않는다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 소정 정도 (예를 들어, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%)의 서열 변이가 본원에 제공된 임의의 CDR 서열을 제외한 중쇄 가변 및/또는 경쇄 가변 서열 내에서 발생할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 프레임워크 서열에 대해 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 프레임워크 서열을 포함하는 중쇄 가변 서열 및 경쇄 가변 서열을 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 특이적으로 결합하는 항-트랜스페린 수용체 항체는 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체의 임의의 CDR-L 도메인 (CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3) 또는 본원에 제공된 CDR-L 도메인 변이체를 포함하는 경쇄 가변 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 특이적으로 결합하는 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함하는 경쇄 가변 VL 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 영역 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함하는 경쇄 가변 (VL) 영역 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 영역 중 1, 2, 3 또는 4개에 대해 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 동일한 경쇄 가변 영역 서열의 프레임워크 영역 중 1, 2, 3 또는 4개를 포함한다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열로부터 유래된 경쇄 가변 프레임워크 영역은 10개 이하의 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입, 바람직하게는 10개 이하의 아미노산 치환의 존재를 제외하고는 상기 아미노산 서열로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열로부터 유래된 경쇄 가변 프레임워크 영역은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 잔기가 상응하는 비-인간, 영장류 또는 인간 경쇄 가변 프레임워크 영역 내의 유사한 위치에서 발견된 아미노산 대신 치환된 상기 아미노산 서열로 이루어진다.

[0104] 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항체는 인간 또는 영장류 항체의 VL로부터 유래된 1, 2, 3 또는 모든 4개의 VL 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 경쇄 CDR 서열과 함께 사용하기 위해 선택된 항체의 영장류 또는 인간 경쇄 프레임워크 영역은, 예를 들어 비-인간 모 항체의 경쇄 프레임워크 영역과 적어도

70% (예를 들어, 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 적어도 99%) 동일성을 가질 수 있다. 선택된 영장류 또는 인간 항체는 그의 경쇄 상보성 결정 영역에, 본원에 제공된 임의의 항체, 예를 들어 표 1로부터 선택된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체의 경쇄 상보성 결정 영역의 것과 동일한 또는 실질적으로 동일한 개수의 아미노산을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 영장류 또는 인간 경쇄 프레임워크 영역 아미노산 잔기는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 경쇄 프레임워크 영역과 적어도 75% 동일성, 적어도 80% 동일성, 적어도 85% 동일성, 적어도 90% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 98% 동일성, 적어도 99% (또는 그 초과) 동일성을 갖는 천연 영장류 또는 인간 항체 경쇄 프레임워크 영역으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 인간 경쇄 가변 카파 서브패밀리로부터 유래된 1, 2, 3 또는 모든 4개의 VL 프레임워크 영역을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 인간 경쇄 가변 람다 서브패밀리로부터 유래된 1, 2, 3 또는 모든 4개의 VL 프레임워크 영역을 추가로 포함한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체는 경쇄 불변 영역을 추가로 포함하는 경쇄 가변 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역이다. 일부 실시양태에서, 카파 또는 람다 경쇄 불변 영역은 포유동물, 예를 들어 인간, 원숭이, 래트 또는 마우스로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 인간 카파 경쇄 불변 영역이다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 인간 람다 경쇄 불변 영역이다. 본원에 제공된 임의의 경쇄 불변 영역은 본원에 제공된 임의의 경쇄 불변 영역의 변이체일 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 일부 실시양태에서, 경쇄 불변 영역은 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 임의의 경쇄 불변 영역에 대해 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0106] 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나이다.

[0107] 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 항-트랜스페린 수용체 항체, 예컨대 표 1로부터 선택된 항-트랜스페린 수용체 항체 중 어느 하나의 아미노산 서열을 포함하는 VL 도메인을 포함하고, 여기서 불변 영역은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 이뮤노글로불린 분자 또는 인간 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 이뮤노글로불린 분자의 불변 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-트랜스페린 수용체 항체는 임의의 VL 도메인 또는 VL 도메인 변이체 및 임의의 VH 도메인 또는 VH 도메인 변이체를 포함하며, 여기서 VL 및 VH 도메인 또는 그의 변이체는 동일한 항체 클론으로부터의 것이고, 여기서 불변 영역은 IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 또는 IgY 이뮤노글로불린 분자, 이뮤노글로불린 분자의 임의의 부류 (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 임의의 하위부류 (예를 들어, IgG2a 및 IgG2b)의 불변 영역의 아미노산 서열을 포함한다. 인간 불변 영역의 비제한적 예는 관련 기술분야에 기재되어 있으며, 예를 들어 상기 문헌 [Kabat E A et al., (1991)]을 참조한다.

[0108] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 표적 항원 (예를 들어, 트랜스페린 수용체)에 비교적 높은 친화도로, 예를 들어 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 그 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-트랜스페린 수용체 항체는 트랜스페린 수용체 단백질 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 5 pM 내지 500 nM, 예를 들어 50 pM 내지 100 nM, 예를 들어 500 pM 내지 50 nM의 친화도로 결합할 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 임의의 항체와 트랜스페린 수용체 단백질 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에의 결합에 대해 경쟁하고 50 nM 이하 (예를 들어, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 500 pM 이하, 50 pM 이하 또는 5 pM 이하)의 친화도를 갖는 항체를 포함한다. 항-트랜스페린 수용체 항체의 친화도 및 결합 동역학은 바이오센서 기술 (예를 들어, 옥테트(OCTET) 또는 비아코어(BIACORE))을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 방법을 사용하여 시험될 수 있다.

[0109] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 항체는 표적 항원 (예를 들어, 트랜스페린 수용체)에 비교적 높은 친화도로, 예를 들어 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M 또는 그 미만의 K_D 로 결합할 수 있다. 예를 들어, 항-트랜스페린 수용체 항체는 트랜스페린 수용체 단백질 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에 5 pM 내지 500 nM, 예를 들어 50 pM 내지 100 nM, 예를 들어 500 pM 내지 50 nM의 친화도로 결합할 수 있다. 본 개시내용은 또한 본원에 기재된 임의의 항체와 트랜스페린 수용체 단백질 (예를 들어, 인간 트랜스페린 수용체)에의 결합에 대해 경쟁하고 50 nM 이하 (예를 들어, 20 nM 이하, 10 nM 이하, 500 pM 이하, 50 pM 이하 또는 5 pM 이하)의 친화도를 갖는 항체를 포함한다. 항-트랜스페린 수용체 항체의 친화도 및 결합 동역학은 바이오센서 기술 (예

를 들어, 옥테트 또는 비아코어)을 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 적합한 방법을 사용하여 시험될 수 있다.

[0110] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 트랜스페린 수용체 항체 (예를 들어, 국제 출원 공개 WO 2016/081643 (본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 항체 및 그의 변이체)이다.

[0111] 상이한 정의 시스템에 따른 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR이 표 1.1에 제공된다. 상이한 정의 시스템, 예를 들어 카바트 정의, 코티아 정의 및/또는 접촉 정의가 기재되었다. 예를 들어, 문헌 [Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, Chothia et al., (1989) Nature 342:877; Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917, Al-lazikani et al. (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948; 및 Almagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004)]을 참조한다. 또한 hgmp.mrc.ac.uk and bioinf.org.uk/abs를 참조한다.

[0112] 표 1.1 마우스 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄 및 경쇄 CDR

CDR	카바트	코티아	접촉
CDR-H1	SYWMH (SEQ ID NO: 17)	GYTFTSY (SEQ ID NO: 23)	TSYWMH (SEQ ID NO: 25)
CDR-H2	EINPTNGRTNYIEKFS (SEQ ID NO: 18)	NPTNGR (SEQ ID NO: 24)	WIGEINPTNGRTN (SEQ ID NO: 26)
CDR-H3	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	GTRAYHY (SEQ ID NO: 19)	ARGTRA (SEQ ID NO: 27)
CDR-L1	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	RASDNLYSNLA (SEQ ID NO: 20)	YSNLAWY (SEQ ID NO: 28)
CDR-L2	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	DATNLAD (SEQ ID NO: 21)	LLVYDATNLA (SEQ ID NO: 29)
CDR-L3	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPLT (SEQ ID NO: 22)	QHFWGTPL (SEQ ID NO: 30)

[0113]

[0114] 중쇄 가변 도메인 (VH) 및 경쇄 가변 도메인 서열이 또한 제공된다:

[0115] VH

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQTSVTVS
S (SEQ ID NO: 33)

[0116]

[0117] VL

DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASDNLYSNLAWYQQKQKSPQLLVYDATNLADGV
PSRFGSGSGTQYSLKINSLSQSEDFGTYYCQHFWGTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:
34)

[0118]

[0119] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3과 동일한 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다.

[0120] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3과 비교하여 집합적으로 5개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함한다. "집합적으로"는 3개의 중쇄 CDR 모두에서의 아미노산 변이의 총수가 정의된 범위 내에 있다는 것을 의미한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3과 비교하여 집합적으로 5개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포

함할 수 있다.

- [0121] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3을 포함하며, 이들 중 적어도 1개는 표 1.1에 제시된 바와 같은 대응물 중쇄 CDR과 비교하여 3개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 적어도 하나가 표 1.1에 제시된 바와 같은 대응물 경쇄 CDR과 비교하여 3개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함할 수 있다.
- [0122] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 CDR-L3과 비교하여 3개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 CDR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 CDR-L3과 비교하여 1개의 아미노산 변이를 함유하는 CDR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 QHFAGTIPLT (카바트 및 코티아 정의 시스템에 따른 서열식별번호: 31) 또는 QHFAGTIPL (접촉 정의 시스템에 따른 서열식별번호: 32)의 CDR-L3을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-L2를 포함하고, QHFAGTIPLT (카바트 및 코티아 정의 시스템에 따른 서열식별번호: 31) 또는 QHFAGTIPL (접촉 정의 시스템에 따른 서열식별번호: 32)의 CDR-L3을 포함한다.
- [0123] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 중쇄 CDR에 대해 집합적으로 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 중쇄 CDR을 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 바와 같은 경쇄 CDR에 대해 집합적으로 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 경쇄 CDR을 포함한다.
- [0124] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0125] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33에 제시된 VH와 비교하여 20개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 15개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 VL을 포함한다.
- [0126] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.
- [0127] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 인간화 항체 (예를 들어, 항체의 인간화 변이체)이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-L3을 포함하고, 인간화 중쇄 가변 영역 및/또는 인간화 경쇄 가변 영역을 포함한다.
- [0128] 인간화 항체는 수용자의 상보성 결정 영역 (CDR)으로부터의 잔기가 목적하는 특이성, 친화도 및 능력을 갖는 비-인간 종 (공여자 항체), 예컨대 마우스, 랫트 또는 토끼의 CDR로부터의 잔기에 의해 대체된 인간 이뮤노글로불린 (수용자 항체)이다. 일부 실시양태에서, 인간 이뮤노글로불린의 Fv 프레임워크 영역 (FR) 잔기는 상응하는 비-인간 잔기에 의해 대체된다. 추가로, 인간화 항체는 수용자 항체에서도 발견되지 않고 도입된 CDR 또는 프레임워크 서열에서도 발견되지 않지만 항체 성능을 추가로 정밀화하고 최적화하기 위해 포함되는 잔기를 포함할 수 있다. 일반적으로, 인간화 항체는 적어도 1개 및 전형적으로 2개의 가변 도메인을 실질적으로 모두 포함할 것이며, 여기서 모든 또는 실질적으로 모든 CDR 영역은 비-인간 이뮤노글로불린의 것에 상응하고, 모든 또는 실질적으로 모든 FR 영역은 인간 이뮤노글로불린 컨센서스 서열의 것이다. 또한, 인간화 항체는 최적으로는 이뮤노글로불린 불변 영역 또는 도메인 (Fc)의 적어도 한 부분, 전형적으로는 인간 이뮤노글로불린의 것을 포함할 것이다. 항체는 WO 99/58572에 기재된 바와 같이 변형된 Fc 영역을 가질 수 있다. 다른 형태의 인간화 항체는 원래 항체에 비해 변경된 1개 이상의 CDR (1, 2, 3, 4, 5, 6개)을 가지며, 이는 또한 원래 항체로부터의 1개 이

상의 CDR로부터 유래된 1개 이상의 CDR로 명명된다. 인간화 항체는 또한 친화도 성숙을 수반할 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 인간화는 CDR (예를 들어, 표 1.1에 제시된 바와 같음)을 IGKV1-NL1*01 및 IGHV1-3*01 인간 가변 도메인 내로 그래프트함으로써 달성된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 위치 9, 13, 17, 18, 40, 45 및 70에서 1개 이상의 아미노산 치환 및/또는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 위치 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 및 108에서 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 인간화 변이체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 위치 9, 13, 17, 18, 40, 45 및 70 모두에서 아미노산 치환 및/또는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 위치 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 66, 75, 81, 83, 87 및 108 모두에서 아미노산 치환을 포함하는 인간화 변이체이다.

[0130] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 인간화 항체이고, 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL의 위치 43 및 48에서의 잔기를 함유한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 인간화 항체이고, 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH의 위치 48, 67, 69, 71 및 73에서의 잔기를 함유한다.

[0131] 본 개시내용에 따라 사용될 수 있는 예시적인 인간화 항체의 VH 및 VL 아미노산 서열이 제공된다:

[0132] 인간화 VH

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVTV
SS (SEQ ID NO: 35)

[0133]

[0134] 인간화 VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGV
PSRFGSGSGSDYSLKINSLQSEDFGTYTCQHFHWGTPFTFGAGTKLELK (SEQ ID NO:
36)

[0135]

[0136] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 20개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 36에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 15개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 VL을 포함한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35에 제시된 바와 같은 VH에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VH를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 36에 제시된 바와 같은 VL에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 VL을 포함한다.

[0139] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 위치 43 및 48 중 1개 이상에서의 아미노산 치환 및/또는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 위치 48, 67, 69, 71 및 73 중 1개 이상에서의 아미노산 치환을 포함하는 인간화 변이체이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 S43A 및/또는 V48L 돌연변이 및/또는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 A67V, L69I, V71R 및 K73T 돌연변이 중 1개 이상을 포함하는 인간화 변이체이다.

[0140] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 34에 제시된 바와 같은 VL과 비교하여 위치 9, 13, 17, 18, 40, 43, 48, 45 및 70 중 1개 이상에서의 아미노산 치환 및/또는 서열식별번호: 33에 제시된 바와 같은 VH와 비교하여 위치 1, 5, 7, 11, 12, 20, 38, 40, 44, 48, 66, 67, 69, 71, 73, 75, 81,

83, 87 및 108 중 1개 이상에서의 아미노산 치환을 포함하는 인간화 변이체이다.

[0141] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 인간 항체로부터의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있는 키메라 항체이다. 키메라 항체는 제1 종으로부터의 가변 영역 또는 가변 영역의 일부 및 제2 종으로부터의 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 이들 키메라 항체에서, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 포유동물의 한 종 (예를 들어, 비-인간 포유동물, 예컨대 마우스, 토끼 및 래트)으로부터 유래된 항체의 가변 영역을 모방하고, 반면에 불변 부분은 또 다른 포유동물, 예컨대 인간으로부터 유래된 항체 내의 서열에 대해 상동이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변형은 가변 영역 및/또는 불변 영역에서 이루어질 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 인간 항체로부터의 중쇄 불변 영역 및 경쇄 불변 영역을 포함할 수 있는 키메라 항체이다. 키메라 항체는 제1 종으로부터의 가변 영역 또는 가변 영역의 일부 및 제2 종으로부터의 불변 영역을 갖는 항체를 지칭한다. 전형적으로, 이들 키메라 항체에서, 경쇄 및 중쇄 둘 다의 가변 영역은 포유동물의 한 종 (예를 들어, 비-인간 포유동물, 예컨대 마우스, 토끼 및 래트)으로부터 유래된 항체의 가변 영역을 모방하고, 반면에 불변 부분은 또 다른 포유동물, 예컨대 인간으로부터 유래된 항체 내의 서열에 대해 상동이다. 일부 실시양태에서, 아미노산 변형은 가변 영역 및/또는 불변 영역에서 이루어질 수 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 임의의 트랜스페린 수용체 항체의 중쇄는 중쇄 불변 영역 (CH) 또는 그의 부분 (예를 들어, CH1, CH2, CH3 또는 그의 조합)을 포함할 수 있다. 중쇄 불변 영역은 임의의 적합한 기원, 예를 들어 인간, 마우스, 래트 또는 토끼의 것일 수 있다. 하나의 구체적 예에서, 중쇄 불변 영역은 인간 IgG (감마 중쇄), 예를 들어 IgG1, IgG2 또는 IgG4로부터의 것이다. 예시적인 인간 IgG1 불변 영역이 하기에 제공된다:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSG
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)

[0144]

[0145] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 임의의 트랜스페린 수용체 항체의 경쇄는 관련 기술분야에 공지된 임의의 경쇄 불변 영역 (CL)일 수 있는 CL을 추가로 포함할 수 있다. 일부 예에서, CL은 카파 경쇄이다. 다른 예에서, CL은 람다 경쇄이다. 일부 실시양태에서, CL은 카파 경쇄이며, 이의 서열은 하기에 제공된다:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSG
SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO:

[0146] 38)

[0147] 다른 항체 중쇄 및 경쇄 불변 영역은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어 IMGT 데이터베이스 (www.imgt.org) 또는 www.vbase2.org/vbstat.php. (이들 둘 다 본원에 참조로 포함됨)에 제공된 것이다.

[0148] 기재된 트랜스페린 수용체 항체의 예시적인 중쇄 및 경쇄 아미노산 서열이 하기에 제공된다:

[0149] 중쇄 (VH + 인간 IgG1 불변 영역)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL
PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT
VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 39)

[0150]

[0151] 경쇄 (VL + 카파 경쇄)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQTSVTVS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID
NO: 40)

[0152]

[0153] 중쇄 (인간화 VH + 인간 IgG1 불변 영역)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYT
LPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL
TVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 41)

[0154]

[0155] 경쇄 (인간화 VL + 카파 경쇄)

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASDNLYSNLAWYQQKPGKSPKLLVYDATNLADGV
PSRFGSGSGTDYSLKINSLSQSEDFGTYCYQHFHWGTPLTFGAGTKLELKASTKGPSVFPL
APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTV
VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP (SEQ ID NO: 42)

[0156]

[0157] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 40에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0158]

일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39에 제시된 바와 같은 중쇄와 비교하여 20개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 경쇄와 비교하여 15개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 경쇄를 포함한다.

[0159]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 41에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 42에 대해 적어도 80% (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 98%) 동일한 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 포함하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 포함하는 경쇄를 포함한다.

[0160]

일부 실시양태에서, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39에 제시된 바와 같은 인간화 항체의 중쇄와 비교하여 20개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 중쇄를 포함한다. 대안적으로 또는 추가로, 본 개시내용의 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 40에 제시된 바와 같은 인간화 항체의 경쇄와 비교하여 15개 이하의 아미노산 변이 (예를 들어, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 이하의 아미노산 변이)를 함유하는 경쇄를 포함한다.

[0161] 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체 항체는 무손상 항체 (전장 항체)의 항원 결합 단편 (FAB)이다. 무손상 항체 (전장 항체)의 항원 결합 단편은 상용 방법을 통해 제조될 수 있다. 예를 들어, F(ab')₂ 단편은 항체 분자의 펩신 소화에 의해 생산될 수 있고, Fab 단편은 F(ab')₂ 단편의 디설파이드 가교를 환원시킴으로써 생성될 수 있다. 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체의 예시적인 FAB 아미노산 서열이 하기에 제공된다:

[0162] 중쇄 FAB (VH + 인간 IgG1 불변 영역의 부분)

QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGTRAYHYWGQGTSTVTS
SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTTCP (SEQ ID
NO: 43)

[0163]

[0164] 중쇄 FAB (인간화 VH + 인간 IgG1 불변 영역의 부분)

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYWMHWVRQAPGQRLEWIGEINPTNGR
TNYIEKFKSRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGTRAYHYWGQGTMTVT
SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSVVVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTTCP (SEQ ID
NO: 44)

[0165]

[0166] 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 무손상 (즉, 전장) 항체, 그의 항원-결합 단편 (예컨대 Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), 단일 쇄 항체, 이중특이적 항체 또는 나노바디를 포함하나 이에 제한되지는 않는 임의의 항체 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 scFv이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 scFv-Fab (예를 들어, 불변 영역의 부분에 융합된 scFv)이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스페린 수용체 항체는 불변 영역 (예를 들어, 서열식별번호: 39에 제시된 바와 같은 인간 IgG1 불변 영역)에 융합된 scFv이다.

[0167] b. 다른 근육-표적화 항체

[0168] 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 헤모주벨린, 카베올린-3, 뒤시엔느 근육 이영양증 펩티드, 미오신 Iib 또는 CD63에 특이적으로 결합하는 항체이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 근원성 전구체 단백질에 특이적으로 결합하는 항체이다. 예시적인 근원성 전구체 단백질은, 비제한적으로, ABCG2, M-카드헤린/카드헤린-15, 카베올린-1, CD34, FoxK1, 인테그린 알파 7, 인테그린 알파 7 베타 1, MYF-5, MyoD, 미오게닌, NCAM-1/CD56, Pax3, Pax7 및 Pax9를 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 골격근 단백질에 특이적으로 결합하는 항체이다. 예시적인 골격근 단백질은, 비제한적으로, 알파-사르코글리칸, 베타-사르코글리칸, 칼파인 억제제, 크레아틴 키나제 MM/CKMM, eIF5A, 엔올라제 2/뉴런-특이적 엔올라제, 앵실론-사르코글리칸, FABP3/H-FABP, GDF-8/미오스타틴, GDF-11/GDF-8, 인테그린 알파 7, 인테그린 알파 7 베타 1, 인테그린 베타 1/CD29, MCAM/CD146, MyoD, 미오게닌, 미오신 경쇄 키나제 억제제, NCAM-1/CD56 및 트로포닌 I을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 항체는 평활근 단백질에 특이적으로 결합하는 항체이다. 예시적인 평활근 단백질은, 비제한적으로, 알파-평활근 액틴, VE-카드헤린, 칼데스몬/CALD1, 칼포닌 1, 데스민, 히스타민 H2 R, 모틸린 R/GPR38, 트랜스글리틴/TAGLN 및 비멘틴을 포함한다. 그러나, 추가의 표적에 대한 항체는 본 개시내용의 범주 내에 있고, 본원에 제공된 표적의 예시적인 목록은 제한적인 것으로 의도되지 않는 것이 인지되어야 한다.

[0169] c. 항체 특색/변경

[0170] 일부 실시양태에서, 보존적 돌연변이는, 예를 들어 결정 구조에 기초하여 결정된 바와 같이, 잔기가 표적 항원 (예를 들어, 트랜스페린 수용체)과 상호작용하는데 수반될 가능성이 없는 위치에서 항체 서열 (예를 들어, CDR 또는 프레임워크 서열) 내로 도입될 수 있다. 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과 돌연변이 (예를 들어, 아미노산 치환)가 본원에 기재된 근육-표적화 항체의 Fc 영역 내로 (예를 들어, CH2 도메인 (인간 IgG1의 잔기 231-340) 및/또는 CH3 도메인 (인간 IgG1의 잔기 341-447) 및/또는 힌지 영역에 (여기서 넘버링은 카바트 넘버링 시스템 (예를 들어, 카바트에서의 EU 인덱스)에 따름)) 도입되어 항체의 1종 이상의 기능적 특성, 예컨대 혈청 반감기, 보체 고정, Fc 수용체 결합 및/또는 항원-의존성 세포성 세포독성을 변경시킨다.

[0171] 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과 돌연변이 (예를 들어, 아미노산 치환)가, 예를 들어 미국 특허 번호

5,677,425에 기재된 바와 같이 Fc 영역의 힌지 영역 (CH1 도메인) 내로 도입되어 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 개수가 변경 (예를 들어, 증가 또는 감소)된다. CH1 도메인의 힌지 영역 내의 시스테인 잔기의 개수는 변경되어, 예를 들어 경쇄 및 중쇄의 조립을 용이하게 하거나 또는 항체의 안정성을 변경 (예를 들어, 증가 또는 감소)시키거나 또는 링커 접합을 용이하게 할 수 있다.

[0172] 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과와 돌연변이 (예를 들어, 아미노산 치환)가 본원에 기재된 근육-표적화 항체의 Fc 영역 내로 (예를 들어, CH2 도메인 (인간 IgG1의 잔기 231-340) 및/또는 CH3 도메인 (인간 IgG1의 잔기 341-447) 및/또는 힌지 영역에 (여기서 넘버링은 카바트 넘버링 시스템 (예를 들어, 카바트에서의 EU 인덱스)에 따름)) 도입되어 이펙터 세포의 표면 상의 Fc 수용체 (예를 들어, 활성화된 Fc 수용체)에 대한 항체의 친화도를 증가 또는 감소시킨다. Fc 수용체에 대한 항체의 친화도를 감소 또는 증가시키는 항체의 Fc 영역 내의 돌연변이 및 Fc 수용체 또는 그의 단편 내로 이러한 돌연변이를 도입하는 기술은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. Fc 수용체에 대한 항체의 친화도를 변경시키도록 제조될 수 있는 항체의 Fc 수용체 내의 돌연변이의 예는, 예를 들어 문헌 [Smith P et al., (2012) PNAS 109: 6181-6186], 미국 특허 번호 6,737,056 및 국제 공개 번호 WO 02/060919; WO 98/23289; 및 WO 97/34631 (이들은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다.

