(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0025000
(43) 공개일자 2023년02월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/21* (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) *C07K 14/735* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0025 (2013.01)
A61K 38/217 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7001712
(22) 출원일자(국제) 2021년06월16일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년01월16일
(86) 국제출원번호 PCT/US2021/037575
(87) 국제공개번호 WO 2021/257668
국제공개일자 2021년12월23일
(30) 우선권주장
63/135,998 2021년01월11일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베니아
미국 펜실베니아 필라델피아 (우편번호 19104) 월넛 스트리트 3451 7플로어
(72) 발명자
힌더러 크리스티안
미국 루이지애나 70115 뉴올리언스 로렐 스트리트 4723
호리우치 마코토
미국 펜실베니아 19106 필라델피아 스프루스 스트리트 413 아파트먼트 1
윌슨 제임스 엠.
미국 펜실베니아 19103 필라델피아 델란시 스트리트 1831
(74) 대리인
특허법인와이에스장

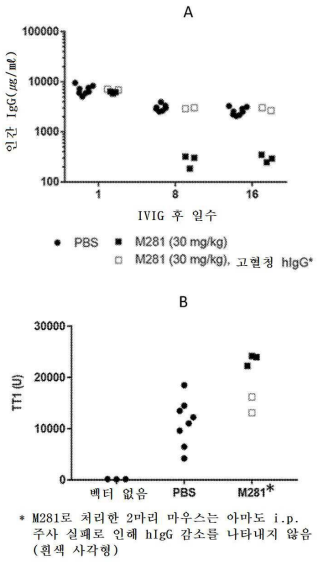
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 요법 환자의 치료를 위한 조성물 및 방법**

(57) 요 약

유전자 요법 벡터 캡시드의 바이러스 공급원에 대한 기존 중화 항체를 갖는 환자에게 유전자 요법 벡터와 함께 공동 투여하는 데 유용한 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 조성물은 FcRn과 IgG 사이의 특이적 결합을 저해하는 FcRn 리간드를 포함한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 39/395 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61K 9/0019 (2013.01)
A61P 7/00 (2018.01)
C07K 14/70535 (2013.01)
C07K 16/28 (2013.01)
A61K 2039/505 (2013.01)
A61K 2300/00 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/040,381 2020년06월17일 미국(US)
63/152,085 2021년02월22일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

선택된 AAV 캡시드 또는 선택된 캡시드에 대해 혈청학적 교차 반응성인 AAV 캡시드에 대한 면역글로불린 G(IgG) 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하는 조합 요법으로서, 상기 요법은 (a) 선택된 AAV 캡시드 및 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 벡터를 투여하는 것, 및 (b) 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 대한 알부민 결합을 방해하지 않으면서 FcRn과 중화 항체 사이의 결합을 특이적으로 방지하는 리간드를 공동 투여하는 것을 포함하는, 조합 요법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 리간드는 펩타이드, 단백질, RNAi 서열, 또는 소분자로부터 선택되는, 조합 요법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 리간드는 FcRn에 대해 지시되는 단클론성 항체, 면역어드헤신, 낙타과 항체, Fab 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편인, 조합 요법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 니포칼리맙(M281), 로자놀릭시주맙; IMVT-1401, RVT-1401, HL161, HBM916, 에프가티지모드, 오릴라놀리맙(SYNT001), SYNT002, ABY-039, DX-2507, 이의 유도체 또는 조합물로부터 선택되는 단클론성 항체인, 조합 요법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 니포칼리맙(M281) 또는

(a) (i) 서열번호 16의 CDR H1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, (ii) 서열번호 18의 CDR H2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 및 (iii) 서열번호 20의 CDR H3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 중쇄 CDR; 또는

(b) 서열번호 10의 CDR L1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 12의 CDR L2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 14의 CDR L3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 경쇄 CDR

로부터 선택되는 3개 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린 작제물인, 조합 요법.

청구항 6

제5항에 있어서, 니포칼리맙 또는 상기 면역글로불린 작제물은

(a) (i) 서열번호 16의 CDR H1, (ii) 서열번호 18의 CDR H2, 및 (iii) 서열번호 20의 CDR H3의 중쇄 CDR; 또는

(b) 서열번호 10의 CDR L1, 서열번호 12의 CDR L2, 서열번호 14의 CDR L3의 경쇄 CDR

을 포함하는, 조합 요법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 리간드의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 리간드를 인코딩하는 서열을 포함하는 벡터의 전달 후 생체 내에서 발현되는, 조합 요법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유전자 산물을 인코딩하는 rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh91, AAVhu37, 또는 AAVhu68로부터 선택되는 캡시드를 갖는, 조합 요법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조합 요법의 전달 전, 환자는 시험관 내 분석에서 결정될 때 rAAV 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대해 1:5 초과의 중화 역가를 갖는, 조합 요법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 rAAV의 전달 1 내지 7일 전에 전달되는, 조합 요법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 매일 전달되는, 조합 요법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 rAAV가 전달되는 당일에 전달되는, 조합 요법.

청구항 13

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 rAAV 전달 후 1일 내지 4주 동안 및/또는 4주 내지 6개월 동안 전달되는, 조합 요법.

청구항 14

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 리간드는 경구로 전달되는, 조합 요법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는, 선택적으로 복강내, 정맥내, 근육내, 또는 비강내, 또는 척수강내를 통해 전신으로 전달되는, 조합 요법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 환자의 기존 중화 항체가 야생형 바이러스 벡터 감염의 결과가 되도록 저해성 리간드와 조합된 바이러스 벡터의 전달 전에 이전에 유전자 요법 치료 또는 AAV를 사용한 유전자 전달을 받은 적이 없는, 조합 요법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 요법은 (a) 스테로이드 또는 스테로이드의 조합; 및/또는 (b) IgG-절단 효소; 및 (c) Fc-IgE 결합의 저해제; (d) Fc-IgM 결합의 저해제; (e) Fc-IgA 결합의 저해제; 및/또는 (f) 감마 인터페론 중 하나 이상을 공동 투여하는 것을 추가로 포함하는, 조합 요법.

청구항 18

유효량의 유전자 산물을 이용하여 치료를 필요로 하는 환자를 치료하기 위한, 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 조합 요법에 유용한 약제의 제조에 있어서 항-FcRn 항체의 용도.

청구항 19

rAAV 벡터와 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 따른 항-FcRn 항체의 공동 투여를 포함하는 조합 요법에서 유용한 약제의 제조에 있어서 세포로의 전달을 위한 이식유전자를 포함하는 rAAV 벡터의 용도.

청구항 20

rAAV-매개 유전자 요법이 효과적인 환자 집단을 증가시키는 방법으로서,

상기 방법은 이식유전자 산물의 효과적인 전달 및 발현 수준을 방지하는 선택된 AAV 바이러스 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대한 중화 항체 역가를 갖는 집단 유래의 환자에게,

(a) 선택된 AAV 캡시드 및 선택된 캡시드 내에 패키징된 벡터 게놈을 갖는 재조합 rAAV; 및

(b) 실질적으로 신생아 Fc 수용체(FcRn)-알부민 결합을 방해하지 않으면서 유전자 요법 벡터의 전달 전에 FcRn에 특이적으로 결합하는 리간드

를 공동 투여하는 단계를 포함하되,

상기 리간드는 면역글로불린 G(IgG)에 대한 FcRN의 결합을 차단하고, 유효량의 유전자 요법 산물이 환자에서 발현되는 것을 허용하는, 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 단클론성 항체, 면역어드헤신, 낙타과 항체, Fab 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편으로부터 선택되는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 rAAV는 전신으로 전달되는, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 rAAV는 정맥내, 복강내, 비강내로, 또는 흡입을 통해 전달되는, 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh91, AAVhu37, AAVhu68로부터 선택되는 캡시드를 갖는, 방법.

청구항 25

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 단클론성 항체 니포칼리맙(M281) 또는 이의 3개 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린 작제물인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은

(a) (i) 서열번호 16의 CDR H1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, (ii) 서열번호 18의 CDR H2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 및 (iii) 서열번호 20의 CDR H3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 중쇄 CDR; 또는

(b) 서열번호 10의 CDR L1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 12의 CDR L2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 14의 CDR L3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 경쇄 CDR

을 포함하는, 방법.

청구항 27

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 로자놀릭시주맙(UCB7665), IMVT-1401, RVT-1401, HL161, HBM916, ARGX-113(에프가티지모드), SYNT001, SYNT002, ABY-039, 또는 DX-2507, 또는 면역글로불린 작제물의 유도체, 또는 면역글로불린 작제물 및/또는 이의 유도체의 조합물로부터 선택되는, 방법.

청구항 28

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 rAAV의 전달 1 내지 7일 전에 전달되는, 방법.

청구항 29

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 매일 전달되는, 방법.

청구항 30

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 rAAV가 전달되는 당일에 전달되는, 방법.

청구항 31

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 rAAV 전달 후 적어도 1일 내지 4주 동안 전달되는, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 rAAV 전달 후 4주 내지 6개월 동안 전달되는, 방법.

청구항 33

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 rAAV가 전달되는 것과 상이한 경로를 통해 전달되는, 방법.

청구항 34

제20항에 있어서, 상기 면역글로불린 작제물은 경구로 전달되는, 방법.

청구항 35

제20항에 있어서, 상기 환자는 시험관 내 분석에서 결정될 때 중화 역가가 1:5보다 크도록 미리 결정된, 방법.

청구항 36

제20항에 있어서, 상기 방법은 (a) 스테로이드 또는 스테로이드의 조합 및/또는 (b) IgG-절단 효소, (c) Fc-IgE 결합의 저해제; (d) Fc-IgM 결합의 저해제; (e) Fc-IgA 결합의 저해제; 및/또는 (f) 감마 인터페론 중 하나 이상을 공동 투여하는 것을 추가로 포함하는 요법의 일부인, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터는 파보바이러스과(Parvoviridae) 계열의 작고 외피가 없는 4.7 kb의 DNA 데펜도바이러스(dependovirus)인 야생형(WT) AAV로부터 유래된다. 이러한 rAAV는 눈, 간, 골격근 및 중추신경계를 포함하여 다양한 조직에서 유용한 유전자 전달 시스템이 될 수 있는 능력을 입증하였다. WT AAV는 다수의 상이한 인간 조직에서 검출되었기 때문에, 인간 집단에서 매우 널리 퍼져있다[Smith-Arica JR, et al., Infection efficiency of human and mouse embryonic stem cells using adenoviral and adeno-associated viral vectors. Cloning Stem Cells 2003; 5:51-62; Friedman-Einat M, et al, Detection of adeno-associated virus type 2 sequences in the human genital tract. J Clin Microbiol 1997; 35:71-8; 및 Auricchio A, Rolling F. Adeno-associated viral vectors for retinal gene transfer and treatment of retinal diseases. Curr Gene Ther 2005; 5:339-48]. 예를 들어, 자연 AAV 감염의 유병률은 인구의 15% 내지 30%(>1:20, AAV8)만큼 높은 것으로 설명되었다.

[0002] WT AAV에 대한 노출이 임의의 임상 병리 또는 질환과 연관되지는 않았지만, 특정 AAV에 대한 기존 중화 항체가 존재하는 것으로 나타나 이를 갖는 rAAV를 방지할 수 있거나 혈청학적 교차 반응성 캡시드는 벡터 투여 후 조직 형질도입을 방지할 수 있다. 이러한 이유로, 1:5보다 큰 중화 항체 역가의 존재는 AAV-기반 전신 유전자 요법에 대한 일반적인 제외 기준이다. HC Verdera, et al, Molecular Therapy, Vol. 28, No. 3, pp 723-746 (March 2020). 1:5보다 높은 NAb 역가는 정맥내 AAV 투여 후 이식유전자의 발현을 상당히 감소시킨다. 특히 AAV의 전신/정맥내 투여에 의해, NAb는 1:10 초과의 역가에서 유전자 형질도입을 완전히 차단한다.

[0003] 현재, 환자는 AAV 중화 항체 역가를 기준으로 임상 시험에서 제외되며, 환자의 최대 30%는 중화 항체 역가를 기반으로 하여 승인된 AAV 약물을 받을 자격이 없을 것으로 예상된다.

[0004] 선택된 AAV 캡시드를 갖는 rAAV를 이용하여 환자를 효과적으로 치료하는 능력에 대한 상기 캡시드에 대한 기존 중화 항체의 효과를 감소시키기 위한 다양한 노력이 시도되었다. 이러한 접근법은 rAAV 전달과 함께 다양한 면역 억제 요법의 사용을 포함한다.

[0005] 신생아 Fc 수용체(FcRn)는 독특한 막관통 공통 β2-마이크로글로불린(β2m)으로 이루어진 비고전적 주요 조직적합성(MHC) 클래스 I 분자이다(Burmeister, W. P. Huber, A. H. & Bjorkman, P. J. Crystal structure of the

complex of rat neonatal Fc receptor with Fc. Nature 372, 379-383 (1994), Burmeister, W. P. Gastinel, L. N. Simister, N. E., Blum, M. L. & Bjorkman, P. J. Crystal structure at 2.2 Å resolution of the MHC-related neonatal Fc receptor. Nature 372, 336-343 (1994); West, A. P. Jr. & Bjorkman, P. J.Crystal structure and immunoglobulin G (IgG) binding properties of the human major histocompatibility complex-related Fc receptor. Biochemistry 39, 9698-9708 (2000)). FcRn은 포유동물에서 IgG 및 혈청(SA) 알부민 수준을 조절하는 역할을 하는 것으로 기재되었다. 인간 FcRn의 3차원 구조가 기재되었다[V Oganesyan, et al, J Biol Chem., Vol 289, No. 11, pp 2812-78124 (March 2014). FcRn의 저해제는 체액-매개 자가면역 장애를 치료하는 역할에 대하여 제안된 바 있다. 문헌[X Li and RP Kimberly, Expert Opin Ther Targets, 2014 March; 18(3): 335-350]을 참조한다.

[0006] AAV 캡시드에 대한 중화 항체를 갖는 환자의 유전자 요법 치료를 위한 조성물 및 방법에 대한 당업계의 필요성이 존재한다.

발명의 내용

[0007] 본 명세서에서 제공되는 조성물 및 요법은 선택된 바이러스 벡터 캡시드에 대한 중화 항체의 효과를 제거함으로써 유전자 요법 벡터를 이용하여 치료될 수 있는 환자 집단을 증가시키고, 이에 의해 원하는 유전자 산물을 보유하는 AAV 캡시드를 갖는 rAAV의 효과적인 전달을 허용한다.

[0008] 바이러스 벡터에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하기 위한 조합 요법으로서, 상기 요법은 표적 세포에서의 발현을 위한 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열 및 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn) 및 면역글로불린 G(IgG)의 결합을 저해하는 리간드와 함께 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 바이러스 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 전신으로 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 펩타이드, 단백질, RNAi 서열, 또는 소분자이다. 특정 실시형태에서, 단백질은 단클론성 항체, 면역어드헤신(immunoadhesin), 낙타과(camelid) 항체, Fab 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편이다. 특정 실시형태에서, 재조합 바이러스 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스, 재조합 아데노바이러스, 재조합 단순 헤르페스 바이러스, 또는 재조합 렌티바이러스이다. 특정 실시형태에서, 리간드는 FcRn-알부민 결합을 방해하지 않으면서 FcRn-IgG 결합을 특이적으로 저해하는 단클론성 항체이다. 특정 실시형태에서, 단클론성 항체는 니포칼리맙(M281), 로자놀릭시주맙(UCB7665); IMVT-1401, RVT-1401, HL161, HBM916, ARGX-113(에프가티지모드), SYNT001, SYNT002, ABY-039, 또는 DX-2507, 이의 유도체 또는 조합물이다. 특정 실시형태에서, 리간드는 바이러스 벡터의 투여 1 내지 7일 전에 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 매일 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 바이러스 벡터가 투여되는 당일에 투약되거나 투여된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 벡터 투여 후 1일 내지 4주 동안 투약된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 벡터와 상이한 투여 경로를 통해 투약된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 경구로 투약된다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 복강내, 정맥내, 근육내, 비강내, 또는 척수강내로 투약된다. 특정 실시형태에서, 환자는 시험관 내 분석에서 측정될 때 벡터 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 1:5보다 크도록 미리 결정된다. 특정 실시형태에서, 환자는 환자의 기존 중화 항체가 야생형 감염의 결과가 되도록 저해성 리간드와 조합된 바이러스 벡터의 전달 전에 이전에 유전자 요법을 받은 적이 없다. 특정 실시형태에서, 환자는 저해성 면역글로불린 작제물과 조합된 바이러스 벡터의 전달 전에 이전에 유전자 요법 치료를 받은 적이 있다. 특정 실시형태에서, 요법은 (a) 스테로이드 또는 스테로이드의 조합 및/또는 (b) IgG-절단 효소, (c) Fc-IgE 결합의 저해제; (d) Fc-IgM 결합의 저해제; (e) Fc-IgA 결합의 저해제; 및/또는 (f) 감마 인터페론 중 하나 이상을 공동 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0009] 추가 양태에서, 유전자 요법이 효과적인 환자 집단을 증가시키는 방법이 제공된다. 방법은 선택된 바이러스 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 1:5보다 큰 집단 유래의 환자에게, (a) 선택된 바이러스 캡시드 및 유전자 요법 발현 카세트가 내부에 패키징된 재조합 바이러스; 및 (b) 유전자 요법 벡터의 전달 전에 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 특이적으로 결합하는 리간드를 공동 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 리간드는 면역글로불린 G(IgG)에 결합하는 FcRN을 차단하고 유효량의 유전자 요법 산물이 환자에서 발현되는 것을 허용한다.

[0010] 특정 실시형태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 캡시드에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 rAAV를 항-신생아 Fc 수용체(FcRn) 면역글로불린 작제물과 조합하여 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 면역글로불린 작제물은 FcRn - 면역글로불린 G(IgG) 결합을 특이적으로 저해한다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 단클론성 항체, 면역어드헤신, 낙타과 항체, Fab 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편으로부터 선택된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 FcRn-알부민 결합을 방해하지 않으면

서 인간 FcRn-IgG 결합을 특이적으로 저해한다. 특정 실시형태에서, rAAV는 전신으로, 예를 들어, 정맥내, 복강내, 비강내로 또는 흡입을 통해 전달된다. 특정 실시형태에서, rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37로부터 선택되는 캡시드를 갖는다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 니포칼리맙(M281)의 중쇄 및/또는 경쇄의 CDR을 포함한다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 단클론성 항체 니포칼리맙(M281)이다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 rAAV가 투여되는 당일에 전달된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 rAAV 투여 후 적어도 1일 내지 4주 후에 전달된다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 rAAV 투여 후 4주 내지 6개월 동안 전달된다.

[0011] 본 발명의 다른 양태 및 이점은 본 발명의 하기 상세한 설명으로부터 쉽게 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1A 및 도 1B는 M281 mAb가 IVIG로 처리된 hFcRn 마우스에서 hIgG를 감소시키고 AAV-TT1(테스트 이식유전자 1) 형질도입을 개선시킴을 도시한다. 도 1A는 IVIG 처리 후 제1일 내지 제16일의 혈청 인간 IgG의 수준을 나타낸다. 도 1B는 AAV8 벡터 전달 후 혈청에서 이식유전자 활성의 수준을 단위(U)로 표시하여 나타낸다. 사각형은 M281 정맥내 주사를 받은 마우스를 표시한다. 채워진 사각형은 IgG 수준 감소가 관찰된 마우스를 표시한다. 빈 사각형은 IgG 수준 감소가 관찰되지 않은 마우스를 표시한다.

도 2A 및 도 2B는 M281에 의한 FcRn의 저해가 총 hIgG와 함께 IVIG-유래 NAb를 감소시키고 AAV8 벡터의 정맥내 전달 후 간 형질도입을 허용하였음을 도시한다. 도 2A는 IVIG로 전처리한 후 제0일 내지 제5일의 혈청 인간 IgG(hIgG)의 수준을 나타낸다. M281 및 AAV 벡터의 투여는 화살표로 표시되어 있다. 도 2B는 연구 제0일 내지 제33일의 혈청 중 TT1 수준을 나타낸다.

도 3은 비-인간 영장류(NHP)에서 NAb 역가 및 AAV-TT2(테스트 이식유전자 2) 형질도입에 대한 FcRn의 차단 효과를 평가하기 위한 연구 설계(연구 1 및 연구 2)를 도시한다.

도 4A 내지 도 4D는 M281 주입이 NHP에서 IgG와 함께 기존의 NAb 역가를 감소시켰음을 도시한다(연구 1). 도 4A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 히말라야 원숭이(rhesus macaque) IgG(rhIgG)의 수준을 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4B는 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4C는 AAVhu68 중화 결합 항체(NAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4D는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 알부민의 수준을 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다.

도 5A 내지 도 5B는 M281 주입이 NHP에서 IgG와 함께 기존의 NAb 역가를 감소시켰음을 도시한다(연구 2). 도 5A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 히말라야 원숭이 IgG(rhIgG)의 수준을 나타내며, 여기서 M281의 투여(제-5일, 제-4일 및 제-3일) 및 AAV의 투여(제0일)는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 5B는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 알부민의 수준을 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다.

도 6A 내지 도 6B는 AAV-결합 항체 역가(연구 2)를 도시한다. 도 6A는 연구 제-15일 내지 제0일 동안의 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281은 제-5일, 제-4일 및 제-3일에 투여되고 AAV는 제0일에 투여된다. 도 6B는 연구 제0일 내지 제30일 동안 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타낸다.

도 7A 내지 도 7E는 마이크로그램(μg) DNA당 게놈 복제수(GC)로 플로팅된, 연구 2에서 수확한 다양한 조직에서의 벡터 게놈 생체분포를 도시한다. 도 7A는 심장에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7B는 골격근에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7C는 간의 우엽에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7D는 간의 좌엽에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7E는 비장에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다.

도 8A 및 도 8B는 연구 2에서 수확한 심장 및 간 조직에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내(in situ) 혼성화 정량화 결과를 양성 면적비로 플로팅하여 도시한다. 도 8A는 연구 2에서 수확한 간 조직(좌엽 및 우엽)에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내 혼성화 결과를 나타낸다. 도 8B는 연구 2에서 수확한 심장 조직(좌심실, 우심실 및 중격)에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내 혼성화의 결과를 나타낸다.