[0173] 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과와 아미노산 돌연변이 (즉, 치환, 삽입 또는 결실)가 IgG 불변 도메인 또는 그의 FcRn-결합 단편 (바람직하게는 Fc 또는 힌지-Fc 도메인 단편) 내로 도입되어 생체내 항체의 반감기를 변경 (예를 들어, 감소 또는 증가)시킨다. 생체내 항체의 반감기를 변경 (예를 들어, 감소 또는 증가)시킬 돌연변이의 예에 대해서는, 예를 들어 국제 공개 번호 WO 02/060919; WO 98/23289; 및 WO 97/34631; 및 미국 특허 번호 5,869,046, 6,121,022, 6,277,375 및 6,165,745를 참조한다.

[0174] 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과와 아미노산 돌연변이 (즉, 치환, 삽입 또는 결실)가 IgG 불변 도메인 또는 그의 FcRn-결합 단편 (바람직하게는 Fc 또는 힌지-Fc 도메인 단편) 내로 도입되어 생체내 항-트랜스페린 수용체 항체의 반감기를 감소시킨다. 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과와 아미노산 돌연변이 (즉, 치환, 삽입 또는 결실)가 IgG 불변 도메인 또는 그의 FcRn-결합 단편 (바람직하게는 Fc 또는 힌지-Fc 도메인 단편) 내로 도입되어 생체내 항체의 반감기를 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 항체는 제2 불변 (CH2) 도메인 (인간 IgG1의 잔기 231-340) 및/또는 제3 불변 (CH3) 도메인 (인간 IgG1의 잔기 341-447)에 1개 이상의 아미노산 돌연변이 (예를 들어, 치환)를 가질 수 있으며, 여기서 넘버링은 카바트에서의 EU 인덱스에 따른다 (상기 문헌 [Kabat E A et al., (1991)]). 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 IgG1의 불변 영역은 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된, 위치 252에서의 메티오닌 (M)에서 티로신 (Y)으로의 치환, 위치 254에서의 세린 (S)에서 트레오닌 (T)으로의 치환, 및 위치 256에서의 트레오닌 (T)에서 글루탐산 (E)으로의 치환을 포함한다. 미국 특허 번호 7,658,921을 참조하며, 이는 본원에 참조로 포함된다. "YTE 돌연변이체"로 지칭되는 이러한 유형의 돌연변이가 IgG는 동일한 항체의 야생형 버전과 비교하여 4배 증가된 반감기를 나타내는 것으로 밝혀졌다 (문헌 [Dall'Acqua W F et al., (2006) J Biol Chem 281: 23514-24] 참조). 일부 실시양태에서, 항체는 카바트에서와 같은 EU 인덱스에 따라 넘버링된 위치 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 및 428-436에서의 아미노산 잔기의 1, 2, 3개 또는 그 초과와 아미노산 치환을 포함하는 IgG 불변 도메인을 포함한다.

[0175] 일부 실시양태에서, 1, 2개 또는 그 초과와 아미노산 치환이 IgG 불변 도메인 Fc 영역 내로 도입되어 항-트랜스페린 수용체 항체의 이펙터 기능(들)을 변경시킨다. 친화도가 변경된 이펙터 리간드는, 예를 들어 Fc 수용체 또는 보체의 C1 성분일 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 5,624,821 및 5,648,260에 추가로 상세히 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 불변 영역 도메인의 결실 또는 불활성화 (점 돌연변이 또는 다른 수단을 통해)는 순환 항체의 Fc 수용체 결합을 감소시킴으로써 종양 국재화를 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 불변 도메인을 결실시키거나 불활성화시켜 종양 국재화를 증가시키는 돌연변이의 기재에 대해서는 미국 특허 번호 5,585,097 및 8,591,886을 참조한다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 아미노산 치환이 본원에 기재된 항체의 Fc 영역 내로 도입되어 Fc 영역 상의 잠재적 글리코실화 부위를 제거할 수 있고, 이는 Fc 수용체 결합을 감소시킬 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Shields R L et al., (2001) J Biol Chem 276: 6591-604] 참조).

[0176] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 근육-표적화 항체의 불변 영역 내의 1개 이상의 아미노산은 상이한 아미노산 잔기로 대체되어 항체가 변경된 Clq 결합 및/또는 감소 또는 제거된 보체 의존성 세포독성 (CDC)을 갖도록 할 수 있다. 이러한 접근법은 미국 특허 번호 6,194,551 (Idusogie et al.)에 추가로 상세히 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 CH2 도메인의 N-말단 영역 내의 1개 이상의 아미노산 잔기는 변경되어 이에 의해 보체를 고정시키는 항체의 능력을 변경시킨다. 이러한 접근법은 국제 공개 번호 WO 94/29351에 추가로 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항체의 Fc 영역은 변형되어 항체 의존성 세포독

성 (ADCC)을 매개하는 항체의 능력을 증가시키고/거나 Fc γ 수용체에 대한 항체의 친화도를 증가시킨다. 이러한 접근법은 국제 공개 번호 WO 00/42072에 추가로 기재되어 있다.

[0177] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체의 중쇄 및/또는 경쇄 가변 도메인(들) 서열(들)은, 예를 들어 본원의 다른 곳에 기재된 바와 같은 CDR-그래프트된, 키메라, 인간화 또는 복합 인간 항체 또는 항원-결합 단편을 생성하는데 사용될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 바와 같이, 본원에 제공된 임의의 항체로부터 유래된 임의의 변이체, CDR-그래프트된, 키메라, 인간화 또는 복합 항체는 본원에 기재된 조성물 및 방법에 유용할 수 있고, 트랜스페린 수용체에 특이적으로 결합하는 능력을 유지할 것이며, 따라서 변이체, CDR-그래프트된, 키메라, 인간화 또는 복합 항체는 그것이 유래된 원래 항체에 비해 트랜스페린 수용체에 대한 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 그 초과와 결합을 갖는다.

[0178] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 항체는 바람직한 특성을 항체에 부여하는 돌연변이를 포함한다. 예를 들어, 천연 IgG4 mAb에 의해 발생하는 것으로 공지된 Fab-아암 교환으로 인한 잠재적 합병증을 피하기 위해, 본원에 제공된 항체는 세린 228 (EU 넘버링; 카바트 넘버링의 잔기 241)이 프롤린으로 전환되어 IgG1-유사 힌지 서열을 생성하는 안정화 'Adair' 돌연변이를 포함할 수 있다 (Angal S., et al., "A single amino acid substitution abolishes the heterogeneity of chimeric mouse/human (IgG4) antibody," Mol Immunol 30, 105-108; 1993). 따라서, 임의의 항체는 안정화 'Adair' 돌연변이를 포함할 수 있다.

[0179] 본원에 제공된 바와 같이, 본 개시내용의 항체는 임의로 불변 영역 또는 그의 일부를 포함할 수 있다. 예를 들어, VL 도메인은 그의 C-말단 단부에서 경쇄 불변 도메인, 예컨대 C κ 또는 C λ 에 부착될 수 있다. 유사하게, VH 도메인 또는 그의 부분은 IgA, IgD, IgE, IgG 및 IgM, 및 임의의 이소형 하위부류와 같은 중쇄의 모두 또는 일부에 부착될 수 있다. 항체는 적합한 불변 영역을 포함할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, No. 91-3242, National Institutes of Health Publications, Bethesda, Md. (1991)] 참조). 따라서, 본 개시내용의 범주 내의 항체는 임의의 적합한 불변 영역과 조합된 VH 및 VL 도메인 또는 그의 항원 결합 부분을 포함할 수 있다.

[0180] ii. 근육-표적화 펩티드

[0181] 본 개시내용의 일부 측면은 근육-표적화제로서의 근육-표적화 펩티드를 제공한다. 특이적 세포 유형에 결합하는 짧은 펩티드 서열 (예를 들어, 5-20개 아미노산 길이의 펩티드 서열)이 기재되었다. 예를 들어, 세포-표적화 펩티드는 문헌 [Vines e., et al., A. "Cell-penetrating and cell-targeting peptides in drug delivery" Biochim Biophys Acta 2008, 1786: 126-38; Jarver P., et al., "In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery" Trends Pharmacol Sci 2010; 31: 528-35; Samoylova T.I., et al., "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening" Muscle Nerve 1999; 22: 460-6]; 2001년 12월 11일에 허여된 미국 특허 번호 6,329,501 (발명의 명칭: "METHODS AND COMPOSITIONS FOR TARGETING COMPOUNDS TO MUSCLE"); 및 [Samoylov A.M., et al., "Recognition of cell-specific binding of phage display derived peptides using an acoustic wave sensor." Biomol Eng 2002; 18: 269-72] (이들 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재되었다. 특이적 세포 표면 항원 (예를 들어, 수용체)과 상호작용하는 펩티드를 설계함으로써, 목적하는 조직, 예를 들어 근육에 대한 선택성이 달성될 수 있다. 골격근-표적화가 연구되었고, 다양한 분자 페이로드가 전달될 수 있다. 이들 접근법은 대형 항체 또는 바이러스 입자의 많은 실제 단점 없이 근육 조직에 대한 높은 선택성을 가질 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 4 내지 50개 아미노산 길이인 근육-표적화 펩티드이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 아미노산 길이이다. 근육-표적화 펩티드는 임의의 여러 방법, 예컨대 파지 디스플레이를 사용하여 생성될 수 있다.

[0182] 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 특정 다른 세포와 비교하여 근육 세포에서 과다발현되거나 비교적 고도로 발현되는 내재화 세포 표면 수용체, 예를 들어 트랜스페린 수용체에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 트랜스페린 수용체를 표적화할 수 있고, 예를 들어 그에 결합할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체를 표적화하는 펩티드는 자연 발생 리간드의 절편, 예를 들어 트랜스페린을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체를 표적화하는 펩티드는 미국 특허 번호 6,743,893, 출원일 11/30/2000, "RECEPTOR-MEDIATED UPTAKE OF PEPTIDES THAT BIND THE HUMAN TRANSFERRIN RECEPTOR"에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체를 표적화하는 펩티드는 문헌 [Kawamoto, M. et al., "A novel transferrin receptor-targeted hybrid peptide disintegrates cancer cell membrane to induce rapid

killing of cancer cells." BMC Cancer. 2011 Aug 18;11:359]에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 트랜스페린 수용체를 표적화하는 펩티드는 미국 특허 번호 8,399,653, 출원일 5/20/2011, "TRANSFERRIN/TRANSFERRIN RECEPTOR-MEDIATED SIRNA DELIVERY"에 기재된 바와 같다.

[0183] 상기 논의된 바와 같이, 근육 표적화 펩티드의 예가 보고되었다. 예를 들어, 표면 헵타펩티드를 제시하는 파지 디스플레이 라이브러리를 사용하여 근육-특이적 펩티드가 확인되었다. 한 예로서, 아미노산 서열 ASSLNIA (서열식별번호: 6)을 갖는 펩티드는 시험관내에서 C2C12 뮬린 근관에 결합하였고, 생체내에서 마우스 근육 조직에 결합하였다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 아미노산 서열 ASSLNIA (서열식별번호: 6)을 포함한다. 이러한 펩티드는 간, 신장 및 뇌에 대한 결합이 감소된 마우스에서 정맥내 주사 후 심장 및 골격근 조직에 대한 결합에 대해 개선된 특이성을 나타냈다. 추가의 근육-특이적 펩티드는 파지 디스플레이를 사용하여 확인되었다. 예를 들어, DMD에 대한 치료와 관련하여 근육 표적화를 위한 파지 디스플레이 라이브러리에 의해 12개 아미노산 펩티드가 확인되었다. 문헌 [Yoshida D., et al., "Targeting of salicylate to skin and muscle following topical injections in rats." Int J Pharm 2002; 231: 177-84] (이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다. 여기서, 서열 SKTFNTHPQSTP (서열식별번호: 7)을 갖는 12개 아미노산 펩티드가 확인되었고, 이러한 근육-표적화 펩티드는 ASSLNIA (서열식별번호: 6) 펩티드에 비해 C2C12 세포에 대한 개선된 결합을 나타냈다.

[0184] 다른 세포 유형에 비해 근육 (예를 들어, 골격근)에 대해 선택적인 펩티드를 확인하기 위한 추가의 방법은 문헌 [Ghosh D., et al., "Selection of muscle-binding peptides from context-specific peptide-presenting phage libraries for adenoviral vector targeting" J Virol 2005; 79: 13667-72] (이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 시험관내 선택을 포함한다. 무작위 12량체 펩티드 파지 디스플레이 라이브러리를 비-근육 세포 유형의 혼합물과 함께 사전-인큐베이션함으로써, 비-특이적 세포 결합제를 선택하였다. 선택 라운드 후, 12개 아미노산 펩티드 TARGEHKEELI (서열식별번호: 8)가 가장 빈번하게 출현하였다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 아미노산 서열 TARGEHKEELI (서열식별번호: 8)을 포함한다.

[0185] 근육-표적화제는 아미노산-함유 분자 또는 펩티드일 수 있다. 근육-표적화 펩티드는 근육 세포에서 발견된 단백질 수용체에 우선적으로 결합하는 단백질의 서열에 상응할 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 높은 경향의 소수성 아미노산, 예를 들어 발린을 함유하여, 펩티드가 근육 세포를 우선적으로 표적화하도록 한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 이전에 특징화되거나 개시되지 않았다. 이들 펩티드는 임의의 여러 방법론, 예를 들어 파지 디스플레이된 펩티드 라이브러리, 1-비드 1-화합물 펩티드 라이브러리, 또는 위치 스캐닝 합성 펩티드 조합 라이브러리를 사용하여 고안, 생산, 합성 및/또는 유도체화될 수 있다. 예시적인 방법론은 관련 기술분야에서 특징화되었으며, 참조로 포함된다 (Gray, B.P. and Brown, K.C. "Combinatorial Peptide Libraries: Mining for Cell-Binding Peptides" Chem Rev. 2014, 114:2, 1020-1081.; Samoylova, T.I. and Smith, B.F. "Elucidation of muscle-binding peptides by phage display screening." Muscle Nerve, 1999, 22:4. 460-6.). 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 이전에 개시되었다 (예를 들어, 문헌 [Writer M.J. et al. "Targeted gene delivery to human airway epithelial cells with synthetic vectors incorporating novel targeting peptides selected by phage display." J. Drug Targeting. 2004;12:185; Cai, D. "BDNF-mediated enhancement of inflammation and injury in the aging heart." Physiol Genomics. 2006, 24:3, 191-7.; Zhang, L. "Molecular profiling of heart endothelial cells." Circulation, 2005, 112:11, 1601-11.; McGuire, M.J. et al. "In vitro selection of a peptide with high selectivity for cardiomyocytes in vivo." J Mol Biol. 2004, 342:1, 171-82.] 참조). 예시적인 근육-표적화 펩티드는 하기 군의 아미노산 서열을 포함한다: CQAQQQLVC (서열식별번호: 9), CSERSMNFC (서열식별번호: 10), CPKTRRVPC (서열식별번호: 11), WLSEAGPVVTVRALRGTSW (서열식별번호: 12), ASSLNIA (서열식별번호: 6), CMQHSMRVC (서열식별번호: 13) 및 DDTRHWG (서열식별번호: 14). 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 약 2-25개 아미노산, 약 2-20개 아미노산, 약 2-15개 아미노산, 약 2-10개 아미노산 또는 약 2-5개 아미노산을 포함할 수 있다. 근육-표적화 펩티드는 자연 발생 아미노산, 예를 들어 시스테인, 알라닌, 또는 비-자연 발생 또는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 비-자연 발생 아미노산은 β -아미노산, 호모-아미노산, 프롤린 유도체, 3-치환된 알라닌 유도체, 선형 코어 아미노산, N-메틸 아미노산 및 관련 기술분야에 공지된 다른 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 선형일 수 있고; 다른 실시양태에서, 근육-표적화 펩티드는 시클릭, 예를 들어 비시클릭일 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Silvana, M.G. et al. Mol. Therapy, 2018, 26:1, 132-147.] 참조).

[0186] iii. 근육-표적화 수용체 리간드

- [0187] 근육-표적화제는 리간드, 예를 들어 수용체 단백질에 결합하는 리간드일 수 있다. 근육-표적화 리간드는 근육 세포에 의해 발현되는 내재화 세포 표면 수용체에 결합하는 단백질, 예를 들어 트랜스페린일 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 트랜스페린 수용체에 결합하는 트랜스페린 또는 그의 유도체이다. 근육-표적화 리간드는 대안적으로 다른 세포 유형에 비해 근육 세포를 우선적으로 표적화하는 소분자, 예를 들어 친지성 소분자일 수 있다. 근육 세포를 표적화할 수 있는 예시적인 친지성 소분자는 콜레스테롤, 콜레스테릴, 스테아르산, 팔미트산, 올레산, 올레일, 리놀렌, 리놀레산, 미리스트산, 스테롤, 디히드로테스토스테론, 테스토스테론 유도체, 글리세린, 알킬 설페, 트리틸 기 및 알콕시산을 포함하는 화합물을 포함한다.
- [0188] iv. 근육-표적화 압타머
- [0189] 근육-표적화제는 다른 세포 유형에 비해 근육 세포를 우선적으로 표적화하는 압타머, 예를 들어 RNA 압타머일 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 압타머는 이전에 특정화되거나 개시되지 않았다. 이들 압타머는 임의의 여러 방법론, 예를 들어 지수적 풍부화에 의한 리간드의 체계적 진화를 사용하여 고안, 생산, 합성 및/또는 유도체화될 수 있다. 예시적인 방법론은 관련 기술분야에서 특정화되었으며, 참조로 포함된다 (Yan, A.C. and Levy, M. "Aptamers and aptamer targeted delivery" RNA biology, 2009, 6:3, 316-20.; Germer, K. et al. "RNA aptamers and their therapeutic and diagnostic applications." Int. J. Biochem. Mol. Biol. 2013; 4: 27-40.). 일부 실시양태에서, 근육-표적화 압타머는 이전에 개시되었다 (예를 들어, 문헌 [Phillippou, S. et al. "Selection and Identification of Skeletal-Muscle-Targeted RNA Aptamers." Mol Ther Nucleic Acids. 2018, 10:199-214.; Thiel, W.H. et al. "Smooth Muscle Cell-targeted RNA Aptamer Inhibits Neointimal Formation." Mol Ther. 2016, 24:4, 779-87.] 참조). 예시적인 근육-표적화 압타머는 A01B RNA 압타머 및 RNA Apt 14를 포함한다. 일부 실시양태에서, 압타머는 핵산-기반 압타머, 올리고뉴클레오타이드 압타머 또는 펩티드 압타머이다. 일부 실시양태에서, 압타머는 약 5-15 kDa, 약 5-10 kDa, 약 10-15 kDa, 약 1-5 Da, 약 1-3 kDa 또는 그 미만일 수 있다.
- [0190] v. 다른 근육-표적화제
- [0191] 근육 세포 (예를 들어, 골격근 세포)를 표적화하기 위한 하나의 전략은 근육 수송체 단백질, 예컨대 근초 상에 발현된 수송체 단백질의 기질을 사용하는 것이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 근육 조직에 특이적인 유입 수송체의 기질이다. 일부 실시양태에서, 유입 수송체는 골격근 조직에 특이적이다. 다음 2종의 주요 부류의 수송체가 골격근 근초 상에서 발현된다: (1) 골격근 조직으로부터의 유출을 용이하게 하는 아데노신 트리포스페이트 (ATP) 결합 카세트 (ABC) 슈퍼패밀리 및 (2) 골격근 내로의 기질 유입을 용이하게 할 수 있는 용질 담체 (SLC) 슈퍼패밀리. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 ABC 슈퍼패밀리 또는 SLC 슈퍼패밀리의 수송체에 결합하는 기질이다. 일부 실시양태에서, ABC 또는 SLC 슈퍼패밀리의 수송체에 결합하는 기질은 자연 발생 기질이다. 일부 실시양태에서, ABC 또는 SLC 슈퍼패밀리의 수송체에 결합하는 기질은 비-자연 발생 기질, 예를 들어 ABC 또는 SLC 슈퍼패밀리의 수송체에 결합하는 그의 합성 유도체이다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 SLC 슈퍼패밀리의 수송체의 기질이다. SLC 수송체는 평형화 수송체이거나 또는 기질의 수송을 구동하기 위해 막을 가로질러 생성된 양성자 또는 나트륨 이온 구배를 사용한다. 높은 골격근 발현을 갖는 예시적인 SLC 수송체는, 비제한적으로, SATT 수송체 (ASCT1; SLC1A4), GLUT4 수송체 (SLC2A4), GLUT7 수송체 (GLUT7; SLC2A7), ATRC2 수송체 (CAT-2; SLC7A2), LAT3 수송체 (KIAA0245; SLC7A6), PHT1 수송체 (PTR4; SLC15A4), OATP-J 수송체 (OATP5A1; SLC21A15), OCT3 수송체 (EMT; SLC22A3), OCTN2 수송체 (FLJ46769; SLC22A5), ENT 수송체 (ENT1; SLC29A1 및 ENT2; SLC29A2), PAT2 수송체 (SLC36A2), 및 SAT2 수송체 (KIAA1382; SLC38A2)를 포함한다. 이들 수송체는 골격근 내로의 기질의 유입을 용이하게 하여, 근육 표적화를 위한 기회를 제공할 수 있다.
- [0193] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 평형화 뉴클레오시드 수송체 2 (ENT2) 수송체의 기질이다. 다른 수송체에 비해, ENT2는 골격근에서 가장 높은 mRNA 발현 중 하나를 갖는다. 인간 ENT2 (hENT2)는 대부분의 신체 기관, 예컨대 뇌, 심장, 태반, 흉선, 췌장, 전립선 및 신장에서 발현되지만, 골격근에서 특히 풍부하다. 인간 ENT2는 그의 기질의 흡수를 이들의 농도 구배에 따라 용이하게 한다. ENT2는 광범위한 퓨린 및 피리미딘 핵염기를 수송함으로써 뉴클레오시드 항상성을 유지하는데 소정 역할을 한다. hENT2 수송체는 이노신을 제외한 모든 뉴클레오시드 (아데노신, 구아노신, 우리딘, 티미딘 및 시티딘)에 대해 낮은 친화도를 갖는다. 따라서, 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 ENT2 기질이다. 예시적인 ENT2 기질은, 비제한적으로, 이노신, 2',3'-디데옥시이노신 및 클로파라빈을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 임의의 근육-표적화제는 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 페이로드)와 회합된다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 분자 페이로드에 공

유 연결된다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 분자 페이로드에 비-공유 연결된다.

[0194] 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 나트륨 이온-의존성, 고친화도 카르니틴 수송체인 유기 양이온/카르니틴 수송체 (OCTN2)의 기질이다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화제는 OCTN2에 결합하는 카르니틴, 밀드로네이트, 아세틸카르니틴 또는 그의 임의의 유도체이다. 일부 실시양태에서, 카르니틴, 밀드로네이트, 아세틸카르니틴 또는 그의 유도체는 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 페이로드)에 공유 연결된다.

[0195] 근육-표적화제는 근육 세포를 표적화하는 적어도 1종의 가용성 형태로 존재하는 단백질인 단백질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 근육-표적화 단백질은 철 과부하 및 항산성에 수반되는 단백질인 헤모주벨린 (반발성 유도 분자 C 또는 혈액소중 2형 단백질로도 공지됨)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤모주벨린은 전장, 또는 기능성 헤모주벨린 단백질에 대해 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 단편 또는 돌연변이체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤모주벨린 돌연변이체는 가용성 단편일 수 있고/거나, N-말단 신호전달이 결여될 수 있고/거나, C-말단 앵커링 도메인이 결여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤모주벨린은 진뱅크 RefSeq 수탁 번호 NM_001316767.1, NM_145277.4, NM_202004.3, NM_213652.3 또는 NM_213653.3 하에 주석달린 것일 수 있다. 헤모주벨린은 인간, 비-인간 영장류 또는 설치류 기원의 것일 수 있다는 것이 인지되어야 한다.

[0196] B. 분자 페이로드

[0197] 본 개시내용의 일부 측면은, 예를 들어 생물학적 결과, 예를 들어 DNA 서열의 전사, 단백질의 발현 또는 단백질의 활성을 조정하기 위한 분자 페이로드를 제공한다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 근육-표적화제에 연결되거나 또는 달리 그와 회합된다. 일부 실시양태에서, 이러한 분자 페이로드는, 예를 들어 회합된 근육-표적화제에 의한 근육 세포로의 전달 후 근육 세포 내 핵산 또는 단백질에 대한 특이적 결합을 통해 근육 세포에 표적화될 수 있다. 다양한 유형의 근육-표적화제가 본 개시내용에 따라 사용될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 예를 들어, 분자 페이로드는 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드), 펩티드 (예를 들어, 근육 세포에서 질환과 연관된 핵산 또는 단백질에 결합하는 펩티드), 단백질 (예를 들어, 근육 세포에서 질환과 연관된 핵산 또는 단백질에 결합하는 단백질), 또는 소분자 (예를 들어, 근육 세포에서 질환과 연관된 핵산 또는 단백질의 기능을 조정하는 소분자)를 포함하거나 또는 그로 이루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 돌연변이 GAA 대립유전자에 대한 상보성 영역을 갖는 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 GYS1에 대한 상보성 영역을 갖는 가닥을 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 야생형 GAA 단백질을 포함하거나 코딩한다. 예시적인 분자 페이로드는 본원에 추가로 상세히 기재되어 있지만, 본원에 제공된 예시적인 분자 페이로드는 제한적인 것으로 의도되지 않는다는 것이 인지되어야 한다.