도 9는 1×10^{13}개 GC/kg의 용량으로 AAV8.TT3(테스트 이식유전자 3)의 재투여 후 기존 FcRn NAb의 역가를 차단하는 효과를 평가하기 위한 연구 설계를 도시한다.

도 10A 및 도 10B는 M281 투여가 NHP(이전에 AAV8.TT3을 투여받음)에서 IgG와 함께 기존 NAb 역가(AAV8)를 감소시킨 AAV8.TT3 재투여 연구의 결과를 도시한다. 도 10A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 히말라야 원숭이

IgG(rhIgG)의 혈청 수준을 나타내며, 여기서 NHP에게 제-5일, 제-4일, 제-3일 및 제-2일에 M281을 투여하고 제0일에 AAV8.TT3을 투여하였다. 도 10B는 mg/mℓ로 플로팅된 M281의 측정된 혈청 수준을 나타낸다.

도 11A 및 도 11B는 M281 투여가 자연 감염에 의해 기존 NAb+(1:20)를 갖는 NHP에서 IgG와 함께 기존 NAb 역가(AAV8)를 감소시킨 또 다른 AAV8.TT3 연구의 결과를 도시한다. 도 11A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 총 히말라야 원숭이 IgG 수준(rhIgG)을 나타내며, 여기서 NHP에게 제-5일, 제-4일, 제-3일 및 제-2일에 M281을 투여하고 제0일에 AAV8.TT3을 투여하였다. 도 11B는 mg/mℓ로 플로팅되고 ELISA를 사용하여 측정된 혈청 M281 수준(hIgG)을 나타낸다.

도 12는 AAV8.TT1 벡터 투여 시점에 IVIG를 공동 처리한 마우스에서 감소된 TT1 활성 수준의 결과를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 환자의 표적 세포/조직에 유전자 산물을 전달하기 위해 선택된 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 중화 항체를 갖는 환자의 치료에 유용한 요법 및 조성물이 제공된다. 특정 실시형태에서, 환자는 선택된 바이러스 벡터를 이용한 임의의 치료적 처리에 대해 무경험일 수 있고 야생형 바이러스에 의한 사전 감염으로 인해 기존 면역을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 환자는 사전 치료 또는 백신의 결과로서 중화 항체를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 중화 항체를 1:1 내지 1:20, 또는 1:2 초과, 1:5 초과, 1:10 초과, 1:20 초과, 1:50, 1:100 초과, 1:200 초과, 1:300 초과 또는 그 이상으로 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 1:1 내지 1:200, 또는 1:5 내지 1:100, 또는 1:2 내지 1:20, 또는 1:5 내지 1:50, 또는 1:5 내지 1:20 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 단일 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 FcRn-IgG 결합을 조절하고 효과적인 벡터 전달을 허용하는 유일한 작용제로서 받는다. 다른 실시형태에서, 환자는 하나 이상의 항-FcRn 리간드와 제2 구성요소(예를 들어, Fc 수용체 하향 조절제(예를 들어, 인터페론 감마), IgG 효소, 또는 다른 적합한 구성요소)의 조합을 받을 수 있다. 이와 같은 조합은 특히 높은 중화 항체 수준(예를 들어, 1:200 초과)을 갖는 환자에게 특히 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-FcRn 리간드를 포함하는 조성물, 및 요법 및 공동 투여는 바이러스 벡터의 전신 전달 동안 이용된다. 그러나, 본 발명은 본 명세서에서 보다 상세하게 기재된 바와 같이 그렇게 제한되지 않는다.

[0014] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FcRn"은 면역글로불린(IgG) 항체의 Fc 영역에 결합하는 신생아 Fc 수용체를 지칭한다. 예시적인 FcRn은 UniProt ID 번호 P55899(서열번호 45)를 갖는 인간 FcRn이다. 인간 FcRn은 구성적으로 내재화된 IgG를 결합하고 이를 IgG의 재활용을 위해 다시 세포 표면으로 수송함으로써 IgG의 반감기를 유지하는 역할을 하는 것으로 여겨진다. 달리 명시되지 않는 한, "FcRn"은 환자의 고유 FcRn을 지칭한다.

[0015] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "면역글로불린 G" 또는 "IgG"는 IgG1, IgG2, IgG3 및 IgG4로 지정된 IgG 분자의 4가지 상이한 하위유형 또는 하위부류로 구성된 항체 부류의 임의의 구성원을 지칭한다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에서 제공된 조성물, 요법 및 조합물에 사용하기 위해 선택된 항-FcRn 리간드는 환자의 IgG 중화 항체(NAb)의 임의의 하위유형에 결합할 수 있다. 특정 실시형태에서, NAb IgG 하위부류의 하위집합, 예를 들어, IgG1 단독, 또는 IgG1, IgG2, 또는 IgG3 또는 IgG4, IgG4 단독, 또는 다른 조합에 결합하는 항-Fc 리간드가 선택될 수 있다. 현재 선택된 외부 캡시드(외피 비보유 벡터의 경우) 또는 바이러스 벡터의 외피 단백질(예를 들어, AAV의 캡시드 단백질)에 대한 기존 중화 항체는 주로 IgG 부류(또는 이의 하위부류)인 것으로 여겨지는 반면, 특정 실시형태에서, 저해성 리간드를 포함하는 본 명세서에서 제공된 조성물 및 조합물은 다른 면역글로불린 부류의 중화 항체, 예를 들어, AAV 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대한 기존의 중화 항체를 저해하는 데 유용하다.

[0016] 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 조성물은 바이러스 벡터(예를 들어, 유전자 요법 벡터)가 전신으로 전달될 때 사용하기에 특히 매우 적합하다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "전신 전달"은 복강내, 근육내, 피하, 정맥내, 경구, 눈(예를 들어, 유리체내, 망막하), 뇌 및 중추신경계의 다른 부분(예를 들어, 척수강내)을 제외한, 장기(예를 들어, 심장, 간)로의 직접 투여를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적합한 전달 경로를 포함한다. 그러나, 본 명세서에서 제공된 바와 같은 FcRn 차단 리간드 조성물의 전달이 비-전신성 벡터-기반 유전자 요법, 예를 들어, 눈(예를 들어, 망막하, 유리체내), 뇌, 또는 CNS의 다른 부분에 직접 투여되는 벡터와 함께 사용하는 것을 요망하는 특정 실시형태가 있다.

[0017] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오타이드와 같은 이종성 분자를 수송하거나, 형질도입하거나 그렇지 않으면 상기 이종성 분자의 운반체의 역할을 하는 임의의 분자 또는 모이어티를 지칭한다. "바이러스 벡터"는 관심이 있는 분자, 예를 들어, 이식유전자, 폴리펩타이드 또는 다중-폴리펩타이드를 인코딩

하는 폴리뉴클레오타이드 또는 조절 핵산을 인코딩하거나 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 영역을 포함하는 벡터이다. 바이러스 벡터는 재조합적으로 생산될 수 있다. 본 명세서의 예는 선택된 환자가 중화 항체를 갖는 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 캡시드와 함께 항-FcRN 리간드를 공동 투여하는 방법을 입증한다.

[0018] 그러나, 방법 및 조성물은 아데노바이러스 캡시드 단백질(재조합 아데노바이러스를 이용한 치료용), 단순 헤르페스 바이러스(재조합 단순 헤르페스 바이러스 벡터를 이용한 치료용), 또는 렌티바이러스(재조합 렌티바이러스를 이용한 치료용)에 대한 중화 항체를 갖는 환자에서 이용될 수 있다. 이들 각각의 벡터 범주 내에서, 중화 항체는 혈청학적으로 특이적일 수 있지만, 이 특이성 내에서 캡시드와 혈청학적으로 교차 반응성인 동일한 캡시드 공급원 또는 상이한 캡시드 공급원을 갖는 바이러스일 수 있다. 각각의 바이러스 유형(AAV, 아데노바이러스, HSV 또는 렌티바이러스) 내의 상이한 바이러스 캡시드는 혈청학적으로 구별되거나 혈청학적으로 교차 반응성일 수 있다. 예를 들어, 원하는 이식유전자를 보유하는 rAAV8을 투여받을 환자는 AAV8에 대한 중화 항체에 대해 스크리닝될 것이다.

[0019] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "중화 항체" 또는 "NAb"는 바이러스 캡시드 또는 외피에 특이적으로 결합하고 바이러스, 또는 바이러스 캡시드 또는 외피를 갖는 재조합 바이러스 벡터의 감염성을 방해하여, 재조합 바이러스 벡터가 벡터 게놈에서 발현 카세트에 의해 인코딩된 유전자 산물의 유효량을 전달하는 것을 방지한다. 환자의 혈청에서 중화 항체를 평가하기 위한 다양한 방법이 이용될 수 있다. 방법과 분석이라는 용어는 호환 가능하게 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "중화 분석" 및 "혈청 바이러스 중화 분석"은 바이러스의 감염성을 방지할 수 있는 전신 항체의 존재를 검출하기 위한 혈청학적 테스트를 지칭한다. 이와 같은 분석은 또한 표적을 중화시키는 항체의 결합 능력(예를 들어, 크기) 또는 효율을 정성적으로 또는 정량적으로 분별할 수 있다. 면역학적 분석은 효소면역측정법(EIA), 방사성 동위원소를 사용하는 방사면역측정법(RIA), 형광 물질을 사용하는 형광면역측정법(FIA), 화학발광 물질을 사용하는 화학발광면역측정법(CLIA) 및 입자 계수 기법을 이용하는 계수면역측정법(CIA), 기타 변형된 분석법, 예컨대, 웨스턴 블롯, 면역조직화학(IHC) 및 응집 반응을 포함할 수 있다. 가장 일반적인 효소면역측정법 중 하나는 효소 결합 면역흡착 분석법(ELISA)이다.

[0020] 적합한 방법의 예는, 예를 들어, 문헌[R Calcedo, et al, Journal Infectious Diseases, 2009, 199:381-290; GUO, et al., "Rapid AAV_Neutralizing Antibody Determination with a Cell-Binding Assay", Molecular Therapy: Methods & Clinical Development Vol. 13 June 2019, T. Ito et al, "A convenient enzyme-linked immunosorbent assay for rapid screening of anti-adeno-associated virus neutralizing antibodies", Ann Clin Biochem 2009; 46: 508-510; 미국 제2018/0356394A2호(Voyager Therapeutics)]에 기재된 것을 포함한다. 추가적으로 시판 키트가 존재한다(예를 들어, Athena Diagnostics, Invitrogen, ThermoFisher.com; Covance).

[0021] 항체의 중화 능력은 보통 리포터 유전자, 예컨대 루시페라제 또는 GFP의 발현을 통해 측정된다. 중화 항체의 활성을 결정하고 비교하기 위해, 테스트된 항체는 본 명세서에 기재된 중화 분석법 중 하나에서 50% 이상의 중화 활성을 나타내어야 한다. 일부 예에서, 중화 능력은 리포터 유전자 산물(예를 들어, 루시페라제, GFP)의 활성을 측정함으로써 결정된다. 특정 바이러스 벡터에 대한 항체의 중화 능력은 적어도 50%, 예를 들어, 적어도 55%, 60%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 적어도 99%일 수 있다.

[0022] 현재, 많은 임상 시험은 테스트 중인 바이러스 벡터의 캡시드(또는 외피)에 대해 NAb가 존재하는지에 대하여 잠재적인 환자를 테스트할 것을 요구한다. 특정 임상 시험은 현재 1:20 이상, 1:10 이상, 또는 1:5 이상의 NAb 역가를 시험에서 치료를 위한 배제 조건으로 사용한다. 이는 바이러스 벡터가 전신으로 전달될 경우에 특히 중요하다. 그러나, 본 명세서에서 제공된 조성물 및 방법은 효과적인 유전자 요법(또는 백신) 치료를 받기 위해 이러한 배제 기준 중 하나, 둘 또는 모두에 속하는 환자를 허용할 수 있다. 효과적인 유전자 전달은 미리 선택된 NAb 역가가 없는 환자 집단에 대해 선택된 표준을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 효과적인 유전자 전달은 이식유전자 발현, 질환 바이오마커, 질환 증상의 감소, 질환 진행의 감소, 및/또는 개선된 임상 후유증의 기타 미리 선택된 결정 요인을 측정함으로써 결정될 수 있다.

[0023] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "NAb 역가"는 그의 표적화된 에피토프(예를 들어, AAV)의 생리학적 효과를 중화시키는 중화 항체(예를 들어, 항-AAV Nab)가 얼마나 많이 생산되는지에 대한 측정값을 지칭한다. 항-AAV NAb 역가는, 예를 들어, 문헌[Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390]에 기재된 바와 같이 측정될 수 있으며, 상기 문헌은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0024] 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터의 현탁액을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일

실시형태에서, 방법은 제형 완충액 중 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV의 현탁액을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0025] 조성물(들) 및 방법(들)은 벡터를 이용하여 치료를 필요로 하는 대상체(인간 환자)의 치료를 허용한다. 특히 바람직한 실시형태에서,

[0026] 1. FcRn 리간드

[0027] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "FcRn 리간드"는 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)와 환자의 중화 항체 사이의 결합을 차단하거나 현저하게 감소시키는 임의의 모이어티(예를 들어, 제한 없이, 펩타이드, 단백질, 항체, shRNA, RNAi, 펩타이드, 단백질, 또는 항체를 인코딩하는 핵산, 또는 소분자 약물)이다. 원하는 실시형태에서, 리간드는 본 명세서에서 "항-FcRn"으로 지칭될 수 있다. 특정 실시형태에서, FcRn 리간드는 알부민에 대한 FcRn 결합을 차단하지 않으면서 환자의 NAb에 대한 FcRn 결합을 차단한다. 이는 본 명세서에서 FcRn-IgG 차단 리간드, FcRn-NAb 차단 리간드, 또는 항-FcRn 리간드로 지칭될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "FcRn에 대한 IgG 결합을 저해한다"는 환자의 천연 FcRn(예를 들어, 인간 환자에서 인간 FcRn)에 대한 IgG(예를 들어, IgG1)의 결합을 차단하거나 저해하는 리간드의 능력을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 리간드는, 예를 들어, IgG가 결합하는 인간 FcRn 상의 부위에서, FcRn에 결합한다. 따라서, 리간드는 FcRn에 대한 환자의 IgG 자가항체의 결합을 저해한다. 일부 실시형태에서, 리간드는 IgG에 대한 결합을 실질적으로 또는 완전히 저해한다. 일부 실시형태에서, IgG의 결합은 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95%, 또는 심지어 100%만큼 감소된다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 알부민 수준을 차단하거나 방해하지 않고 FcRn을 특이적으로 저해한다는 것은 선택된 항-FcRn 리단드의 특성 및 FcR에 대한 항-AAV 중화 항체의 결합을 특이적으로 감소시키는 상기 리간드의 능력을 지칭한다. "특이적으로"란, 본 명세서에서 제공된 항-FcRn 항체 요법을 이용한 치료 후 환자가 적어도 필요한 혈청 알부민의 최소 수준을 유지함을 의미한다. 바람직하게는, 환자 알부민 수준은 정상 범위, 예를 들어, 약 3.4 g/dℓ 내지 약 5.5 g/dℓ(34 내지 54 g/ℓ) 내에서 유지되지만, 약한 정도의 고갈(예를 들어, 2.8 내지 3.4 g/dℓ) 내지 중간 정도의 알부민 고갈(2 g/dℓ 내지 2.7 g/dℓ)을 특징으로 할 수 있다. 약한 정도, 중간 정도 또는 심한 정도의 알부민 고갈(예를 들어, 3 g/dℓ 미만)이 있는 환자는 여전히 치료 요법의 후보가 될 수 있다. 특정 실시형태에서, 알부민 대체 요법(예를 들어, 정맥내 주입으로 전달됨)은 본 명세서에서 제공된 요법과 함께 추가로 공동 투여될 수 있다.

[0030] 항-FcRn 면역글로불린

[0031] 특정 실시형태에서, 중쇄(H) CDR H1[서열번호 16] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, CDR H2[서열번호 18] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, CDR H3[서열번호 20] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 상보성 결정 영역(CDR)을 갖는 단클론성 항체가 선택된다. 특정 실시형태에서, WO 2016/124521의 N027의 전장 중쇄가 제공된다. 예를 들어, 서열번호 8 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 참조한다. 특정 실시형태에서, CDR H1, H2 및/또는 H3 중 임의의 것에서 1개 이하의 아미노산 변화가 있다. 특정 실시형태에서, 중쇄에서 1 내지 4개 이하의 아미노산 변화가 있다. 특정 실시형태에서, 중쇄의 CDR이 사용을 위해 선택되지만, 상기 CDR은 상이한 항체 스캐폴드로 조작되고 상이한 중쇄 불변 영역이 선택된다. 특정 실시형태에서, CDR L1[서열번호 10] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, CDR L2[서열번호 12] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, CDR L3[서열번호 14] 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 경쇄 CDR을 갖는 단클론성 항체가 선택된다. 특정 실시형태에서, WO 2016/124521의 N027의 전장 중쇄가 제공된다. 예를 들어, 서열번호 7 또는 이와 적어도 95% 동일한 서열을 참조한다. 특정 실시형태에서, CDR L1, L2 및/또는 L3 중 임의의 것에서 1개 이하의 아미노산 변화가 있다. 특정 실시형태에서, 경쇄에서 1 내지 4개 이하의 아미노산 변화가 있다. 특정 실시형태에서, 경쇄의 CDR이 사용을 위해 선택되지만, 상기 CDR은 상이한 항체 스캐폴드로 조작되고 상이한 경쇄 불변 영역이 선택된다. 특정 실시형태에서, 단클론성 항체는 서열번호 4 또는 8의 중쇄 및 서열번호 2 또는 7의 경쇄, 또는 이와 적어도 95% 동일하거나, 이와 적어도 97% 동일하거나, 이와 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 경쇄의 CDR은 서열번호 41의 CDR L3 변이체 및/또는 서열번호 42의 CDR L2 변이체, 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열로부터 추가로 선택된다. 특정 실시형태에서, 중쇄의 CDR은 서열번호 21, 22 및 43의 CDR H1 변이체, 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 23, 24, 25 및 44의 CDR H2 변이체, 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열로부터 추가로 선택된다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "상보적 결정 영역" 및 "CDR"은 서열에서 초가변성이고/이거나 구조적으로 한정된 루프를 형성하는 항체 가변 도메인의 영역을 지칭한다. CDR은 또한 초가변 영역으로도 알려져

있다. 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 각각 3개의 CDR을 갖는다. 경쇄 가변 영역은 CDR L1, CDR L2 및 CDR L3을 포함한다. 중쇄 가변 영역은 CDR H1, CDR H2 및 CDR H3을 포함한다. 각각의 CDR은 Kabat에 의해 정의된 바와 같은 상보성 결정 영역으로부터의 아미노산 잔기(즉, 경쇄 가변 영역에서 잔기 약 24 내지 약 34(CDR L1), 약 50 내지 약 56(CDR L2) 및 약 89 내지 약 97(CDR L3) 및 중쇄 가변 영역에서 잔기 약 31 내지 약 35(CDR H1), 약 50 내지 약 65(CDR H2) 및 약 95 내지 약 102(CDR H3))를 포함할 수 있다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "가변 영역" 및 "가변 도메인"은 상보성 결정 영역(CDR, 예를 들어, CDR L1, CDR L2, CDR L3, CDR H1, CDR H2 및 CDR H3) 및 프레임워크 영역(FR)의 아미노산 서열을 포함하는 항체의 경쇄 및 중쇄의 일부를 지칭한다. CDR 및 FR에 부여된 아미노산 위치는 Kabat에 따라 정의된다(Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). 넘버링 시스템을 사용하여, 실제 선형 아미노산 서열은 가변 영역의 CDR(본 명세서에서 추가로 정의됨) 또는 FR(본 명세서에서 추가로 정의됨)의 단축 또는 이로의 삽입에 해당하는 더 적거나 추가적인 아미노산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 중쇄 가변 영역은 CDR H2의 잔기 52 다음에 삽입된 단일 잔기(즉, Kabat에 따르면 잔기 52a) 및 중쇄 FR의 잔기 82 다음에 삽입된 잔기(즉, Kabat에 따르면 잔기 82a, 82b, 82c 등)를 포함할 수 있다. 잔기의 Kabat 넘버링은 "표준" Kabat 넘버링된 서열과 함께 항체 서열의 상동성 영역에서의 정렬에 의해 주어진 항체에 대해 결정될 수 있다.

[0034] 용어 "면역글로불린"은 본 명세서에서 항체, 이의 기능성 단편, 및 면역어드헤신를 포함하는 데 사용된다. 특정 실시형태에서, 이들은 또한 본 명세서에서 "면역글로불린 작제물" 또는 "항체 작제물"이라고도 한다. 항체는, 예를 들어, 다클론성 항체, 단클론성 항체, 낙타화(calmelized) 단일 도메인 항체, 세포내 항체("인트라바디"), 재조합 항체, 다중특이성 항체, 항체 단편, 예컨대, Fv, Fab, $F(ab)_2$, $F(ab)_3$, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, 단일 사슬 가변 단편 항체(scFv), 탠덤(tandem)/(비스)-scFv, Fc, pFc', scFvFc(또는 scFv-Fc), 이황화물 Fv(dsfv), 이중특이성 항체(bc-scFv), 예컨대 BiTE 항체; 낙타과 항체, 재표면화 항체, 인간화 항체, 완전 인간 항체, 단일-도메인 항체(sdAb, NANOBODY®로도 알려짐), 다중-도메인 항체(mdAb), 키메라 항체, 적어도 하나의 인간 불변 영역을 포함하는 키메라 항체 등을 포함하여 다양한 형태로 존재할 수 있다.

[0035] 본 명세서에 기재된 항-FcRn 면역글로불린 작제물은 시험관 내 임의의 적합한 생산 시스템에서 생산되고, 정제되며, 본 명세서에 기재된 바와 같이 환자에게 전달하기에 적합한 조성물로 제형화될 수 있다. 선택적으로, 이들 작제물은 하나 이상의 면역글로불린 작제물을 포함할 수 있다. 선택적으로, 이들 작제물(예를 들어, 단클론성 항체)은 바이러스 벡터와 별도로 제형화될 수 있다. 다른 실시형태에서, 작제물은 바이러스 벡터와 함께 제형화되고 전달될 수 있다.