[0198] i. 올리고뉴클레오타이드

[0199] 임의의 적합한 올리고뉴클레오타이드가 본원에 기재된 바와 같은 분자 페이로드로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 분해를 유발하도록 설계될 수 있다 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 분해를 유발하는 겹머, siRNA, 리보자임 또는 압타머일 수 있음). 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 번역을 차단하도록 설계될 수 있다 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 번역을 차단하는 믹스머, siRNA 또는 압타머일 수 있음). 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 mRNA의 분해를 유발하고 그의 번역을 차단하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 효소 (예를 들어, 유전자 편집 효소)의 활성을 지시하기 위한 가이드 핵산 (예를 들어, 가이드 RNA)일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드의 다른 예가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 한 포맷의 올리고뉴클레오타이드 (예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드)는 한 포맷에서 또 다른 포맷 (예를 들어, siRNA 올리고뉴클레오타이드)으로 기능적 서열 (예를 들어, 안티센스 가닥 서열)을 혼입시킴으로써 다른 포맷에 적합하게 적합화될 수 있다는 것이 인지되어야 한다.

[0200] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 문헌 [van der Wal, et al., "GAA Deficiency in Pompe Disease is Alleviated by Exon Inclusion in iPSC-Derived Skeletal Muscle Cells," Mol Ther Nucleic Acids. 2017 Jun 16; 7: 101-115] (이의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에서와 같이 PD-연관 GAA 대립유전자 내 엑손 2 포함을 매개한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 PD-연관 GAA 대립유전자에 대한 상보성 영역을 가질 수 있다.

[0201] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드, 예컨대 RNAi 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 문헌 [Clayton, et al., "Antisense Oligonucleotide-mediated Suppression of Muscle Glycogen Synthase 1

Synthesis as an Approach for Substrate Reduction Therapy of Pompe Disease," published in Mol Ther Nucleic Acids in 2017] 또는 2017년 6월 29일에 공개된 미국 특허 출원 공개 번호 2017182189 (발명의 명칭: "INHIBITING OR DOWNREGULATING GLYCOGEN SYNTHASE BY CREATING PREMATURE STOP CODONS USING ANTISENSE OLIGONUCLEOTIDES") (이들의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 보고된 바와 같이 근육 세포에서 야생형 GYS1의 발현을 억제하는데 이용된다. 따라서, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드는 하기와 같이 RefSeq 번호 NM_002103.4에 상응하는 인간 GYS1 서열 (서열식별번호: 15) 및/또는 RefSeq 번호 NM_030678.3에 상응하는 마우스 GYS1 서열 (서열식별번호: 16)의 서열에 대한 상보성 영역을 갖는 안티센스 가닥을 가질 수 있다.

인간 GYS1 (NM_002103.4):

TCCTGGCGGCTGCGAGGTTTCACTGCAGGGGCGCCAGTGGGCTCAGTGACGCTGCG
GCCTCCTTCTGCCCTAGGTCCCAACGCTTCGGGGCAGGGGTGCGGTCTTGCAATAGGA
AGCCGAGCGTCTTGCAAGCTTCCCGTCGGGCACCCAGCTACTCGGCCCCGCACCCTAC
CTGGTGCAATCCCTAGACACCTCCGGGGTCCCTACCTGGAGATCCCCGGAGCCCCC
TTCCTGCGCCAGCCATGCCTTTAAACCGCACTTTGTCCATGTCCTCACTGCCAGGAC
TGGAGGACTGGGAGGATGAATTCGACCTGGGAGAACGCAGTGCTCTTGAAGTGGCC
TGGGAGGTGGCTAACAAGGTGGGTGGCATCTACACGGTGCTGCAGACGAAGGCGA
AGGTGACAGGGGACGAATGGGGCGACAATACTTCCTGGTGGGGCCGTACACGGA
GCAGGGCGTGAGGACCCAGGTGGAAGTCTGGAGGCCCCCACCCTGGCCCTGAAG

AGGACACTGGATTCCATGAACAGCAAGGGCTGCAAGGTGTATTTCTGGGCGCTGGCT
 GATCGAGGGAGGCCCTCTGGTGGTGCTCCTGGACGTGGGTGCCTCAGCTTGGGCCC
 TGGAGCGCTGGAAGGGAGAGCTCTGGGATACCTGCAACATCGGAGTGCCGTGGTAC
 GACCGCGAGGCCAACGACGCTGTCCTCTTTGGCTTTCTGACCACCTGGTTCCTGGGT
 GAGTTCCTGGCACAGAGTGAGGAGAAGCCACATGTGGTTGCTCACTTCCATGAGTG
 GTTGGCAGGCGTTGGACTCTGCCTGTGTCTGTGCCCCGGCGACTGCCTGTAGCAACCAT
 CTTACACCCCATGCCACGCTGCTGGGGCGCTACCTGTGTGCCGGTGCCGTGGACTT
 CTACAACAACCTGGAGAACTTCAACGTGGACAAGGAAGCAGGGGAGAGGCAGATC
 TACCACCGATACTGCATGGAAAGGGCGGCAGCCCACTGCGCTCACGTCTTCACTAC
 TGTGTCCCAGATCACCGCCATCGAGGCACAGCACTTGCTCAAGAGGAAACCAGATA
 TTGTGACCCCCAATGGGCTGAATGTGAAGAAGTTTTCTGCCATGCATGAGTTCAGA
 ACCTCCATGCTCAGAGCAAGGCTCGAATCCAGGAGTTTGTGCGGGGCCATTTTTATG
 GGCATCTGGACTTCAACTTGGACAAGACCTTATACTTCTTTATCGCCGGCCGCTATG
 AGTTCCTCCAACAAGGGTGCTGACGCTTCTCTGGAGGCATTGGCTCGGCTCAACTATC
 TGCTCAGAGTGAACGGCAGCGAGCAGACAGTGGTTGCCTTCTTCATCATGCCAGCG
 CGGACCAACAATTTCAACGTGGAAACCCCTCAAAGGCCAAGCTGTGCGCAAACAGCT
 TTGGGACACGGCCAACACGGTGAAGGAAAAGTTCGGGAGGAAGCTTTATGAATCCT
 TACTGGTTGGGAGCCTTCCCGACATGAACAAGATGCTGGATAAGGAAGACTTCACT
 ATGATGAAGAGAGCCATCTTTGCAACGCAGCGGCAGTCTTTCCCCCTGTGTGCACC
 CACAATATGCTGGATGACTCCTCAGACCCCATCTGACCACCATCCGCCGAATCGGC
 CTCTTCAATAGCAGTGCCGACAGGGTGAAGGTGATTTTCCACCCGGAGTTCCTCTCC
 TCCACAAGCCCCCTGCTCCCTGTGGACTATGAGGAGTTTGTCCGTGGCTGTACCTT
 GGAGTCTTCCCCTCCTACTATGAGCCTTGGGGCTACACACCGGCTGAGTGCACGGTT
 ATGGGAATCCCCAGTATCTCCACCAATCTCTCCGGCTTCGGCTGCTTCATGGAGGAA
 CACATCGCAGACCCCTCAGCTTACGGTATCTACATTCTTGACCGGCGGTTCCGCAGC
 CTGGATGATTCTGCTCGCAGCTCACCTCCTTCTCTACAGTTTCTGTGTCAGCAGAGC
 CGGCGGCAGCGTATCATCCAGCGGAACCGCACGGAGCGCCTCTCCGACCTTCTGGA
 CTGGAATACCTAGGCCGGTACTATATGTCTGCGCGCCACATGGCGCTGTCCAAGG
 CCTTTCCAGAGCACTTCACCTACGAGCCCAACGAGGCGGATGCGGCCCAGGGGTAC
 CGCTACCCACGGCCAGCCTCGGTGCCACCGTCGCCCTCGCTGTACGACACTCCAGC
 CCGCACCAGAGTGAGGACGAGGAGGATCCCCGGAACGGGCGGCTGGAGGAAGACG
 GCGAGCGCTACGATGAGGACGAGGAGGCCGCAAGGACCGGCGCAACATCCGTGC

[0204]

ACCAGAGTGGCCGCGCCGAGCGTCTGCACCTCCTCCACCAGCGGCAGCAAGCGCA
 ACTCTGTGGACACGGCCACCTCCAGCTCACTCAGCACCCCGAGCGAGCCCCTCAGC
 CCCACCAGCTCCCTGGGCGAGGAGCGTAACCTAAGTCCGCCCCACCACACTCCCCGC
 CTGTCCTGCCTCTCTGCTCCAGAGAGAGGATGCAGAGGGGTGCTGCTCCTAAACCCC
 CGCTCCAGATCTGCACTGGGTGTGGCCCCGCAGTGCCCCCACCCAGTCCGCCAAAC
 ACTCCACCCCCCTCCAGCTCCAGTTTCCAAGTTCTGCACTCCAGAATCCACAAAGCC
 GTGCCTTTCTCTGGCTCCAGAATATGCATAATCAGCGCCCTGGAGTCCCCTGGGCCT
 GGACCGCTTCCCAGAGGCCAGGAATCTGCCATTACTCTGCGGTGGTGCCAGAGGTT
 TTAGGAAACCTGGCATGGTGCTTTTCAAGTCTGGGGCTTTTAGAGCCCCCGTGTGGC
 TTACAAATTCTACAGCATAACAGAGCAGGCCACGCTCAGGCCCGCATGCGGGCCAC
 CAAGTTCTGGAACACCGTGGTGCTCCCTGCGAATGGGGCGATCAAGTCCAGAGCCG
 GGGCACTTTCAGAGTTTGAAGGTAACCTGAGAGCAGATGGTCCTCCATTTCAACTCCA
 GAAGTGGGGCTCTGGGAGGGATGTTCTAGCCCTCCCTGGCATGTCAGAGCCAGGCT
 CTGCCTGGAGGATCCCTCCATCCGGCTCCTGTCTATCCCTACACTTTGGCCAAGCAA
 GAGGTGGTAGAACCACTTGGCTGCTCATTCCTTCTGGAGGACACACAGTCTCAGTCC
 AGATGCCTTCCTGTCTTTCTGGCCCTTCTGGACCAGATCCTACTCTTCCTTTCTAAA
 TCTGAGATCTCCCTCCAGGGAATCCGCTGCAGAGGACAGAGCTGGCTGTCTTCCCC
 CACCCCTAACCTGGCTTATCCCAACTGCTCTGCCCACTGTGAAACCACTAGGTTCT
 AGGTCCTGGCTTCTAGATCTGGAACCTTACCACGTTACTGCATACTGATCCCTTTCC
 CATGATCCAGAACTGAGGTCACTGGGTTCTAGAACCCCAACATTTACCTCGAGGCTC
 TTCCATCCCCAACTGTGCCCTGCCTTCAGCTTTGGTGAAAGGAGGGCCCCTCATG
 TGTGCTGTGCTGTGTCTGCACCGCTTGGTTTGCAGTTGAGAGGGGAGGGCAGGAGG
 GGTGTGATTGGAGTGTGTCCGGAGATGAGATGAAAAAATACATCTATATTTAAGA
 ATCCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (SEQ ID NO: 15)

[0205]

[0206]

마우스 GYS1 (NM_030678.3):

ACTGCAGCTGCCCCGCCGATTCAAGTGTCTCAGCTCACCTACCTGAGTCGGAGCGCT
 CTGGGGCGGGGTGCGGTCTGTGAATAGGAAGCGGAGCGCCTTGCAAGCTTCCCCT
 GGGACACCCGCTAACTCTACCGGTCACCAAGTCTGCTGCGTTCCCAGCCGATCTCTC
 TGGTTTCCAGTTTGGTGCTCGAAGTCCCCTGCCCCGAGTAGCCATGCCTCTCAGCC
 GCAGTCTCTGTGTCTCGCTTCCAGGATTGGAAGACTGGGAGGATGAATTGACC
 CCGAGAACGCAGTGCTTTTCGAGGTGGCCTGGGAGGTGGCCAACAAGGTGGGTGGC
 ATCTACACTGTGCTGCAGACGAAGGCGAAGGTGACAGGGGATGAATGGGGTGACA

[0207]

ACTACTATCTGGTGGGACCATACACGGAGCAGGGTGTGAGGACGCAGGTAGAGCTC
 CTGGAGCCCCCAACTCCGGAAGTGAAGAGGACTTTGGATTCCATGAACAGCAAGGG
 TTGTAAGGTGTATTTTGGGCGTTGGCTGATCGAGGGGGGACCCCTAGTGGTGCTCCT
 GGATGTAGGAGCCTCAGCTTGGGCCCTGGAGCGCTGGAAGGGTGAGCTTTGGGACA
 CCTGCAACATCGGGGTACCTGGTACGACCGCGAGGCCAATGACGCTGTCCTGTTT
 GGCTTCCTCACCACCTGGTTCTGGGTGAGTTCCTGGCCCAGAACGAAGAGAAGCC
 GTATGTGGTTGCCCACTTCCACGAATGGTTGGCTGGCGTTGGTCTGTGTCTGTGCCG
 TGCCCGGCGCTTGCCGGTGGCAACCATCTTACCACCTCATGCCACGCTGCTGGGGCG
 CTACCTGTGTGCTGGCGCTGTGGACTTCTACAACAACCTGGAGAATTCAATGTAGA
 CAAGGAAGCAGGAGAGAGGCAGATCTATACCGGTACTGCATGGAGCGTGCAGCA
 GCTCACTGTGCCCATGTCTTCACTACCGTATCCCAGATCACCGCAATCGAGGCTCAA
 CACCTCCTTAAGAGAAAACCAGATATTGTGACCCCCAACGGGCTGAATGTGAAGAA
 GTTCTCTGCTATGCACGAATTCCAGAACCTTCATGCTCAGAGCAAAGCACGAATCCA
 GGAATTTGTGCGTGGCCATTTTATGGGCACCTGGACTTCAACCTAGACAAGACTTT
 GTATTTCTTTATCGCTGGCCGCTATGAGTTTCCAACAAGGGAGCTGATGTGTTCTT
 GGAGGCATTGGCCCGGCTCAACTATCTGCTCAGAGTGAATGGCAGTGAGCAAACAG
 TTGTCGCATTCTTCATCATGCCGGCCCGGACCAATAATTTCAACGTGGAAACCCTGA
 AGGGCCAAGCCGTGCGCAAACAACATATGGGACACAGCCAATACAGTCAAGGAGAA
 ATTTGGGAGGAAGCTCTACGAATCCCTTTTAGTGGGGAGCCTCCCGGACATGAACA
 AGATGCTGGACAAGGAGGACTTCACTATGATGAAGAGAGCCATCTTTGCCACTCAG
 CGGCAGTCTTTCCCACCAGTGTGCACCCACAACATGCTGGACGACTCCTCAGACCCC
 ATCTTGACCACCATCCGCCGAATTGGCCTTTTCAACAGCAGTGCCGACCGTGTGAAG
 GTGATTTTTACCCAGAATTCTTTCTTCCACAAGCCCTCTCCTCCCCGTGGATTATG
 AGGAATTTGTCCGCGGCTGTCACCTTGGGGTCTTCCCCTCCTACTATGAGCCCTGGG
 GCTACACACCAGCGGAGTGCATGTCATGGGCATCCCCAGCATCTCCACCAACCTCT
 CCGGCTTTGGCTGCTTTATGGAGGAACACATCGCAGATCCCTCAGCTTACGGCATT
 ACATTCTGGATCGGAGGTTCGCGAGCCTGGATGATTATGCTCACAGCTCACCTCCT
 TCCTGTACAGCTTCTGCCAGCAGAGCCGGCGACAGCGCATCATCCAGCGGAACCGC
 ACAGAACGGTTGTGCGACTTGCTAGATTGGAAGTACCTGGGCCGGTACTACATGTC
 TGCGCGCCACATGGCTCTGGCCAAGGCCTTTCCAGACCACTTACCTATGAACCCCA
 TGAGGTAGATGCGACCCAGGGGTACCGGTACCCACGACCAGCCTCCGTCCCGCCGT
 CGCCCTCACTGTCTCGACACTCCAGCCCACACCAGAGTGAGGATGAGGAAGAGCCA

[0208]

CGGGATGGACCCCTGGGGGAAGACAGTGAGCGTTATGATGAGGAAGAGGAGGCTG
CCAAGGACCGCCGCAACATCCGGGCACCTGAGTGGCCACGCAGGGCCTCCTGTTCC
TCCTCCACAGGTGGCAGCAAGAGAAGCAACTCGGTGGACACTGGGCCCTCCAGCTC
ACTCAGCACACCCACTGAGCCCCTGAGTCCCTACCAGTTCCCTGGGTGAGGAGCGCA
ACTAAGCTCCCACCCCATCCCATTCCCTGCCTGTCCAGTGCTCCTCTCGCAGAGGG
CCTATGCAGATGGGAGGGTGCCTGAACCCCACTCCAGACTCTTGAGTGGGACCCCT
ACCCAGTGTGGTCCATAGCCTAACCTCTGTTTCAGACACTCCAGCCCTTGAGCTCCA
ATCTTGAGTTCCCGCACTCCACGCCGCCGTGCCTTTCTTGATTGCAGGATGCATT
CTTTGTGCACTGATCTGGAGTCTCCAGGCTTAGACTGGGTCCCAGAGGCCAGGCATC
TGCCATTGTTTTTCAATGCCAGAGGTTTTAGGACACCTGGTTTTATTGGCTTCCAGGCT
GTGGCTTCTTCGTTTGATCCTATAATCATACAGAGTATGCTTTGCTCAGGCCTGCCTC
TGGGACCACCTCATGTTGGATTCTGTGTGGCTTCCCGAATCAGCCAAGTTCAGAGTT
AGGACATTTACAGGGATTAACATAATTGAAAATCAGCCTGCAAGGTAGCTCAGTAGC
TCTGTGACAGATTGCTTGTCTAGCATGCCCCAAGCCCTGGGATCTAACTCTAGAAC
CTCATAAACCTGGTGCGGTGATACACATCTGTAATCCCAGCACTCGGTAGGTAGAG
GTAGACGGATCAAGAGTTAAAGGCCATCATCCTCTGCTACATAGGGAGTTCAAGGC
CAAACCTGGGCAACATGAGACACTGTCTCAAAAGCAAAGTAAAGGTGGTGGAATGCT
CACGGTCTCCATTTCAACCCACGACTGCGATGCTGGGACATGCTGCAAGGTTGGCC
TCCCTGGGTGTGTTCTTCAAAGGAGCATGCGGAGTTGGACCAGACACCTTTCTGCCT
TTTTTCTGGACCAGACCTTCTTTTCTTGGTCCAGTGTCCTCTAGGGAATGCCTCC
ATTGAGGGCAGAATGTCTGTCAACCCACAAGTGCTCAGCCCACTGTGAAACCACT
GGGTTCTGGGTCCCAGTGGCTGAATCAGGAGTCTTTTGTCACTGTGCTGCACCCCGG
TCCCTTTTCTGATACAAAACCGAGCCCACCGCTTCTTGAAGCCCCACATGTACCT
CGAGGCCTTTCTGCCTGCAAGCTTCAGTGAATGGGCGGGCCCTCCTCACGTGTGCT
GTGTCTGGCCCAGTGCCTTTGGTTTGCATTTGGGAGGGGGAGGGCAGAAGGTGTGT
GATTGGAGTGTGTCTAGAGATGAAAAAAAAAAAAAGAAAATACACCTGTATTTAAG
AATGCC (SEQ ID NO: 16)

[0209]

[0210]

a. 올리고뉴클레오타이드 크기/서열

[0211]

올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 포맷에 따라 다양한 상이한 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 35, 40, 45, 50, 75개 또는 그 초과인 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 8 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 8 내지 40개 뉴클레오타이드 길이, 8 내지 30개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 15개 뉴클레오타이드 길이, 10 내지 20개 뉴클레오타이드 길이, 15 내지 25개 뉴클레오타이드 길이, 21 내지 23개 뉴클레오타이드 길이 등이다.

[0212]

일부 실시양태에서, 본 개시내용의 목적을 위한 올리고뉴클레오타이드의 상보적 핵산 서열은 표적 분자 (예를 들어, mRNA)에 대한 서열의 결합이 표적 (예를 들어, mRNA)의 정상 기능을 방해하여 활성의 손실 (예를 들어, 번역을 억제함) 또는 발현의 손실 (예를 들어, 표적 mRNA를 분해함)을 유발하는 경우에 표적 핵산에 특이적으로 혼성화가능하거나 특이적이고, 비-특이적 결합의 회피가 요망되는 조건 하에, 예를 들어 생체내 검정 또는 치유적 치료의 경우에는 생리학적 조건 하에, 및 시험관내 검정의 경우에는 검정이 적합한 엄격도 조건 하에 수행되는 조건 하에, 비-표적 서열에 대한 서열의 비-특이적 결합을 회피하기에 충분한 정도의 상보성이 존재한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 연속 뉴클레오타이드에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 상보적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 상보적 뉴클레오타이드 서열은 표적 핵산에 특이적으로 혼성화가능하거나 특이적이 되기 위해 그의 표적의 서열에 대해 100% 상보적일 필요는 없다.

[0213]

일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 8 내지 15, 8 내지 30, 8 내지 40, 또는 10 내지 50, 또는 5 내지 50, 또는 5 내지 40개 뉴클레오타이드 길이의 범위인 표적 핵산에 대한 상보성 영역을 포함한다. 일부 실시양태

에서, 표적 핵산에 대한 올리고뉴클레오타이드의 상보성 영역은 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 또는 50개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시양태에서, 상보성 영역은 표적 핵산의 적어도 8개의 연속 뉴클레오타이드와 상보적이다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 연속 뉴클레오타이드의 부분과 비교하여 1, 2 또는 3개의 염기 미스매치를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 15개 염기에 걸쳐 3개 이하의 미스매치 또는 10개 염기에 걸쳐 2개 이하의 미스매치를 가질 수 있다.

[0214] b. 올리고뉴클레오타이드 변형

[0215] 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 변형될 수 있으며, 예를 들어 변형된 당 모이어티, 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 추가로, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 특성 중 1종 이상을 나타낼 수 있다: 선택적 스플라이싱을 매개하지 않음; 번역 자극성이 아님; 뉴클레아제 저항성임; 비변형된 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 개선된 세포 흡수를 가짐; 세포 또는 포유동물에 대해 독성이 아님; 세포 내부에 개선된 엔도솜 출구를 가짐; TLR 자극을 최소화함; 또는 패턴 인식 수용체를 회피함. 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드의 변형된 화학 또는 포맷 중 임의의 것은 서로 조합될 수 있다. 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5종 또는 그 초과와 상이한 유형의 변형이 동일한 올리고뉴클레오타이드 내에 포함될 수 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, 변형이 혼입되는 올리고뉴클레오타이드를 천연 올리고데옥시뉴클레오타이드 또는 올리고리보뉴클레오타이드 분자보다 뉴클레아제 소화에 대해 더 저항성으로 만드는 이러한 특정 뉴클레오타이드 변형이 사용될 수 있고; 이들 변형된 올리고뉴클레오타이드는 비변형된 올리고뉴클레오타이드보다 더 긴 시간 동안 무손상으로 생존한다. 변형된 올리고뉴클레오타이드의 구체적 예는 변형된 백본, 예를 들어 변형된 뉴클레오타이드간 연결, 예컨대 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬 또는 시클로알킬 당간 연결 또는 단쇄 헤테로원자 또는 헤테로시클릭 당간 연결을 포함하는 것을 포함한다. 따라서, 본 개시내용의 올리고뉴클레오타이드는, 예컨대 변형, 예를 들어 뉴클레오타이드 변형의 혼입에 의해 핵산분해적 분해에 대해 안정화될 수 있다.

[0217] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 2 내지 10, 2 내지 15, 2 내지 16, 2 내지 17, 2 내지 18, 2 내지 19, 2 내지 20, 2 내지 25, 2 내지 30, 2 내지 40, 2 내지 45개 또는 그 초과와 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드인 50개 이하 또는 100개 이하의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 2 내지 10, 2 내지 15, 2 내지 16, 2 내지 17, 2 내지 18, 2 내지 19, 2 내지 20, 2 내지 25, 2 내지 30개 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드인 8 내지 30개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 올리고뉴클레오타이드의 2 내지 4, 2 내지 5, 2 내지 6, 2 내지 7, 2 내지 8, 2 내지 9, 2 내지 10, 2 내지 11, 2 내지 12, 2 내지 13, 2 내지 14개 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드인 8 내지 15개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 임의로, 올리고뉴클레오타이드는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 뉴클레오타이드가 변형된 것을 제외하고는 모든 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드 변형은 본원에 추가로 기재된다.

[0218] c. 변형된 뉴클레오타이드

[0219] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 2'-변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 2'-데옥시, 2'-데옥시-2'-플루오로, 2'-O-메틸, 2'-O-메톡시에틸 (2'-O-MOE), 2'-O-아미노프로필 (2'-O-AP), 2'-O-디메틸아미노에틸 (2'-O-DMAOE), 2'-O-디메틸아미노프로필 (2'-O-DMAP), 2'-O-디메틸아미노에틸옥시에틸 (2'-O-DMAEOE) 또는 2'-O--N-메틸아세트아미도 (2'-O--NMA)를 포함한다.