[0036] 다른 실시형태에서, 또 다른 단클론성 항체가 선택되거나, 조합되어 사용될 수 있다. 이와 같은 항체의 예는, 예를 들어, 로자놀릭시주맙(UCB7665)(UCB SA); IMVT-1401, RVT-1401(HL161), HBM9161(모두 HanAll BioPhrma Co. Ltd 제품), 니포칼리맙(M281)(Momenta Pharmaceuticals Inc), ARGX-113(에프가티지모드)(Argenx S.E.), 오릴라놀리맙(ALXN 1830, SYNT001, Alexion Pharmaceuticals Inc), SYNT002, ABY-039(Affibody AB), 또는 DX-2507(Takeda Pharmaceutical Co. Ltd), 이들의 조합, 또는 다른 리간드와 조합된 이들 항체 중 하나를 포함할 수 있다. 대안적으로, 다른 항체 작제물은 특히 이들 항체로부터 유래될 수 있다.

[0037] 치료용 단백질로서 하나 이상의 항-FcRn 항체 작제물을 포함하는 본 발명의 약제학적 조성물은 정맥내 투여, 비경구 투여, 피하 투여, 근육내 투여, 동맥내 투여, 척수강내 투여, 또는 복강내 투여용으로 제형화될 수 있다. 특히, 정맥내 투여가 바람직하다. 약제학적 조성물은 또한, 경구, 비강, 스프레이, 에어로졸, 직장 또는 질 투여용으로 제형화되거나 이를 통해 투여될 수 있다. 주사 가능한 제형의 경우, 다양한 효과적인 약제학적 담체가 당업계에 알려져 있다. 본 발명의 약제학적 조성물의 투약량은 투여 경로 및 물리적 특성, 예를 들어, 대상체의 연령, 체중, 전반적인 건강 상태를 포함하는 요인에 따라 달라진다. 약제학적 조성물은 0.01 내지 500 mg/kg(예를 들어, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 mg/kg), 및 더 구체적인 실시형태에서 약 1 내지 약 100 mg/kg, 더 구체적인 실시형태에서 약 1 내지 약 50 mg/kg, 더 구체적인 실시형태에서 약 15 내지 약 30 mg/kg 범위의 항-FcRn 항체 작제물의 투약량을 포함할 수 있다. 투약량은 질환의 정도 및 대상체의 다양한 매개변수와 같은 통상적인 요인에 따라 의사에 의해 조정될 수 있다. 약제학적 조성물은 투약 제형과 호환되는 방식으로 투여된다. 약제학적 조성물은 다양한 투약 형태, 예를 들어, 정맥내 투약 형태, 피하 투약 형태 및 경구 투약 형태(예를 들어, 섭취 가능한 용액, 약물 방출 캡슐)로 투여된다. 일반적으로, 치료용 단백질은 1 내지 100 mg/kg, 예를 들어, 1 내지 50 mg/kg으로 투약된다. 특정 실시형태에서, 이들 조성물은 미리 결정된 일수(예를 들어, 3일 내

지 7일) 동안 또는 또 다른 미리 선택된 기간 동안 상승 또는 하강 용량으로 투약될 수 있다. 선택적으로, 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)는 적합한 전달 벡터(예를 들어, rAAV 또는 다른 바이러스 벡터)로 조작될 수 있고 상기 양으로 단백질 수준을 발현하기에 적합한 양으로 전달될 수 있다.

[0038] 항-FcRn 항체 작제물을 포함하는 약제학적 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게, 예를 들어, 매일, 매주, 매월, 2년마다, 매년, 또는 의학적으로 필요한 경우 1회 이상(예를 들어, 1 내지 10회 이상) 투여될 수 있다. 투약량은 단일 또는 다중 투약 요법으로 제공될 수 있다.

[0039] 항-FcRn 펩타이드 및 단백질

[0040] 선택적으로, 상기 기재한 FcRn 항체 작제물에 추가적으로 또는 대안적으로, 적합한 항-FcRn 리간드는 IgG 결합을 저해하기 위해 인간 FcRn에 결합하는 펩타이드 또는 단백질 작제물일 수 있다. 예는, 예를 들어, SYN1436(Biogen), SYN 1327(서열번호 30)의 이량체인 IgG와의 상호작용을 차단하기 위해 FcRn에 결합하는 26-아미노산 펩타이드, 또는 이의 변형된 변이체(서열번호 31), 또는 이의 절단되지 않고 이량체화되지 않은 펩타이드 변이체 SYN746(서열번호 29)을 포함할 수 있다. 또한, 미국 특허 제9,527,890호를 참조한다. 또한, 예는 FcRN 친화성 결합 분자, 예를 들어, 58개의 아미노산 및 접힌 역평행 3중 나선 다발 구조를 갖는 Z_{FcRn}, 또는 $Z_{FcRn,}$ 융합 단백질, 예컨대 Z_{FcRn} - 알부민 결합 도메인(ABD) 융합 단백질을 포함할 수 있다. 여기서, ZFcRn 펩타이드는 서열번호 26의 아미노산 서열을 갖는 ZFcRn-2, 서열번호 27의 아미노산 서열을 갖는 ZFcRn-4 및/또는 서열번호 28의 아미노산 서열을 갖는 ZFcRn-16을 포함할 수 있다(Seijsing, J., et al., 2014, PNAS, 111(48):1710-17115). 다른 적합한 항-FcRn 리간드는, 예를 들어, QRFCTGHFGGLYPCNGP(서열번호 32), GGGCVTGHFGGIYCNYQ(서열번호 33), KIICSPGHFGGMYCQGK(서열번호 34), PSYCIEGHIDGIYCFNA(서열번호 35) 및/또는 NSFCRGRPGHFGGCYLF(서열번호 36)를 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2007/098420 A2를 참조한다. 또한, 적합한 단백질 작제물의 예는 DX-2504 경쇄(서열번호 37), DX-2504 중쇄(서열번호 38), DX-2507 경쇄(서열번호 39) 및/또는 DX-2507 중쇄(서열번호 40)를 포함할 수 있다. 또한, 미국 제9,359.438 B2호를 참조한다.

[0041] 약제학적 조성물은 0.01 내지 500 mg/kg(예를 들어, 0.01, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 mg/kg), 더 구체적인 실시형태에서 약 1 내지 약 100 mg/kg, 더 구체적인 실시형태에서 약 1 내지 약 50 mg/kg 범위의 항-FcRn 펩타이드 또는 단백질의 투약량을 포함할 수 있다.

[0042] 단백질 및 펩타이드 생산

[0043] 항-FcRn 단백질 또는 펩타이드(예를 들어, 면역글로불린, 면역글로불린 작제물, 항체, 항체 작제물)의 아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열은 당업계에 알려진 다양한 방법에 의해 제조될 수 있다. 서열 목록은 시험관 내에서 발현되고 실시예에 사용된 항체의 경쇄 및 중쇄를 발현시키는 데 사용된 핵산 서열을 제공한다. 이들 서열은, 예를 들어, 서열번호 5 또는 이와 적어도 90% 동일하고 서열번호 7의 아미노산 서열을 갖는 M281 경쇄를 인코딩하는 서열, 서열번호 6 또는 이와 적어도 90% 동일하고 서열번호 8의 M281 중쇄 아미노산 서열을 인코딩하는 서열, 서열번호 9 또는 이와 적어도 90% 동일하고 서열번호 10의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-L1을 인코딩하는 서열, 서열번호 11 또는 이와 90% 동일하고 서열번호 12의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-L2를 인코딩하는 서열, 서열번호 13 또는 이와 90% 동일하고 서열번호 14의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-L3을 인코딩하는 서열, 서열번호 15 또는 이와 적어도 90% 동일하고 서열번호 16의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-H1을 인코딩하는 서열, 서열번호 17 또는 이와 90% 동일하고 서열번호 18의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-H2를 인코딩하는 서열, 서열번호 19 또는 이와 90% 동일하고 서열번호 20의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-H3을 인코딩하는 서열을 포함한다. 다른 핵산 서열은 서열번호 21 또는 서열번호 22의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-H1 변이체, 서열번호 23, 또는 서열번호 24, 또는 서열번호 25의 아미노산 서열을 갖는 M281 CDR-H2 변이체 중 하나 이상을 인코딩하는 것을 포함할 수 있다.

[0044] 다른 핵산 서열은 서열번호 26(Z FcRn2), 서열번호 27(Z FcRn-4); 서열번호 28(Z FcRn-16), SYN746(서열번호 29), 서열번호 30(SYN 1327), 변형된 SYN1327(서열번호 31), 98420-p1(서열번호 32), 98420-p2(서열번호 33), 98420-p3(서열번호 34), 98420-p4(서열번호 35), 98420-p5(서열번호 36), DX-2504-LC(서열번호 37), DX-2504-HC(서열번호 38), DX-2507-LC(서열번호 39), DX-2507-HC(서열번호 40), DX-CDR-L3(서열번호 41), DX-CDR-L2(서열번호 42), DX-CDR-H1(서열번호 43), 또는 DX-CDR-H2(서열번호 44)의 아미노산 서열을 갖는 단백질 및 펩타이드 중 하나 이상을 인코딩하는 것을 포함할 수 있다.

[0045] 항-FcRn 리간드를 인코딩하는 핵산 분자는 표준 기법, 예를 들어, 유전자 합성을 사용하여 얻을 수 있다. 대안

적으로, 야생형 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항체)를 인코딩하는 핵산 분자는 당업계의 표준 기법, 예를 들어, QuikChange™ 돌연변이유발을 사용하여 특정 아미노산 치환을 포함하도록 돌연변이될 수 있다. 핵산 분자는 뉴클레오타이드 합성기 또는 OCR 기법을 사용하여 합성될 수 있다. 항-FcRn 항체 또는 다른 리간드를 인코딩하는 핵산 서열은 원핵 또는 진핵 숙주 세포에서 핵산 분자를 복제하고 발현할 수 있는 벡터에 삽입될 수 있다. 시험관 내 단백질 또는 펩타이드 생산에 적합한 많은 벡터가 당업계에서 이용 가능하고 사용될 수 있다. 각각의 벡터는 특정 숙주 세포와의 호환성을 위해 조정되고 최적화될 수 있는 다양한 구성요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 벡터 구성요소는 복제 기점, 선택 마커 유전자, 프로모터, 리보솜 결합 부위, 신호 서열, 관심이 있는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열, 및 전사 종결 서열을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 벡터는 항-FcRn 항체와 같은 리간드의 생체 내 생산을 위해 설계될 수 있다. 이와 같은 벡터는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어, rAAV 또는 유전자 산물을 인코딩하는 rAAV와 관련하여 기재된 것과 같은 다른 바이러스 벡터로부터 선택될 수 있다.

[0046] 일부 실시형태에서, 항-FcRn 항체의 생산에 사용되는 벡터는 서열번호 2의 항-FcRn 단백질 M281-LC의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호 1의 핵산 서열을 포함하는 플라스미드이다. 일부 실시형태에서, 항-FcRn 단백질 또는 펩타이드의 생산에 사용되는 벡터를 포함하는 플라스미드는 서열번호 4의 항-FcRn 단백질 M281-HC의 아미노산 서열을 인코딩하는 서열번호 3의 핵산 서열 또는 이와 적어도 90% 동일한 서열을 포함한다.

[0047] 일부 실시형태에서, 포유동물 세포는 숙주 세포로 사용된다. 포유동물 세포 유형의 예는 인간 배아 신장(HEK)(예를 들어, HEK293, HEK 293F), 중국 햄스터 난소(CHO), HeLa, COS, PC3, Vero, MC3T3, NSO, Sp2/0, VERY, BHK, MDCK, W 138, BT483, Hs578T, HTB2, BT20, T47D, NSO(임의의 면역글로불린 사슬을 내인성으로 생산하지 않는 뮤린 골수종 세포주), CRL7030, 및 HsS78Bst 세포를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 다른 실시형태에서, 이. 콜라이(*E. coli*) 세포는 본 발명을 위한 숙주 세포로서 사용된다. 상이한 숙주 세포는 단백질 산물의 번역 후 가공 및 변형을 위한 특징적이고 특이적인 메커니즘을 갖는다. 발현된 항-FcRn 항체(또는 다른 리간드)의 올바른 변형 및 가공을 보장하기 위해 적절한 세포주 또는 숙주 시스템이 선택될 수 있다. 상기-기재된 발현 벡터는 당업계의 통상적인 기법, 예를 들어, 형질전환, 형질감염, 전기천공, 인산칼슘 침전, 및 직접 미세주입을 사용하여 적절한 숙주 세포에 도입될 수 있다.

[0048] 벡터가 단백질 생산을 위해 숙주 세포에 도입되면, 숙주 세포는 프로모터를 유도하거나, 형질전환체를 선택하거나, 원하는 서열을 인코딩하는 유전자를 증폭시키는 데 적절하게 변형된 통상적인 영양 배지에서 배양된다. 치료용 단백질의 발현 방법은 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어, 문헌[Paulina Balbas, Argelia Lorence (eds.) Recombinant Gene Expression: Reviews and Protocols (Methods in Molecular Biology), Humana Press; 2nd ed. 2004 (2004년 7월 20일) 및 Vladimir Voynov and Justin A. Caravella (eds.) Therapeutic Proteins: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) Humana Press; 2nd ed. 2012 (2012년 6월 28일)]을 참조한다.

[0049] 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항체 또는 다른 펩타이드 또는 단백질)를 생산하는 데 사용되는 숙주 세포는 당업계에 알려지고 선택된 숙주 세포의 배양에 적합한 배지에서 성장될 수 있다. 포유동물 숙주 세포에 적합한 배지는, 예를 들어, 최소 필수 배지(Minimal Essential Medium: MEM), 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM), Expi293™ 발현 배지, 소태아혈청(FBS)이 보충된 DMEM, 및 RPMI-1640을 포함할 수 있다. 박테리아 숙주 세포에 적합한 배지의 예는 루리아 브로쓰(Luria broth: LB)와 필수적인 보충제, 예컨대, 선별제, 예를 들어, 암피실린을 포함한다. 숙주 세포는, 약 20℃ 내지 약 39℃, 예를 들어, 25℃ 내지 약 37℃, 바람직하게는 37℃와 같은 적합한 온도, 및 CO_2 수준에서 배양된다. 배지의 pH는 일반적으로 주로 숙주 유기체에 따라 약 6.8 내지 7.4, 예를 들어, 7이다. 본 발명의 발현 벡터에 유도성 프로모터가 사용되는 경우, 프로모터의 활성화에 적합한 조건 하에서 단백질 발현이 유도된다. 단백질 회수는, 일반적으로 삼투 충격, 초음파 처리 또는 용해와 같은 수단에 의해, 전형적으로 숙주 세포를 파괴하는 것을 포함한다. 세포가 파괴되면, 원심분리 또는 여과에 의해 세포 파편을 제거할 수 있다. 단백질은 추가로 정제될 수 있다. 항-FcRn 항체는 단백질 정제 분야에 알려진 임의의 방법, 예를 들어, 단백질 A 친화성, 기타 크로마토그래피(예를 들어, 이온 교환, 친화성 및 크기 배제 컬럼 크로마토그래피), 원심분리, 차등 용해도, 또는 단백질 정제를 위한 임의의 다른 표준 기법에 의해 정제될 수 있다(문헌[Process Scale Purification of Antibodies, Uwe Gottschalk (ed.) John Wiley & Sons, Inc., 2009] 참조). 일부 경우에, 항-FcRn 항체(또는 다른 리간드)는 정제를 용이하게 하기 위해 펩타이드와 같은 마커 서열에 접합될 수 있다. 마커 아미노산 서열의 예는 마이크로몰 친화성으로 니켈-기능화된 아가로스 친화성 컬럼에 결합하는 헥사-히스티딘 펩타이드(His-tag)이다. 정제에 유용한 다른 펩타이드 태그는 인플루엔자 헤마글루티닌 단백질로부터 유도된 에피토프에 해당하는 헤마글루티닌 "HA" 태그를 포함하지만

이에 제한되지 않는다.

[0050] 항-FcRn 단백질 또는 펩타이드의 생체 내 발현

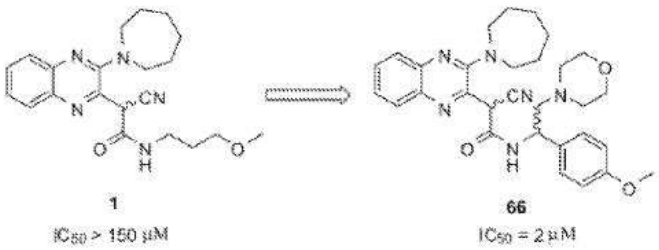
[0051] 특정 실시형태에서, 항-FcRn 면역글로불린, 펩타이드 및/또는 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 대상체(예를 들어, 인간 환자)에게 전달되어, 대상체가 항-FcRn 면역글로불린, 펩타이드 및/또는 단백질(예를 들어, 항-FcRn 항체)을 생산할 수 있게 한다. 치료법의 맥락에서, 이는 이러한 핵산 서열을 보유하는 바이러스 또는 비-바이러스 벡터를 투여함으로써 달성될 수 있다. 이와 같은 벡터는, 숙주 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 항-FcRn 리간드를 인코딩하는 핵산 분자를 포함하는, 복제-불능 아데노-연관 바이러스(AAV) 또는 다른 바이러스 벡터, 예를 들어, 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터(예를 들어, 백시니아 바이러스 벡터, 예컨대, 변형된 백시니아 앙카라(MVA), 또는 알파바이러스 벡터)일 수 있다. 선택적으로, 조절 서열은 약리학적 모이어티(예를 들어, 라팔로그 또는 라파마이신)와 함께 투약하여 항-FcRn 리간드의 발현 제어를 허용하는 조절 가능한 프로모터를 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 조절 서열은 또 다른 적합한 프로모터, 예를 들어, 구성적 프로모터, 조직-특이적 프로모터, 또는 다른 원하는 유형의 프로모터일 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-FcRn 리간드는 치료 또는 백신 유전자 산물(들)에 대한 코딩 서열을 전달하는 것과 동일한 벡터를 통해 전달된다. 벡터는 (예를 들어, 형질전환, 형질감염, 전기천공, 인산칼슘 침전, 및 직접 미세주입, 감염 등에 의해) 대상체의 세포 내부에 들어가면, 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항체 작제물)의 발현을 촉진할 것이며, 이는 이후 세포에서 분비된다.

[0052] 특정 실시형태에서, 숙주 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 인코딩하는 핵산 분자는 발현 카세트 내의 핵산 서열이다.

[0053] 특정 실시형태에서, 수용체-표적화 나노입자가 사용될 수 있으며, 여기서 나노입자는 숙주 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 인코딩하는 캡슐화된 핵산 서열을 포함한다. 예를 들어, 수용체-표적화 나노입자는 mRNA 또는 펩타이드를 포함하는 다른 활성제를 전달하는 데 사용될 수 있다. 이와 같은 나노입자의 예는, 예를 들어, 미국 제2018/0021455A1호에 제공되어 있다.

[0054] 소분자 저해제

[0055] 특정 실시형태에서, FcRn-IgG 결합의 소분자 저해제가 선택될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Z Wang, et al, "Discovery and structure-activity relationships of small molecules that block the human immunoglobulin G-human neonatal Fc receptor (hIgG-hFcRn) protein-protein interaction", Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, Vol 23, Issue 5, 1 March 2013, pp. 1253-1256]을 참조한다.

[0056] 

[0057] 선택적으로, 또 다른 Fc 수용체에 대한 항체 또는 다른 리간드가 본 명세서에서 제공된 바와 같은 FcRn 리간드와 함께 사용될 수 있다. 이와 같은 다른 수용체는, 예를 들어, IgA에 대한 수용체(예를 들어, Fcα(CD89)), IgE에 대한 수용체(FcεRI), IgM에 대한 수용체(FCμR)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[X Li and RP Kimberly, Expert Opin Ther Targets, 2014 March; 18(3): 335-350]을 참조하며, 이는 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0058] 2. 발현 카세트

[0059] 바이러스 벡터에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하기 위한 요법 및 방법은 바이러스 벡터 및 항-FcRn-IgG 리간드를 투여하는 단계를 포함한다. 바이러스 벡터는 표적 세포에서의 발현을 위한 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열, 및 바이러스 벡터에 대한 중화 항체 없이 환자에게 투여될 때 또는 본 명세서에서 제공된 방법으로 투여될 때 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "발현 카세트"는 생물학적으로 유용한 핵산 서열(예를 들어, 단백질, 효소

또는 기타 유용한 유전자 산물 등을 인코딩하는 유전자 cDNA, mRNA 등) 및 핵산 서열 및 이의 유전자 산물의 전사, 번역 및/또는 발현을 지시하거나 조절하는 이에 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된" 서열은 핵산 서열과 인접하거나 비-인접한 조절 서열 및 트랜스 또는 시스 핵산 서열에서 작용하는 조절 서열을 둘 다 포함한다. 이와 같은 조절 서열은 전형적으로, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론, 코작 서열, 폴리아데닐화 서열, 및 TATA 신호 중 하나 이상을 포함한다. 발현 카세트는 유전자 서열의 상류(유전자 서열에 대해 5')에 있는 조절 서열, 예를 들어, 하나 이상의 프로모터, 인핸서, 인트론 등, 및 유전자 서열의 하류(유전자 서열에 대해 3')에 있는 조절 서열, 예를 들어, 다른 요소 중에서 폴리아데틸화 부위를 포함하는 3' 비번역 영역(3' UTR)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 조절 서열은 유전자 산물의 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되며, 여기서 조절 서열은 개재 핵산 서열, 즉 5'-비번역 영역(5'UTR)에 의해 유전자 산물의 핵산 서열로부터 분리된다. 특정 실시형태에서, 발현 카세트는 하나 이상의 유전자 산물의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 발현 카세트는 모노시스트론 또는 바이시스트론 발현 카세트일 수 있다. 다른 실시형태에서, 용어 "이식유전자"는 표적 세포에 삽입되는 외인성 공급원 유래의 하나 이상의 DNA 서열을 지칭한다.

[0061] 전형적으로, 이와 같은 발현 카세트는 바이러스 벡터에 대한 벡터 게놈을 생성하는 데 사용될 수 있고 바이러스 게놈의 패키징 신호 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 발현 제어 서열이 측접한 본 명세서에 기재된 유전자 산물에 대한 코딩 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 벡터 게놈은 2개 이상의 발현 카세트를 포함할 수 있다. 선택적으로, 발현 카세트(및 벡터 게놈)는 UTR에 하나 이상의 후근신경절(dorsal root ganglion; drg)-miRNA 표적화 서열을 포함하여, 예를 들어, drg-독성 및/또는 축삭병을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 발명의 명칭이 모두 "Compositions for Drg-Specific Reduction of Transgene Expression"인 2019년 12월 20일자로 출원되고 현재 WO 2020/132455로 공개된 PCT/US2019/67872, 2020년 5월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/023593호, 및 2020년 6월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/038488호를 참조하며, 이들은 본 명세서에 전문이 원용된다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "벡터 게놈"은 바이러스 입자를 형성하는 파보바이러스(예를 들어, rAAV) 캡시드 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 이와 같은 핵산 서열은 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)을 포함한다. 본 명세서의 예에서, 벡터 게놈은 5'에서 3'으로, 최소한 AAV 5' ITR, 코딩 서열(들)(즉, 이식유전자(들)), 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 캡시드와 상이한 공급원의 AAV인 AAV2로부터의 ITR, 또는 전장 ITR 이외의 것이 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, ITR은 생산 동안 rep 기능을 제공하는 AAV 또는 트랜스상보성(transcomplementing) AAV와 동일한 AAV 공급원으로부터 유래된다. 또한, 다른 ITR, 예를 들어, 자가-상보적(scAAV) ITR이 사용될 수 있다. 단일-가닥 AAV 및 자가-상보적(sc) AAV는 둘 다 rAAV와 함께 포함된다. 이식유전자는 벡터 서열에 대해 이종성인 핵산 코딩 서열이며, 이는 폴리펩타이드, 단백질, 기능성 RNA 분자(예를 들어, miRNA, miRNA 저해제) 또는 관심 있는 다른 유전자 산물을 인코딩한다. 핵산 코딩 서열은 표적 조직의 세포에서 이식유전자의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 구성요소에 작동 가능하게 연결된다. 벡터 게놈의 적합한 구성요소는 본 명세서에서 보다 상세히 논의된다. 일 례에서, "벡터 게놈"은 5'에서 3'으로, 최소한 벡터-특이적 서열, (표적 세포에서 발현을 지시하는) 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 항-FcRn 항체를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 벡터-특이적 서열은 벡터 게놈을 바이러스 벡터 캡시드 또는 외피 단백질로 특이적으로 패키징하는 말단 반복 서열일 수 있다. 예를 들어, AAV 반전 말단 반복부는 AAV 및 특정 기타 파보바이러스 캡시드로 패키징하는 데 이용된다.

[0063] 일 양태에서, 원하는 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열(이식유전자)을 인코딩하는 조작된 핵산 서열, 및 이의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 일 실시형태에서, 기능성 유전자 산물을 인코딩하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조작된 핵산 서열, 및 이의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다.

[0064] 발현 카세트는 환자에게 전달하기 위한 임의의 적합한 이식유전자를 포함할 수 있다. 바이러스 벡터를 통해 전신으로 전달될 발현 카세트가 특히 적합하다. 유용한 유전자, 코딩 서열 및 유전자 산물의 예는 하기 사용 방법과 관련된 섹션에서 제공된다.

[0065] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보가 기능성 유전자 산물의 합성에 사용되는 과정을 지칭한다. 유전자 산물은 단백질, 펩타이드, 또는 핵산 중합체(예컨대, RNA, DNA 또는 PNA)일 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조절 서열", 또는 "발현 제어 서열"은 작동 가능하게 연결된 단백질

인코딩 핵산 서열의 전사를 유도, 억제, 또는 그렇지 않으면 제어하는 개시자 서열, 인핸서 서열, 및 프로모터 서열과 같은 핵산 서열을 지칭한다.

[0067] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하는 데 사용되는 바와 같은 용어 "외인성"은 핵산 또는 단백질이 염색체, 또는 숙주 세포에 존재하는 위치에서 자연적으로 발생하지 않음을 의미한다. 외인성 핵산 서열은 또한 동일한 숙주 세포 또는 대상체로부터 유래되고 동일한 숙주 세포 또는 대상체에 삽입되지만, 비-자연 상태, 예를 들어, 상이한 복제 수로, 또는 상이한 조절 요소의 제어 하에 존재하는 서열을 지칭한다.

[0068] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하는 데 사용되는 바와 같은 용어 "이종성"은 핵산 또는 단백질이 이것이 발현되는 숙주 세포 또는 대상체와 상이한 유기체 또는 동일한 유기체의 상이한 종으로부터 유래되었음을 의미한다. 플라스미드, 발현 카세트 또는 벡터(예를 들어, rAAV)에서 단백질 또는 핵산과 관련하여 사용될 때 용어 "이종성"은 단백질 또는 핵산이 당해 단백질 또는 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 다른 서열 또는 하위서열과 함께 존재함을 나타낸다.

[0069] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 인간 대상체에서의 발현 및 분비를 위해 설계된다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 근육에서의 발현을 위해 설계된다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 간에서의 발현을 위해 설계된다.

[0070] 특정 실시형태에서, 구성적 프로모터가 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 프로모터는 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 또는 닭 β-액틴 프로모터이다. 다양한 닭 베타-액틴 프로모터는 단독으로 또는 다양한 인핸서 요소와 조합하여 기재되었다(예를 들어, CB7은 사이토메갈로바이러스 인핸서 요소가 있는 닭 베타-액틴 프로모터이고; CAG 프로모터는 닭 베타 액틴의 프로모터, 제1 엑손 및 제1 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 억셉터를 포함하며; CBh 프로모터는 문헌[SJ Gray et al, Hu Gene Ther, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153]의 것임). 대안적으로, 다른 구성적 프로모터가 선택될 수 있다.

[0071] 다른 적합한 프로모터는, 예를 들어, 조직-특이적 프로모터 또는 유도성/조절 프로모터를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 이와 같은 프로모터는 인간 기원의 것이다.

[0072] 간-특이적 프로모터의 예는, 예를 들어, 갑상선 호르몬-결합 글로불린(TBG), 알부민, 문헌[Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71:5124-32]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, 문헌[Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9]; 또는 인간 알파 1-항트립신, 포스포에놀피루베이트 카복시키나제(PECK), 또는 알파-태아단백질(AFP), 문헌[Arbuthnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14]을 포함할 수 있다. 근육-특이적 프로모터의 예는, 예를 들어, 근육 크레아틴 키나제(MCK) 프로모터 및 이의 절단 형태를 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[B. Wang, et al, Gene Therapy volume 15, pages 1489-1499 (2008)]을 참조한다. 또한, 근육-특이적 전사 시스-조절 모듈(CRM), 예컨대, 문헌[S. Sarcare, et al, (Jan 2019) Nat Commun. 2019; 10: 492]에 기재된 것을 참조한다.

[0073] 대안적으로, 조절 가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 원용된, 다양한 조절 가능한 발현 시스템을 기재하는 WO 2017/106244, 예를 들어, WO 2007/126798, 미국 제6,506,379호, 및 WO 2011/126808B2에 기재된 라파마이신/라파로그 유도성 시스템을 참조한다.

[0074] 일 실시형태에서, 조절 서열은 인핸서를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조절 서열은 하나의 인핸서를 포함한다. 다른 실시형태에서, 조절 서열은 2개 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 이들 인핸서는 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서 또는 CMV 인핸서를 포함할 수 있다. 이 인핸서는 서로 인접하여 위치한 2개의 복사체에 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 복사체는 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0075] 일 실시형태에서, 조절 서열은 인트론을 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, 인트론은 닭 베타-액틴 인트론이다. 다른 적합한 인트론은 당업계에 알려진 것을 포함하며, 인간 β-글로빈 인트론, 및/또는 상업적으로 입수 가능한 Promega® 인트론, 및 WO 2011/126808에 기재된 것일 수 있다.

[0076] 일 실시형태에서, 조절 서열은 폴리아데닐화 신호(polyA)를 추가로 포함한다. 추가 실시형태에서, 폴리A는 토끼 글로빈 폴리 A이다. 예를 들어 WO 2014/151341을 참조한다. 대안적으로, 또 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열, SV40 폴리A, 티미딘 키나제(TK) 또는 합성 폴리A가 발현 카세트에 포함될 수 있다.

[0077] 본 명세서에 기재된 발현 카세트의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 연대, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0078] 3. 벡터

[0079] 일 양태에서, 기능성 인간 유전자 산물을 인코딩하는 조작된 핵산 서열 및 표적 세포에서 이의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 벡터가 본 명세서에서 제공된다. 특정 실시형태에서, 이들 벡터의 조합이 사용된다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "벡터"는 상기 핵산 서열의 복제 또는 발현을 위해 적절한 표적 세포 내로 도입될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 생물학적 또는 화학적 모이어티이다. 벡터의 예는 재조합 바이러스, 플라스미드, 리포플렉스, 폴리머좀, 폴리플렉스, 덴드리머, 세포 침투 펩타이드(CPP) 접합체, 자성 입자, 또는 나노입자를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 일 실시형태에서, 벡터는 기능성 유전자 산물(들)을 인코딩하는 외인성 또는 이종성 또는 조작된 핵산이 삽입될 수 있는 핵산 분자이며, 이는 이후 적절한 표적 세포로 도입될 수 있다. 이와 같은 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제 기점, 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 종종, 예를 들어, 벡터가 없는 세포에서 벡터가 있는 세포를 선택할 수 있는 수단을 가지며, 예를 들어, 벡터는 약물 내성 유전자를 인코딩한다. 일반적인 벡터는 플라스미드, 바이러스 게놈 및 "인공 염색체"를 포함한다. 벡터의 생성, 생산, 특성화 또는 정량화의 통상적인 방법은 당업자에게 이용 가능하다.

[0081] 일 실시형태에서, 벡터는 이의 기재된 발현 카세트, 예를 들어, "네이키드 DNA", "네이키드 플라스미드 DNA", RNA, 및 mRNA를 포함하는 비-바이러스 플라스미드이고; 예를 들어 미셀, 리포솜, 양이온성 지질 - 핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 기타 중합체, 지질 및/또는 콜레스테롤 기반 - 핵산 접합체, 및 기타 작제물, 예컨대 본 명세서에 기재된 것을 포함하여 다양한 조성물 및 나노 입자와 커플링된다. 예를 들어, 문헌[X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774?787; 웹 공개: 2011년 3월 21일]; WO2013/182683, WO 2010/053572 및 WO 2012/170930을 참조하며 이들 모두 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0082] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 "복제-결핍 바이러스" 또는 기능성 유전자 산물(들)을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 바이러스 캡시드 또는 외피에 패키징된 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하는 "바이러스 벡터"이며, 여기서 또한 바이러스 캡시드 또는 외피 내에 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제-결핍이고; 즉, 상기 서열은 자손 비리온을 생성할 수 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제하는 데 필요한 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하지 않지만(게놈은 인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호가 측접한 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열만을 포함하는 "거틀리스(gutless)"가 되도록 조작될 수 있음), 이들 유전자는 생산 동안 공급될 수 있다. 따라서, 복제에 필요한 바이러스 효소가 존재하는 경우를 제외하고 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 발생할 수 없으므로 유전자 요법에서 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

[0083] 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 보카바이러스, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV), 또는 다른 재조합 파보바이러스(예를 들어, 보카바이러스 또는 하이브리드 AAV/보카바이러스), 레트로바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터(예를 들어, 백시니아 바이러스 벡터, 예컨대, 변형된 백시니아 앙카라(MVA)), 또는 알파바이러스 벡터)와 같은 임의의 적합한 전달 벡터를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터는 이를 필요로 하는 환자에게 유전자 산물을 전달하기 위한 재조합 AAV이다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 패키징 세포주는 인 벡터(in vector)(예를 들어, 재조합 AAV)의 생산에 사용된다. 숙주 세포는 임의의 수단, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전, 미세주입, 형질전환, 바이러스 감염, 형질 감염, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합에 의해 세포 내로 도입된 외인성 또는 이종성 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포(예를 들어, 인간, 곤충, 또는 효모)일 수 있다. 숙주 세포의 예는 단리된 세포, 세포 배양물, 대장균(에스케리치아 콜라이(*Escherichia coli*)) 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 비-포유동물 세포, 곤충 세포, HEK-293 세포, 간 세포, 신장 세포, 중추신경계 세포, 뉴런, 신경아교세포, 또는 줄기 세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0085] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "표적 세포"는 기능성 유전자 산물의 발현이 요구되는 임의의 표적 세포를 지칭한다. 특정 실시형태에서, 용어 "표적 세포"는 치료될 대상체의 세포를 지칭하는 것으로 의도된다. 표적 세포의 예는 간 세포, 골격근 세포, 심장 세포 등을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 표적 세포의 다른 예는 본 명세서에 기재되어 있다.

[0086] 본 명세서에 기재된 벡터 내의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 연대, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0087] 아데노-연관 바이러스(AAV)

[0088] 일 양태에서, AAV 캡시드 및 내부에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)가 본 명세서에서 제공된다. 특정 실시형태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' 반전 말단 반복(ITR), 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 산물을 인코딩하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 유전자 산물의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 벡터 게놈은 AAV 5' 반전 말단 반복부(ITR), 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 산물을 인코딩하는 조작된 핵산 서열, 표적 세포에서 유전자 산물의 발현을 지시하는 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조절 서열은 조직-특이적 프로모터(예를 들어, 근육 또는 간)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 조절 서열은 인핸서를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조절 서열은 인트론을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조절 서열은 폴리 A를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV1 캡시드이다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV8 캡시드이다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드이다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAVhu68 캡시드이다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAVrh91 캡시드이다.

[0089] 일 실시형태에서, 조절 서열은 상기 기재된 바와 같다. 일 실시형태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' 반전 말단 반복부(ITR), 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트, 및 AAV 3' ITR을 포함한다.

[0090] ITR은 벡터 생산 동안 게놈의 복제 및 패키징을 담당하는 유전 요소이며 rAAV를 생성하는 데 필요한 유일한 바이러스 시스 요소이다. 일 실시형태에서, ITR은 캡시드를 공급하는 것과 상이한 AAV로부터 유래한다. 바람직한 실시형태에서, AAV2 유래의 ITR 서열, 또는 이의 결실 형태(ΔITR)가 편의를 위해 그리고 규제 승인을 가속화하기 위해 사용될 수 있다. 그러나 다른 AAV 공급원의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2 유래이고 AAV 캡시드가 다른 AAV 공급원 유래인 경우, 생성되는 벡터는 슈도타입화(pseudotyped)된 것으로 불릴 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, 유전자 산물(들) 및 임의의 조절 서열을 인코딩하는 핵산 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이러한 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다. 일 실시형태에서, 자가-상보적 AAV가 제공된다. D-서열 및 말단 해상도 부위(terminal resolution site: trs)가 결실된 ΔITR로 불리는 5' ITR의 단축 형태가 기재되었다. 특정 실시형태에서, 벡터 게놈은 130개 염기쌍의 단축된 AAV2 ITR을 포함하며, 여기서 외부 "a" 요소는 결실된다. 단축된 ITR은 내부 A 요소를 주형으로 사용하여 벡터 DNA 증폭 동안 145개 염기쌍의 야생형 길이로 되돌아간다. 다른 실시형태에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 용어 "AAV"는 자연적으로 발생하는 아데노-연관 바이러스, 당업계에서 및/또는 본 명세서에 기재된 조성물(들) 및 방법(들)의 견지에서 당업자에게 이용 가능한 아데노-연관 바이러스뿐만 아니라, 인공 AAV를 지칭한다. 아데노-연관 바이러스(AAV) 바이러스 벡터는 표적 세포로의 전달을 위해 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)이 측접한 패키징된 발현 카세트가 패키징된 AAV 단백질 캡시드를 갖는 AAV Dnase-내성 입자이다. AAV 캡시드는 60개의 캡시드(cap) 단백질 서브유닛인 VP1, VP2 및 VP3으로 구성되며, 이는 선택된 AAV에 따라 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비율로 이십면체 대칭으로 배열된다. 다양한 AAV가 상기 확인된 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 공급원으로서 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드 또는 이의 변이체이다. 특정 실시형태에서, 캡시드 단백질은 rAAV 벡터의 이름에서 용어 "AAV"다음에 오는 숫자, 또는 숫자와 문자의 조합에 의해 지정된다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 AAV 캡시드, ITR, 및 기타 선택된 AAV 구성요소는 제한 없이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37, AAVrh32.33, AAV8bp, AAV7M8 and AAVAnc80, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh74, AAV-DJ8, AAV-DJ, AAVhu68(제한 없음)로 확인된 AAV를 포함하는 임의의 AAV 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, WO2019/168961 및 WO 2019/169004(AAV 벡터; 탈아마이드화); WO 2019/169004(신규한 AAV 캡시드); 미국 공개 특허출원 제2007-0036760-A1호; 미국 공개 특허출원 제2009-0197338-A1호; EP 제1310571호를 참조한다. 또한, WO 2003/042397(AAV7 및 기타 유인원 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), WO 2005/033321 및 미국 제7,906,111호(AAV9), 및 WO 2006/110689, 및 WO 2003/042397(rh.10), 및 WO 2005/033321을 참조하며, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 다른 적합한 AAV는 제한 없이 AAVrh90, AAVrh91, AAVrh92, AAVrh93, AAVrh91.93을 포함할 수 있다. 예를 들어, WO 2020/223232 A1(AAV rh.90), WO 2020/223231 A1(AAV rh.91), 및 WO 2020/223236 A1(AAV rh.92, AAV rh.93, AAV rh.91.93)을 참조하며, 이들은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다. 다른 적합한 AAV는, AAV3B.AR2.01, AAV3B.AR2.02, AAV3B.AR2.03, AAV3B.AR2.04(서열번호 8), AAV3B.AR2.05, AAV3B.AR2.06, AAV3B.AR2.07, AAV3B.AR2.08, AAV3B.AR2.10, AAV3B.AR2.11, AAV3B.AR2.12, AAV3B.AR2.13, AAV3B.AR2.14, AAV3B.AR2.15, AAV3B.AR2.16, 또는 AAV3B.AR2.17을 기재하는 2020년 10월 20일자로 출원된 PCT/US20/56511(2020년 1월 31일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/924,112호 및 2020년 5월 18일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/025,753호의 이익을 주장함)에 기재된

AAV3B 변이체를 포함하며, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 이들 문헌은 또한 AAV를 생성하기 위해 선택될 수 있는 다른 AAV를 기재하며 참조에 의해 원용된다. 인간 또는 비-인간 영장류(NHP)로부터 단리되거나 조작되고 잘 특성화된 AAV 중에서, 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로서 개발된 최초의 AAV이며; 다양한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험에 널리 사용되었다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, AAV와 관련하여, 용어 "변이체"는 보존적 아미노산 대체를 갖는 것, 및 아미노산 또는 핵산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 공유하는 것을 포함하여, 알려진 AAV 서열로부터 유래된 임의의 AAV 서열을 의미한다. 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 임의의 기재되거나 알려진 AAV 캡시드 서열로부터 최대 약 10%까지의 변이를 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본 명세서에서 제공되고/되거나 당업계에 알려진 AAV 캡시드와 약 90% 동일성 내지 약 99.9% 동일성, 약 95% 내지 약 99% 동일성, 또는 약 97% 동일성 내지 약 98% 동일성을 공유한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV 캡시드와 적어도 95% 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 동일성 백분율을 결정할 때, 가변 단백질(예를 들어, vp1, vp2 또는 vp3) 중 임의의 것에 대해 비교가 이루어질 수 있다.

[0093] ITR 또는 다른 AAV 구성요소는 AAV로부터 당업자에게 이용 가능한 기법을 사용하여 용이하게 단리되거나 조작될 수 있다. 이와 같은 AAV는 학술적, 상업적, 또는 공공 공급원(예를 들어, American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매너서스 소재)으로부터 단리되거나, 조작되거나, 입수될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은, 예를 들어, GenBank, PubMed 등과 같은 문헌 또는 데이터베이스에서 이용 가능한 것과 같은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적합한 수단을 통해 조작될 수 있다. AAV 바이러스는 종래 분자 생물학 기법에 의해 조작되어, 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성 최소화, 안정성 및 입자 수명 조정, 효율적인 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 이들 입자를 최적화할 수 있다.

[0094] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 호환 가능하게 사용되는 용어 "rAAV" 및 "인공 AAV"는 제한 없이 캡시드 단백질 및 내부에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 AAV를 의미하며, 여기서 벡터 게놈은 AAV에 이종성인 핵산을 포함한다. 일 실시형태에서, 캡시드 단백질은 비-자연적으로 발생하는 캡시드이다. 이와 같은 인공 캡시드는 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 상이한 선택된 AAV, 동일한 AAV의 비-인접 부분, 비-AAV 바이러스 공급원, 또는 비-바이러스 공급원으로부터 얻을 수 있는 이종성 서열과 조합하여 사용하여 임의의 적합한 기법에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는 제한 없이 슈도타입 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드, 또는 "인간화" AAV 캡시드일 수 있다. 하나의 AAV의 캡시드가 이종성 캡시드 단백질로 대체된 슈도타입화 벡터가 본 발명에서 유용하다. 일 실시형태에서, AAV2/5 및 AAV2/8은 예시적인 슈도타입화 벡터이다. 선택된 유전 요소는 형질감염, 전기천공, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 이와 같은 작제물을 만드는 데 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 숙련자에게 알려져 있으며 유전 공학, 재조합 공학, 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]을 참조한다.

[0095] 캡시드를 생성하는 방법, 이에 따른 코딩 서열, 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법이 기재되었다. 예를 들어, 문헌[Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)] 및 미국 제2013/0045186A1호를 참조한다.

[0096] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV는 자가-상보적 AAV이다. "자가-상보적 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열이 보유하는 코딩 영역이 분자내 이중-가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 감염 시, 두 번째 가닥의 세포 매개 합성을 기다리기 보다는, scAAV의 상보적인 두 반쪽이 회합하여 즉각적인 복제 및 전사 준비가 된 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 단위를 형성할 것이다. 예를 들어, 문헌[D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254]을 참조한다. 자가-상보적 AAV는 미국 특허 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기재되어 있으며, 이들은 각각 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다.