[0220] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 2'-O-메틸-변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 일부 실시양태에서, 모든 뉴클레오타이드는 2'-O-메틸 변형을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 리보스 고리가 고리 내의 2개의 원자를 연결하는, 예를 들어 2'-O 원자를 4'-C 원자에 연결하는 가교 모이어티를 포함하는 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 "잠금"되며, 예를 들어 리보스 고리가 2'-O 원자 및 4'-C 원자를 연결하는 메틸렌 가교에 의해 "잠금"된 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. LNA의 예는 2008년 4월 17일에 공개된 국제 특허 출원 공개 WO/2008/043753 (발명의 명칭: "RNA Antagonist Compounds For The Modulation Of PCSK9")에 기재되어 있으며, 이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0221] 본원에 개시된 올리고뉴클레오타이드에 사용될 수 있는 다른 변형은 에틸렌-가교된 핵산 (ENA)을 포함한다. ENA는 2'-O,4'-C-에틸렌-가교된 핵산을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. ENA의 예는 2005년 5월 12일에 공개된 국제 특허 공개 번호 WO 2005/042777 (발명의 명칭: "APP/ENA Antisense"); 문헌 [Morita et al., Nucleic Acid Res., Suppl 1:241-242, 2001; Surono et al., Hum. Gene Ther., 15:749-757, 2004; Koizumi, Curr. Opin. Mol. Ther., 8:144-149, 2006 및 Horie et al., Nucleic Acids Symp. Ser (Oxf), 49:171-172, 2005]에 제공되어 있으며; 이의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0222] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 가교된 뉴클레오타이드, 예컨대 잠금 핵산 (LNA) 뉴클레오타이드, 구속성 에틸 (cEt) 뉴클레오타이드, 또는 에틸렌 가교된 핵산 (ENA) 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 하기 미국 특허 또는 특허 출원 공개 중 하나에 개시된 변형된 뉴클레오타이드를 포함한다: 2008년 7월 15일에 허여된 미국 특허 7,399,845 (발명의 명칭: "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"); 2010년 6월 22일에 허여된 미국 특허 7,741,457 (발명의 명칭: "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"); 2011년 9월 20일에 허여된 미국 특허 8,022,193 (발명의 명칭: "6-Modified Bicyclic Nucleic Acid Analogs"); 2009년 8월 4일에 허여된 미국 특허 7,569,686 (발명의 명칭: "Compounds And Methods For Synthesis Of Bicyclic Nucleic Acid Analogs"); 2008년 2월 26일에 허여된 미국 특허 7,335,765 (발명의 명칭: "Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues"); 2008년 1월 1일에 허여된 미국 특허 7,314,923 (발명의 명칭: "Novel Nucleoside And Oligonucleotide Analogues"); 2010년 10월 19일에 허여된 미국 특허 7,816,333 (발명의 명칭: "Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same") 및 미국 공개 번호 2011/0009471이며 2015년 2월 17일에 허여된 현재 미국 특허 8,957,201 (발명의 명칭: "Oligonucleotide Analogues And Methods Utilizing The Same") (이들 각각의 전체 내용은 모든 목적을 위해 본원에 참조로 포함됨).
- [0223] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 당의 2' 위치에서 변형된 적어도 1개의 뉴클레오타이드, 바람직하게는 2'-O-알킬, 2'-O-알킬-O-알킬 또는 2'-플루오로-변형된 뉴클레오타이드를 포함한다. 다른 바람직한 실시양태에서, RNA 변형은 RNA의 3' 말단에 피리미딘, 무염기성 잔기 또는 역전된 염기의 리보스 상에 2'-플루오로, 2'-아미노 및 2' O-메틸 변형을 포함한다.
- [0224] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 갖지 않는 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 1°C, 2°C, 3°C, 4°C 또는 5°C 범위의 올리고뉴클레오타이드 Tm의 증가를 유발하는 적어도 1개의 변형된 뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 변형된 뉴클레오타이드를 갖지 않는 올리고뉴클레오타이드와 비교하여 2°C, 3°C, 4°C, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C 또는 그 초과 범위의 올리고뉴클레오타이드 Tm의 총 증가를 유발하는 복수의 변형된 뉴클레오타이드를 가질 수 있다.
- [0225] 올리고뉴클레오타이드는 상이한 종류의 교대 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 예를 들어, 올리고뉴클레오타이드는 교대 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 2'-플루오로-데옥시리보뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 교대 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 교대 2'-플루오로 뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 올리고뉴클레오타이드는 교대 가교된 뉴클레오타이드 및 2'-플루오로 또는 2'-O-메틸 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.
- [0226] d. 뉴클레오타이드간 연결 / 백본
- [0227] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 또는 다른 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 적어도 2개의 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 모든 뉴클레오타이드 사이에 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 뉴클레오타이드 서열의 5' 또는 3' 말단에서 제1, 제2 및/또는 제3 뉴클레오타이드간 연결에 변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다.
- [0228] 사용될 수 있는 인-함유 연결은 포스포로티오에이트, 키랄 포스포로티오에이트, 포스포로디티오에이트, 포스포트리에스테르, 아미노알킬포스포트리에스테르, 3'알킬렌 포스포네이트 및 키랄 포스포네이트를 포함하는 메틸 및 다른 알킬 포스포네이트, 포스포네이트, 3'-아미노 포스포르아미데이트 및 아미노알킬포스포르아미데이트를 포함하는 포스포르아미데이트, 티오노포스포르아미데이트, 티오노알킬포스포네이트, 티오노알킬포스포트리에스테르, 및 정상 3'-5' 연결을 갖는 보라노포스페이트, 이들의 2'-5' 연결 유사체, 및 뉴클레오타이드 단위의 인접한 쌍이 3'-5'에서 5'-3' 또는 2'-5'에서 5'-2'로 연결된 역극성을 갖는 것을 포함하나 이에 제한되지는 않으며;

미국 특허 번호 3,687,808; 4,469,863; 4,476,301; 5,023,243; 5,177,196; 5,188,897; 5,264,423; 5,276,019; 5,278,302; 5,286,717; 5,321,131; 5,399,676; 5,405,939; 5,453,496; 5,455,233; 5,466,677; 5,476,925; 5,519,126; 5,536,821; 5,541,306; 5,550,111; 5,563,253; 5,571,799; 5,587,361; 및 5,625,050을 참조한다.

[0229] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 헤테로원자 백본, 예컨대 메틸렌(메틸이미노) 또는 MMI 백본; 아미드 백본 (문헌 [De Mesmaeker et al. *Ace. Chem. Res.* 1995, 28:366-374] 참조); 모르폴리노 백본 (미국 특허 번호 5,034,506 (Summerton and Weller) 참조); 또는 펩티드 핵산 (PNA) 백본 (여기서 올리고뉴클레오타이드의 포스포디에스테르 백본은 폴리아미드 백본으로 대체되고, 뉴클레오타이드는 폴리아미드 백본의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합됨, 문헌 [Nielsen et al., *Science* 1991, 254, 1497] 참조).

[0230] e. 입체특이적 올리고뉴클레오타이드

[0231] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드간 인 원자는 키랄이고, 올리고뉴클레오타이드의 특성은 키랄 인 원자의 배위에 기초하여 조정된다. 일부 실시양태에서, 적절한 방법을 사용하여 P-키랄 올리고뉴클레오타이드 유사체를 입체제어된 방식으로 합성할 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Oka N, Wada T, *Stereocontrolled synthesis of oligonucleotide analogs containing chiral internucleotidic phosphorus atoms*. *Chem Soc Rev.* 2011 Dec;40(12):5829-43.]에 기재된 바와 같음). 일부 실시양태에서, 실질적으로 모든 Sp 또는 실질적으로 모든 Rp 포스포로티오에이트 당간 연결에 의해 함께 연결된 뉴클레오시드 단위를 포함하는 포스포로티오에이트 함유 올리고뉴클레오타이드가 제공된다. 일부 실시양태에서, 실질적으로 키랄 순수한 당간 연결을 갖는 이러한 포스포로티오에이트 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 1996년 12월 12일에 허여된 미국 특허 5,587,261 (이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 효소적 또는 화학적 합성에 의해 제조된다. 일부 실시양태에서, 키랄 제어된 올리고뉴클레오타이드는 표적 핵산의 선택적 절단 패턴을 제공한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 키랄 제어된 올리고뉴클레오타이드는, 예를 들어 2017년 2월 2일에 공개된 미국 특허 출원 공개 20170037399 A1 (발명의 명칭: "CHIRAL DESIGN") (이의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같이, 핵산의 상보적 서열 내에 단일 부위 절단을 제공한다.

[0232] f. 모르폴리노

[0233] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 모르폴리노-기재 화합물일 수 있다. 모르폴리노-기재 올리고머 화합물은 문헌 [Dwayne A. Braasch and David R. Corey, *Biochemistry*, 2002, 41(14), 4503-4510]; *Genesis*, volume 30, issue 3, 2001; Heasman, J., *Dev. Biol.*, 2002, 243, 209-214; Nasevicius et al., *Nat. Genet.*, 2000, 26, 216-220; Lacerra et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2000, 97, 9591-9596]; 및 1991년 7월 23일에 허여된 미국 특허 번호 5,034,506에 기재되어 있다. 일부 실시양태에서, 모르폴리노-기재 올리고머 화합물은 포스포로디아미데이트 모르폴리노 올리고머 (PMO)이다 (예를 들어, 문헌 [Iverson, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 3:235-238, 2001; 및 Wang et al., *J. Gene Med.*, 12:354-364, 2010]에 기재된 바와 같고, 이들의 개시내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함됨).

[0234] g. 펩티드 핵산 (PNA)

[0235] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 단위의 당 및 뉴클레오시드간 연결 (백본) 둘 다는 신규 기로 대체된다. 일부 실시양태에서, 염기 단위는 적절한 핵산 표적 화합물과의 혼성화를 위해 유지된다. 탁월한 혼성화 특성을 갖는 것으로 나타난 올리고뉴클레오타이드 모방체인 하나의 이러한 올리고머 화합물은 펩티드 핵산 (PNA)으로 지칭된다. PNA 화합물에서, 올리고뉴클레오타이드의 당-백본은 아미드 함유 백본, 예를 들어 아미노에틸글리신 백본으로 대체된다. 핵염기는 보유하고, 백본의 아미드 부분의 아자 질소 원자에 직접적으로 또는 간접적으로 결합된다. PNA 화합물의 제조를 보고하는 대표적인 공개는 미국 특허 번호 5,539,082; 5,714,331; 및 5,719,262를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다. PNA 화합물의 추가의 교시내용은 문헌 [Nielsen et al., *Science*, 1991, 254, 1497-1500]에서 찾을 수 있다.

[0236] h. 갭머

[0237] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 갭머이다. 갭머 올리고뉴클레오타이드는 일반적으로 식 5'-X-Y-Z-3'을 가지며, 여기서 X 및 Z는 갭 영역 Y 주위의 플랭킹 영역이다. 일부 실시양태에서, Y 영역은 뉴클레오타이드의 연속 스트레치, 예를 들어 RNase, 예컨대 RNase H를 동원할 수 있는 적어도 6개의 DNA 뉴클레오타이드의 영역이다. 일부 실시양태에서, 갭머는 표적 핵산에 결합하며, 이 지점에서 RNase가 동원된 다음 표적 핵산을 절단할 수 있다. 일부 실시양태에서, Y 영역은 고친화도 변형된 뉴클레오타이드, 예를 들어 1 내지 6개의 변형된 뉴클레오타이드를 포함하는 영역 X 및 Z가 5' 및 3' 둘 다에 플랭킹되어 있다. 변형된 뉴클레오타이드의 예는 2' MOE 또는 2'

OMe 또는 잠금 핵산 염기 (LNA)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 플랭킹 서열 X 및 Z는 1 내지 20개 뉴클레오타이드, 1 내지 8개 뉴클레오타이드 또는 1 내지 5개 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 플랭킹 서열 X 및 Z는 유사한 길이 또는 상이한 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭-절편 Y는 5 내지 20개 뉴클레오타이드, 내지는 12개 뉴클레오타이드, 또는 6 내지 10개 뉴클레오타이드 길이의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다.

[0238] 일부 실시양태에서, 갭머 올리고뉴클레오타이드의 갭 영역은 DNA 뉴클레오타이드에 추가로 효율적인 RNase H 작용에 허용되는 것으로 공지된 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 C4'-치환된 뉴클레오타이드, 비-시클릭 뉴클레오타이드 및 아라비노-구성된 뉴클레오타이드를 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 갭 영역은 1개 이상의 비변형된 뉴클레오타이드간 연결을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 또는 둘 다의 플랭킹 영역은 각각 독립적으로 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개 또는 그 초과 뉴클레오타이드 사이에 1개 이상의 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 또는 다른 연결)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 갭 영역 및 2개의 플랭킹 영역은 각각 독립적으로 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개 또는 그 초과 뉴클레오타이드 사이에 변형된 뉴클레오타이드간 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 또는 다른 연결)을 포함한다.

[0239] 갭머는 적절한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 갭머의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허, 미국 특허 공개 및 PCT 공개는 미국 특허 번호 5,013,830; 5,149,797; 5,220,007; 5,256,775; 5,366,878; 5,403,711; 5,491,133; 5,565,350; 5,623,065; 5,652,355; 5,652,356; 5,700,922; 5,898,031; 7,432,250; 및 7,683,036; 미국 특허 공개 번호 US20090286969, US20100197762 및 US20110112170; 및 PCT 공개 번호 W02008049085 및 W02009090182를 포함하나 이에 제한되지는 않으며, 이들 각각은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0240] i. 믹스머

[0241] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 올리고뉴클레오타이드는 믹스머일 수 있거나 또는 믹스머 서열 패턴을 포함할 수 있다. 일반적으로, 믹스머는 자연 및 비-자연 발생 뉴클레오타이드 둘 다를 포함하거나 또는 2종의 상이한 유형의 비-자연 발생 뉴클레오타이드를 전형적으로 교대 패턴으로 포함하는 올리고뉴클레오타이드이다. 믹스머는 일반적으로 비변형된 올리고뉴클레오타이드보다 더 높은 결합 친화도를 갖고, 표적 분자에 특이적으로 결합하는데, 예를 들어 표적 분자 상의 결합 부위를 차단하는데 사용될 수 있다. 일반적으로, 믹스머는 RNase를 표적 분자로 동원하지 않고, 따라서 표적 분자의 절단을 촉진하지 않는다. RNase H를 동원할 수 없는 이러한 올리고뉴클레오타이드는 기재되었으며, 예를 들어 W02007/112754 또는 W02007/112753을 참조한다.

[0242] 일부 실시양태에서, 믹스머는 반복 패턴의 뉴클레오타이드 유사체 및 자연 발생 뉴클레오타이드, 또는 한 유형의 뉴클레오타이드 유사체 및 제2 유형의 뉴클레오타이드 유사체를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 그러나, 믹스머는 반복 패턴을 포함할 필요가 없고, 대신에 변형된 뉴클레오타이드 및 자연 발생 뉴클레오타이드의 임의의 배열 또는 한 유형의 변형된 뉴클레오타이드 및 제2 유형의 변형된 뉴클레오타이드의 임의의 배열을 포함할 수 있다. 반복 패턴은, 예를 들어 매 두 번째 또는 매 세 번째 뉴클레오타이드가 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 LNA이고, 나머지 뉴클레오타이드는 자연 발생 뉴클레오타이드, 예컨대 DNA, 또는 2' 치환된 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 2' MOE 또는 2' 플루오로 유사체, 또는 본원에 기재된 임의의 다른 변형된 뉴클레오타이드일 수 있다. 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 LNA 단위의 반복 패턴은 고정된 위치, 예를 들어 5' 또는 3' 말단에서 변형된 뉴클레오타이드와 조합될 수 있는 것으로 인식된다.

[0243] 일부 실시양태에서, 믹스머는 5개 초과, 4개 초과, 3개 초과 또는 2개 초과 연속 자연 발생 뉴클레오타이드, 예컨대 DNA 뉴클레오타이드의 영역을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 2개의 연속 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 적어도 2개의 연속 LNA로 이루어진 영역을 적어도 포함한다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 3개의 연속 변형된 뉴클레오타이드 단위, 예컨대 적어도 3개의 연속 LNA로 이루어진 영역을 적어도 포함한다.

[0244] 일부 실시양태에서, 믹스머는 7개 초과, 6개 초과, 5개 초과, 4개 초과, 3개 초과 또는 2개 초과 연속 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 LNA의 영역을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, LNA 단위는 다른 뉴클레오타이드 유사체, 예컨대 본원에 언급된 것으로 대체될 수 있다.

[0245] 믹스머는 친화도 증진 변형된 뉴클레오타이드, 예컨대 비제한적 예로, LNA 뉴클레오타이드 및 2'-O-메틸 뉴클레오타이드의 혼합물을 포함하도록 설계될 수 있다. 일부 실시양태에서, 믹스머는 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4, 적어도 5개 또는 그 초과 뉴클레오타이드 사이에 변형된 뉴클레오타이드간 연결 (예를 들어, 포스포로티오에이트 뉴클레오타이드간 연결 또는 다른 연결)을 포함한다.

- [0246] 믹스머는 임의의 적합한 방법을 사용하여 제조될 수 있다. 믹스머의 제조를 교시하는 대표적인 미국 특허, 미국 특허 공개 및 PCT 공개는 미국 특허 공개 번호 US20060128646, US20090209748, US20090298916, US20110077288 및 US20120322851, 및 미국 특허 번호 7687617을 포함한다.
- [0247] 일부 실시양태에서, 믹스머는 1개 이상의 모르폴리노 뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 믹스머는 1개 이상의 다른 뉴클레오티드 (예를 들어, DNA, RNA 뉴클레오티드) 또는 변형된 뉴클레오티드 (예를 들어, LNA, 2'-O-메틸 뉴클레오티드)와 혼합된 (예를 들어, 교대 방식으로) 모르폴리노 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.
- [0248] 일부 실시양태에서, 믹스머는, 예를 들어 문헌 [Touznik A., et al., LNA/DNA mixmer-based antisense oligonucleotides correct alternative splicing of the SMN2 gene and restore SMN protein expression in type 1 SMA fibroblasts Scientific Reports, volume 7, Article number: 3672 (2017), Chen S. et al., Synthesis of a Morpholino Nucleic Acid (MNA)-Uridine Phosphoramidite, and Exon Skipping Using MNA/2'-O-Methyl Mixmer Antisense Oligonucleotide, Molecules 2016, 21, 1582] (이들 각각의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 보고된 바와 같이, 스플라이스 교정 또는 엑손 스킵핑에 유용하다.
- [0249] j. RNA 간섭 (RNAi)
- [0250] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오티드는 짧은 간섭 RNA 또는 침묵 RNA로도 공지된 소형 간섭 RNA (siRNA)의 형태일 수 있다. siRNA는 세포 내의 RNA 간섭 (RNAi) 경로를 통한 분해를 위해 핵산 (예를 들어, mRNA)을 표적화하는, 전형적으로 약 20-25개의 염기 쌍 길이의 이중 가닥 RNA 분자의 부류이다. siRNA 분자의 특이성은 분자의 안티센스 가닥이 그의 표적 RNA에 결합하는 것에 의해 결정될 수 있다. 효과적인 siRNA 분자는 인터페론 반응을 통한 세포 내의 비-특이적 RNA 간섭 경로의 촉발을 방지하기 위해 일반적으로 30 내지 35개 미만의 염기 쌍 길이이며, 더 긴 siRNA도 효과적일 수 있다.
- [0251] 적절한 표적 RNA 서열의 선택 후, 안티센스 서열인, 표적 서열의 모두 또는 일부에 대해 상보적인 뉴클레오티드 서열을 포함하는 siRNA 분자가 적절한 방법을 사용하여 설계 및 제조될 수 있다 (예를 들어, PCT 공개 번호 WO 2004/016735; 및 미국 특허 공개 번호 2004/0077574 및 2008/0081791 참조).
- [0252] siRNA 분자는 이중 가닥 (즉, 안티센스 가닥 및 상보적 센스 가닥을 포함하는 dsRNA 분자) 또는 단일 가닥 (즉, 안티센스 가닥만을 포함하는 ssRNA 분자)일 수 있다. siRNA 분자는 자기-상보적 센스 및 안티센스 가닥을 갖는 듀플렉스, 비대칭 듀플렉스, 헤어핀 또는 비대칭 헤어핀 2차 구조를 포함할 수 있다.
- [0253] 이중 가닥 siRNA는 동일한 길이 또는 상이한 길이인 RNA 가닥을 포함할 수 있다. 이중 가닥 siRNA 분자는 또한 스템-루프 구조의 단일 올리고뉴클레오티드로부터 조립될 수 있으며, 여기서 siRNA 분자의 자기-상보적 센스 및 안티센스 영역은 핵산 기반 또는 비-핵산-기반 링커(들)에 의해 연결되고, 뿐만 아니라 2개 이상의 루프 구조 및 자기-상보적 센스 및 안티센스 가닥을 포함하는 스템을 갖는 원형 단일 가닥 RNA로부터 조립될 수 있으며, 여기서 원형 RNA는 생체내 또는 시험관내에서 프로세싱되어 RNAi를 매개할 수 있는 활성 siRNA 분자를 생성할 수 있다. 따라서, 소형 헤어핀 RNA (shRNA) 분자가 또한 본원에서 고려된다. 이들 분자는 전형적으로 스페이서 또는 루프 서열에 의해 분리되어 있는, 역 상보체 (센스) 서열에 추가로 특이적 안티센스 서열을 포함한다. 스페이서 또는 루프의 절단은 단일 가닥 RNA 분자 및 그의 역 상보체를 제공하여, 이들이 어닐링되어 dsRNA 분자를 형성할 수 있다 (임의로 어느 한쪽 또는 양쪽 가닥의 3' 말단 및/또는 5' 말단으로부터 1, 2, 3개 또는 그 초과 뉴클레오티드의 부가 또는 제거를 유발할 수 있는 추가의 프로세싱 단계가 존재함). 스페이서는 안티센스 및 센스 서열이 스페이서의 절단 (및 임의로, 어느 한쪽 또는 양쪽 가닥의 3' 말단 및/또는 5' 말단으로부터 1, 2, 3, 4개 또는 그 초과 뉴클레오티드의 부가 또는 제거를 유발할 수 있는 후속 프로세싱 단계) 전에 어닐링되어 이중 가닥 구조 (또는 스템)를 형성하도록 허용하기에 충분한 길이일 수 있다. 스페이서 서열은 이중 가닥 핵산으로 어닐링되는 경우 shRNA에 포함되는 2개의 상보적 뉴클레오티드 서열 영역 사이에 위치하는 비관련 뉴클레오티드 서열일 수 있다.
- [0254] siRNA 분자의 전체 길이는 설계되는 siRNA 분자의 유형에 따라 약 14 내지 약 100개 뉴클레오티드로 달라질 수 있다. 일반적으로, 이들 뉴클레오티드 중 약 14 내지 약 50개는 RNA 표적 서열에 대해 상보적이며, 즉 siRNA 분자의 특이적 안티센스 서열을 구성한다. 예를 들어, siRNA가 이중 또는 단일 가닥 siRNA인 경우에, 길이는 약 14 내지 약 50개 뉴클레오티드로 달라질 수 있는 반면, siRNA가 shRNA 또는 원형 분자인 경우에, 길이는 약 40개 뉴클레오티드 내지 약 100개 뉴클레오티드로 달라질 수 있다.
- [0255] siRNA 분자는 분자의 한 말단에 3' 오버행을 포함할 수 있다. 다른 말단은 평활 말단일 수 있거나 또는 또한

오버행 (5' 또는 3')을 가질 수 있다. siRNA 분자가 분자의 양쪽 말단에 오버행을 포함하는 경우에, 오버행의 길이는 동일하거나 상이할 수 있다. 한 실시양태에서, 본 개시내용의 siRNA 분자는 분자의 양쪽 말단에 약 1 내지 약 3개 뉴클레오타이드의 3' 오버행을 포함한다.

[0256] k. 마이크로RNA (miRNA)

[0257] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 마이크로RNA (miRNA)일 수 있다. 마이크로RNA ("miRNA"로 지칭됨)는 표적 RNA 전사체 상의 상보적 부위에 결합함으로써 유전자 발현을 제어하는 조절 분자의 부류에 속하는 소형 비-코딩 RNA이다. 전형적으로, miRNA는 대형 RNA 전구체 (pri-miRNA로 명명됨)로부터 생성되며, 이들은 핵에서 대략 70개 뉴클레오타이드의 pre-miRNA로 프로세싱되어 불완전한 스템-루프 구조로 폴딩된다. 이들 pre-miRNA는 전형적으로 세포질 내에서 RNase III 효소인 다이서에 의해 pre-miRNA 헤어핀의 한 측면으로부터 18-25개 뉴클레오타이드 길이의 성숙 miRNA가 절제되는 추가의 프로세싱 단계를 겪는다.

[0258] 본원에 사용된 바와 같이, miRNA는 pri-miRNA, pre-miRNA, 성숙 miRNA 또는 성숙 miRNA의 생물학적 활성을 보유하는 그의 변이체의 단편을 포함한다. 한 실시양태에서, miRNA의 크기 범위는 21개 뉴클레오타이드 내지 170개 뉴클레오타이드일 수 있다. 한 실시양태에서, miRNA의 크기 범위는 70 내지 170개 뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 실시양태에서, 21 내지 25개 뉴클레오타이드 길이의 성숙 miRNA가 사용될 수 있다.