[0097] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 rAAV는 뉴클레아제-내성이다. 이와 같은 뉴클레아제는 단일 뉴클레아제, 또는 뉴클레아제의 혼합물일 수 있으며, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다. 뉴클레아제-내성 rAAV는 AAV 캡시드가 생산 공정에서 존재할 수 있는 오염 핵산을 제거하도록 설계된 뉴클레아제 인큐베이션 단계 동안 패키징된 게놈 서열을 완전히 조립하고 분해(소화)로부터 이를 보호함을 나타낸다. 많은

경우에, 본 명세서에 기재된 rAAV는 DNase 내성이다.

[0098] 본 명세서에 기재된 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)는 알려진 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; 미국 제7588772 B2호를 참조한다. 이와 같은 방법은 AAV 캡시드를 인코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; AAV 반전 말단 반복부(ITR)가 측접한 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트; 및 AAV 캡시드 단백질로의 발현 카세트의 패키징을 허용하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또한 AAV 캡시드를 인코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 기재된 바와 같은 벡터 게놈; 및 AAV 캡시드 단백질로의 벡터 게놈의 패키징을 허용하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포이다. 일 실시형태에서, 숙주 세포는 HEK 293 세포이다. 이들 방법은 WO2017160360 A2에 더 상세히 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0099] 당업자에게 이용 가능한 rAAV를 생산하는 다른 방법이 이용될 수 있다. 적합한 방법은 바큘로바이러스 발현 시스템 또는 효모를 통한 생산을 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌[Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15; 20(R1): R2-R6. 온라인 공개 2011년 4월 29일. doi: 10.1093/hmg/ddr141; Aucoin mg et al., Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. Biotechnol Bioeng. 2006 Dec 20;95(6):1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. 2012년 플로리다 대학교 대학원에 제출된 논문; Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, Mol Ther. 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. [인쇄에 앞서 Epub]; Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA. Hum Gene Ther Methods. 2017 Feb;28(1):15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. pLoS One. 2013 Aug 1;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. J Invertebr Pathol. 2011 Jul;107 Suppl:S80-93. doi: 10.1016/j.jip.2011.05.008; 및 Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29]을 참조한다.

[0100] 높은 염 농도에서 2 단계 친화성 크로마토그래피 정제에 이어 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 사용하여 벡터 약물 제품을 정제하고 빈 캡시드를 제거한다. 이들 방법은 발명의 명칭이 "Scalable Purification Method for AAV9"인 WO 2017/160360에 더 상세히 기재되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 간단히 말하면, 게놈-결핍 AAV9 중간체로부터 패키징된 게놈 서열을 갖는 rAAV9 입자를 분리하는 방법은 재조합 AAV9 바이러스 입자 및 AAV 9 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액에 고속 성능 액체 크로마토그래피을 적용하는 것을 포함하며, 여기서 AAV9 바이러스 입자 및 AAV9 중간체는 pH 10.2에서 평형화된 강한 음이온 교환 수지에 결합되고, 약 260 및 약 280에서 자외선 흡광도에 대해 용출액을 모니터링하면서 염 구배를 거친다. rAAV9에 덜 최적이지만, pH는 약 10.0 내지 10.4의 범위일 수 있다. 이 방법에서, AAV9 전체 캡시드는 A260/A280의 비율이 변곡점에 도달할 때 용출되는 분획에서 수집된다. 일 례에서, 친화성 크로마토그래피 단계를 위해, 투석여과된 생성물은 AAV2/9 혈청형을 효율적으로 포획하는 Capture Select™ Poros- AAV2/9 친화성 수지(Life Technologies)에 적용될 수 있다. 이러한 이온 조건 하에서, 상당한 비율의 잔류 세포 DNA 및 단백질이 컬럼을 통해 흐르는 반면, AAV 입자는 효율적으로 포획된다.

[0101] rAAV의 특성화 또는 정량화를 위한 통상적인 방법이 당업자에게 이용 가능하다. 빈 입자 및 채워진 입자 함량을 계산하기 위해, 선택된 샘플에 대한 VP3 밴드 부피(예를 들어, 본 명세서의 예에서 아이오딕사놀 구배-정제 제제, 여기서, GC의 # = 입자의 #임)는 로딩된 GC 입자에 대해 플로팅된다. 생성된 선형 방정식(y = mx+c)은 테스트 항목 피크의 밴드 부피에서 입자 수를 계산하는 데 사용된다. 그 다음 로딩된 20 ㎕당 입자 수(pt)에 50을 곱하여 입자(pt)/㎖를 제공한다. Pt/㎖를 GC/㎖로 나눈 값은 입자 대 게놈 복제물의 비율(pt/GC)을 제공한다. Pt/㎖-GC/㎖은 빈 pt/㎖를 제공한다. 빈 pt/㎖를 pt/㎖로 나누고 100을 곱한 값은 빈 입자의 백분율을 제공한다. 일반적으로, 패키징된 게놈을 갖는 빈 캡시드 및 AAV 벡터 입자에 대한 분석 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128]을 참조한다. 변성된 캡시드를 테스트하기 위해, 방법은 처리된 AAV 스톡에 SDS-폴리아크릴아

마이드 겔 전기영동(이는 3개의 캡시드 단백질을 분리할 수 있는 임의의 겔, 예를 들어, 완충액에 3 내지 8% 트리스-아세테이트를 포함하는 구배 겔로 이루어짐)을 적용하는 단계, 그 다음 샘플 물질이 분리될 때까지 겔을 실행하는 단계, 및 겔을 나일론 또는 나이트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론에 블롯팅하는 단계를 포함한다. 그 다음 항-AAV 캡시드 항체는 변성된 캡시드 단백질에 결합하는 1차 항체, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론성 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론성 항체로서 사용된다(Wobus et al., J. Viral. (2000) 74:9281-9293). 그 다음 1차 항체에 결합하고 1차 항체와의 결합을 검출하기 위한 수단을 포함하는 2차 항체, 더 바람직하게는 1차 항체에 공유 결합된 검출 분자를 포함하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 호스래디쉬 퍼옥시다제에 공유 연결된 양 항-마우스 IgG 항체가 사용된다. 결합을 검출하는 방법은 1차 항체와 2차 항체 사이의 결합을 반정량적으로 결정하는 데 사용되며, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출, 전자기 방사선 또는 비색 변화를 검출할 수 있는 검출 방법, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트가 사용된다. 예를 들어, SDS-PAGE의 경우, 컬럼 분획으로부터 샘플을 채취하여 환원제(예를 들어, DTT)를 포함하는 SDS-PAGE 로딩 완충액에서 가열할 수 있으며, 캡시드 단백질은 미리 주조된 구배 폴리아크릴아마이드 겔(예를 들어, Novex)에서 분해되었다. 제조업체의 지침 또는 기타 적합한 염색 방법, 즉 SYPRO 염색에 따라 SilverXpress(Invitrogen, CA)를 사용하여 은 염색을 수행할 수 있다. 일 실시형태에서, 컬럼 분획에서 AAV 벡터 게놈(vg)의 농도는 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해 측정될 수 있다. 샘플을 희석하고 dNase I(또는 다른 적합한 뉴클레아제)로 분해하여 외인성 DNA를 제거한다. 뉴클레아제를 불활성화시킨 후, 샘플을 추가로 희석하고 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 TaqMan™ 형광 프로브와 프라이머를 사용하여 증폭시킨다. 정의된 형광 수준(임계값 주기, Ct)에 도달하는 데 필요한 주기 수는 Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System에서 각각의 샘플에 대해 측정된다. AAV 벡터에 포함된 것과 동일한 서열을 포함하는 플라스미드 DNA가 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성하기 위해 이용된다. 샘플에서 얻은 주기 역치(Ct) 값은 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값으로 정규화하여 벡터 게놈 역가를 결정하는 데 사용된다. 디지털 PCR을 기반으로 하는 종점 분석도 또한 사용될 수 있다.

[0102] 일 양태에서, 광범위한 스펙트럼의 세린 프로테아제, 예를 들어, 프로테이나제 K(예컨대, Qiagen으로부터 상업적으로 입수 가능함)를 이용하는 최적화된 q-PCR 방법이 사용된다. 더 구체적으로, 최적화된 qPCR 게놈 역가 분석은 dNase I 소화 후 샘플을 프로테이나제 K 완충액으로 희석하고 프로테이나제 K로 처리한 다음 열 불활성화한다는 점을 제외하면 표준 분석과 유사하다. 적합하게 샘플은 샘플 크기와 동일한 양의 프로테이나제 K 완충액으로 희석된다. 프로테이나제 K 완충액은 2배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2 mg/mℓ이지만, 약 0.1 mg/mℓ 내지 약 1 mg/mℓ으로 다양할 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55℃에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 낮은 온도(예를 들어, 약 37℃ 내지 약 50℃)에서 더 긴 시간(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분) 동안, 또는 더 높은 온도(예를 들어, 최대 약 60℃)에서 더 짧은 시간(예를 들어, 약 5 내지 10분) 동안 수행될 수 있다. 유사하게, 열 불활성화는 일반적으로 약 95℃에서 약 15분 동안 이루어지지만, 온도가 더 낮아질 수 있고(예를 들어, 약 70 내지 약 90℃) 시간이 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 그 다음 샘플은 희석(예를 들어, 1000배)되고 표준 분석에 기재된 바와 같이 TaqMan 분석을 거친다.

[0103] 추가적으로 또는 대안적으로, 액적 디지털 PCR(ddPCR)이 사용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의해 단일-가닥 및 자가-상보적 AAV 벡터 게놈 역가를 결정하는 방법이 기재되었다. 예를 들어, 문헌[M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14]을 참조한다.

[0104] 캡시드 단백질의 vp1, vp2 및 vp3 간의 비율을 결정하는 방법도 또한 이용 가능하다. 예를 들어, 문헌[Vamseedhar Rayaprolu et al, Comparative Analysis of Adeno-Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol. 2013 Dec; 87(24): 13150-13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells. J. Virol. 25:331-338; 및 Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J. Virol. 8:766-770]을 참조한다.

[0105] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, rAAV의 "스톡"은 rAAV의 집단을 지칭한다. 탈아마이드화로 인한 캡시드 단백질의 이질성에도 불구하고, 스톡의 rAAV는 동일한 벡터 게놈을 공유할 것으로 예상된다. 스톡은, 예를 들어, 선택된 AAV 캡시드 단백질 및 선택된 생산 시스템의 특징적인 이종성 탈아마이드화 패턴이 있는 캡시드를 갖는 rAAV를 포함할 수 있다. 스톡은 단일 생산 시스템에서 생산되거나 생산 시스템의 여러 실행에서 풀링될 수 있다. 본 명세서에 기재된 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 생산 시스템이 선택될 수 있다.

[0106] 본 명세서에 기재된 rAAV의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 요법, 양태, 실시형태 및 방법에 적

용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0107] 5. 약제학적 조성물

[0108] 일 양태에서, 제형 완충액에 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 본원에 제공된다. 특정 실시형태에서, 벡터를 포함하는 약제학적 조성물은 항-FcRn 리간드, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-FcRn 항체를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 항-FcRn 리간드는 벡터와 별도로 제형화되고 전달된다. 일 실시형태에서, 제형 완충액에 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 특정 실시형태에서, 제형 완충액 중에 본 명세서에 기재된 바와 같은 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 인코딩하는 캡슐화된 핵산 서열을 포함하는 수용체-표적화된 나노입자를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0109] 일 실시형태에서, 제형은 수성 현탁 액체에 용해된 계면활성제, 방부제, 부형제 및/또는 완충액을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 완충액은 PBS이다. 적합하게는, 제형은 생리학적으로 허용 가능한 pH, 예를 들어, pH 6 내지 8 범위로 조정되며; 정맥내 전달의 경우에는 pH 6.8 내지 약 7.2가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이러한 하위범위 내의 다른 pH가 다른 전달 경로에 대해 선택될 수 있다.

[0110] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합은 비독성인 비-이온성 계면활성제 중에서 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 1차 하이드록실 기로 종결되는 이작용성 블록 공중합체 계면활성제가 선택되며, 예를 들어, 중성 pH를 가지고 평균 분자량이 8400인 Pluronic® F68[BASF](폴록사머 188로도 알려짐)이 선택된다. 기타 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 사슬이 측접한 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 삼중블록 공중합체, SOLUTOL HS 15(Macrogol-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(카프릴로카프로일 마크로골 글리세라이드), 폴리옥시 10 올레일 에터, TWEEN(폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌 글라이콜이 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 포함한다. 이러한 공중합체는 일반적으로 문자 "P"(폴록사머의 경우)와 그 뒤의 세 자리 숫자로 명명되며: 처음 두 자리×100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자량을 제공하고, 마지막 숫자×10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%까지의 양으로 존재할 수 있다.

[0111] 추가적으로 약제학적으로 허용 가능한 담체 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 기능성 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이와 같은 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 보충 활성 성분이 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 리포좀, 나노캡슐, 미세입자, 미세구, 지질 입자, 소포 등과 같은 전달 비히클이 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포로 도입하기 위해 사용될 수 있다. 특히, rAAV 벡터는 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노스피어 또는 나노입자 등에 캡슐화된 전달을 위해 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 상기 벡터의 치료적 유효량이 약제학적 조성물에 포함된다. 담체의 선택은 본 발명의 제한이 아니다. 방부제 또는 화학적 안정화제와 같은 다른 통상적인 약제학적으로 허용 가능한 담체. 적합한 예시적인 방부제는 클로로뷰탄올, 솔빈산칼륨, 솔빈산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0112] 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 숙주에게 투여될 때 알레르기 또는 유사한 원치 않는 반응을 나타내지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다.

[0113] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "투약량" 또는 "양"은 치료 과정에서 대상체에게 전달되는 총 투약량 또는 양, 또는 단일 단위(또는 다중 단위 또는 분할 투약량) 투여로 전달되는 투약량 또는 양을 지칭할 수 있다.

[0114] 또한, 복제-결핍 바이러스 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 약 1.0×10^{9}개 GC 내지 약 1.0×10^{16}개 GC의 범위(평균 체중 70 kg의 대상체를 치료하기 위함), 바람직하게는 인간 환자의 경우 1.0×10^{12}개 GC 내지 1.0×10^{14}개 GC인 복제-결핍 바이러스의 양을 포함하도록 투약량 단위로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9}, 또는 9×10^{9}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 다른 실시형태에서, 조성물은

범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10}, 또는 9×10^{10}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11}, 또는 9×10^{11}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12}, 7×10^{12}, 8×10^{12}, 또는 9×10^{12}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13}, 또는 9×10^{13}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{14}, 2×10^{14}, 3×10^{14}, 4×10^{14}, 5×10^{14}, 6×10^{14}, 7×10^{14}, 8×10^{14}, 또는 9×10^{14}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{15}, 2×10^{15}, 3×10^{15}, 4×10^{15}, 5×10^{15}, 6×10^{15}, 7×10^{15}, 8×10^{15}, 또는 9×10^{15}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 일 실시형태에서, 인간 적용의 경우 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12}개 GC의 범위일 수 있다.

[0115] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물은 뇌 덩어리의 그램당 약 1×10^{9}개 GC 내지 뇌 덩어리의 그램당 약 1×10^{14}개 GC의 용량으로 투여 가능하다.

[0116] 본 명세서에 기재된 수성 현탁액 또는 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하도록 설계된다. 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 뇌실내(ICV), 척수강내(IT), 또는 수조내 주사를 통한 전달용으로 제형화된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 정맥내 주사에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하도록 설계된다. 대안적으로, 다른 투여 경로(예를 들어, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 근육내, 및 기타 비경구 경로)가 선택될 수 있다.

[0117] 특정 실시형태에서, 수성 현탁액 또는 약제학적 조성물이 약제를 제조하는 데 사용된다. 특정 실시형태에서, 이를 필요로 하는 환자에서 벡터(예를 들어, 모체 AAV 캡시드 공급원)에 대한 중화 항체의 수준을 감소시키기 위한 용도가 제공된다.

[0118] 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 연대, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0119] 6. 치료 방법

[0120] 일 실시형태에서, 바이러스 벡터에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하기 위한 조합 요법이 제공된다. 요법은 인간 FcRn 및 기존 환자 중화 항체(예를 들어, IgG)의 결합을 저해하는 리간드와 함께 벡터를 투여하는 것을 포함한다. FcRn 리간드(즉, 항-FcRn)는 본 명세서에 기재된 바와 같다. 특정 실시형태에서, 리간드는 항-FcRn 항체 작제물이고, 벡터는 재조합 바이러스 벡터이다. 벡터는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 또 다른 바이러스 벡터(예를 들어, 재조합 아데노바이러스, 재조합 단순 헤르페스 바이러스, 또는 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스 벡터, 재조합 폭스바이러스 벡터(예를 들어, 백시니아 바이러스 벡터, 예컨대, 변형된 백시니아 앙카라(MVA)), 또는 알파바이러스 벡터))일 수 있고 선택된 환자는 벡터에 대한 중화 항체(예를 들어, 모체 AAV 캡시드 공급원)를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 기존의 항-AAV8 항체를 가지고, 조합은 항-FcRn 리간드 및 rAAV8 벡터 또는 교차-반응성 벡터의 공동 투여를 포함한다. 특정 실시형태에서, 환자는 기존의 항-AAV2 항체를 가지고, 조합은 항-FcRn 리간드 및 rAAV2 벡터 또는 교차-반응성 벡터(예를 들어, AAV2 변이체 또는 상이한 AAV 클레이드 B AAV))의 공동 투여를 포함한다. 특정 실시형태에서, 환자는 기존의 항-아데노바이러스 유형 5를 가지고 항-FcRn 리간드 및 유형 5 캡시드를 갖는 재조합 아데노바이러스를 공동 투여받는다. 본 명세서의 교시내용의 관점에서 다른 바이러스 유형 및 하위유형이 선택될 수 있다.

[0121] 특정 실시형태에서, 환자는 선택된 바이러스 벡터를 이용한 임의의 치료적 처리에 대해 무경험일 수 있고 야생형 바이러스에 의한 사전 감염으로 인해 기존 면역을 가질 수 있다. 다른 실시형태에서, 환자는 사전 치료 또는 백신의 결과로서 중화 항체를 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 중화 항체를 1:1 내지 1:20, 또는 1:2

초과, 1:5 초과, 1:10 초과, 1:20 초과, 1:50 초과, 1:100 초과, 1:200 초과, 1:300 초과 또는 그 이상으로 가질 수 있다. 특정 실시형태에서, 환자는 1:1 내지 1:200, 또는 1:5 내지 1:100, 또는 1:2 내지 1:20, 또는 1:5 내지 1:50, 또는 1:5 내지 1:20 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 1 초과 내지 약 5 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 약 1 내지 약 20 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 약 1 내지 약 40 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 약 1 내지 약 80 범위의 중화 항체를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 단일 항-FcRn 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 FcRn-IgG 결합을 조절하고 효과적인 벡터 전달을 가능하게 하는 유일한 작용제로서 수용한다. 다른 실시형태에서, 환자는 하나 이상의 항-FcRn 리간드와 제2 구성요소(예를 들어, Fc 수용체 하향 조절제(예를 들어, 인터페론 감마), IgG 효소, 또는 다른 적합한 구성요소)의 조합을 수용할 수 있다. 이와 같은 조합은 특히 높은 중화 항체 수준(예를 들어, 1:200 초과)을 갖는 환자에게 특히 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-FcRn 리간드를 포함하는 조성물, 및 요법 및 공동 투여는 바이러스 벡터의 전신 전달 동안 이용된다. 그러나, 본 발명은 본 명세서에서 보다 상세하게 기재된 바와 같이 그렇게 제한되지 않는다.

[0122] 특정 실시형태에서, 항-FcRn 리간드(들)(예를 들어, 항체)는 선택된 바이러스 벡터 이전에 그리고 선택적으로 동시에 중화 항체를 갖는 환자에게 투여된다. 특정 실시형태에서, 유전자 요법 벡터의 투여 후 항-FcRn 리간드의 지속적인 발현은 단기간(일시적으로), 예를 들어, 바이러스 벡터가 환자로부터 소거될 때까지 요구될 수 있다. 특정 실시형태에서, 항-FcRn 리간드의 지속적인 발현이 요구될 수 있다. 선택적으로, 이 실시형태에서, 리간드는, 예를 들어, 치료용 이식유전자를 발현하는 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 벡터를 통해 전달될 수 있다. 그러나, 이러한 실시형태는 전달되는 치료 유전자가 항체 또는 항체 작제물 또는 IgG 사슬을 포함하는 또 다른 작제물인 경우 바람직하지 않다. 이와 같은 실시형태에서, IgG 사슬을 갖는 항체 작제물이 바이러스 벡터를 통해 기존 면역을 갖는 환자에게 전달되는 경우, 항-FcRn 리간드는 일시적으로 전달되거나 투약되어 순환계에서 항-FcRn 리간드의 양이 효과적인 수준의 벡터-매개 이식유전자 산물이 발현되기 전에 혈청에서 제거된다.

[0123] 특정 실시형태에서, FcRn 리간드는 벡터(예를 들어, rAAV)의 투여 1일 내지 7일 전에 전달된다. 특정 실시형태에서, FcRn 리간드는 매일 전달된다. 특정 실시형태에서, FcRn 리간드(예를 들어, 면역글로불린 작제물(들))는 벡터가 투여되는 당일에 전달된다. 특정 실시형태에서, FcRn 리간드(예를 들어, 면역글로불린 작제물(들))는 rAAV의 투여 적어도 1일 내지 4주 후에 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 rAAV 투여 후 4주 내지 6개월 동안 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 rAAV와 상이한 투여 경로를 통해 투약된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 경구, 정맥내, 또는 복강내로 투약된다.

[0124] 특정 실시형태에서, 환자는 WT 감염(예를 들어, WT AAV에 의함)의 결과로서 기존 중화 항체를 가지고 항-FcRn 면역글로불린 작제물과 조합된 벡터의 전달 전에 이전에 벡터-기반 유전자 요법 치료를 받은 적이 없다. 특정 실시형태에서, 환자는 시험관 내 분석에서 결정될 때 1:5 초과의 중화 역가를 갖는다. 특정 실시형태에서, 환자는 항-FcRn 면역글로불린 작제물과 조합된 벡터(예를 들어, rAAV)의 전달 전에 이전에 유전자 요법을 받은 적이 있다.