[0259] 1. 압타머

[0260] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 압타머의 형태일 수 있다. 일반적으로, 분자 페이로드와 관련하여, 압타머는 세포 내의 표적, 예컨대 소분자, 단백질, 핵산에 특이적으로 결합하는 임의의 핵산이다. 일부 실시양태에서, 압타머는 DNA 압타머 또는 RNA 압타머이다. 일부 실시양태에서, 핵산 압타머는 단일 가닥 DNA 또는 RNA (ssDNA 또는 ssRNA)이다. 단일 가닥 핵산 압타머는 나선 및/또는 루프 구조를 형성할 수 있는 것으로 이해되어야 한다. 핵산 압타머를 형성하는 핵산은 자연 발생 뉴클레오타이드, 변형된 뉴클레오타이드, 탄화수소 링커 (예를 들어, 알킬렌) 또는 폴리에테르 링커 (예를 들어, PEG 링커)가 1개 이상의 뉴클레오타이드 사이에 삽입된 자연 발생 뉴클레오타이드, 탄화수소 또는 PEG 링커가 1개 이상의 뉴클레오타이드 사이에 삽입된 변형된 뉴클레오타이드, 또는 그의 조합을 포함할 수 있다. 압타머 및 압타머의 제조 방법을 기재하는 예시적인 공개 및 특허는, 예를 들어 문헌 [Lorsch and Szostak, 1996; Jayasena, 1999]; 미국 특허 번호 5,270,163; 5,567,588; 5,650,275; 5,670,637; 5,683,867; 5,696,249; 5,789,157; 5,843,653; 5,864,026; 5,989,823; 6,569,630; 8,318,438 및 PCT 출원 WO 99/31275를 포함하며, 이들 각각은 본원에 참조로 포함된다.

[0261] m. 리보자임

[0262] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 올리고뉴클레오타이드는 리보자임의 형태일 수 있다. 리보자임 (리보핵산 효소)은 단백질 효소의 작용과 유사한 특이적 생화학적 반응을 수행할 수 있는 분자, 전형적으로 RNA 분자이다. 리보자임은 이들이 혼성화된 RNA 분자 내의 특정 포스포디에스테르 연결에서 절단 능력을 포함한 촉매 활성을 갖는 분자, 예컨대 mRNA, RNA-함유 기질, lncRNA 및 리보자임 그 자체이다.

[0263] 리보자임은 여러 물리적 구조 중 하나를 취할 수 있으며, 이 중 하나는 "해머헤드"로 불린다. 해머헤드 리보자임은 9개의 보존된 염기를 함유하는 촉매 코어, 이중 가닥 스템 및 루프 구조 (스스템-루프 II), 및 촉매 코어의 표적 RNA 플랭킹 영역에 대해 상보적인 2개의 영역으로 구성된다. 플랭킹 영역은 리보자임이 이중 가닥 스템 I 및 III을 형성함으로써 특이적으로 표적 RNA에 결합할 수 있게 한다. 절단은 3',5'-포스페이트 디에스테르로부터 2',3'-시클릭 포스페이트 디에스테르로의 에스테르교환 반응에 의해 특이적 리보뉴클레오타이드 삼중체 옆에 시스로 일어나거나 (즉, 해머헤드 모티프를 함유하는 동일한 RNA 분자의 절단) 또는 트랜스로 일어난다 (리보자임을 함유하는 것 이외의 RNA 기질의 절단). 이론에 얽매이는 것을 원하지는 않지만, 이러한 촉매 활성은 리보자임의 촉매 영역에 고도로 보존된 특이적 서열의 존재를 필요로 하는 것으로 여겨진다.

[0264] 리보자임 구조에서의 변형은 또한 분자의 다양한 비-코어 부분의 비-뉴클레오타이드 분자로의 치환 또는 대체를 포함하였다. 예를 들어, 문헌 [Benseler et al. (J. Am. Chem. Soc. (1993) 115:8483-8484)]에는 스템 II의 염기 쌍 중 2개 및 루프 II의 뉴클레오타이드 중 4개 모두가 헥사에틸렌 글리콜, 프로판디올, 비스(트리에틸렌 글리콜)포스페이트, 트리스(프로판디올)비스포스페이트 또는 비스(프로판디올)포스페이트 기반 비-뉴클레오타이드 링커로 대체된 해머헤드-유사 분자가 개시되었다. 문헌 [Ma et al. (Biochem. (1993) 32:1751-1758; Nucleic Acids Res. (1993) 21:2585-2589)]에서는 TAR 리보자임 헤어핀의 6개 뉴클레오타이드 루프를 비-뉴클레오타이드인 에틸렌 글리콜-관련 링커로 대체하였다. 문헌 [Thomson et al. (Nucleic Acids Res. (1993) 21:5600-5603)]에서는 루프 II를 13, 17 및 19개 원자 길이의 선형 비-뉴클레오타이드 링커로 대체하였다.

- [0265] 리보자임 올리고뉴클레오타이드는 널리 공지된 방법 (예를 들어, PCT 공개 W09118624; W09413688; W09201806; 및 WO 92/07065; 및 미국 특허 5436143 및 5650502 참조)을 사용하여 제조될 수 있거나 또는 상업적 공급원 (예를 들어, 유에스 바이오케미칼스(US Biochemicals))으로부터 구입될 수 있고, 원하는 경우에, 세포에서 뉴클레아제에 의한 분해에 대한 올리고뉴클레오타이드의 저항성을 증가시키는 뉴클레오타이드 유사체를 혼입시킬 수 있다. 리보자임은 임의의 공지된 방식으로, 예를 들어 어플라이드 바이오시스템즈, 인크.(Applied Biosystems, Inc.) 또는 밀리겐(Milligen)에 의해 생산된 상업적으로 입수가능한 합성기를 사용하여 합성될 수 있다. 리보자임은 또한 통상적인 수단에 의해 재조합 벡터에서 생산될 수 있다. 문헌 [Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (Current edition)]을 참조한다. 리보자임 RNA 서열은 통상적으로, 예를 들어 RNA 폴리머라제, 예컨대 T7 또는 SP6을 사용하여 합성될 수 있다.
- [0266] n. 가이드 핵산
- [0267] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오타이드는 가이드 핵산, 예를 들어 가이드 RNA (gRNA) 분자이다. 일반적으로, 가이드 RNA는 (1) 핵산 프로그램가능한 DNA 결합 단백질 (napDNAbp), 예컨대 Cas9에 결합하는 스캐폴드 서열, 및 (2) gRNA가 결합하는 DNA 표적 서열 (예를 들어, 게놈 DNA 표적)을 정의하여 핵산 프로그램가능한 DNA 결합 단백질을 이러한 DNA 표적 서열에 근접하게 가져오는 뉴클레오타이드 스페이서 부분으로 구성된 짧은 합성 RNA이다. 일부 실시양태에서, napDNAbp는 핵산-프로그램가능한 단백질을 표적 DNA 서열 (예를 들어, 표적 게놈 DNA 서열)에 표적화하는 1개 이상의 RNA(들)와 복합체를 형성하는 (예를 들어, 그와 결합하거나 회합하는) 핵산-프로그램가능한 단백질이다. 일부 실시양태에서, 핵산-프로그램가능한 뉴클레아제는, RNA와의 복합체로 존재하는 경우에, 뉴클레아제:RNA 복합체로 지칭될 수 있다. 가이드 RNA는 2개 이상의 RNA의 복합체로서 또는 단일 RNA 분자로서 존재할 수 있다.
- [0268] 단일 RNA 분자로서 존재하는 가이드 RNA (gRNA)는 단일-가이드 RNA (sgRNA)로 지칭될 수 있으며, gRNA는 또한 단일 분자로서 또는 2개 이상의 분자의 복합체로서 존재하는 가이드 RNA를 지칭하는 것으로 사용된다. 전형적으로, 단일 RNA 종으로서 존재하는 gRNA는 다음 2개의 도메인: (1) 표적 핵산에 대한 상동성을 공유하는 (즉, 표적에 대한 Cas9 복합체의 결합을 지시하는) 도메인; 및 (2) Cas9 단백질에 결합하는 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 도메인 (2)는 tracrRNA로 공지된 서열에 상응하며, 스템-루프 구조를 포함한다. 일부 실시양태에서, 도메인 (2)는 문헌 [Jinek et al., Science 337:816-821 (2012)] (이의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 제공된 바와 같은 tracrRNA와 동일하거나 상동이다.
- [0269] 일부 실시양태에서, gRNA는 도메인 (1) 및 (2) 중 2개 이상을 포함하며, 연장된 gRNA로 지칭될 수 있다. 예를 들어, 연장된 gRNA는 본원에 기재된 바와 같이 2개 이상의 Cas9 단백질에 결합하고, 2개 이상의 별개의 영역에서 표적 핵산에 결합할 것이다. gRNA는 표적 부위에 상보적인 뉴클레오타이드 서열을 포함하며, 이는 상기 표적 부위에 대한 뉴클레아제/RNA 복합체의 결합을 매개하여, 뉴클레아제:RNA 복합체의 서열 특이성을 제공한다. 일부 실시양태에서, RNA-프로그램가능한 뉴클레아제는 (CRISPR-연관 시스템) Cas9 엔도뉴클레아제, 예를 들어 스트렙토코쿠스 피오게네스(*Streptococcus pyogenes*)로부터의 Cas9 (Csn1)이다 (예를 들어, 문헌 ["Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Ferretti J.J., McShan W.M., Ajdic D.J., Savic D.J., Savic G., Lyon K., Primeaux C., Sezate S., Suvorov A.N., Kenton S., Lai H.S., Lin S.P., Qian Y., Jia H.G., Najar F.Z., Ren Q., Zhu H., Song L., White J., Yuan X., Clifton S.W., Roe B.A., McLaughlin R.E., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 98:4658-4663 (2001); "CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III." Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E., Nature 471:602-607 (2011); 및 "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity." Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. Science 337:816-821 (2012)] 참조, 이들 문헌 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함됨).
- [0270] o. 다량체
- [0271] 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 링커에 의해 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드의 다량체 (예를 들어, 콘카테머)를 포함할 수 있다. 이러한 방식으로, 일부 실시양태에서, 복합체/접합체의 올리고뉴클레오타이드 로딩은 표적화제 상의 이용가능한 연결 부위 (예를 들어, 항체 상의 이용가능한 티올 부위)를 넘어 증가되거나 또는 달리 특정한 페이로드 로딩 함량을 달성하도록 조정될 수 있다. 다량체 내의 올리고뉴클레오타이드는 동일하거나 상이할 수 있다 (예를 들어, 상이한 유전자 또는 동일한 유전자 상의 상이한 부위 또는 그의 생성물을 표적화함).

- [0272] 일부 실시양태에서, 다량체는 절단가능한 링커에 의해 함께 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 그러나, 일부 실시양태에서, 다량체는 비-절단가능한 링커에 의해 함께 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 함께 연결된 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 또는 그 초과 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 함께 연결된 2 내지 5, 2 내지 10 또는 4 내지 20개의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다.
- [0273] 일부 실시양태에서, 다량체는 말단-대-말단 (선형 배열로) 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 올리고뉴클레오타이드 기반 링커 (예를 들어, 폴리-dT 링커, 무염기성 링커)를 통해 말단-대-말단 연결된 2개 이상의 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 한 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이 또 다른 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 연결된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 한 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단이 또 다른 올리고뉴클레오타이드의 3' 말단에 연결된 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 다량체는 한 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단이 또 다른 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단에 연결된 것을 포함한다. 또한, 일부 실시양태에서, 다량체는 분지화 링커에 의해 함께 연결된 다수의 올리고뉴클레오타이드를 포함하는 분지형 구조를 포함할 수 있다.
- [0274] 본원에 제공된 복합체에 사용될 수 있는 다량체의 추가의 예는, 예를 들어 2015년 11월 5일에 공개된 미국 특허 출원 번호 2015/0315588 A1 (발명의 명칭: Methods of delivering multiple targeting oligonucleotides to a cell using cleavable linkers); 2015년 9월 3일에 공개된 미국 특허 출원 번호 2015/0247141 A1 (발명의 명칭: Multimeric Oligonucleotide Compounds); 2011년 6월 30일에 공개된 미국 특허 출원 번호 US 2011/0158937 A1 (발명의 명칭: Immunostimulatory Oligonucleotide Multimers); 및 1997년 12월 2일에 허여된 미국 특허 번호 5,693,773 (발명의 명칭: Triplex-Forming Antisense Oligonucleotides Having Abasic Linkers Targeting Nucleic Acids Comprising Mixed Sequences Of Purines And Pyrimidines)에 개시되어 있으며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0275] ii. 소분자
- [0276] 임의의 적합한 소분자가 본원에 기재된 바와 같은 분자 페이로드로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 소분자는 2016년 2월 25일에 공개된 미국 특허 출원 공개 번호 20160051528 (발명의 명칭: "METHOD FOR TREATMENT OF POMPE DISEASE USING 1-DEOXYNOJIRIMYCIN DERIVATIVES")에 기재된 바와 같은 1-데옥시노지리마이신 (DNJ) 유도체, 예컨대 N-부틸-DNJ, N-메틸-DNJ 또는 N-시클로프로필메틸-DNJ이다. 일부 실시양태에서, 소분자 DNJ 유도체는 GAA의 활성을 증가시키는 분자 샤페론으로서 사용된다. 일부 실시양태에서, 비-억제성 산 알파-글루코시다제 샤페론 ML247 소분자는 문헌 [Marugan, et al., "Discovery, SAR, and Biological Evaluation of a Non-Inhibitory Chaperone for Acid Alpha Glucosidase," published in Probe Reports from NIH Molecular Libraries in December 2011]에서와 같이 이용된다. 예를 들어, 소분자 샤페론 ML247은 PD-연관 GAA 대립유전자 또는 야생형 GAA 대립유전자의 활성을 증가시키는데 이용된다. 상기 열거된 이들 공개 각각의 내용은 그 전문이 본원에 포함된다.
- [0277] iii. 펩티드/단백질
- [0278] 임의의 적합한 펩티드 또는 단백질이 본원에 기재된 바와 같은 분자 페이로드로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단백질은 효소 (예를 들어, GAA 유전자에 의해 코딩되는 바와 같은, 예를 들어 산 알파-글루코시다제)이다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드는 2016년 12월 1일에 공개된 미국 특허 출원 공개 번호 20160346363 (발명의 명칭: "METHODS AND ORAL FORMULATIONS FOR ENZYME REPLACEMENT THERAPY OF HUMAN LYSOSOMAL AND METABOLIC DISEASES"), 2016년 9월 29일에 공개된 미국 특허 출원 공개 번호 20160279254 (발명의 명칭: "METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE'S DISEASE") 또는 2013년 9월 19일에 공개된 미국 특허 출원 공개 번호 20130243746 (발명의 명칭: "METHODS AND MATERIALS FOR TREATMENT OF POMPE'S DISEASE")에서와 같은 단백질 또는 효소, 예컨대 산 알파-글루코시다제 또는 야생형 GAA 단백질 또는 그의 활성 단편이다. 일부 실시양태에서, 산 알파-글루코시다제 또는 야생형 GAA 단백질은 대상체의 GAA 활성을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 산 알파-글루코시다제 또는 야생형 GAA 단백질은 GAA 유전자에 의해 코딩된다.
- [0279] NCBI 서열 XP_005257251.1 (리소솜 알파-글루코시다제 이소형 X1)에 상응하는 예시적인 인간 야생형 GAA 단백질 서열은 하기와 같다:

MGVRHPPCSHRLAVCALVSLATAALLGHILLHDFLLVPRELSGSSPVLEETHPAHQQG
ASRPGPRDAQAHPGRPRAVPTQCDVPPNSRFDCAPDKAITQEACEARGCCYIPAKQGLQ
GAQMGPWCFFPPSYPSYKLENLSSEMGTATLTRTTPTFFPKDILTRLDDVMMETEN
RLHFTIKDPANRRYEVPLETPHVHSRAPSPLYSVEFSEEPFGVIVRRQLDGRVLLNTTVA
PLFFADQFLQLSTSLPSQYITGLAEHLSPLMLSTSWTRITLWNRDLAPTPGANLYGSHPF
YLALEDGGSAGHVFLLSNAMDVVLQPSALSWRSTGGILDVYIFLGPEPKSVVQQYL
DVVGYPFMPYWGGLGFHLCRWGYSSAITRQVVENMTRAHFPLDVQWNDLDYMDSR
RDFTFNKDGFRDFPAMVQELHQGGRRYMMIVDPAISSSGPAGSYRPHYDEGLRRGVFITN
ETGQPLIGKVWPGSTAFPDFTNPTALAWWEDMVAEFHDQVPFDGMWIDMNEPSNFIRG
SEDGCPNNELENPPYVPGVVGGLTQAATICASSHQFLSTHYNLHNLGLTEAIAASHRAL
VKARGTRPFVISRSTFAGHGRYAGHWTGDVWSSWEQLASSVPEILQFNLLGVPLVGAD
VCGFLGNTSEELCVRWTQLGAFYPFMRNHNLSLSPQEPYSFSEPAQQAMRKALTRY
ALLPHLYTLFHQAHVAGETVARPLFLEFPKDSSTWTVDHQLLWGEALLITPVLQAGKA
EVTGYFPLGTWYDLQTVPEALGSLPPPPAAPREPAIHSEGQWVTLPAPLDTINVHLRA
GYIPLQGPGLTTTESRQQPMALAVALTGGGEARGELFWDDGESLEVLERGAYTQVIFL
ARNNTIVNELVRVTSEGAGLQLQKVTVLGVATAPQQVLSNGVPVSNFTYSPDTKVLDIC
VSLLMGEQFLVSWC

[0280]

[0281]

iv. 핵산 구축물

[0282]

임의의 적합한 유전자 발현 구축물이 본원에 기재된 바와 같은 분자 페이로드로서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 벡터 또는 cDNA 단편일 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 메신저 RNA (mRNA)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 mRNA는, 예를 들어 2014년 4월 24일에 허여된 미국 특허 8,710,200 (발명의 명칭: "Engineered nucleic acids encoding a modified erythropoietin and their expression")에 기재된 바와 같은 변형된 mRNA일 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 5' 메틸 캡을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, mRNA는 임의로 160개 이하의 뉴클레오타이드 길이의 폴리A 테일을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 근육 세포의 핵 내에서 발현, 예를 들어 과다발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 적어도 1개의 아연 핑거를 포함하는 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 야생형 GAA 단백질을 코딩한다. 일부 실시양태에서, 유전자 발현 구축물은 유전자 편집 효소를 코딩한다. 분자 페이로드로서 사용될 수 있는 핵산 구축물의 추가의 예는 2017년 9월 19일에 공개된 국제 특허 출원 공개 WO2017152149A1 (발명의 명칭: "CLOSED-ENDED LINEAR DUPLEX DNA FOR NON-VIRAL GENE TRANSFER"); 2014년 10월 7일에 허여된 미국 특허 8,853,377B2 (발명의 명칭: "MRNA FOR USE IN TREATMENT OF HUMAN GENETIC DISEASES"); 및 2014년 9월 2일에 허여된 미국 특허 US8822663B2 (발명의 명칭: "ENGINEERED NUCLEIC ACIDS AND METHODS OF USE THEREOF")에 제공되어 있으며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0283]

C. 링커

[0284]

본원에 기재된 복합체는 일반적으로 근육-표적화제를 분자 페이로드에 연결하는 링커를 포함한다. 링커는 적어도 1개의 공유 결합을 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 근육-표적화제를 분자 페이로드에 연결하는 단일 결합, 예를 들어 디설피드 결합 또는 디설피드 가교일 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 링커는 다수의 공유 결합을 통해 근육-표적화제를 분자 페이로드에 연결시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 절단가능한 링커일 수 있다. 그러나, 일부 실시양태에서, 링커는 비-절단가능한 링커일 수 있다. 링커는 일반적으로 시험관내 및 생체내에서 안정하고, 특정 세포 환경에서 안정할 수 있다. 추가적으로, 일반적으로 링커는 근육-표적화제 또는 분자 페이로드의 기능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않는다. 링커의 합성의 예 및 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Kline, T. et al. "Methods to Make Homogenous Antibody Drug Conjugates." Pharmaceutical Research, 2015, 32:11, 3480-3493.; Jain, N. et al. "Current ADC Linker Chemistry" Pharm Res. 2015, 32:11, 3526-3540.; McCombs, J.R. and Owen, S.C. "Antibody Drug Conjugates: Design and Selection of Linker, Payload and Conjugation Chemistry" AAPS J. 2015, 17:2, 339-351.] 참조).

[0285] 링커에 대한 전구체는 전형적으로 근육-표적화제 및 분자 페이로드 둘 다에 대한 부착을 가능하게 하는 2종의 상이한 반응성 종을 함유할 것이다. 일부 실시양태에서, 2종의 상이한 반응성 종은 친핵체 및/또는 친전자체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 근육-표적화제의 리신 잔기 또는 시스테인 잔기에 대한 접합을 통해 근육-표적화제에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 말레이미드-함유 링커를 통해 근육-표적화제의 시스테인 잔기에 연결되며, 여기서 임의로 말레이미드-함유 링커는 말레이미도카프로일 또는 말레이미도메틸 시클로헥산-1-카르복실레이트 기를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 3-아릴프로피오닐 관능기를 통해 근육-표적화제 또는 티올 관능화된 분자 페이로드의 시스테인 잔기에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아마이드 결합, 히드라지드, 트리아졸, 티오에테르 또는 디설피드 결합을 통해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다.

[0286] i. 절단가능한 링커

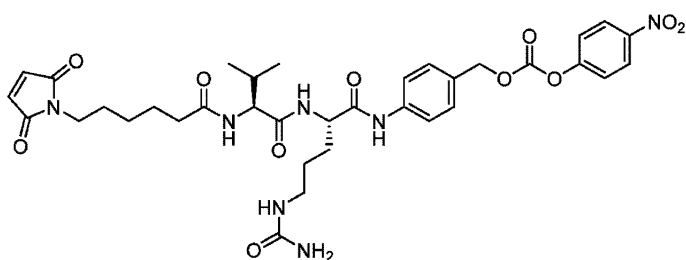
[0287] 절단가능한 링커는 프로테아제-감수성 링커, pH-감수성 링커 또는 글루타티온-감수성 링커일 수 있다. 이들 링커는 일반적으로 세포내에서만 절단가능하고, 바람직하게는 세포외 환경, 예를 들어 근육 세포에 대한 세포외 환경에서 안정하다.

[0288] 프로테아제-감수성 링커는 프로테아제 효소적 활성에 의해 절단가능하다. 이들 링커는 전형적으로 펩티드 서열을 포함하고, 2-10개 아미노산, 약 2-5개 아미노산, 약 5-10개 아미노산, 약 10개 아미노산, 약 5개 아미노산, 약 3개 아미노산 또는 약 2개 아미노산 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 펩티드 서열은 자연 발생 아미노산, 예를 들어 시스테인, 알라닌, 또는 비-자연 발생 또는 변형된 아미노산을 포함할 수 있다. 비-자연 발생 아미노산은 β -아미노산, 호모-아미노산, 프롤린 유도체, 3-치환된 알라닌 유도체, 선형 코어 아미노산, N-메틸 아미노산 및 관련 기술분야에 공지된 다른 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-감수성 링커는 발린-시트룰린 또는 알라닌-시트룰린 디펩티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로테아제-감수성 링커는 리소솜 프로테아제, 예를 들어 카텝신 B 및/또는 엔도솜 프로테아제에 의해 절단될 수 있다.

[0289] pH-감수성 링커는 높은 또는 낮은 pH 환경에서 용이하게 분해되는 공유 연결이다. 일부 실시양태에서, pH-감수성 링커는 4 내지 6의 범위의 pH에서 절단될 수 있다. 일부 실시양태에서, pH-감수성 링커는 히드라존 또는 시클릭 아세탈을 포함한다. 일부 실시양태에서, pH-감수성 링커는 엔도솜 또는 리소솜 내에서 절단된다.

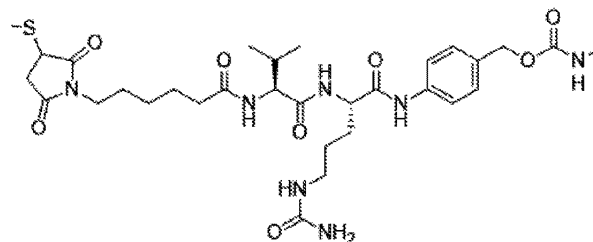
[0290] 일부 실시양태에서, 글루타티온-감수성 링커는 디설피드 모이어티를 포함한다. 일부 실시양태에서, 글루타티온-감수성 링커는 세포 내부의 글루타티온 종과의 디설피드 교환 반응에 의해 절단된다. 일부 실시양태에서, 디설피드 모이어티는 적어도 1개의 아미노산, 예를 들어 시스테인 잔기를 추가로 포함한다.

[0291] 일부 실시양태에서, 링커는 Val-cit 링커이다 (예를 들어, 본원에 참조로 포함된 미국 특허 6,214,345에 기재된 바와 같음). 일부 실시양태에서, 접합 전에, val-cit 링커는 하기의 구조를 갖는다:



[0292]

[0293] 일부 실시양태에서, 접합 후에, val-cit 링커는 하기의 구조를 갖는다:



[0294]

[0295] ii. 비-절단가능한 링커

- [0296] 일부 실시양태에서, 비-절단가능한 링커가 사용될 수 있다. 일반적으로, 비-절단가능한 링커는 세포 또는 생리학적 환경에서 용이하게 분해될 수 없다. 일부 실시양태에서, 비-절단가능한 링커는 임의로 치환된 알킬 기를 포함하며, 여기서 치환은 할로젠, 히드록실 기, 산소 중 및 다른 통상의 치환을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 임의로 치환된 알킬, 임의로 치환된 알킬렌, 임의로 치환된 아릴렌, 헤테로아릴렌, 적어도 1개의 비-천원 아미노산을 포함하는 펩티드 서열, 말단절단된 글리칸, 효소적으로 분해될 수 없는 당 또는 당들, 아지드, 알킨-아지드, LPXT 서열을 포함하는 펩티드 서열, 티오에테르, 비오틴, 비페닐, 폴리에틸렌 글리콜의 반복 단위 또는 등가 화합물, 산 에스테르, 산 아마이드, 술폰아미드 및/또는 알콕시-아민 링커를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 소르타제-매개된 라이게이션을 이용하여 LPXT 서열을 포함하는 근육-표적화제를 (G)_n 서열을 포함하는 분자 페이로드에 공유 연결시킬 것이다 (예를 들어, 문헌 [Proft T. Sortase-mediated protein ligation: an emerging biotechnology tool for protein modification and immobilization. *Biotechnol Lett.* 2010, 32(1):1-10.] 참조).
- [0297] 일부 실시양태에서, 링커는 치환된 알킬렌, 임의로 치환된 알케닐렌, 임의로 치환된 알키닐렌, 임의로 치환된 시클로알킬렌, 임의로 치환된 시클로알케닐렌, 임의로 치환된 아릴렌, N, O 및 S로부터 선택된 적어도 1개의 헤테로원자를 추가로 포함하는 임의로 치환된 헤테로아릴렌; N, O 및 S로부터 선택된 적어도 1개의 헤테로원자를 추가로 포함하는 임의로 치환된 헤테로시클릴렌; 이미노, 임의로 치환된 질소 중, 임의로 치환된 산소 중 O, 임의로 치환된 황 중, 또는 폴리(알킬렌 옥사이드), 예를 들어 폴리에틸렌 옥사이드 또는 폴리프로필렌 옥사이드를 포함할 수 있다.
- [0298] iii. 링커 접합
- [0299] 일부 실시양태에서, 링커는 포스페이트, 티오에테르, 에테르, 탄소-탄소 또는 아마이드 결합을 통해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 포스페이트 또는 포스포로티오에이트 기, 예를 들어 올리고뉴클레오타이드 백본의 말단 포스페이트를 통해 올리고뉴클레오타이드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 근육-표적화제 상에 존재하는 리신 또는 시스테인 잔기를 통해 근육-표적화제, 예를 들어 항체에 연결된다.
- [0300] 일부 실시양태에서, 링커는 아지드와 알킨 사이의 고리화첨가 반응으로 트리아졸을 형성하는 것에 의해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결되며, 여기서 아지드 및 알킨은 근육-표적화제, 분자 페이로드 또는 링커 상에 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 알킨은 시클릭 알킨, 예를 들어 시클로옥타인일 수 있다. 일부 실시양태에서, 알킨은 비시클로노닌 (비시클로[6.1.0]노닌 또는 BCN으로도 공지됨) 또는 치환된 비시클로노닌일 수 있다. 일부 실시양태에서, 시클로옥탄은 2011년 11월 3일에 공개된 국제 특허 출원 공개 W02011136645 (발명의 명칭: "Fused Cyclooctyne Compounds And Their Use In Metal-free Click Reactions")에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 아지드는 아지드를 포함하는 당 또는 탄수화물 분자일 수 있다. 일부 실시양태에서, 아지드는 6-아지도-6-데옥시갈락토스 또는 6-아지도-N-아세틸갈락토사민일 수 있다. 일부 실시양태에서, 아지드를 포함하는 당 또는 탄수화물 분자는 2016년 10월 27일에 공개된 국제 특허 출원 공개 W02016170186 (발명의 명칭: "Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase")에 기재된 바와 같다. 일부 실시양태에서, 아지드와 알킨 사이의 고리화첨가 반응으로 트리아졸을 형성하며, 여기서 아지드 및 알킨은 근육-표적화제, 분자 페이로드 또는 링커 상에 위치할 수 있다는 것은 2014년 5월 1일에 공개된 국제 특허 출원 공개 W02014065661 (발명의 명칭: "Modified antibody, antibody-conjugate and process for the preparation thereof"); 또는 2016년 10월 27일에 공개된 국제 특허 출원 공개 W02016170186 (발명의 명칭: "Process For The Modification Of A Glycoprotein Using A Glycosyltransferase That Is Or Is Derived From A β (1,4)-N-Acetylgalactosaminyltransferase")에 기재된 바와 같다.
- [0301] 일부 실시양태에서, 링커는 스페이서, 예를 들어 폴리에틸렌 글리콜 스페이서 또는 아실/카르보모일 술폰아미드 스페이서, 예를 들어 히드라스페이스(HydraSpace)TM 스페이서를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 스페이서는 문헌 [Verkade, J.M.M. et al., "A Polar Sulfamide Spacer Significantly Enhances the Manufacturability, Stability, and Therapeutic Index of Antibody-Drug Conjugates", *Antibodies*, 2018, 7, 12]에 기재된 바와 같다.
- [0302] 일부 실시양태에서, 링커는 친디엔체와 디엔/헤테로-디엔 사이의 딜스-알더 반응에 의해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결되며, 여기서 친디엔체 및 디엔/헤테로-디엔은 근육-표적화제, 분자 페이로드 또는 링커 상에 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 다른 페리시클릭 반응, 예를 들어 엔 반응에 의해 근육-표적

화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 아마이드, 티오아미드 또는 술폰아미드 결합 반응에 의해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 축합 반응으로 링커와 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드 사이에 존재하는 옥심, 히드라존 또는 세미카르바지드 기를 형성하는 것에 의해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다.

[0303]

일부 실시양태에서, 링커는 친핵체, 예를 들어 아민 또는 히드록실 기와 친전자체, 예를 들어 카르복실산 또는 알데히드 사이의 공액 첨가 반응에 의해 근육-표적화제 및/또는 분자 페이로드에 연결된다. 일부 실시양태에서, 친핵체는 링커 상에 존재할 수 있고, 친전자체는 링커와 근육-표적화제 또는 분자 페이로드 사이의 반응 전 근육-표적화제 또는 분자 페이로드 상에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친전자체는 링커 상에 존재할 수 있고, 친핵체는 링커와 근육-표적화제 또는 분자 페이로드 사이의 반응 전 근육-표적화제 또는 분자 페이로드 상에 존재할 수 있다. 일부 실시양태에서, 친전자체는 아지드, 규소 중심, 카르보닐, 카르복실산, 무수물, 이소시아네이트, 티오이소시아네이트, 숙신이미딜 에스테르, 술포숙신이미딜 에스테르, 말레이미드, 알킬 할라이드, 알킬 슈도할라이드, 에폭시드, 에피술피드, 아지리딘, 아릴, 활성화된 인 중심 및/또는 활성화된 황 중심일 수 있다. 일부 실시양태에서, 친핵체는 임의로 치환된 알켄, 임의로 치환된 알킨, 임의로 치환된 아릴, 임의로 치환된 헤테로시클릴, 히드록실 기, 아미노 기, 알킬아미노 기, 아닐리도 기 또는 티올 기일 수 있다.

[0304]

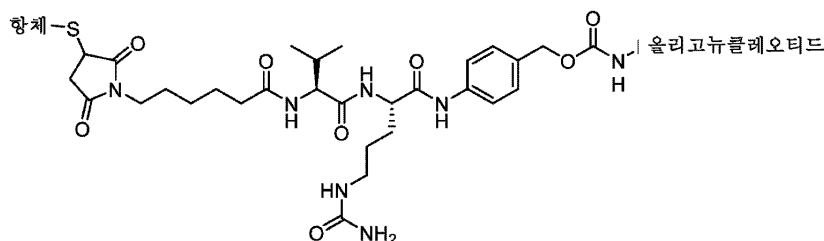
D. 항체-분자 페이로드 복합체의 예

[0305]

본 개시내용의 다른 측면은 본원에 기재된 임의의 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)에 공유 연결된 본원에 기재된 어느 하나의 근육 표적화제 (예를 들어, 트랜스페린 수용체 항체)를 포함하는 복합체를 제공한다. 일부 실시양태에서, 근육 표적화제 (예를 들어, 트랜스페린 수용체 항체)는 링커를 통해 분자 페이로드 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드)에 공유 연결된다. 본원에 기재된 임의의 링커가 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커는 항체에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

[0306]

Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하는 복합체의 예시적인 구조가 하기에 제공되며:



[0307]

[0308]

여기서 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 링커는 항체에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

[0309]

항체는 올리고뉴클레오타이드에 약물 대 항체 비 (DAR) (여기서 "약물"은 올리고뉴클레오타이드임)로 지칭될 수 있는 특성인 상이한 화학량론으로 연결될 수 있는 것으로 인지되어야 한다. 일부 실시양태에서, 1개의 올리고뉴클레오타이드가 항체에 연결된다 (DAR = 1). 일부 실시양태에서, 2개의 올리고뉴클레오타이드가 항체에 연결된다 (DAR = 2). 일부 실시양태에서, 3개의 올리고뉴클레오타이드가 항체에 연결된다 (DAR = 3). 일부 실시양태에서, 4개의 올리고뉴클레오타이드가 항체에 연결된다 (DAR = 4). 일부 실시양태에서, 각각 상이한 DAR을 갖는 상이한 복합체의 혼합물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 이러한 혼합물 중 복합체의 평균 DAR은 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5 또는 그 초과인 범위일 수 있다. DAR은 올리고뉴클레오타이드를 항체 상의 상이한 부위에 접합시킴으로써 및/또는 다량체를 항체 상의 1개 이상의 부위에 접합시킴으로써 증가될 수 있다. 예를 들어, DAR 2는 단일 올리고뉴클레오타이드를 항체 상의 2개의 상이한 부위에 접합시킴으로써 또는 이량체 올리고뉴클레오타이드를 항체의 단일 부위에 접합시킴으로써 달성될 수 있다.

[0310]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링

커 (예를 들어, Val-cit 링커)는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결된다. 일부 실시양태에서, 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

[0311] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및 표 1.1에 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3과 동일한 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다.

[0312] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함한다.

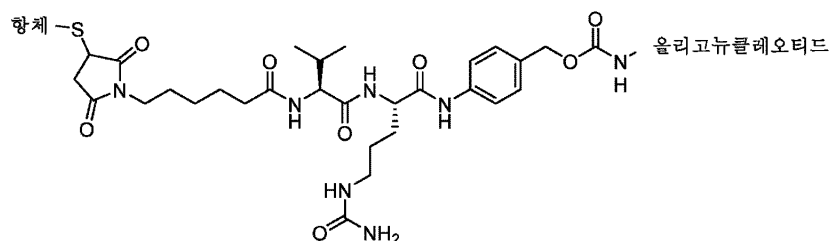
[0313] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

[0314] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및 표 1.1에 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3과 동일한 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함한다.

[0315] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함한다.

[0316] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 링커 (예를 들어, Val-cit 링커)를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함한다.

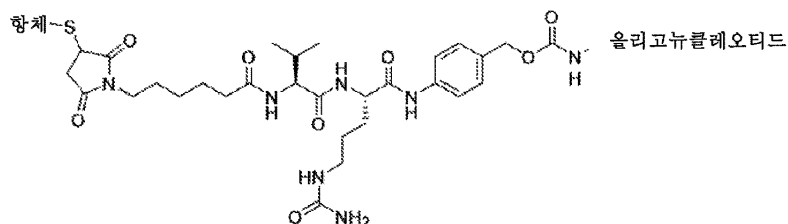
[0317] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 표 1.1에 제시된 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3과 동일한 CDR-H1, CDR-H2 및 CDR-H3; 및 표 1.1에 제시된 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3과 동일한 CDR-L1, CDR-L2 및 CDR-L3을 포함하고, 여기서 복합체는 하기의 구조를 포함하고:



[0318]

[0319] 여기서 링커 Val-cit 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 Val-cit 링커는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

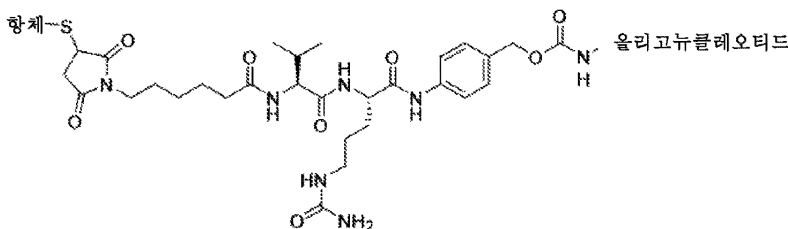
- [0320] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 33의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 34의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하고, 여기서 복합체는 하기의 구조를 포함하고:



[0321]

- [0322] 여기서 링커 Val-cit 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 Val-cit 링커는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

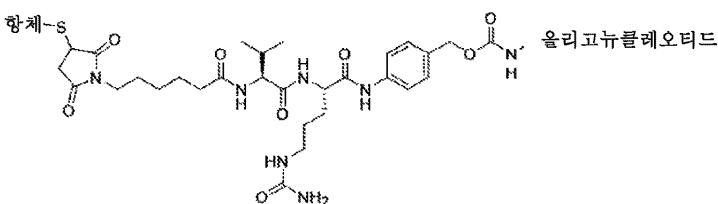
- [0323] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 35의 아미노산 서열을 갖는 VH 및 서열식별번호: 36의 아미노산 서열을 갖는 VL을 포함하고, 여기서 복합체는 하기의 구조를 포함하고:



[0324]

- [0325] 여기서 링커 Val-cit 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 Val-cit 링커는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

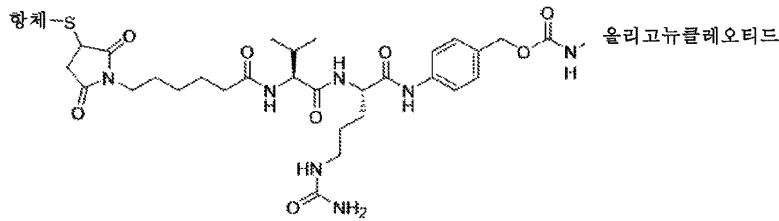
- [0326] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 39의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 40의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하고, 여기서 복합체는 하기의 구조를 포함하고:



[0327]

- [0328] 여기서 링커 Val-cit 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 Val-cit 링커는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

- [0329] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 복합체는 Val-cit 링커를 통해 올리고뉴클레오타이드에 공유 연결된 트랜스페린 수용체 항체를 포함하며, 여기서 트랜스페린 수용체 항체는 서열식별번호: 41의 아미노산 서열을 갖는 중쇄 및 서열식별번호: 42의 아미노산 서열을 갖는 경쇄를 포함하고, 여기서 복합체는 하기의 구조를 포함하고:



[0330]

[0331]

여기서 링커 Val-cit 링커는 올리고뉴클레오타이드의 5' 말단, 3' 말단 또는 내부에 연결되고, 여기서 Val-cit 링커는 항체 (예를 들어, 본원에 기재된 바와 같은 항체 또는 그의 임의의 변이체)에 티올-반응성 연결을 통해 (예를 들어, 항체 내의 시스테인을 통해) 연결된다.

[0332]

III. 제제

[0333]

본원에 제공된 복합체는 임의의 적합한 방식으로 제제화될 수 있다. 일반적으로, 본원에 제공된 복합체는 제약 용도에 적합한 방식으로 제제화된다. 예를 들어, 복합체는 분해를 최소화하거나, 전달 및/또는 흡수를 용이하게 하거나, 또는 제제 내의 복합체에 또 다른 유익한 특성을 제공하는 제제를 사용하여 대상체에게 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합체 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 이러한 조성물은 대상체에게 투여되는 경우에 표적 세포의 바로 옆 환경으로 또는 전신으로, 충분한 양의 복합체가 표적 근육 세포에 진입하도록 적합하게 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 복합체는 완충제 용액, 예컨대 포스페이트-완충 염수 용액, 리포솜, 미셀 구조 및 캡시드 중에 제제화된다.

[0334]

일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 제공된 복합체의 1종 이상의 성분 (예를 들어, 근육-표적화제, 링커, 분자 페이로드 또는 이들 중 어느 하나의 전구체 분자)을 개별적으로 포함할 수 있다는 것이 인지되어야 한다.

[0335]

일부 실시양태에서, 복합체는 물 또는 수용액 (예를 들어, pH 조절이 동반된 물) 중에 제제화된다. 일부 실시양태에서, 복합체는 염기성 완충 수용액 (예를 들어, PBS) 중에 제제화된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 바와 같은 제제는 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 조성물에 활성 성분의 개선된 안정성, 개선된 흡수, 개선된 용해도 및/또는 치료 증진을 부여한다. 일부 실시양태에서, 부형제는 완충제 (예를 들어, 시트르산나트륨, 인산나트륨, 트리스 염기 또는 수산화나트륨) 또는 비히클 (예를 들어, 완충 용액, 페트롤라툼, 디메틸 술폭시드 또는 미네랄 오일)이다.

[0336]

일부 실시양태에서, 복합체 또는 그의 성분 (예를 들어, 올리고뉴클레오타이드 또는 항체)은 그의 보관 수명을 연장시키기 위해 동결건조된 다음, 사용 (예를 들어, 대상체에 대한 투여) 전에 용액으로 만들어진다. 따라서, 본원에 기재된 복합체 또는 그의 성분을 포함하는 조성물 중 부형제는 동결건조보호제 (예를 들어, 만니톨, 락토스, 폴리에틸렌 글리콜 또는 폴리비닐 피롤리돈) 또는 붕괴 온도 조절제 (예를 들어, 텍스트란, 피콜 또는 젤라틴)일 수 있다.

[0337]

일부 실시양태에서, 제약 조성물은 의도된 투여 경로에 적합하도록 제제화된다. 투여 경로의 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 피내, 피하 투여를 포함한다. 전형적으로, 투여 경로는 정맥내 또는 피하이다.

[0338]

주사가능한 용도에 적합한 제약 조성물은 멸균 수용액 (수용성인 경우) 또는 분산액 및 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 일부 실시양태에서, 제제는 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨 및 염화나트륨을 포함한다. 멸균 주사가능한 용액은 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 선택된 용매 중에 필요한 양의 복합체를 혼입시킨 후 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다.

[0339]

일부 실시양태에서, 조성물은 적어도 약 0.1% 또는 그 초과인 복합체 또는 그의 성분을 함유할 수 있으며, 활성 성분(들)의 백분율은 총 조성물의 중량 또는 부피의 약 1% 내지 약 80% 또는 그 초과일 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여 경로, 생성물 보관 수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 이러한 제약 제제를 제조하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고려될 것이고, 따라서 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0340]

IV. 사용 / 치료 방법

[0341]

본원에 기재된 바와 같은 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체는 폼페병을 치료하는

데 효과적이다. 일부 실시양태에서, 폼페병은 PD와 연관된 돌연변이를 포함하는 GAA 대립유전자와 연관된다.

- [0342] 일부 실시양태에서, 대상체는 인간 대상체, 비-인간 영장류 대상체, 설치류 대상체 또는 임의의 적합한 포유동물 대상체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 근긴장성 이영양증을 가질 수 있다. 일부 실시양태에서, 대상체는 리소솜 내의 글리코겐의 독성 축적을 갖는다. 일부 실시양태에서, 폼페병을 갖는 대상체는 현재 효소 대체 요법을 받고 있거나 또는 이전에 받은 적이 있다.
- [0343] 본 개시내용의 한 측면은 대상체에게 유효량의 본원에 기재된 바와 같은 복합체를 투여하는 것을 포함하는 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물의 유효량이 치료를 필요로 하는 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 복합체를 포함하는 제약 조성물은 정맥내 투여를 포함할 수 있는 적합한 경로에 의해, 예를 들어 볼루스로서 또는 일정 기간에 걸친 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 정맥내 투여는 근육내, 복강내, 뇌척수내, 피하, 관절내, 활막내 또는 척수강내 경로에 의해 수행될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 고체 형태, 수성 형태 또는 액체 형태일 수 있다. 일부 실시양태에서, 수성 또는 액체 형태는 네블라이징되거나 동결건조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 네블라이징 또는 동결건조 형태는 수성 또는 액체 용액으로 재구성될 수 있다.
- [0344] 정맥내 투여를 위한 조성물은 다양한 담체, 예컨대 식물성 오일, 디메틸아세트아미드, 디메틸포름아미드, 에틸 락테이트, 에틸 카르보네이트, 이소프로필 미리스테이트, 에탄올 및 폴리올 (글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등)을 함유할 수 있다. 정맥내 주사의 경우, 수용성 항체가 점적 방법에 의해 투여될 수 있고, 이에 의해 항체 및 생리학상 허용되는 부형제를 함유하는 제약 제제가 주입된다. 생리학상 허용되는 부형제는, 예를 들어 5% 텍스트로스, 0.9% 염수, 링거액 또는 다른 적합한 부형제를 포함할 수 있다. 근육내 제제, 예를 들어 항체의 적합한 가용성 염 형태의 멸균 제제는 제약 부형제, 예컨대 주사용수, 0.9% 염수 또는 5% 글루코스 용액 중에 용해되어 투여될 수 있다.
- [0345] 일부 실시양태에서, 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물은 부위-특이적 또는 국부 전달 기술을 통해 투여된다. 이들 기술의 예는 복합체의 이식가능한 데포 공급원, 국부 전달 카테터, 부위 특이적 담체, 직접 주사 또는 직접 적용을 포함한다.
- [0346] 일부 실시양태에서, 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물은 대상체에 대해 치료 효과를 부여하는 유효 농도로 투여된다. 유효량은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인식되는 바와 같이, 질환의 중증도, 치료될 대상체의 고유한 특징, 예를 들어 연령, 신체 상태, 건강 또는 체중, 치료 지속기간, 임의의 공동 요법의 성질, 투여 경로 및 관련 인자에 따라 달라진다. 이들 관련 인자는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 단지 상용에 지나지 않는 실험으로 다루어질 수 있다. 일부 실시양태에서, 유효 농도는 환자에게 안전한 것으로 간주되는 최대 용량이다. 일부 실시양태에서, 유효 농도는 최대 효능을 제공하는 최저 가능한 농도일 것이다.
- [0347] 경험적 고려사항, 예를 들어 대상체에서의 복합체의 반감기는 일반적으로 치료에 사용되는 제약 조성물의 농도의 결정에 기여할 것이다. 투여 빈도는 치료 효능을 최대화하기 위해 실험적으로 결정되고 조정될 수 있다.
- [0348] 일반적으로, 본원에 기재된 임의의 복합체의 투여를 위해, 초기 후보 투여량은 상기 기재된 인자, 예를 들어 안전성 또는 효능에 따라 약 1 내지 100 mg/kg 또는 그 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료는 1회 투여될 것이다. 일부 실시양태에서, 치료는 매일, 격주, 매주, 격월, 매월 또는 대상체에 대한 안전성 위험을 최소화 하면서 최대 효능을 제공하는 임의의 시간 간격으로 투여될 것이다. 일반적으로, 효능 및 치료 및 안전성 위험은 치료 과정 전반에 걸쳐 모니터링될 수 있다.
- [0349] 치료 효능은 임의의 적합한 방법을 사용하여 평가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 효능은 진행성 근육 약화 및 호흡 문제를 포함한 폼페병과 연관된 증상에 대한 관찰의 평가에 의해 평가될 수 있다.
- [0350] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물은 표적 유전자의 활성 또는 발현을 대조군, 예를 들어 치료 전의 유전자 발현의 기준선 수준에 비해 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%에 대해 적어도 80%, 적어도 90% 또는 적어도 95%만큼 억제하는데 충분한 유효 농도로 대상체에게 투여된다.
- [0351] 일부 실시양태에서, 대상체에 대한 본원에 기재된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물의 단일 용량 또는 투여는 표적 유전자의 활성 또는 발현을 적어도 1-5, 1-10, 5-15, 10-20, 15-30, 20-40, 25-50일 또는 그 초과 동안 억제하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 대상체에 대한 본

원에 기재된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물의 단일 용량 또는 투여는 표적 유전자의 활성 또는 발현을 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12주 동안 억제하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 대상체에 대한 본원에 기재된 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 복합체를 포함하는 제약 조성물의 단일 용량 또는 투여는 표적 유전자의 활성 또는 발현을 적어도 1, 2, 3, 4, 5 또는 6개월 동안 억제하는데 충분하다.

[0352] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 분자 페이로드에 공유 연결된 근육-표적화제를 포함하는 1종 초과와 복합체를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 대상체, 예를 들어 폼페병을 갖는 인간 대상체의 치료를 위한 임의의 다른 적합한 치료제를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다른 치료제는 본원에 기재된 복합체의 유효성을 증진 또는 보충할 수 있다. 일부 실시양태에서, 다른 치료제는 본원에 기재된 복합체와 상이한 증상 또는 질환을 치료하는 기능을 할 수 있다.

[0353] 실시예

[0354] 실시예 1: 형질감염된 안티센스 올리고뉴클레오타이드에 의한 HPRT 표적화

[0355] 하이포크산틴 포스포리보실트랜스퍼라제 (HPRT)를 표적화하는 siRNA를 불멸화 세포주에서 HPRT의 발현 수준을 감소시키는 그의 능력에 대해 시험관내 시험하였다. 간략하게, Hepa 1-6 세포를 리포펙타민 2000과 함께 제제화된 대조군 siRNA (siCTRL; 100 nM) 또는 HPRT를 표적화하는 siRNA (siHPRT; 100 nM)로 형질감염시켰다. 형질감염 48시간 후에 HPRT 발현 수준을 평가하였다. 비히클 (포스페이트-완충 염수)을 배양물 중 Hepa 1-6 세포로 전달하고 세포를 48시간 동안 유지하는 대조군 실험을 또한 수행하였다. 도 1에 제시된 바와 같이, HPRT siRNA는 HPRT 발현 수준을 대조군과 비교하여 ~90%만큼 감소시킨 것으로 밝혀졌다.