[0125] 특정 실시형태에서, 방법은 (a) 스테로이드 또는 스테로이드의 조합 및/또는 (b) IgG-절단 효소, (c) Fc-IgE 결합의 저해제; (d) Fc-IgM 결합의 저해제; (e) Fc-IgA 결합의 저해제; 및/또는 (f) 감마 인터페론 중 하나 이상을 공동 투여하는 것을 추가로 포함하는 요법의 일부이다.

[0126] 본 명세서에서 제공된 조성물 및 요법의 효능은, 예를 들어, NAb 역가를 측정함으로써 결정될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 조성물 및 요법의 효능은 벡터 매개 전달 후 이식유전자 발현을 검출하기 위한 분석법을 사용하여 결정될 수 있다. 이와 같은 분석법은 양성 중화 항체, 또는 미리 결정된 중화 항체의 임계값을 테스트하지 않은 환자에서 이식유전자 발현을 검출하는 데 사용되는 것과 동일할 수 있다.

[0127] 전달에 적합한 이식유전자의 예는, 예를 들어, 가족성 고콜레스테롤혈증(예를 들어, VLDLr, LDLr, ApoE, PCSK9), 근이영양증, 낭포성 섬유증, 및 희귀 또는 극희귀(orphan) 질환과 연관된 것을 포함한다. 이와 같은 희귀 질환의 예는 특히 척수성 근위축증(SMA), 헌팅턴병, 레트 증후군(예를 들어, 메틸-CpG-결합 단백질 2(MeCP2); UniProtKB - P51608), 근위축성 축삭 경화증(ALS), 뒤시엔느형 근이영양증, 프레드리히 운동실조(예를 들어, 프라탁신), 프로그래뉼린(PRGN)(전두측두엽 치매(FTD), 진행성 비유창성 실어증(PNFA) 및 의미 치매를 포함하여 비-알츠하이머 뇌 변성과 연관됨)을 포함할 수 있다. 다른 유용한 유전자 산물은 카바모일 합성효소 I, 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC), 아르기노석시네이트 합성효소, 아르기노석시네이트 리아제 결핍증의 치료를 위한 아르기노석시네이트 리아제(ASL), 아르기나제, 푸마릴아세테이트 가수분해효소, 페닐알라닌 하이드록실라제, 알파-1 항트립신, 히말라야 원숭이(rhesus) 알파-태아단백질(AFP), 히말라야 원숭이 융모성 성선자극 호

르몬(CG), 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-신타제, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 아이소발레릴-coA 탈수소효소, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 탈수소효소, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 막관통 조절제(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 산물[예를 들어, 미니- 또는 마이크로-디스트로핀]을 포함한다. 또 다른 유용한 유전자 산물은 효소 대체 요법에 유용할 수 있는 것과 같은 효소를 포함하며, 이는 효소의 결핍 활성으로 인한 다양한 병태에서 유용하다. 예를 들어, 만노스-6-포스페이트를 포함하는 효소는 리소좀 축적병에 대한 요법에 이용될 수 있다(예를 들어, 적합한 유전자는 β-글루쿠로니다제(GUSB)를 인코딩하는 것을 포함함). 전달에 적합한 이식유전자의 예는, 예를 들어, 2020년 12월 18일자로 출원된 PCT/US20/66167, 2019년 12월 19일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/950,834호, 및 2021년 1월 11일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/136,059호에 기재된 바와 같은 AAV 벡터로 전달되는 인간 프라탁신을 포함할 수 있으며, 이들 출원은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 전달에 적합한 이식유전자의 또 다른 예는, 예를 들어, 2020년 4월 30일자로 출원된 PCT/US20/30493(현재 WO2020/223362A1로 공개됨), 2020년 4월 20일자로 출원된 PCT/US20/30484(현재 WO 2020/223356 A1로 공개됨), 2019년 4월 30일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/840,911호, 2019년 10월 10일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62.913,401호, 2020년 5월 14일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/024,941호, 및 2020년 11월 4일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/109,677호에 기재된 바와 같은 AAV 벡터로 전달되는 인간 산-α-글루코시다제(GAA)를 포함할 수 있으며, 이들 출원은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. 또한, 전달에 적합한 이식유전자의 또 다른 예는, 예를 들어, 2014년 3월 13일자로 출원된 PCT/US2014/025509(현재 WO 2014/151341로 공개됨), 및 2013년 3월 15일자로 출원된 미국 특허 가출원 제61/788,724호에 기재된 바와 같은 AAV 벡터로 전달되는 인간 α-L-이두로니다제(IDUA)를 포함할 수 있으며, 이들은 본 명세서에 참조에 의해 원용된다.

[0128] 벡터(예를 들어, rAAV)를 통해 전달될 수 있는 추가의 예시적인 유전자는 제한 없이 글리코겐 축적병 또는 결핍 유형 1A(GSD1)와 연관 글루코스-6-포스파타제, 포스포에놀피루베이트-카복시키나제(PEPCK) 결핍증과 연관된 PEPCK; 발작 및 심각한 신경발달 장애와 연관된 세린/트레오닌 키나제 9(STK9)로도 알려진 사이클린-의존성 키나제-유사 5(CDKL5); 갈락토스혈증과 연관된 갈락토스-1 포스페이트 유리딜 트랜스퍼라제; 페닐케톤뇨증(PKU)과 연관된 페닐알라닌 하이드록실라제; 단풍당뇨증과 연관된 분지쇄 알파-케토산 탈수소효소; 타이로신혈증 유형 1과 연관된 푸마릴아세토아세테이트 가수분해효소; 메틸말론산혈증과 연관된 메틸말로닐-CoA 뮤타제; 중쇄 아세틸 CoA 결핍증과 연관된 중쇄 아실 CoA 탈수소효소; 오르니틴 트랜스카바밀라제 결핍증과 연관된 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC); 시트룰린혈증과 연관된 아르기니노석신산 합성효소(ASS1); 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(LCAT) 결핍증; 메틸말론산혈증(MMA); 니만-피크병, 유형 C1); 프로피온산혈증(PA); 가족성 고콜레스테롤혈증(FH)과 연관된 저밀도 지방단백질 수용체(LDLR) 단백질; 크리글러-나자르병과 연관된 UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라제; 중증 복합 면역결핍병과 연관된 아데노신 데아미나제; 통풍 및 레쉬-니한 증후군과 연관된 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제; 바이오티니다제 결핍증과 연관된 바이오티니다제; 파브리병과 연관된 알파-갈락토시다제 A(a-Gal A); 윌슨병과 연관된 ATP7B; 고세병 유형 2 및 3과 연관된 베타-글루코세레브로시다제; 젤웨거 증후군과 연관된 퍼옥시좀 막 단백질 70 kDa; 이염성 백질이영양증과 연관된 아릴설파타제 A(ARSA), 크라베병과 연관된 갈락토세레브로시다제(GALC) 효소, 폼페병과 연관된 알파-글루코시다제(GAA); 니만 피크병 유형 A와 연관된 스핑고미엘리나제(SMPD1) 유전자; 성인 발병 유형 II 시트룰린혈증(CTLN2)과 연관된 아르기노석시네이트 신타제; 요소 회로 장애와 연관된 카바모일-포스페이트 신타제 1(CPS1); 척수성 근위축증과 연관된 생존 운동 뉴런(SMN) 단백질; 파아버 지방육아종증과 연관된 세라미다제; GM2 강글리오사이드축적증 및 테이-삭스병과 샌드호프병과 연관된 b-헥소사미니다제; 아스파틸-글루코사민우리아와 연관된 아스파틸글루코사미니다제; 푸코사이드 축적증과 연관된 a-푸코시다제; 알파-만노시도시스와 연관된 α-만노시다제; 급성 간헐성 포르피린증(AIP)와 연관된 포르포빌리노겐 데아미나제; 알파-1 항트립신 결핍증(폐기종)의 치료를 위한 알파-1 항트립신; 지중해빈혈 또는 신부전으로 인한 빈혈의 치료를 위한 에리트로포이에틴; 허혈성 질환의 치료를 위한 혈관 내피 성장 인자, 안지오포이에틴-1, 및 섬유아세포 성장 인자; 예를 들어 죽상동맥경화증, 혈전증, 또는 색전증에서 보이는 바와 같은 폐색된 혈관의 치료를 위한 트롬보모듈린 및 조직 인자 경로 저해제; 파킨슨병의 치료를 위한 방향족 아미노산 데카복실라제(AADC), 및 타이로신 하이드록실라제(TH); 울혈성 심부전의 치료를 위한 포스포람반의 베타 아드레날린성 수용체, 이에 대한 안티-센스, 또는 이의 돌연변이 형태, 근육(내)형질세망 아데노신 트라이포스파타제-2(SERCA2), 및 심장 아데닐릴 사이클라제; 다양한 암의 치료를 위한 p53과 같은 종양 억제 유전자; 염증과 면역 장애 및 암의 치료를 위한 다양한 인터류킨 중 하나와 같은 사이토카인; 근이영양증의 치료를 위한 디스트로핀 또는 미니디스트로핀 및 유트로핀 또는 미니유트로핀; 및 당뇨병의 치료를 위한 인슐린 또는 GLP-1을 포함한다. 관심이 있는 추가적인 유전자 및 질환은, 예를 들어, 디스토닌 유전자 관

련 질환, 예컨대, 유전성 감각 및 자율 신경병증 유형 VI(DST 유전자가 디스토닌을 인코딩하며; 단백질의 크기(약 7570개 aa)로 인해 이중 AAV 벡터가 필요할 수 있음); SCN9A 관련 질환을 포함하며, 여기서 기능 상실 돌연변이로 인해 통증을 느낄 수 없게 되고 기능 획득 돌연변이로 인해 피부홍통증과 같은 통증 병태가 유발된다. 또 다른 병태는 NEFL 유전자(신경필라멘트 경쇄)의 돌연변이로 인한 샤르코-마리-투스병 유형 1F 및 2E이며, 이는 다양한 임상 및 전기생리학적 표현이 있는 진행성 말초 운동 및 감각 신경병증을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 뮤코다당증(MPS) 장애의 치료에 사용될 수 있다. 이와 같은 벡터는 MPS I(후를러, 후를러-샤이에 및 샤이에 증후군)의 치료를 위한 α-L-이두로니다제(IDUA)를 인코딩하는 핵산 서열; MPS II(헌터 증후군)의 치료를 위한 이두로네이트-2-설파타제(IDS)를 인코딩하는 핵산 서열; MPSIII A, B, C 및 D(산필리포 증후군)의 치료를 위한 설파미다제(SGSH)를 인코딩하는 핵산 서열; MPS IV A 및 B(모르쿠오 증후군)의 치료를 위한 N-아세틸갈락토사민-6-설페이트 설파타제(GALNS)를 인코딩하는 핵산 서열; MPS VI(마로토-라미 증후군)의 치료를 위한 아릴설파타제 B(ARSB)를 인코딩하는 핵산 서열; MPSI IX(히알루로니다제 결핍증)의 치료를 위한 히알루로니다제를 인코딩하는 핵산 서열 및 MPS VII(슬라이 증후군)의 치료를 위한 베타-글루쿠로니다제를 인코딩하는 핵산 서열을 보유할 수 있다. 예를 들어, www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php; rarediseases.info.nih.gov/diseases를 참조한다.

[0129] 저밀도 지방단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지방단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지방단백질(VLDL) 수용체, 및 스캐빈저 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조절을 위한 수용체를 인코딩하는 핵산 서열이 또한 선택될 수 있다. 다른 적합한 유전자 산물은 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리, 비타민 D 수용체 및 기타 핵 수용체의 구성원을 포함할 수 있다. 추가적으로, 유용한 유전자 산물은 전사 인자, 예컨대, jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오게닌, ETS-박스 포함 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 윌름스 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질, 예를 들어, GATA-3, 및 익상 나선형(winged helix) 단백질의 포크헤드(forkhead) 패밀리를 포함한다.

[0130] 다른 적합한 유전자의 예는, 예를 들어, 제한 없이 인슐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드-1(GLP1), 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체 형성 호르몬(LH), 인간 융모성 성선자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 안지오포이에틴, 안지오스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리트로포이에틴(EPO)(예를 들어, 인간, 개 또는 고양이 epo를 포함함), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 예를 들어, 염기성 섬유아세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유아세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II)를 포함하는 신경영양 인자, TGFα를 포함하는 형질전환 성장 인자 α 슈퍼패밀리 중 임의의 하나, 액티빈, 인히빈, 또는 골형성 단백질(BMP) BMP 1 내지 15 중 임의의 것, 성장 인자의 헤레귤린/뉴레귤린/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 패밀리, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 신경영양 인자(CNTF), 신경아교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린/콜랩신의 패밀리 중 임의의 하나, 네트린-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴, 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) 및 타이로신 하이드록실라제를 포함하는 호르몬 및 성장 및 분화 인자를 포함할 수 있다.

[0131] 다른 유용한 이식유전자 산물은 제한 없이 사이토카인 및 림포카인, 예컨대, 트롬보포이에틴(TPO), 인터류킨(IL) IL-1 내지 IL-36(예를 들어, 인간 인터류킨 IL-1, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35를 포함함), 단핵구 화학유인 단백질, 백혈병 저해 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자 α 및 β, 인터페론 α, β 및 γ, 줄기 세포 인자, flk-2/flt3 리간드를 포함하여 면역계를 조절하는 단백질을 포함한다. 면역계에 의해 생산된 유전자 산물도 또한 본 발명에 유용하다. 여기에는 제한 없이 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단일 사슬 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일 사슬 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자뿐만 아니라, 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 포함한다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, rAAV 항체는, 예를 들어, 항-IgE, 항-IL31, 항-CD20, 항-NGF, 항-GnRH와 같은 개 또는 고양이 항체를 전달하도록 설계될 수 있다. 유용한 유전자 산물은 또한 보체 조절 단백질, 막 보조인자 단백질(MCP), 분해 가속 인자(DAF), CR1, CF2, CD59, 및 C1 에스터라제 저해제(C1-INH)와 같은 보체 조절 단백질을 포함한다. 또 다른 유용한 유전자 산물은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역계 단백질에 대한 수용체 중 임의의 하나를 포함한다.

[0132] 하나 이상의 신경퇴행성 장애의 치료에 유용한 적합한 이식유전자의 예. 이와 같은 장애는 제한 없이, 전염성

해면상 뇌병증(예를 들어, 크로이츠펠트-야콥병), 뒤시엔느 근이영양증(DMD), 근세관성 근병증 및 기타 근병증, 파킨슨병, 근위축성 축삭 경화증(ALS), 다발성 경화증, 알츠하이머병, 헌팅턴병, 카나반병, 외상성 뇌손상, 척수 손상(ATI335, Novartis의 항-nogo1), 편두통(Alder Biopharmaceuticals의 ALD403; Eli의 LY2951742; Labrys Biologics의 RN307), 리소좀 축적병, 뇌졸중, 및 중추신경계에 영향을 미치는 감염성 질환을 포함할 수 있다. 리소좀 축적병의 예는, 예를 들어, 고세병, 파브리병, 니만-피크병, 헌터 증후군, 글리코겐 축적병 II(폼페병), 또는 테이-삭스병을 포함한다. 이들 중 특정 병태, 예를 들어, DMD 및 근병증에 대해, 본 명세서에서 제공된 조성물은 골격근 및 심근의 형질도입 또는 개입을 위한 고용량의 발현 카세트(예를 들어, 바이러스 벡터에 의해 운반됨)와 연관된 축삭병을 감소시키거나 제거하는 데 유용하다.

[0133] 적합한 이식유전자는 또한 생체 내 발현된 항체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태는 바이러스 벡터를 통해 전달되는 치료용 유전자와 함께 항-FcRn 리간드(들)(예를 들어, 항체)의 지속적인 전달(또는 발현)을 허용한다. 그러나, 이 실시형태는 전달되는 치료용 유전자가 항체 또는 항체 작제물 또는 IgG 사슬을 포함하는 또 다른 작제물인 경우 바람직하지 않다. 이와 같은 실시형태에서, IgG 사슬을 갖는 항체 작제물이 바이러스 벡터를 통해 기존 면역을 갖는 환자에게 전달되는 경우, 항-FcRn 리간드는 일시적으로 전달되거나 투약되어 순환계에서 항-FcRn 리간드의 양이 효과적인 수준의 벡터-매개 이식유전자 산물이 발현되기 전에 혈청에서 제거된다.

[0134] 또 다른 핵산은 류신 풍부 반복부, 및 Nogo 수용체의 기능성 구성요소이고 다발성 경화증, 파킨슨병 또는 본태성 떨림 환자에서 본태성 떨림과 연관이 있는 면역글로불린-유사 도메인-포함 단백질 1(LINGO-1)로 지시되는 면역글로불린을 인코딩할 수 있다. 이와 같은 상업적으로 입수 가능한 한 가지 항체는 오크렐리주맙(Biogen, BIIB033)이다. 예를 들어, 미국 특허 제8,425,910호를 참조한다. 일 실시형태에서, 핵산 작제물은 ALS 환자에게 유용한 면역글로불린 작제물을 인코딩한다. 적합한 항체의 예는 ALS 효소 슈퍼옥사이드 디스뮤타제 1(SOD1)에 대한 항체 및 이의 변이체(예를 들어, ALS 변이체 G93A, C4F6 SOD1 항체); Derlin-1 결합 영역으로 지시되는 MS785; 신경돌기 성장 저해제(NOGO-A 또는 레티쿨론 4)에 대한 항체, 예를 들어, GSK1223249, 오자네주맙(인간화, GSK, 또는 다발성 경화증에 유용한 것으로 기재됨)을 포함한다. 알츠하이머병이 있는 환자에서 유용한 면역글루불린을 인코딩하는 핵산 서열이 설계되거나 선택될 수 있다. 이와 같은 항체 작제물은, 예를 들어, 아두마누카브(Biogen), 바피네우주맙(Elan; Aβ의 아미노 말단에 대한 인간화 mAb); 솔라네주맙(Eli Lilly, 가용성 Aβ의 중앙 부분에 대한 인간화 mAb); 간테네루맙(Chugai 및 Hoffmann-La Roche, Aβ의 아미노 말단 및 중앙 부분 둘 다에 대한 완전한 인간 mAb임); 크레네주맙(Genentech, Aβ의 올리고머 및 프로토피브릴 형태를 포함하여 단량체 및 구조적 에피토프에 작용하는 인간화 mAb; BAN2401(Esai Co., Ltd, Aβ 프로토피브릴에 선택적으로 결합하고 Aβ 프로토피브릴의 소거를 향상시키고/시키거나 뇌에서 뉴런에 대한 독성 효과를 중화시키는 것으로 생각되는 인간환 면역글로불린 G1(IgG1) mAb); GSK 933776(Aβ의 아미노 말단에 대한 인간화 IgG1 단클론성 항체); AAB-001, AAB-002, AAB-003(Fc-조작된 바피네우주맙); SAR228810(프로토피브릴 및 저분자량 Aβ에 대한 인간화 mAb); BIIB037/BART(불용성 피브릴 인간 Aβ에 대한 전체 인간 IgG1, Biogen Idec), 항-Aβ 항체, 예컨대, m266, tg2576(Aβ 올리고머에 대한 상대적 특이성)을 포함한다[Brody and Holtzman, Annu Rev Neurosci, 2008; 31: 175-193]. 다른 항체는 베타-아밀로이드 단백질, Aβ, 베타 세크레타제 및/또는 타우 단백질을 표적으로 할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 항-β-아밀로이드 항체는 이펙터 기능을 최소화하기 위해 β-아밀로이드를 표적으로 하는 IgG4 단클론성 항체로부터 유래되거나, 아밀로이드 관련 비정상적 영상 소견(ARIA) 및 염증 반응을 회피하기 위해 Fc 영역이 결여된 scFv 이외의 작제물이 선택된다. 이들 중 특정 실시형태에서, 하나 이상의 scFv 작제물의 중쇄 가변 영역 및/또는 경쇄 가변 영역이 본 명세서에서 제공된 바와 같은 또 다른 적합한 면역글로불린 작제물에서 사용된다. 이러한 scFv 및 다른 조작된 면역글로불린은 Fc 영역을 포함하는 면역글로불린과 비교하여, 혈청 내 면역글로불린의 반감기를 감소시킬 수 있다. 혈청 내 극히 높은 수준의 항-아밀로이드 항체는 아밀로이드 플라크의 부담이 높은 대뇌 혈관을 불안정하게 만들어 혈관 투과성을 유발할 수 있기 때문에, 항-아밀로이드 분자의 혈청 농도를 낮추면 ARIA의 위험을 추가로 감소시킬 수 있다. 파킨슨병 환자의 치료를 위한 다른 면역글로불린을 인코딩하는 핵산은, 예를 들어, 류신-풍부 반복 키나제 2, 다다린(LRRK2) 항체; 항-시누클레인 및 알파-시누클레인 항체 및 DJ-1(PARK7) 항체를 포함하는 작제물을 발현하도록 조작되거나 설계될 수 있다. 다른 항체는 PRX002(Prothena 및 Roche) 파킨슨병 및 관련 시누클레인병증을 포함할 수 있다. 이들 항체, 특히 항-시누클레인 항체는 또한 하나 이상의 리소좀 축적병의 치료에 유용할 수 있다.

[0135] 다발성 경화증을 치료하기 위해 면역글로불린 작제물을 인코딩하는 핵산 작제물을 조작하거나 선택할 수 있다. 이와 같은 면역글로불린은 2006년에 승인된 나탈리주맙(인간화 항-a4-인그린, iNATA, Tysabri, Biogen Idec 및 Elan Pharmaceuticals), 알렘투주맙(Campath-1H, 인간화 항-CD52), 리툭시맙(리투진, 키메라 항-CD20), 다클리주맙(Zenepax, 인간화 항-CD25), 오크렐리주맙(인간화, 항-CD20, Roche), 우스테키누맙(CNTO-1275, 인간 항-IL12 p40+IL23p40); 항-LINGO-1, 및 ch5D12(키메라 항-CD40), 및 rHIgM22(재수초화 단클론성 항체, 아코다 및

메이요 의학 교육 및 연구 재단(Acorda and the Mayo Foundation for Medical Education and Research))와 같은 항체를 포함하거나 이로부터 유래될 수 있다. 또 다른 항-a4-인테그린 항체, 항-CD20 항체, 항-CD52 항체, 항-IL17, 항-CD19, 항-SEMA4D, 및 항-CD40 항체가 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 벡터를 통해 전달될 수 있다.