[0356] 표 2. siHPRT 및 siCTRL의 서열

	서열
siHPRT 센스 가닥	5'-UcCuAuGaCuGuAgAuUuUaU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
siHPRT 안티센스 가닥	5'-paUaAaAuCuAcAgUcAuAgGasAsu-3'
siCTRL 센스 가닥	5'-UgUaAuAaCcAuAuCuAcCuU-(CH ₂) ₆ NH ₂ -3'
siCTRL 안티센스 가닥	5'-aAgGuAgAuAuGgUuUaUaCasAsa-3'

[0357]

[0358] *소문자 - 2'Ome 리보스; 대문자 - 2'플루오로 리보스; p - 포스페이트 연결; s - 포스포로티오에이트 연결

[0359] 실시예 2: 근육-표적화 복합체에 의한 HPRT 표적화

[0360] 항-트랜스페린 수용체 항체인 DTX-A-002에 비-절단가능한 N-감마-말레이미도부티릴-옥시숙신이미드 에스테르 (GMBS) 링커를 통해 공유 연결된 실시예 1에서 사용된 HPRT siRNA (siHPRT)를 포함하는 근육-표적화 복합체를 생성하였다.

[0361] 간략하게, GMBS 링커를 건조 DMSO 중에 용해시키고, 수성 조건 하에 아마이드 결합 형성을 통해 siHPRT의 센스 가닥의 3' 말단에 커플링시켰다. 반응 완결을 카이저 시험에 의해 확인하였다. 과량의 링커 및 유기 용매를 겔 투과 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 이어서, siHPRT의 정제된 말레이미드 관능화 센스 가닥을 마이클 첨가 반응을 사용하여 DTX-A-002 항체에 커플링시켰다.

[0362] 이어서, 항체 커플링 반응의 생성물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC-HPLC)에 적용하였다. DTX-A-002 항체에 공유 부착된 1 또는 2개의 siHPRT 분자를 포함하는 항TfR-siHPRT 복합체를 정제하였다. 밀도측정법은 정제된 복합체 샘플이 1.46의 평균 siHPRT 대 항체 비를 갖는다는 것을 확인시켜 주었다. SDS-PAGE 분석은 정제된 복합체 샘플의 >90%가 1 또는 2개의 siHPRT 분자에 연결된 DTX-A-002를 포함한다는 것을 입증하였다.

[0363] 상기 기재된 것과 동일한 방법을 사용하여, IgG2a (Fab) 항체 (DTX-A-003)에 GMBS 링커를 통해 공유 연결된 실시예 1에서 사용된 HPRT siRNA (siHPRT)를 포함하는 대조군 IgG2a-siHPRT 복합체를 생성하였다. 밀도측정법은 DTX-C-001이 1.46의 평균 siHPRT 대 항체 비를 갖는다는 것을 확인시켜 주었고, SDS-PAGE는 정제된 대조군 복합체 샘플의 >90%가 1 또는 2개의 siHPRT 분자에 연결된 DTX-A-003을 포함한다는 것을 입증하였다.

[0364] 이어서, 항TfR-siHPRT 복합체를 세포 내재화 및 세포 내 HPRT의 억제에 대해 시험하였다. 비교적 높은 발현 수준의 트랜스페린 수용체를 갖는 Hepa 1-6 세포를 비히클 (포스페이트-완충 염수), IgG2a-siHPRT (100 nM), 항

TfR-siCTRL (100 nM) 또는 항TfR-siHPRT (100 nM)의 존재 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 인큐베이션 후에, 세포를 단리하고, HPRT의 발현 수준에 대해 검정하였다 (도 2). 항TfR-siHPRT로 처리된 세포는 비히클 대조군으로 처리된 세포에 비해 ~50%만큼 HPRT 발현의 감소를 나타냈다. 한편, IgG2a-siHPRT 또는 항TfR-siCTRL 중 어느 하나로 처리된 세포는 비히클 대조군과 대등한 HPRT 발현 수준을 가졌다 (HPRT 발현의 감소 없음). 이들 데이터는 항TfR-siHPRT의 항-트랜스페린 수용체 항체가 복합체의 세포 내재화를 가능하게 함으로써 siHPRT가 HPRT의 발현을 억제하도록 한다는 것을 나타낸다.

[0365] 실시예 3: 근육-표적화 복합체에 의한 마우스 근육 조직에서의 HPRT 표적화

[0366] 실시예 2에 기재된 근육-표적화 복합체인 항TfR-siHPRT를 마우스 조직에서의 HPRT의 억제에 대해 시험하였다. C57BL/6 야생형 마우스에게 단일 용량의 비히클 대조군 (포스페이트-완충 염수); siHPRT (2 mg/kg의 RNA); IgG2a-siHPRT (2 mg/kg의 RNA, 9 mg/kg 항체 복합체에 상응함); 또는 항TfR-siHPRT (2 mg/kg의 RNA, 9 mg/kg 항체 복합체에 상응함)를 정맥내로 주사하였다. 각각의 실험 조건을 4마리의 개별 C57BL/6 야생형 마우스에서 반복하였다. 주사 후 3-일 기간 후에, 마우스를 안락사시키고, 단리된 조직 유형으로 절편화하였다. 개별 조직 샘플을 후속적으로 HPRT의 발현 수준에 대해 검정하였다 (도 3a-3b 및 4a-4e).

[0367] 항TfR-siHPRT 복합체로 처리된 마우스는 siHPRT 대조군으로 처리된 마우스에 비해 비복근 (31% 감소; $p < 0.05$) 및 심장 (30% 감소; $p < 0.05$)에서 HPRT 발현의 감소를 나타냈다 (도 3a-3b). 한편, IgG2a-siHPRT 복합체로 처리된 마우스는 모든 검정된 근육 조직 유형에 대해 siHPRT 대조군에 대등한 HPRT 발현 수준을 가졌다 (HPRT 발현의 감소가 거의 또는 전혀 없음).

[0368] 항TfR-siHPRT 복합체로 처리된 마우스는 비-근육 조직, 예컨대 뇌, 간, 폐, 신장 및 비장 조직에서 HPRT 발현의 변화를 나타내지 않았다 (도 4a-4e).

[0369] 이들 데이터는 항TfR-siHPRT 복합체의 항-트랜스페린 수용체 항체가 생체내 마우스 모델에서 근육-특이적 조직 내로의 복합체의 세포 내재화를 가능하게 함으로써 siHPRT가 HPRT의 발현을 억제하도록 한다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 본 개시내용의 항TfR-올리고뉴클레오타이드 복합체가 근육 조직을 특이적으로 표적화할 수 있다는 것을 추가로 입증한다.

[0370] 실시예 4: 근육-표적화 복합체에 의한 GYS1 표적화

[0371] 항-트랜스페린 수용체 항체인 DTX-A-002 (RI7 217 (Fab))에 카텝신 절단가능한 링커를 통해 공유 연결된 GYS1의 돌연변이 대립유전자를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (GYS1 ASO)를 포함하는 근육-표적화 복합체를 생성하였다.

[0372] 간략하게, 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-p-아미노벤질 알콜 p-니트로페닐 카르보네이트 (MC-Val-Cit-PABC-PNP) 링커 분자를 아미드 커플링 반응을 사용하여 $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-GYS1 ASO}$ 에 커플링시켰다. 과량의 링커 및 유기 용매를 겔 투과 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 이어서, 정제된 Val-Cit-링커-GYS1 ASO를 티올-반응성 항-트랜스페린 수용체 항체 (DTX-A-002)에 커플링시켰다.

[0373] 이어서, 항체 커플링 반응의 생성물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC-HPLC)에 적용하여 근육-표적화 복합체를 정제하였다. 정제된 복합체의 밀도측정법 및 SDS-PAGE 분석은 각각 ASO-대-항체의 평균 비 및 총 순도의 결정을 가능하게 하였다.

[0374] 상기 기재된 것과 동일한 방법을 사용하여, IgG2a (Fab) 항체에 Val-Cit 링커를 통해 공유 연결된 GYS1 ASO를 포함하는 대조군 복합체를 생성하였다.

[0375] 이어서, GYS1 ASO에 공유 연결된 DTX-A-002를 포함하는 정제된 근육-표적화 복합체를 세포 내재화 및 GYS1의 억제에 대해 시험하였다. 비교적 높은 발현 수준의 트랜스페린 수용체를 갖는 질환-관련 근육 세포를 비히클 대조군 (염수), 근육-표적화 복합체 (100 nM) 또는 대조군 복합체 (100 nM)의 존재 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 인큐베이션 후에, 세포를 단리하고, GYS1의 발현 수준에 대해 검정하였다.

[0376] 실시예 5: 근육-표적화 복합체에 의한 GAA 표적화

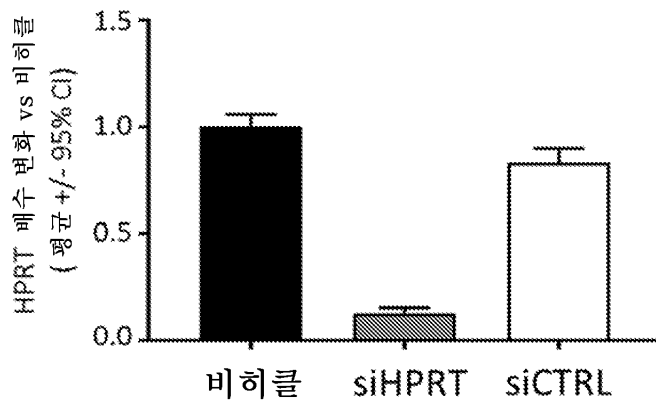
[0377] 항-트랜스페린 수용체 항체인 DTX-A-002 (RI7 217 (Fab))에 카텝신 절단가능한 링커를 통해 공유 연결된 GAA의 돌연변이 대립유전자를 표적화하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드 (GAA ASO)를 포함하는 근육-표적화 복합체를 생성하였다. GAA ASO는 GAA mRNA 전사체의 엑손 2의 포함을 촉진하기 위해 GAA를 표적화하는 올리고뉴클레오타이드이다.

- [0378] 간략하게, 말레이미도카프로일-L-발린-L-시트룰린-p-아미노벤질 알콜 p-니트로페닐 카르보네이트 (MC-Val-Cit-PABC-PNP) 링커 분자를 아미드 커플링 반응을 사용하여 $\text{NH}_2\text{-C}_6\text{-GAA ASO}$ 에 커플링시켰다. 과량의 링커 및 유기 용매를 겔 투과 크로마토그래피에 의해 제거하였다. 이어서, 정제된 Val-Cit-링커-GAA ASO를 티올-반응성 항-트랜스페린 수용체 항체 (DTX-A-002)에 커플링시켰다.
- [0379] 이어서, 항체 커플링 반응의 생성물을 소수성 상호작용 크로마토그래피 (HIC-HPLC)에 적용하여 근육-표적화 복합체를 정제하였다. 정제된 복합체의 밀도측정법 및 SDS-PAGE 분석은 각각 ASO-대-항체의 평균 비 및 총 순도의 결정을 가능하게 하였다.
- [0380] 상기 기재된 것과 동일한 방법을 사용하여, IgG2a (Fab) 항체에 Val-Cit 링커를 통해 공유 연결된 GAA ASO를 포함하는 대조군 복합체를 생성하였다.
- [0381] 이어서, GAA ASO에 공유 연결된 DTX-A-002를 포함하는 정제된 근육-표적화 복합체를 세포 내재화 및 성숙 GAA mRNA 전사체 내 엑손 2의 포함에 대해 시험하였다. 비교적 높은 발현 수준의 트랜스페린 수용체를 갖는 질환-관련 근육 세포를 비히클 대조군 (염수), 근육-표적화 복합체 (100 nM) 또는 대조군 복합체 (100 nM)의 존재 하에 72시간 동안 인큐베이션하였다. 72시간 인큐베이션 후에, 세포를 단리하고, 엑손 2를 포함하는 GAA mRNA의 발현 수준에 대해 검정하였다.
- [0382] 등가물 및 용어
- [0383] 본원에 예시적으로 기재된 본 개시내용은 본원에 구체적으로 개시되지 않은 임의의 요소 또는 요소들, 제한 또는 제한들의 부재 하에 적합하게 실시될 수 있다. 따라서, 예를 들어 본원의 각각의 예에서, 용어 "포함하는", "로 본질적으로 이루어진" 및 "로 이루어진" 중 임의의 용어는 다른 두 용어 중 어느 하나로 대체될 수 있다. 사용된 용어 및 표현은 제한이 아닌 설명의 용어로서 사용되었으며, 이러한 용어 및 표현의 사용에 있어서 제시 및 기재된 특색 또는 그의 부분의 임의의 등가물을 배제하려는 의도는 없지만, 본 개시내용의 범주 내에서 다양한 변형이 가능한 것으로 인식된다. 따라서, 본 개시내용이 바람직한 실시양태에 의해 구체적으로 개시되었지만, 본원에 개시된 개념의 임의적인 특색, 변형 및 변경이 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 재분류될 수 있고, 이러한 변형 및 변경이 본 개시내용의 범주 내에 있는 것으로 간주된다는 것이 이해되어야 한다.
- [0384] 추가로, 본 개시내용의 특색 또는 측면이 마쿠쉬 군 또는 다른 대안적 군의 면에서 기재되는 경우에, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용이 또한 마쿠쉬 군 또는 다른 군의 임의의 개별 구성원 또는 구성원의 하위 군의 면에서 기재된다는 것을 인식할 것이다.
- [0385] 일부 실시양태에서, 서열 목록에 제시된 서열은 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산의 구조를 기재하는데 언급될 수 있다는 것이 인지되어야 한다. 이러한 실시양태에서, 실제 올리고뉴클레오타이드 또는 다른 핵산은 명시된 서열과 본질적으로 동일하거나 유사한 상보적 특성을 보유하면서 명시된 서열과 비교하여 1개 이상의 대안적 뉴클레오타이드 (예를 들어, DNA 뉴클레오타이드의 RNA 대응물 또는 RNA 뉴클레오타이드의 DNA 대응물) 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드 및/또는 1개 이상의 변형된 뉴클레오타이드간 연결 및/또는 1개 이상의 다른 변형을 가질 수 있다.
- [0386] 본 발명을 기재하는 문맥에서 (예를 들어하기 청구범위의 문맥에서) 단수 용어 및 유사한 지시대상의 사용은 본원에 달리 나타내지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 모순되지 않는 한, 단수 및 복수 둘 다를 포괄하는 것으로 해석되어야 한다. 용어 "포함하는", "갖는", "포함한" 및 "함유하는"은 달리 나타내지 않는 한 개방형 용어 (즉, "포함하나 이에 제한되지는 않음"을 의미함)로서 해석되어야 한다. 본원에서 값의 범위에 대한 언급은 본원에 달리 나타내지 않는 한, 단지 상기 범위 내에 속하는 각각의 개별 값을 개별적으로 지칭하는 약칭 방법으로서 제공되는 것으로 의도되고, 각각의 개별 값은 본원에 개별적으로 열거된 것처럼 본 명세서에 포함된다. 본원에 기재된 모든 방법은 본원에 달리 나타내지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 모순되지 않는 한 임의의 적합한 순서로 수행될 수 있다. 본원에 제공된 임의의 및 모든 예 또는 예시적인 어휘 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하는 것으로 의도되며, 달리 청구되지 않는 한 본 발명의 범주에 대한 제한을 부과하지 않는다. 본 명세서의 어떠한 어휘도 임의의 청구되지 않은 요소가 본 발명의 실시예에 필수적인 것임을 나타내는 것으로 해석되어서는 안된다.
- [0387] 본 발명의 실시양태가 본원에 기재된다. 이들 실시양태의 변경은 상기 설명을 읽으면 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 명백해질 수 있다.
- [0388] 본 발명자들은 통상의 기술자가 이러한 변경을 적절하게 사용할 것으로 예상하고, 본 발명자들은 본 발명이 본

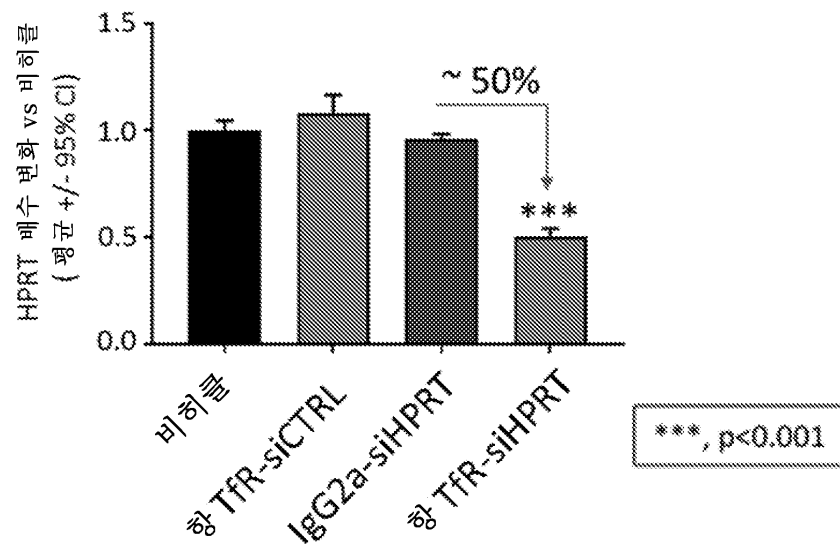
원에 구체적으로 기재된 것과 달리 실시되는 것을 의도한다. 따라서, 본 발명은 적용가능한 법에 의해 허용되는 바와 같은 본원에 첨부된 청구범위에 언급된 대상의 모든 변형 및 등가물을 포함한다. 더욱이, 모든 가능한 변경에서 상기 기재된 요소들의 임의의 조합은 본원에 달리 나타내지 않거나 또는 문맥에 의해 명백하게 모순되지 않는 한 본 발명에 의해 포괄된다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 단지 상용에 지나지 않는 실험을 사용하여, 본원에 기재된 본 발명의 구체적 실시양태에 대한 많은 등가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 이러한 등가물은 하기 청구범위에 포괄되는 것으로 의도된다.

도면

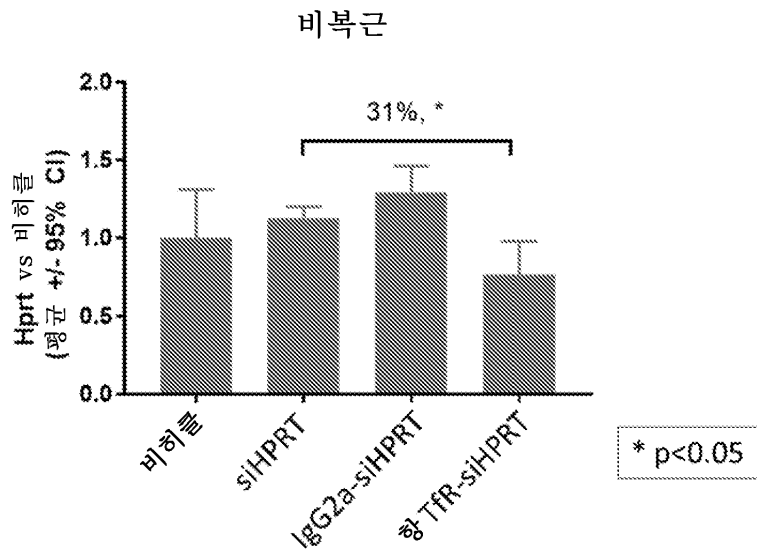
도면1



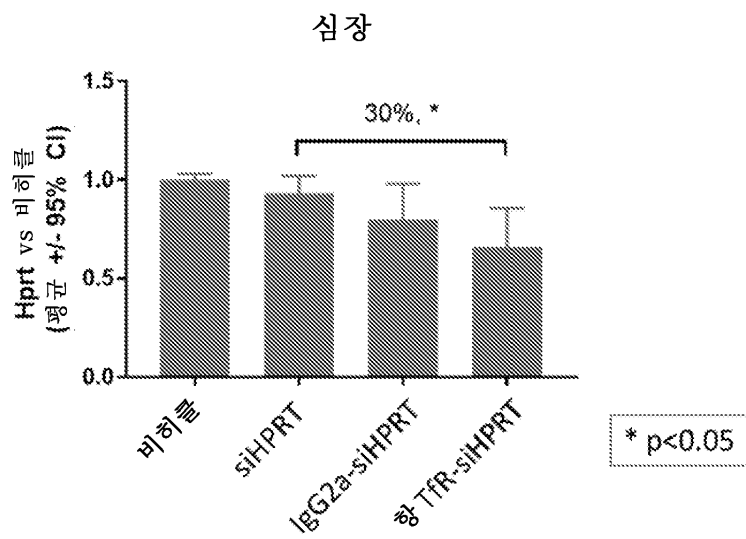
도면2



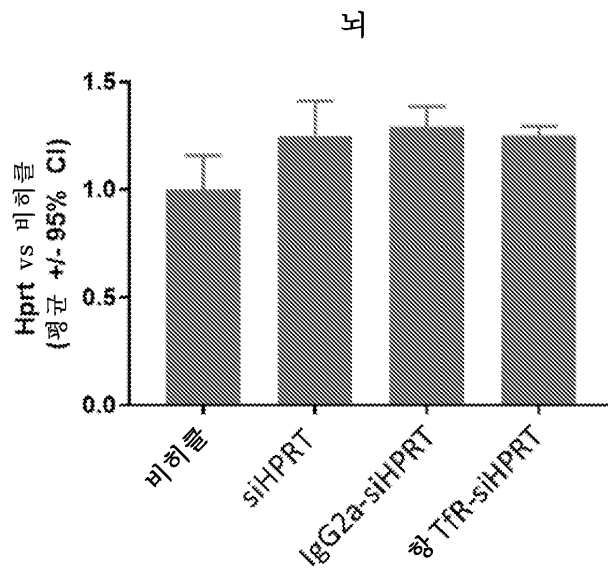
도면3a



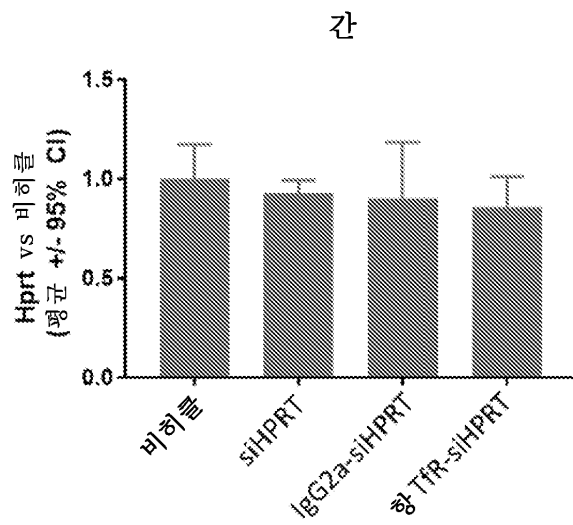
도면3b



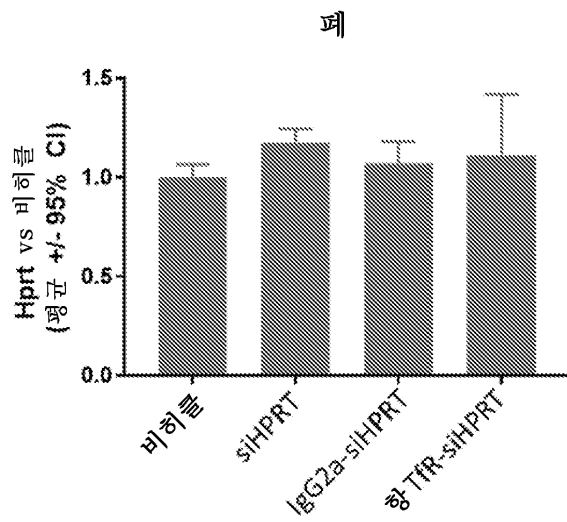
도면4a



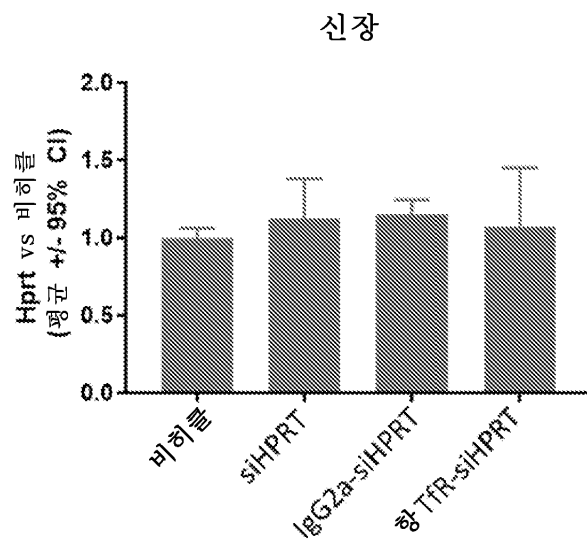
도면4b



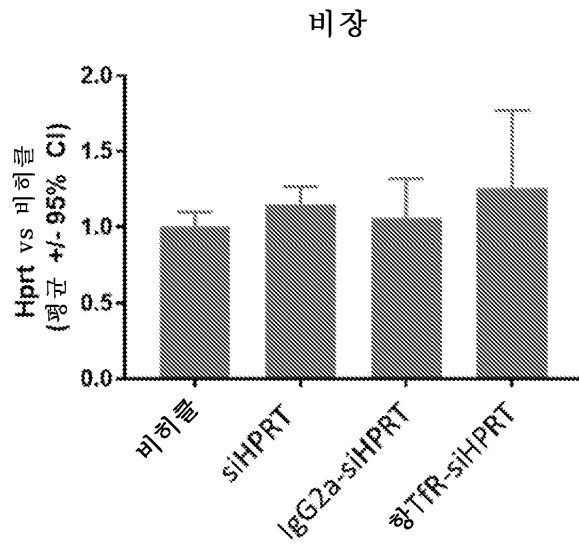
도면4c



도면4d



도면4e



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Dyne Therapeutics, Inc.