[0136] 중추신경계의 다양한 감염에 대한 항체가 또한 본 발명에 의해 고려된다. 이와 같은 감염성 질환은 진균성 질환, 예컨대, 크립토코커스 뇌수막염, 뇌농양, 예를 들어, 크립토코커스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 콕시디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 무코랄레스(*Mucorales*) 목, 아스퍼질러스 종(Aspergillus spp), 및 칸디다 종(*Candida* spp)에 의해 유발되는 척추 경막외 감염; 원충성 질환, 예를 들어, 톡소프라스마 곤디(*Toxoplasma gondii*), 테니아 솔리움(*Taenia solium*), 플라스모듐 팔시파룸(*Plasmodium falciparum*), 스피로메트라 만소노이데스(*Spirometra mansonoides*)(스파르가눔증), 에키노코커스 종(*Echinococcus* spp)(신경 포충증(neuro hydatosis)을 유발함), 및 대뇌 아메바증과 같은 매개물에 의해 유발되는, 예컨대, 톡소플라스마증, 말라리아 및 원발성 아메바성 뇌수막염; 박테리아 질환, 예컨대, 결핵, 한센병, 신경매독, 세균성 뇌수막염, 라임병(보렐리아 부르그도르페리(*Borrelia burgdorferi*)), 로키산 홍반열(리케치아 리케치아(*Rickettsia rickettsia*)), CNS 노카르디아증(노카르디아 종(*Nocardia* spp)), CNS 결핵(마이코박테륨 튜베르쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)), CNS 리스테리아병(리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)), 뇌농양 및 신경보레릴아증; 바이러스 감염, 예를 들어, 헤르페스 패밀리 바이러스(HSV), HSV-1, HSV-2(신생아 단순 헤르페스 뇌염), 수두 대상포진 바이러스(VZV), 비커스태프 뇌염, 엡스타인-바 바이러스(EBV), 사이토메갈로바이러스(CMV, 예컨대, TCN-202는 Theraclone Sciences에 의해 개발 중임), 인간 헤르페스 바이러스 6(HHV-6), B 바이러스(헤르페스바이러스 시미애(*Herpesvirus simiae*)), 플라비바이러스 뇌염, 일본 뇌염, 머레이 계곡열, JC 바이러스(진행성 다초점성 백질이영양증), 니파 바이러스(NiV), 홍역(아급성 경화성 범뇌염)에 의해 유발될 수 있는, 예컨대, 바이러스성 뇌수막염, 동부 말 뇌염(EEE), 세인트루이스 뇌염, 웨스트 나일 바이러스 및/또는 뇌염, 광견병, 캘리포니아 뇌염 바이러스, 라크로스 뇌염, 홍역 뇌염, 소아마비; 기타 감염, 예컨대, 아급성 경화성 범뇌염, 진행성 다초점성 백질이영양증; 인간 면역결핍 바이러스(후천성 면역결핍 증후군(AIDS)); 화농연쇄상 구균 및 기타 β-용혈성 연쇄상 구균(예를 들어, 연쇄상 구균 감염과 연관된 소아 자가면역 신경정신 장애(Pediatric Autoimmune Neuropsychiatric Disorders Associated with Streptococcal Infection: PANDAS) 및/또는 시데남 무도병, 및 길랭-바레 증후군 및 프리온을 포함할 수 있다.

[0137] 적합한 항체 작제물의 예는, 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 원용된 WO 2007/012924A2(2015년 1월 29일)에 기재된 것을 포함할 수 있다.

[0138] 예를 들어, 다른 핵산 서열은 항-프리온 면역글로불린 작제물을 인코딩할 수 있다. 이와 같은 면역글로불린은 주요 프리온 단백질(PrP, 프리온 단백질 또는 프로테아제-내성 단백질의 경우, CD230(분화 클러스터 230)으로도 알려져 있음)에 대해 지시될 수 있다. PrP의 아미노산 서열은, 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 원용된 ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000302에 제공되어 있다. 단백질은 정상 PrPC, 질환-유발 PrPSc, 및 미토콘드리아에 위치한 아이소형과 같은 여러 아이소형으로 존재할 수 있다. 잘못 폴딩된 형태인 PrPSc는 다양한 인지 장애 및 신경퇴행성 질환, 예컨대, 크로이츠펠트-야콥병, 소 해면상 뇌병증, 게르스트만-슈트로이슬러-샤잉커 증후군, 치명적 가족성 불면증, 및 쿠루와 연관된다.

[0139] 특정 실시형태에서, 유전자 요법이 효과적인 환자 집단을 증가시키는 방법이 제공된다. 방법은 선택된 바이러스 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 1:5보다 큰 집단 유래의 환자에게, (a) 선택된 바이러스 캡시드 및 유전자 요법 발현 카세트가 내부에 패키징된 재조합 바이러스; 및 (b) 유전자 요법 벡터의 전달 전에 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 특이적으로 결합하는 리간드를 공동 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 리간드는 면역글로불린 G(IgG)에 결합하는 FcRN을 차단하고 유효량의 유전자 요법 산물이 환자에서 발현되는 것을 허용한다.

[0140] 특정 실시형태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 캡시드에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 rAAV를 본 명세서에 정의된 바와 같은 항-신생아 Fc 수용체(FcRn) 면역글로불린 작제물과 조합하여 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 면역글로불린 작제물은 적합하게는 FcRn-알부민 결합을 방해하지 않으면서, 면역글로불린 G(IgG)에 대한 FcRn 결합을 특이적으로 저해한다.

[0141] 특정 실시형태에서, 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)는 전신으로 전달된다. 특정 실시형태에서, rAAV는 정맥내, 복강내, 비강내, 또는 흡입을 통해 전달된다. 특정 실시형태에서, rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37로부터 선택되는 캡시드를 갖는다. 특정 실시형태에서, rAAV는 AAVhu68 캡시드를

갖는다. 특정 실시형태에서, rAAV는 AAVrh91 캡시드를 갖는다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 단클론성 항체 니포칼리맙(M281), 또는 이의 3개 이상의 CDR, 또는 이의 조합을 포함하는 면역글로불린 작제물이다. 특정 실시형태에서, 면역글로불린 작제물은 로자놀릭시주맙(UCB7665), IMVT-1401, RVT-1401, HL161, HBM916, ARGX-113(에프가티지모드), SYNT001, SYNT002, ABY-039, 또는 DX-2507, 면역글로불린 작제물의 유도체, 또는 면역글로불린 작제물 및/또는 이의 유도체의 조합물로부터 선택된다.

[0142] 일 실시형태에서, 대상체는 본 명세서에 기재된 벡터의 치료적 유효량을 전달받는다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "치료적 유효량"은 효능을 달성하기에 충분한 양의 효소를 표적 세포에서 전달하고 발현하는 기능성 유전자를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물의 양을 지칭한다. 일 실시형태에서, 벡터의 투약량은 용량당 약 1×10^{9}개 GC 내지 약 1×10^{13}개 GC이다. 특정 실시형태에서, 환자에게 투여되는 벡터의 용량은 적어도 약 1.0×10^{9}개 GC/kg, 약 1.5×10^{9}개 GC/kg, 약 2.0×10^{9}개 GC/g, 약 2.5×10^{9}개 GC/kg, 약 3.0×10^{9}개 GC/kg, 약 3.5×10^{9}개 GC/kg, 약 4.0×10^{9}개 GC/kg, 약 4.5×10^{9}개 GC/kg, 약 5.0×10^{9}개 GC/kg, 약 5.5×10^{9}개 GC/kg, 약 6.0×10^{9}개 GC/kg, 약 6.5×10^{9}개 GC/kg, 약 7.0×10^{9}개 GC/kg, 약 7.5×10^{9}개 GC/kg, 약 8.0×10^{9}개 GC/kg, 약 8.5×10^{9}개 GC/kg, 약 9.0×10^{9}개 GC/kg, 약 9.5×10^{9}개 GC/kg, 약 1.0×10^{10}개 GC/kg, 약 1.5×10^{10}개 GC/kg, 약 2.0×10^{10}개 GC/kg, 약 2.5×10^{10}개 GC/kg, 약 3.0×10^{10}개 GC/kg, 약 3.5×10^{10}개 GC/kg, 약 4.0×10^{10}개 GC/kg, 약 4.5×10^{10}개 GC/kg, 약 5.0×10^{10}개 GC/kg, 약 5.5×10^{10}개 GC/kg, 약 6.0×10^{10}개 GC/kg, 약 6.5×10^{10}개 GC/kg, 약 7.0×10^{10}개 GC/kg, 약 7.5×10^{10}개 GC/kg, 약 8.0×10^{10}개 GC/kg, 약 8.5×10^{10}개 GC/kg, 약 9.0×10^{10}개 GC/kg, 약 9.5×10^{10}개 GC/kg, 약 1.0×10^{11}개 GC/kg, 약 1.5×10^{11}개 GC/kg, 약 2.0×10^{11}개 GC/kg, 약 2.5×10^{11}개 GC/kg, 약 3.0×10^{11}개 GC/kg, 약 3.5×10^{11}개 GC/kg, 약 4.0×10^{11}개 GC/kg, 약 4.5×10^{11}개 GC/kg, 약 5.0×10^{11}개 GC/kg, 약 5.5×10^{11}개 GC/kg, 약 6.0×10^{11}개 GC/kg, 약 6.5×10^{11}개 GC/kg, 약 7.0×10^{11}개 GC/kg, 약 7.5×10^{11}개 GC/kg, 약 8.0×10^{11}개 GC/kg, 약 8.5×10^{11}개 GC/kg, 약 9.0×10^{11}개 GC/kg, 약 9.5×10^{11}개 GC/kg, 약 1.0×10^{12}개 GC/kg, 약 1.5×10^{12}개 GC/kg, 약 2.0×10^{12}개 GC/kg, 약 2.5×10^{12}개 GC/kg, 약 3.0×10^{12}개 GC/kg, 약 3.5×10^{12}개 GC/kg, 약 4.0×10^{12}개 GC/kg, 약 4.5×10^{12}개 GC/kg, 약 5.0×10^{12}개 GC/kg, 약 5.5×10^{12}개 GC/kg, 약 6.0×10^{12}개 GC/kg, 약 6.5×10^{12}개 GC/kg, 약 7.0×10^{12}개 GC/kg, 약 7.5×10^{12}개 GC/kg, 약 8.0×10^{12}개 GC/kg, 약 8.5×10^{12}개 GC/kg, 약 9.0×10^{12}개 GC/kg, 약 9.5×10^{12}개 GC/kg, 약 1.0×10^{13}개 GC/kg, 약 1.5×10^{13}개 GC/kg, 약 2.0×10^{13}개 GC/kg, 약 2.5×10^{13}개 GC/kg, 약 3.0×10^{13}개 GC/kg, 약 3.5×10^{13}개 GC/kg, 약 4.0×10^{13}개 GC/kg, 약 4.5×10^{13}개 GC/kg, 약 5.0×10^{13}개 GC/kg, 약 5.5×10^{13}개 GC/kg, 약 6.0×10^{13}개 GC/kg, 약 6.5×10^{13}개 GC/kg, 약 7.0×10^{13}개 GC/kg, 약 7.5×10^{13}개 GC/kg, 약 8.0×10^{13}개 GC/kg, 약 8.5×10^{13}개 GC/kg, 약 9.0×10^{13}개 GC/kg, 약 9.5×10^{13}개 GC/kg, 또는 약 1.0×10^{14}개 GC/kg이다.

[0143] 일 실시형태에서, 방법은 대상체가 면역억제 공동 요법을 받는 것을 추가로 포함한다. 이와 같은 공동 요법을 위한 면역억제제는 글루코코르티코이드, 스테로이드, 항대사제, T-세포 저해제, 마크로라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그), 및 알킬화제, 항-대사제, 세포독성 항생제, 항체, 또는 이뮤노필린에 활성인 작용제를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 면역 억제제는 질소 머스타드, 나이트로소우레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자싸이오프린, 머캅토퓨린, 플루오로우라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-지향 항체, 항-IL-2 항체, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, IFN-β, IFN-γ, 오피오이드, 또는 TNF-α(종양 괴사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다.

[0144] 특정 실시형태에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여 0, 1, 2, 7일, 또는 그 이상 전에 시작될 수 있다. 이와 같은 요법은 같은 날에 2개 이상의 약물(예를 들어, 프레드넬리손, 마이코페놀산(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 공동 투여를 포함할 수 있다. 이러한 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 후 동일한 용량 또는 조정된 용량으로 계속 사용될 수 있다. 이와 같은 요법은 필요에 따라 약 1주(7일), 약 60일, 또는 그 이상 동안일 수 있다. 특정 실시형태에서, 타크롤리무스-무함유 요법이 선택된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV는 필요한 대상체에게 1회 투여된다. 또 다른 실시형태에서, rAAV는 필요한 대상체에게 1회 초과로 투여된다.

[0145] 본 명세서에 기재된 방법의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 연대, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0146] 7. 키트

[0147] 특정 실시형태에서, 제형에 현탁된 농축 벡터(선택적으로 동결됨), 선택적 희석 완충액, 및 투여에 필요한 장치 및 구성요소를 포함하는 키트가 제공된다. 일 실시형태에서, 키트는 주사를 허용하기에 충분한 완충액을 제공한다. 특정 실시형태에서, 키트는 비강내 또는 에어로졸화 투여를 허용하기에 충분한 완충액을 제공한다. 이와 같은 완충액은 농축된 벡터의 약 1:1 내지 1:5 희석 또는 그 이상을 허용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 더 많거나 더 적은 양의 완충액 또는 멸균수가 포함되어 치료하는 임상의에 의한 용량 적정 및 기타 조정을 허용한다. 또 다른 실시형태에서, 장치의 하나 이상의 구성요소가 키트에 포함된다. 식염수, 인산염 완충 식염수(PBS) 또는 글리세롤/PBS와 같은 적합한 희석 완충액이 이용 가능하다.

[0148] 선택적으로, 키트는 전달을 위한 항-FcRn 리간드(예를 들어, 면역글로불린, 항체 작제물)를 포함하는 조성물을 추가로 포함한다.

[0149] 본 명세서에 기재된 키트의 구성은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 구성, 요법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 의도됨을 이해하여야 한다.

[0150] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 어구 "증상이 호전되다", "증상을 개선시키다" 또는 이의 임의의 문법적 변형어는 전달되는 유전자 산물과 연관된 증상, 증상들의 역전 또는 증상의 진행의 방지를 지칭한다. 일 실시형태에서, 호전 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 환자에서 투여 또는 사용 전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%만큼 감소된 증상의 총 수를 지칭한다. 다른 실시형태에서, 호전 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 투여 또는 사용 전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95%만큼 감소된 증상의 중증도 또는 진행을 지칭한다.

[0151] 달리 명시되지 않는 한, "환자"는 남성 또는 여성 인간을 지칭하고 "대상체"는 임상 연구에 사용되는 남성 또는 여성 인간, 개, 및 동물 모델을 지칭한다.

[0152] 특정 실시형태에서, 원하는 바이러스 벡터의 외부 캡시드 또는 외피 단백질에 대한 중화 항체를 이용하여 유전자 요법 환자를 치료하기 위한 조합 요법. 요법은 인간 신생아 Fc 수용체(FcRn)의 결합을 저해하는 리간드와 바이러스 벡터의 외부 캡시드 또는 외피 단백질에 대해 지시되는 면역글로불린 G(IgG)의 치료적 조합으로, 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 보유하는 바이러스 벡터를 공동 투여하는 것을 포함한다. 적합하게는, 리간드는 FcRn-알부민 결합을 방해하지 않으면서 FcRn-IgG 결합에 대해 지시된다. 리간드는 펩타이드, 단백질, RNAi 서열, 또는 소분자로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 리간드 단백질은 단클론성 항체, 면역어드헤신, 낙타과 항체, Fab 단편, Fv 단편 또는 scFv 단편이다. 바이러스 벡터는 제한 없이 재조합 아데노-연관 바이러스, 재조합 아데노바이러스, 재조합 단순 헤르페스 바이러스, 또는 재조합 렌티바이러스일 수 있다.

[0153] 특정 실시형태에서, 요법은 니포칼리맙(M281), 로자놀릭시주맙(UCB7665); IMVT-1401, RVT-1401, HL161, HBM916, ARGX-113(에프가티지모드), 오릴라놀리맙 (SYNT001), SYNT002, ABY-039, 또는 DX-2507, 이들의 유도체 또는 조합물로부터 선택되는 단클론성 항체를 이용한 환자의 치료를 포함한다.

[0154] 특정 실시형태에서, 리간드는 니포칼리맙(M281) 또는 (a) (i) 서열번호 16의 CDR H1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, (ii) 서열번호 18의 CDR H2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 및 (iii) 서열번호 20의 CDR H3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 중쇄 CDR; 또는 (b) 서열번호 10의 CDR L1 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 12의 CDR L2 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열, 서열번호 14의 CDR L3 또는 이와 적어도 99% 동일한 서열의 경쇄 CDR로부터 선택되는 3개 이상의 CDR을 포함하는 면역글로불린 작제물이다. 특정 실시형태에서, 니포칼리맙 또는 면역글로불린 작제물은 (a) (i) 서열번호 16의 CDR H1, (ii) 서열번호 18의 CDR H2, 및 (iii) 서열번호 20의 CDR H3의 중쇄 CDR; 또는 (b) 서열번호 10의 CDR L1, 서열번호 12의 CDR L2, 서열번호 14의 CDR L3의 경쇄 CDR을 포함한다.

[0155] 특정 실시형태에서, 이들 리간드, 또는 다른 선택된 리간드를 인코딩하는 핵산 서열은 본 명세서에서 제공된 방법 및 조성물에 의해 포함된다. 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)는 리간드의 발현을 지시하는 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 리간드(예를 들어, 항-FcRn 항체)를 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터의 투여 후

생체 내에서 발현될 수 있다.

[0156] 특정 실시형태에서, 조합 요법으로 투약하기 전에, 환자는 시험관 내 분석에서 결정될 때 rAAV 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대해 1:5 초과의 중화 역가를 갖는다.

[0157] 특정 실시형태에서, 환자는 바이러스 벡터의 투여 또는 전달 1일 내지 7일 전, 바이러스 벡터와 동일한 날, 및/또는 바이러스 벡터의 전달 후 하루, 며칠, 수주, 또는 수개월(예를 들어, 10일 내지 6개월, 또는 그 이상, 약 2주 내지 12주, 또는 그 이상) 동안 리간드(즉, 전달된 리간드)로 치료될 수 있다. 선택적으로, 리간드는 매일 전달된다. 특정 실시형태에서, 리간드는 바이러스 벡터와 상이한 투여 경로를 통해 전달된다. 리간드는 경구로 전달될 수 있다. 바이러스 벡터는 복강내, 정맥내, 근육내, 비강내, 또는 척수강내로 전달될 수 있다.

[0158] 특정 실시형태에서, 치료 전에 환자는 시험관 내 분석에서 결정될 때 벡터 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 1:5보다 크도록 미리 결정된다. 특정 실시형태에서, 환자는 환자의 기존 중화 항체가 야생형 바이러스 벡터 감염의 결과가 되도록 저해성 리간드와 조합된 바이러스 벡터의 전달 전에 이전에 유전자 요법 또는 바이러스 벡터를 사용한 유전자 전달을 받은 적이 없다. 특정 실시형태에서, 환자는 저해성 리간드와 조합된 마이러스 벡터의 전달 전에 유전자 요법 치료를 받은 적이 있다.

[0159] 특정 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 조합 요법은 (a) 스테로이드 또는 스테로이드의 조합; 및/또는 (b) IgG-절단 효소; 및 (c) Fc-IgE 결합의 저해제; (d) Fc-IgM 결합의 저해제; (e) Fc-IgA 결합의 저해제; 및/또는 (f) 감마 인터페론 중 하나 이상을 공동 투여하는 것을 추가로 포함한다.

[0160] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 방법은 유전자 요법이 효과적인 환자 집단을 확장(증가)시키는 데 효과적이다. 예를 들어, 이와 같은 방법은 선택된 바이러스 캡시드 또는 혈청학적 교차 반응성 캡시드에 대한 중화 항체 역가가 1:5보다 큰 집단 유래의 환자에게, (a) 선택된 바이러스 캡시드 및 선택된 바이러스 캡시드 내에 패키징된 유전자 요법 발현 카세트; 및 (b) 유전자 요법 벡터의 전달 전에 신생아 Fc 수용체(FcRn)에 특이적으로 결합하는 리간드를 공동 투여하는 단계를 포함할 수 있으며, 여기서 리간드는 면역글로불린 G(IgG)에 대한 FcRN의 결합을 차단하고, 유효량의 유전자 요법 산물이 환자에서 발현되는 것을 허용한다. 특정 실시형태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 캡시드에 대한 중화 항체를 이용하여 환자를 치료하는 방법이 제공되며, 방법은 rAAV를 항-신생아 Fc 수용체(FcRn) 면역글로불린 작제물과 조합하여 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 상기 면역글로불린 작제물은 FcRn - 면역글로불린 G(IgG) 결합을 특이적으로 저해한다. 특정 실시형태에서, rAAV는 전신으로, 예를 들어, 정맥내, 복강내, 비강내로, 또는 흡입을 통해 전달된다. 임의의 적합한 캡시드가 선택될 수 있지만, 특정 실시형태에서 rAAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh91, AAVhu37, AAVhu68로부터 선택되는 캡시드를 갖는다.

[0161] 이들 발명의 설명과 관련하여, 본 명세서에 기재된 각각의 조성물은 본 발명의 방법의 또 다른 실시형태에서 유용한 것으로 의도된다. 추가적으로, 방법에 유용한 것으로 본 명세서에 기재된 각각의 조성물은 또 다른 실시형태에서 그 자체가 본 발명의 실시형태인 것으로 의도된다.

[0162] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 그리고 공개된 텍스트를 참조하여 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지며, 이는 당업자에게 본 출원에서 사용되는 다수의 용어에 대한 많은 가이드를 제공한다.