<120> MUSCLE TARGETING COMPLEXES AND USES THEREOF FOR TREATING POMPE DISEASE

<130> D0824.70003W000

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently herewith

<150> US 62/713959

<151> 2019-08-02

<160> 44

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 760

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20

25

30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
 35 40 45
 Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
 50 55 60
 Ser Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Val Phe Phe Leu Ile Gly
 65 70 75 80
 Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
 85 90 95
 Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
 100 105 110
 Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
 115 120 125
 Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile
 130 135 140
 Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
 145 150 155 160
 Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
 165 170 175
 Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
 180 185 190
 Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
 195 200 205
 Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
 245 250 255
 Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
 260 265 270
 Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe

275 280 285
 Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
 290 295 300
 Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
 325 330 335
 Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp

 340 345 350
 Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser
 355 360 365
 Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile
 370 375 380
 Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
 385 390 395 400
 His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala

 405 410 415
 Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
 420 425 430
 Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
 435 440 445
 Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
 450 455 460
 Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr

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

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu

565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu

580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn

595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp

610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln

625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu

645 650 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys

660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro

675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser

690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys

705 710 715 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp

740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe

755 760

<210> 2

<211> 760

<212> PRT

<213> Macaca mulatta

<400> 2

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu

1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Gly Val Asp Glu Glu Glu Asn Thr

35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Pro Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly

50 55 60

Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly

65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr

85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro

100 105 110

Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys

115 120 125

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

130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln

145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe

165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val

180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly

195 200 205

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

210 215 220
 Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
 245 250 255
 Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
 260 265 270
 Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe

 275 280 285
 Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
 290 295 300
 Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
 325 330 335
 Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp

 340 345 350
 Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser
 355 360 365
 Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr
 370 375 380
 Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
 385 390 395 400
 His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala

 405 410 415
 Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
 420 425 430
 Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
 435 440 445
 Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
 450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr

465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val

485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp

500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp

515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu

565 570 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu

580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn

595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp

610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln

625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu

645 650 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys

660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro

675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser

690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg

705 710 715 720
 Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

 725 730 735
 Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
 740 745 750
 Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
 755 760
 <210> 3
 <211> 760
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis
 <400> 3
 Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
 1 5 10 15
 Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

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

 85 90 95
 Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro
 100 105 110
 Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
 115 120 125
 Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
 130 135 140
 Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln

145 150 155 160
 Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
 165 170 175
 Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
 180 185 190
 Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly
 195 200 205
 Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys

 210 215 220
 Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
 225 230 235 240
 Lys Asp Phe Glu Asp Leu Asp Ser Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
 245 250 255
 Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
 260 265 270
 Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe

 275 280 285
 Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
 290 295 300
 Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
 305 310 315 320
 Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
 325 330 335
 Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp

 340 345 350
 Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser
 355 360 365
 Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr
 370 375 380
 Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
 385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala

405 410 415

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

420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile

435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr

450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr

465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val

485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp

500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp

515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe

530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp

545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu

565 570 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu

580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn

595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp

610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln

625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu

645 650 655
Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys

660 665 670
Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro

675 680 685
Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser

690 695 700
Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg

705 710 715 720
Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala

725 730 735
Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp

740 745 750
Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe

755 760
<210> 4

<211> 763

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 4

Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp

20 25 30
Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Ala Asp Glu Glu Glu Asn Ala

35 40 45
Asp Asn Asn Met Lys Ala Ser Val Arg Lys Pro Lys Arg Phe Asn Gly

50 55 60
Arg Leu Cys Phe Ala Ala Ile Ala Leu Val Ile Phe Phe Leu Ile Gly

65 70 75 80
Phe Met Ser Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Arg Val Glu Gln Lys Glu

85	90	95	
Glu Cys Val Lys Leu Ala Glu Thr Glu Glu Thr Asp Lys Ser Glu Thr			
100	105	110	
Met Glu Thr Glu Asp Val Pro Thr Ser Ser Arg Leu Tyr Trp Ala Asp			
115	120	125	
Leu Lys Thr Leu Leu Ser Glu Lys Leu Asn Ser Ile Glu Phe Ala Asp			
130	135	140	
Thr Ile Lys Gln Leu Ser Gln Asn Thr Tyr Thr Pro Arg Glu Ala Gly			
145	150	155	160
Ser Gln Lys Asp Glu Ser Leu Ala Tyr Tyr Ile Glu Asn Gln Phe His			
165	170	175	
Glu Phe Lys Phe Ser Lys Val Trp Arg Asp Glu His Tyr Val Lys Ile			
180	185	190	
Gln Val Lys Ser Ser Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser			
195	200	205	
Asn Gly Asn Leu Asp Pro Val Glu Ser Pro Glu Gly Tyr Val Ala Phe			
210	215	220	
Ser Lys Pro Thr Glu Val Ser Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly			
225	230	235	240
Thr Lys Lys Asp Phe Glu Glu Leu Ser Tyr Ser Val Asn Gly Ser Leu			
245	250	255	
Val Ile Val Arg Ala Gly Glu Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn			
260	265	270	
Ala Gln Ser Phe Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Lys Asn			
275	280	285	
Lys Phe Pro Val Val Glu Ala Asp Leu Ala Leu Phe Gly His Ala His			
290	295	300	
Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His			
305	310	315	320
Thr Gln Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val			
325	330	335	

Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Lys Met Glu

340 345 350

Gly Ser Cys Pro Ala Arg Trp Asn Ile Asp Ser Ser Cys Lys Leu Glu

355 360 365

Leu Ser Gln Asn Gln Asn Val Lys Leu Ile Val Lys Asn Val Leu Lys

370 375 380

Glu Arg Arg Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Tyr Glu Glu

385 390 395 400

Pro Asp Arg Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Leu Gly Ala

405 410 415

Gly Val Ala Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Gly Leu Leu Leu Lys Leu

420 425 430

Ala Gln Val Phe Ser Asp Met Ile Ser Lys Asp Gly Phe Arg Pro Ser

435 440 445

Arg Ser Ile Ile Phe Ala Ser Trp Thr Ala Gly Asp Phe Gly Ala Val

450 455 460

Gly Ala Thr Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys

465 470 475 480

Ala Phe Thr Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Val Val Leu Gly Thr Ser Asn

485 490 495

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

500 505 510

Met Gln Asp Val Lys His Pro Val Asp Gly Lys Ser Leu Tyr Arg Asp

515 520 525

Ser Asn Trp Ile Ser Lys Val Glu Lys Leu Ser Phe Asp Asn Ala Ala

530 535 540

Tyr Pro Phe Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe

545 550 555 560

Cys Glu Asp Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Arg Leu Asp Thr Tyr

565 570 575

Glu Ala Leu Thr Gln Lys Val Pro Gln Leu Asn Gln Met Val Arg Thr

580 585 590
Ala Ala Glu Val Ala Gly Gln Leu Ile Ile Lys Leu Thr His Asp Val

595 600 605
Glu Leu Asn Leu Asp Tyr Glu Met Tyr Asn Ser Lys Leu Leu Ser Phe

610 615 620
Met Lys Asp Leu Asn Gln Phe Lys Thr Asp Ile Arg Asp Met Gly Leu

625 630 635 640
Ser Leu Gln Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Tyr Phe Arg Ala Thr

645 650 655
Ser Arg Leu Thr Thr Asp Phe His Asn Ala Glu Lys Thr Asn Arg Phe

660 665 670
Val Met Arg Glu Ile Asn Asp Arg Ile Met Lys Val Glu Tyr His Phe

675 680 685
Leu Ser Pro Tyr Val Ser Pro Arg Glu Ser Pro Phe Arg His Ile Phe

690 695 700
Trp Gly Ser Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Val Glu Asn Leu Lys

705 710 715 720
Leu Arg Gln Lys Asn Ile Thr Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn

725 730 735
Gln Leu Ala Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Val Ala Asn Ala Leu

740 745 750
Ser Gly Asp Ile Trp Asn Ile Asp Asn Glu Phe

755 760

<210> 5

<211> 197

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 5

Phe Val Lys Ile Gln Val Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile

1 5 10 15

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

Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr
 85 90 95
 Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe
 100 105 110
 Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro
 115 120 125
 Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro
 130 135 140

Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe
 145 150 155 160
 Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr
 165 170 175
 Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser
 180 185 190
 Asn Val Leu Lys Glu
 195

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

223> Synthetic polypeptide

<400> 6

Ala Ser Ser Leu Asn Ile Ala

1 5

<210> 7

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 7

Ser Lys Thr Phe Asn Thr His Pro Gln Ser Thr Pro

1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 8

Thr Ala Arg Gly Glu His Lys Glu Glu Glu Leu Ile

1 5 10

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 9

Cys Gln Ala Gln Gly Gln Leu Val Cys

1 5

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 10

Cys Ser Glu Arg Ser Met Asn Phe Cys

1 5

<210> 11

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 11

Cys Pro Lys Thr Arg Arg Val Pro Cys

1 5

<210> 12

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 12

Trp Leu Ser Glu Ala Gly Pro Val Val Thr Val Arg Ala Leu Arg Gly

1 5 10 15

Thr Gly Ser Trp

20

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 13

Cys Met Gln His Ser Met Arg Val Cys

1 5

<210> 14

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 14

Asp Asp Thr Arg His Trp Gly

1 5

<210> 15

<211> 3635

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 15

tcctggcggc tgcgaggttt cactgcaggg gcgccagtgg gctcagtgac gctgcggcct	60
ccttctgcct aggtcccaac gcttcggggc aggggtgcgg tcttgcaata ggaagccgag	120
cgtcttgcaa gcttcccgtc gggcaccagc tactcggccc cgcacccctac ctggtgcatt	180
ccctagacac ctccggggtc cctacctgga gatccccgga gcccccttc ctgcgccagc	240
catgccttta aaccgcactt tgtccatgic ctactgcca ggactggagg actgggagga	300
tgaattcgac ctggagaacg cagtgtcttt cgaagtggcc tgggaggtgg ctaacaaggt	360
gggtggcatc tacacggtgc tgcagacgaa ggcgaaagtg acaggggacg aatggggcga	420
caactacttc ctggtggggc cgtacacgga gcagggcgctg aggaccagg tggaactgct	480
ggaggcccc accccggccc tgaagaggac actggattcc atgaacagca agggctgcaa	540
ggtgtatttc gggcgctggc tgatcgaggg aggcctctg gtggtgctcc tggacgtggg	600
tgctcagct tgggccctgg agcgctggaa gggagagctc tgggatacct gcaacatcg	660
agtgccgtgg tacgaccgag aggccaaacga cgtgtcttc tttggcttcc tgaccacctg	720
gttcctgggt gagtctctgg cacagagtga ggagaagcca catgtggttg ctcaattcca	780
tgagtggttg gcaggcgttg gactctgcct gtgtcgtgcc cggcgactgc ctgtagcaac	840
catcttcacc acccatgcca cgctgctggg gcgctacctg tgtgccgtg ccgtggactt	900
ctacaacaac ctggagaact tcaacgtgga caaggaagca ggggagaggc agatctacca	960
ccgatactgc atggaaaggg gcgcagccca ctgcgctcac gtcttacta ctgtgtccca	1020
gataccgcc atcgaggcac agcacttgct caagaggaaa ccagatatg tgaccccaa	1080
tggtctgaat gtgaagaagt tttctgcat gcatgagttc cagaacctcc atgtcagag	1140
caaggtcga atccaggagt ttgtcgggg ccatttttat gggcatctgg acttcaactt	1200
ggacaagacc ttatacttct ttatcgccgg ccgctatgag ttctccaaca aggtgctga	1260
cgtcttctg gaggcattgg ctggctcaa ctatctgctc agagtgaacg gcagcgagca	1320
gacagtgtt gccttcttca tcatgccagc gcggaccaac aatttcaacg tggaaacct	1380
caaaggccaa gcgtgcgca aacagctttg ggacacggcc aacacggtga aggaaaagtt	1440
cgggaggaag ctttatgaat cttactggt tgggagcctt cccgacatga acaagatgct	1500
ggataaggaa gacttacta tgatgaagag agccatcttt gcaacgcagc ggcagtcttt	1560
ccccctgtg tgcaccaca atatgctgga tgactctca gacccatcc tgaccacat	1620

ccgccgaatc ggctcttca atagcagtgc cgacagggtg aaggtgattt tccacccgga	1680
gttctcttcc tccacaagcc cctgtctccc tgtggactat gaggagtgtg tccgtggctg	1740
tcaccttggga gtcttccct cctactatga gccttggggc tacacaccgg ctgagtgcac	1800
ggttatggga atccccagta tctccacaa tctctccggc ttcggctgct tcatggagga	1860
acacatcgca gacccctcag cttacgggat ctacattctt gaccggcggt tccgcagcct	1920
ggatgattcc tgctcgagc tcacctctt cctctacagt ttctgtcagc agagccggcg	1980
gcagcgtatc atccagcgga accgcacgga gcgcctctcc gaccttctgg actggaaata	2040
cctaggccgg tactatatgt ctgcgcgcca catggcgtg tccaaggcct ttccagagca	2100
cttcacctac gagcccaacg aggcggatgc ggcccagggg taccgctacc cacggccagc	2160
ctcggtgcca ccgtcgccct cgctgtcagc aactccagc ccgcaccaga gtgaggacga	2220
ggaggatccc cggaacgggc cgctggagga agacggcgag cgctacgatg aggacgagga	2280
ggccgccaag gaccggcgca acatccgtgc accagagtgg ccgcgccgag cgtcctgcac	2340
ctctccacc agcggcagca agcgcaactc tgtggacacg gccacctcca gctactcag	2400
caccccgagc gagccctca gcccaccag ctccctgggc gaggagcgta actaagtccg	2460
ccccaccaca ctccccgct gtctgcctc tctgtccag agagaggatg cagaggggtg	2520
ctgtctctaa acccccgctc cagatctgca ctgggtgtgg ccccgcatg cccccacca	2580
gtccgcaaa cactccacc cctccagtc cagtttcaa gttcctgcac tccagaatcc	2640
acaaagccgt gcctttctct ggctccagaa tatgcataat cagcgccctg gattccctg	2700
ggcctggacc gcttccaga ggccaggaat ctgccattac tctcggtgg tgccagaggt	2760
tttaggaaac ctggcatggt gcttcagggt ctggggcttt tagagcccc cgtgtggctt	2820
acaaattcta cagcatacag agcaggccac gctcaggccc ggcatgcggg ccaccaagtt	2880
ctggaaacca cgtggtgtcc ctgcgaatgg ggcgatcaag tccagagcgg gggcactttc	2940
agagtttgaa ggtaactgag agcagatggt cctccatttc aactccagaa gtggggctct	3000
gggagggatg ttctagccct cctggcatg tcagagccag gctctgcctg gaggatccct	3060
ccatccggct cctgtcatcc cctacattt ggccaagcaa gaggtggtag aaccacttgg	3120
ctgtcattc ctctggagg acacacagtc tcagtcaga tgccttctg tctttctggc	3180
ctttctgga ccagatccta ctcttcttt ctaaactga gatctccctc cagggaatcc	3240
gcctgcagag gacagagctg gctgtcttcc cccacccta acctggctta ttcccaactg	3300
ctctgccac tgtgaaacca ctaggttcta ggtcctggct tctagatctg gaaccttacc	3360
acgttactgc atactgatcc ctctccatg atccagaact gaggtcactg ggttctagaa	3420
ccccacatt tactcgagg ctcttccatc cccaaactgt gccctgcctt cagctttggt	3480

gaaaggagg gccctcatg tgtgtgtgc tgtgtctgca ccgcttggtt tgcagttgag 3540
 aggggagggc aggaggggtg tgattggagt gtgtccggag atgagatgaa aaaaatacat 3600

ctatatTTAA gaatcccaaa aaaaaaaaaa aaaaa 3635

<210> 16
 <211> 3681
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 16

actgcagctg cccgcccgat tcagtgtctc agctcacct accagagtcg gagcgtctg 60
 gggcggggtt gcggtcgtgc aataggaagc ggagcgctt gcaagcttcc cctgggacac 120
 ccgctaactc taccggtcac caagtctgct gcgttcccag ccgattcttc tggtttccag 180
 ttttggtgct cgaagtcccc tgcccgcagt agccatgcct ctgagccgca gtctctctgt 240
 gtctctgctt ccaggattgg aagactggga ggatgaattc gaccccgaga acgagtgct 300

tttcgagggtg gcctgggagg tggccaacaa ggtgggtggc atctacactg tgctgcagac 360
 gaaggcgaag gtgacagggg atgaatgggg tgacaactac tatctggtgg gaccatacac 420
 ggagcagggt gtgaggacgc aggtagagct cctggagccc ccaactccgg aactgaagag 480
 gactttggat tccatgaaca gcaagggttg taagggtgat tttgggcgtt ggctgatcga 540
 ggggggaccc ctagtgtgct tcctggatgt aggagcctca gcttgggccc tggagcgtg 600
 gaagggtgag ctttgggaca cctgcaacat cggggtaccc tggtagcacc gcgaggccaa 660
 tgacgtgtc ctgttcggct tcctcaccac ctggttcctg ggtgagttcc tggcccagaa 720

cgaagagaag ccgtatgtgg ttgcccactt ccacgaatgg ttggtggcg ttggtctgtg 780
 tctgtgccgt gcccggcgtt tgccggtggc aaccatcttc accactcatg ccacgtgct 840
 ggggcgctac ctgtgtgtg gcgctgtgga ctctacaac aacctggaga atttcaatgt 900
 agacaaggaa gcaggagaga ggcagatcta tcaccgttac tgcatggagc gtgcagcagc 960
 tcaactgtcc catgtcttca ctaccgtatc ccagatcacc gcaatcgagg ctcaacacct 1020
 ccttaagaga aaaccagata ttgtgacccc caacgggctg aatgtgaaga agttctctgc 1080
 tatgcacgaa ttccagaacc ttcatgctca gagcaaagca cgaatccagg aatttgtgcg 1140

tggccatttt taigggcacc tggacttcaa cctagacaag actttgtatt tctttatcgc 1200
 tggccgctat gagttttcca acaaggagc tgatgtgttc ctggaggcat tggccggct 1260
 caactatctg ctgagatga atggcagtga gcaaacagtt gtcgcattct tcatcatgcc 1320
 ggccccgacc aataatttca acgtggaaac cctgaagggc caagccgtgc gcaaacact 1380

atgggacaca gccaatcacg tcaaggagaa atttgggagg aagctctacg aatccctttt	1440
agtggggagc ctcccgaca tgaacaagat gctggacaag gaggacttca ctatgatgaa	1500
gagagccatc tttgccactc agcggcagtc tttcccacca gtgtgcaccc acaacatgct	1560
ggacgactcc tcagacccca tcttgaccac catccgccga attggccttt tcaacagcag	1620
tgccgaccgt gtgaaggatga tttttcacc agaattcctt tcttcacaa gccctctcct	1680
ccccgtggat tatgaggaat ttgtccgcgg ctgtcacctt ggggtcttcc cctcctacta	1740
tgagccctgg ggctacacac cagcggagtg cactgtcatg ggcatccca gcatctccac	1800
caacctctcc ggctttggct gctttatgga ggaacacatc gcagatccct cagcttacgg	1860
catttacatt ctggatcgga ggttccgcag cctggatgat tcatgctcac agctcacctc	1920
cttctgtac agcttctgcc agcagagccg gcgacagcgc atcatccagc ggaaccgcac	1980
agaacggttg tcggacttgc tagattggaa gtacctgggc cggctactaca tgtctgcgcg	2040
ccacatggct ctggccaagg cctttccaga ccacttcacc tatgaacccc atgaggtaga	2100
tgcgaccag gggtaccggt acccacgacc agcctccgtc ccgccgtcgc cctcactgtc	2160
tcgacactcc agccacacac agagtgagga tgaggaagag ccacgggatg gaccctggg	2220
ggaagacagt gagcgttatg atgaggaaga ggaggctgcc aaggaccgcc gcaacatccg	2280
ggcacctgag tggccacgca gggcctctg ttcctctcc acaggtggca gcaagagaag	2340
caactcgggtg gacactgggc cctccagctc actcagcaca cccactgagc ccctgagtec	2400
taccagtacc ctgggtgagg agcgcaacta agctcccacc cccatcccat tccctgcctg	2460
tccagtgtc ctctgcaga gggcctatgc agatgggagg gtgcctgaac cccactccag	2520
actcttgagt gggacccta cccagtgtgg tccatagcct aacctctgtt tcagacactc	2580
cagcccttga gctccaatc tggagtccc gactccacg ccgccgtgcc tttcttggat	2640
tgcaggatgc attctttgtg cactgatctg gactctccag gcttagactg ggtcccagag	2700
gccaggcatc tgccattgtt tttcaatgcc agaggtttta ggacacctgg tttattggct	2760
tccaggtgtt ggctttctg tttgatccta taatcataca gagtatgctt tgctcaggcc	2820
tgctctggg accacctcat gttggattct gtgtggcttc ccgaatcagc caagttcaga	2880
gttaggacat ttcagggatt aacataattg aaaatcagcc tgcaaggtag cttagtagct	2940
ctgtcgacag attgcttgct tagcatgccc gaagccctgg gatctaacctc tagaacctca	3000
taaacctggt gcggtgatac acatctgtaa tcccagcact cggtaggtag aggtagacgg	3060
atcaagagtt aaaggccatc atcctctgct acataggag ttcaaggcca aactgggcaa	3120
catgagacac tgtctcaaaa gcaaagtaaa ggtggtggaa tgctcacggt cctccatttc	3180

aacccacgac tgcgatgctg ggacatgctg caaggttggc ctccctgggt gtgtttctca 3240

aaggagcatg cggagttgga ccagacacct ttctgccttt tttctggacc agaccttctt 3300

ttctttggtc cagtgtcccc tctaggaat gcctccattg agggcagaat gtctgtcaac 3360

cccacaagtg ctgagccac tgtgaaacca ctgggttctg ggtcccagt gctgaatcag 3420

gagtcttttg tcaactgtgt gcaccccggt cccctttct gatacaaac cgagcccacc 3480

ggcttcttga agccccacat gtacctgag gcctttctgc ctgcaagctt cagtgaatgg 3540

gcggggccct cctcacgtgt gctgtgtctg gccagtgcc tttggtttgc atttgggagg 3600

gggagggcag aaggtgtgtg attggagtgt gtctagagat gaaaaaaaa aaaagaaaat 3660

acacctgtat ttaagaatgc c 3681

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 17

Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 18

Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Ser

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 19

Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr

1 5

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 20

Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 21

Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 22

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 23

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 24

Asn Pro Thr Asn Gly Arg

1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 25

Thr Ser Tyr Trp Met His

1 5

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 26

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn

1 5 10

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 27

Ala Arg Gly Thr Arg Ala

1 5

<210> 28

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 28

Tyr Ser Asn Leu Ala Trp Tyr

1 5

<210> 29

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 29

Leu Leu Val Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 30

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu

1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 31

Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu Thr

1 5

<210> 32

<211> 8

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 32

Gln His Phe Ala Gly Thr Pro Leu

1 5

<210> 33

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic polypeptide

<400> 33

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Synthetic polypeptide

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu

85 90 95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 35

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 36

<211> 107

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 36

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

1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp Asn Leu Tyr Ser Asn

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

35 40 45
Tyr Asp Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65 70 75 80
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu

85 90 95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105

<210> 37

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 37

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

1 5 10 15

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

 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

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

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 38

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
100 105 110

<210> 39

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 39

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220
 Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240
 Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro

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

 305 310 315 320
 Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335
 Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

 435 440 445
 <210> 40
 <211> 226

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 40

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

195 200 205

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

210 215 220

Cys Pro

225

<210> 41

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 41

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val

100 105 110

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

115 120 125

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130 135 140

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

145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu

180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

435

440

445

<210> 42

<211> 217

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic polypeptide

<400> 42

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser

65

70

75

80

Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Leu

85

90

95

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Ala Ser Thr Lys Gly

100

105

110

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

115

120

125

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

130

135

140

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

145

150

155

160

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

165

170

175

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

180 185 190
 Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
 195 200 205
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro
 210 215
 <210> 43
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 43
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
 Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Glu Ile Asn Pro Thr Asn Gly Arg Thr Asn Tyr Ile Glu Lys Phe
 50 55 60
 Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

 130 135 140
 Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160
 Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser

165 170 175
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190
 Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr

 195 200 205
 Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220
 Cys Pro
 225
 <210> 44
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic polypeptide
 <400> 44
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

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

 85 90 95
 Ala Arg Gly Thr Arg Ala Tyr His Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
 100 105 110
 Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 115 120 125
 Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu

130						135						140					
Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly		
145						150						155					
Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser		
					165						170						
Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu		
					180						185						
Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr		
					195						200						
Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr		
					210						215						
Cys	Pro																
225																	