[0163] 핵산은 중합체 형태의 뉴클레오타이드를 지칭하며 RNA, mRNA, cDNA, 게놈 DNA, 펩타이드 핵산(PNA) 및 이들의 합성 형태 및 혼합 중합체를 포함한다. 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시뉴클레오타이드 또는 뉴클레오타이드의 어느 한 형태의 변형된 형태(예를 들어, 펩타이드 핵산 올리고머)를 지칭한다. 이 용어는 또한 단일-가닥 및 이중-가닥 형태의 DNA를 포함한다. 당업자는 이들 핵산 분자의 기능성 변이체도 또한 본 발명의 일부인 것으로 의도된다는 것을 이해할 것이다. 기능성 변이체는 모 핵산 분자로부터 번역된 것과 동일한 아미노산 서열을 제공하기 위해, 표준 유전자 코드를 사용하여 직접 번역될 수 있는 핵산 서열이다.

[0164] 방법은 알려져 있으며 이전에 기재된 바 있다(예를 들어, WO 96/09378). 야생형 서열과 비교하여 적어도 하나의 비선호 코돈이 더 바람직한 코돈으로 대체된다면 서열은 조작된 것으로 간주된다. 본 명세서에서, 비선호 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하는 다른 코돈보다 유기체에서 덜 자주 사용되는 코돈이며, 더 바람직한 코돈은 비선호 코돈보다 유기체에서 더 자주 사용되는 코돈이다. 특정 유기체에 대한 코돈 사용 빈도는 www.kazusa.jp/codon과 같은 코돈 빈도 표에서 찾을 수 있다. 바람직하게는 하나 초과의 비선호 코돈, 바람직하게는 대부분 또는 모든 비선호 코돈은 더 바람직한 코돈으로 대체된다. 바람직하게는 유기체에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈이 조작된 서열에서 사용된다. 선호되는 코돈에 의한 대체는 일반적으로 더 높은 발현을 야기한다. 또

한, 다수의 상이한 핵산 분자가 유전자 코드의 축퇴의 결과로서 동일한 폴리펩타이드를 인코딩할 수 있다는 것도 당업자에 의해 이해될 것이다. 또한 당업자는 일상적인 기법을 사용하여 폴리펩타이드가 발현될 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영하기 위해 핵산 분자에 의해 인코딩된 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오타이드 치환을 할 수 있음이 이해된다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 인코딩하는 핵산 서열"은 서로의 축퇴 형태이고 동일한 아미노산 서열을 인코딩하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 핵산 서열은 일상적인 분자 생물학 기법을 사용하여 클로닝되거나, DNA 합성에 의해 신규로(de novo) 생성될 수 있으며, 이는 DNA 합성 및/또는 분자 클로닝 분야에서 비즈니스를 수행하는 서비스 회사(예를 들어, GeneArt, GenScript, Life Technologies, Eurofins)에 의해 일상적인 절차를 사용하여 수행될 수 있다.

[0165] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "동일성 백분율(%)", "서열 동일성", "서열 동일성 백분율", 또는 "동일한 백분율"은 대응하도록 정렬될 때 동일한 두 서열의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 게놈의 전장, 유전자 코딩 서열의 전장, 또는 적어도 약 500 내지 5000개 뉴클레오타이드의 단편에 걸칠 수 있으며, 이 길이가 바람직하다. 그러나, 예를 들어, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 보통 적어도 약 20 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 이상의 뉴클레오타이드의 더 작은 단편들 사이의 동일성이 또한 바람직할 수 있다.

[0166] 다수의 서열 정렬 프로그램이 또한 핵산 서열에 이용 가능하다. 이와 같은 프로그램의 예는 "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "BLAST", "MAP" 및 "MEME"를 포함하며, 이들은 인터넷의 웹 서버를 통해 접근 가능하다. 이와 같은 프로그램에 대한 다른 공급원은 당업자에게 알려져 있다. 대안적으로, Vector NTI 유틸리티도 또한 사용된다. 또한, 상기 기재한 프로그램에 포함된 것을 포함하여 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하는 데 사용될 수 있는 당업계에 알려진 다수의 알고리즘이 있다. 다른 예로서, GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta™을 사용하여 폴리뉴클레오타이드 서열을 비교할 수 있다. Fasta™는 질의 서열과 검색 서열 사이의 가장 잘 겹치는 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다. 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 원용된 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같이 디폴트 매개변수(단어 크기 6 및 스코어링 매트릭스에 대한 NOPAM 인자)와 함께 Fasta™를 사용하여 핵산 서열 사이의 서열 동일성 백분율을 결정할 수 있다.

[0167] 동일성 백분율은 단백질, 폴리펩타이드, 약 32개 아미노산, 약 330개 아미노산, 또는 이들의 펩타이드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 서열의 전체 길이에 걸쳐 아미노산 서열에 대해 쉽게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 길이가 적어도 약 8개 아미노산일 수 있고, 최대 약 700개 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 사이의 "동일성", "상동성" 또는 "유사성"을 지칭할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열을 참조하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 종종 참조 서열과 비교하여 누락되거나 추가된 염기 또는 아미노산에 대한 수정을 포함하는 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다.

[0168] 상한 범위에 의해 달리 명시되지 않는 한, 동일성 백분율은 동일성의 최소 수준이며 참조 서열에 대해 최대 100% 동일성의 더 높은 모든 수준의 동일성을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 달리 명시되지 않는 한, 동일성 백분율은 최소 수준의 동일성이며 참조 서열에 대해 최대 100% 동일성의 더 높은 모든 수준의 동일성을 포함하는 것으로 이해될 것이다. 예를 들어, "95% 동일성" 및 "적어도 95% 동일성"은 호환 가능하게 사용될 수 있으며 참조 서열에 대한 95, 96, 97, 98, 99 내지 100%의 동일성, 및 그 사이의 모든 비율을 포함할 수 있다.

[0169] 달리 명시되지 않는 한, 수치는 통상적인 수학 반올림 규칙이 적용되는 것으로 이해될 것이다.

[0170] 동일성은 서열의 정렬을 준비함으로써 그리고 당업계에 알려져 있거나 상업적으로 이용 가능한 다양한 알고리즘 및/또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, BLAST, ExPASy; Clustal Omega; FASTA; 예를 들어, Needleman-Wunsch 알고리즘, Smith-Waterman 알고리즘을 사용함)의 사용을 통해 결정될 수 있다. 정렬은 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다양한 다중 서열 정렬 프로그램 중 임의의 것을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램, 예를 들어, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램은 아미노산 서열에 대해 이용 가능하다. 일반적으로, 임의의 이러한 프로그램은 디폴트 설정으로 사용되지만, 당업자는 필요에 따라 이러한 설정을 변경할 수 있다. 대안적으로, 당업자는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 것과 적어도 그 수준의 동일성 또는 정렬을 제공하는 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)]을 참조한다.

[0171] 본 명세서에 기재된 수성 현탁액 또는 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하도록 설계된다.

[0172] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "척수강내 전달" 또는 "척수강내 투여"는 약물이 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 척추관, 더 구체적으로는 지주막하 공간으로의 주사를 통한 약물 투여 경로를 지칭한다. 척수강내 전달은 요추 천자, 심실내, 후두하/수조내, 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 요추 천자를 통해 지주막하 공간 전체에 걸친 확산을 위해 물질이 도입될 수 있다. 다른 예에서, 주사는 대수조 내로 이루어질 수 있다. 수조 내 전달은 벡터 확산을 증가시키고/시키거나 투여로 인한 독성 및 염증을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌[Christian Hinderer et al, Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, Mol Ther Methods Clin Dev. 2014; 1: 14051. 온라인 공개 2014년 12월 10일. doi: 10.1038/mtm.2014.51]을 참조한다.

[0173] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여"는 뇌실의 뇌척수액 또는 소뇌 대수조 내로 직접, 더 구체적으로는 후두하 천자를 통해 또는 대수조 내로의 직접 주사에 의해 또는 영구적으로 배치된 튜브를 통해 약물을 투여하는 경로를 지칭한다.

[0174] "포함하는"은 다른 구성요소 또는 방법 단계의 포함을 의미하는 용어이다. "포함하는"이 사용되는 경우, 관련 실시형태는 다른 구성요소 또는 방법 단계를 배제하는 "로 이루어진" 용어, 및 실시형태 또는 발명의 특성을 실질적으로 변경하는 임의의 구성요소 또는 방법 단계를 배제하는 "로 본질적으로 이루어진" 용어를 사용하는 기재를 포함하는 것으로 이해되어야 한다. 명세서의 다양한 실시형태는 "포함하는" 언어를 사용하여 제시되지만, 다양한 상황 하에서 관련 실시형태는 또한 "로 이루어진" 또는 "로 본질적으로 이루어진" 언어를 사용하여 기재됨을 이해하여야 한다.

[0175] 단수 용어는 하나 이상을 지칭하며, "벡터"는 하나 이상의 rAAV(들) 또는 다른 명시된 벡터를 나타내는 것으로 이해된다는 것에 유의하여야 한다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 호환 가능하게 사용된다.

[0176] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한, 주어진 참조값으로부터 플러스 또는 마이너스 10%의 가변성을 의미한다.

[0177] 특정 경우에, 용어 "E+#" 또는 용어 "e+#"는 지수를 언급하는 데 사용된다. 예를 들어, "5E10" 또는 "5e10"은 5×10^{10}이다. 이들 용어는 호환 가능하게 사용될 수 있다.

[0178] 8. 실시예

[0179] 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명은 결코 이들 실시예에 제한되는 것으로 해석되어서는 안 되며, 오히려 본 명세서에서 제공된 교시내용의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0180] 본 발명자들은 AAV 벡터와 함께 기존 중화 항체를 이용하여 대상체를 치료하기 위한 전략을 개발하였다. 신생아 Fc 수용체(FcRn)를 표적으로 하는 단일 용량의 단클론성 항체를 사용하면, 기존 중화 항체가 일시적으로 최대 10배까지 감소하여 효과적인 AAV 투여가 가능하다.

[0181] 인간 IgG로 처리된 마우스에서, 단일 FcRN mAb 용량은 항체 역가를 10배 감소시켰고 성공적인 AAV-매개 간 형질도입을 허용하였다.

[0182] 실시예 1. 마우스에서 NAb 역가 및 AAV 형질도입에 대한 FcRn의 차단 효과

[0183] 이 연구에서 본 발명자들은 항-FcRn 항체가 항-AAV NAb의 수준을 감소시키고 이에 의해 마우스에서 AAV의 정맥내(i.v.) 투여 후 AAV-매개 유전자 형질도입을 향상시킬 수 있는지 여부를 테스트하였다. 이 연구에서, 본 발명자들은 M281 단클론성 항체(mAb)의 투여가 풀링된 인간 IgG로 전처리된 인간화 FcRn 유전자이식 마우스에서 정맥내 벡터 투여 후 간-표적화 유전자 형질도입의 인간-NAb 매개 차단을 되돌리는 것을 관찰하였다. 도 12는 AAV8.TT1 벡터 투여 시점에 IVIG를 공동 처리한 마우스에서 감소된 TT1 활성 수준의 결과를 나타낸다.

[0184] 하기 표 1은 마우스에서 NAb 역가 및 AAV 형질도입에 대한 FcRn 차단의 효과를 조사하기 위한 요약된 연구 설계를 나타낸다. 이 연구에서, 본 발명자들은 M281 항체의 표적인 인간 FcRn의 발현에 의해 인간 면역글로불린 G(hIgG)의 더 긴 혈청 반감기를 제공하는 인간 FcRn 유전자이식 마우스(즉, SCID-hFcRnTg32 마우스(JAX: 018441))를 사용하였다. M281은 서열번호 8의 중쇄 M281-HC 및 서열번호 7의 경쇄를 포함하는 hIgG1 항체이다. 연구 시작 시점인 제0일에, 마우스에 Privigen(IVIG)을 0.5 g/kg의 용량으로 정맥내 주사하였다. Privigen은 0.1 g/mℓ 용액에 1:320의 비율로 AAV8 중화 항체(NAb)를 가졌다. 제1일에, 마우스에 30 mg/kg 용량의 M281(그룹

2) 또는 대조군의 PBS(그룹 1)를 복강내 주사하였다. 제16일에, 마우스에 4×10^{12}개 GC/kg의 용량으로 AAV8.TBG.TT1을 투여하였다. AAV8.TBG.TT1은 AAV8 캡시드 및 테스트 이식유전자 1(즉, TT1) 이식유전자를 인코딩하는 벡터 게놈을 갖는 벡터이다. hIgG/Nab 역가의 혈청 수준을 연구의 판독값으로 측정하였다.

표 1

[0185]

일수	처리	그룹 1 N=8	그룹 2 N=5	샘플
-7				혈청
0	IVIG(i.v.) 0.5 g/kg	×	×	혈청
1	M281(i.p.) 30 mg/kg	PBS	PBS	혈청
8				혈청
16	AAV8.TBG.TT1 (i.v. 4e12개 GC/kg)	×	×	혈청
44				혈청
72				부검(혈청, 간, 심장)

[0186] 제16일까지, NAb를 포함한 hIgG의 수준은 약 50%로 감소되었다. 도 1A 및 도 1B는 M281 mAb의 투여가 IVIG로 전처리되었을 때 hFcRn 마우스의 간에서 hIgG의 수준을 감소시키고 AAV 형질도입을 개선시켰음을 나타낸다. 도 1A는 IVIG 전처리 후 제1일 내지 제16일에 혈청 인간 IgG의 수준을 나타낸다. 도 1B는 AAV 형질도입 후 제28일에 이식유전자 활성의 수준을 단위(U)로 표시하여 나타낸다. 사각형은 M281 정맥내 주사를 받은 마우스를 표시한다. 채워진 사각형은 IgG 수준 감소가 관찰된 마우스를 표시한다. 빈 사각형은 IgG의 혈청 수준이 PBS-처리 그룹과 비교하여 높고 이와 상관관계가 있는 마우스를 표시한다. M281로 처리되고 hIgG 감소를 나타내지 않은 2마리 마우스(빈 사각형)는 복강내 주사 실패로 인한 것으로 보인다.

[0187] 본 발명자들은 다음으로 IVIG로 전처리된 hFcRn Tg 마우스에서 더 높은 용량으로 정맥내 AAV 투여에 의한 이식유전자 형질도입에 대한 M281의 효과를 조사하였다. 하기 표 2는 마우스당 1×10^{11}개 GC의 고용량에서 NAb 역가와 AAV8.TBG.TT1 형질도입 사이의 상관관계 및 FcRn 차단 효과를 조사하기 위한 요약된 연구 설계를 나타낸다.

표 2

[0188]

그룹 지정	1	2	3
N/그룹	5	5	5
설명	IVIG 없음	IVIG+PBS	IVIG+M281
유전자형	hFcRnTg32	hFcRnTg32	hFcRnTg32
IVIG(iv) – 제0일	비히클 대조군	1 g/kg	1 g/kg
M281(ip)– 6h 및 24h	-	비히클 대조군	30 mg/kg
벡터 용량(iv)	1e11개 GC/마우스	1e11개 GC/마우스	1e11개 GC/마우스
기간, 판독값	35일 연구 혈청 NAb, BAb, 및 IgG(생전) 및 부검 후 벡터 게놈 생체분포		

[0189] 이 실험에서는, 인간화 FcRn 유전자이식 scid 마우스를 사용하였다. 실험 그룹의 경우, 제0일에 1 g/kg의 정맥

내 풀링된 인간 IgG로 처리된 마우스는 인간 IgG 후 6시간 및 24시간째(각각의 시점에 대해 30 mg/kg)에 복강내 M281 주사를 받았다. 대조군 그룹은 인간 IgG 또는 M281을 받지 않았고 다른 대조군 그룹은 인간 IgG를 받았지만 M281 mAb를 받았다. 제5일에 모든 마우스에 정맥내 AAV8.TBG.TT1 벡터(1×10^{11}개 GC/마우스)를 투여하여 혈청 TT1 활성에 의한 제19일, 제26일 및 제33일에 간-표적 유전자 형질도입을 조사하였다. NAb(중화 결합 항체), BAb(비-중화 결합 항체) 및 hIgG(인간 IgG)의 혈청 수준, 및 벡터 게놈 생체분포를 연구의 판독값으로서 측정하였다. 인간 IgG ELISA는 인간 IgG 처리 후 제5일에 인간 IgG로 처리하였지만 M281 mAb로 처리된 마우스의 10% 미만으로, M281 mAb로 처리된 마우스에서 인간 IgG의 상당한 감소를 나타내었다(도 2A). 인간 IgG는 M281 mAb를 투여하지 않았을 때, 혈청 TT1 활성을 완전히 감소시켰다. 대조적으로, 인간 IgG가 없는 마우스는 풀링된 인간 IgG로부터 유래된 NAb가 IV 벡터에 의한 간-표적화 유전자 형질도입을 차단함을 시사하는 혈청 TT1 활성의 현저한 증가를 나타내었다. M281 mAb에 의한 인간 IgG의 90% 초과의 감소는 간 형질도입을 인간 IgG로 처리하지 않은 마우스의 60% 초과로 회복시켰다. 이러한 결과는 항-AAV NAb의 긴 혈청 반감기가 생체 내에서 FcRn 수용체에 의존하고 M281 mAb에 의한 수용체 차단이 NAb와 함께 순환하는 IgG를 감소시킨다는 것을 증명한다. 도 2A는 IVIG로 전처리한 후 혈청 인간 IgG(hIgG)의 수준을 나타낸다. M281 및 AAV의 투여는 화살표로 표시되어 있다. 연구 제5일에 M281로 처리된 마우스(그룹 3)에서 혈청 hIgG 수준이 감소되었으며, 그 결과는 하기 표 3에 요약되어 있다. 도 2B는 연구 제0일 내지 제35일의 혈청 내 벡터 생체분포 수준을 나타낸다. 혈청 내 TT1 활성 수준은 IVIG로 전처리하지 않은 대조군 1의 마우스와 유사하였다. M281에 의한 FcRn의 저해는 총 hIgG와 함께 IVIG-유래 NAb를 감소시켰고 정맥내 AAV8에 의한 간 유전자 형질도입을 허용하였다.

표 3

[0190]

그룹	제5일의 AAV8 NAb
IVIG 없음	<1:5
IVIG+PBS	1:10
IVIG+M281	<1:5

[0191] 본 발명자들은 풀링된 인간 IgG(IVIG)가 주입될 때 인간 FcRn 유전자이식 마우스 모델에서 인간 IgG 수준의 감소 및 AAV 매개 유전자 전달의 향상에 대한 항-FcRn 항체 M281의 효능을 확인하였다.

[0192] 실시예 2. 비-인간 영장류(NHP)에서 NAb 역가 및 AAV 형질도입에 대한 FcRn 차단의 효과

[0193] 이 연구에서, 본 발명자들은 AAVhu68 벡터(AAVhu68 캡시드 및 CB7 프로모터와 이식유전자 2 이식유전자(즉, TT2)를 갖는 벡터 게놈)의 정맥내 전달 후 NHP의 기존 NAb 및 심장 유전자 형질도입에 대한 M281의 효과를 테스트하였다. 이 연구에서, 본 발명자들은 M281 mAb의 투여가 기존 NAb 역가를 일시적으로 감소시키고 내인성 기존 NAb가 있는 비-인간 영장류에서 정맥내 벡터 투여로 유전자 형질도입을 향상시킴을 관찰하였다.

[0194] 도 3은 NHP에서 NAb 역가 및 AAV 형질도입에 대한 FcRn 차단의 효과를 조사하기 위한 연구 설계를 나타낸다. 본 발명자들의 연구에서, 본 발명자들은 표시된 경우, 측정된 기존 NAb 역가가 1:80, 1:40, 1:20 및/또는 1:5 미만인 히말라야 원숭이(NHP)를 사용하였다. NHP는 AAV 주사(제0일) 전 제5일, 제4일 및 제3일(제-5일, 제-4일 및 제-3일)에 M281을 8 mg/kg의 용량으로 정맥내 투약하였다. 제0일에, NHP에 AAVhu68 벡터를 3×10^{13}개 GC/kg으로 정맥내 주사하였다. 초기 연구 1(도 3에 나타낸 바와 같음)에서, 각각 기존의 AAVhu68 NAb 역가가 1:20 및 1:40인 2마리의 히말라야 원숭이를 연속 3일(제-5일, 제-4일 및 제-3일) 동안 8 mg/kg으로 정맥내 M281 mAb로 처리하여 비-인간 영장류에서 기존의 NAb 역가에 대한 M281에 의한 FcRn 차단 효과를 조사하하였다. 도 4B에 나타낸 바와 같이, AAVhu68 NAb 역가는 제-3일에 절반으로 감소한 다음 두 동물 모두에서 제0일에 1:5에 도달하였다. NAb 역가는 제2일에 1:10으로 약간의 증가를 나타내었고 제9일까지 1:10으로 유지되었다. 이러한 결과는 M281 mAb가 히말라야 원숭이 FcRn에 교차 반응하고 NAb와 함께 내인성 히말라야 원숭이 IgG를 감소시킨다는 것을 분명히 나타낸다. M281 투약 프로토콜은 최대 1:40의 기존 NAb 역가를 갖는 NHP에 대해 NAb 역가를 1:5로 감소시키는 데 효과적인 것으로 나타났다. 도 4A 내지 도 4D는 M281 주입이 NHP에서 기존의 NAb 역가 및 IgG를 감소시켰음을 나타낸다. 도 4A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 히말라야 원숭이 IgG(rhIgG)의 수준을 나타내며, 여기서 M281의 투여 일수는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4B는 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281의 투여 일수는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4C는 AAVhu68 중화 결합 항체

(NAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281의 투여 일수는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 4D는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 알부민의 수준을 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다.

[0195] 다음으로, 연구 2(도 3에 나타낸 바와 같음)에서 본 발명자들은 M281 mAb로 각각 AAVhu68 NAb 역가 1:40 및 1:80으로 2마리의 히말라야 원숭이를 처리한 다음 벡터를 정맥내로 투약하여 M281 mAb에 의한 NAb 감소가 정맥내 AAV 유전자 요법과 관련하여 유전자 형질도입에 대한 긍정적인 영향을 미치는지 여부를 테스트하였다. 이 연구에서, 제-5일, 제-4일 및 제-3일에 8 mg/kg M281의 3일 정맥내 주사 후 제0일에 TT2(3×10^{13}개 GC/kg)를 발현하는 AAVhu68 벡터를 정맥내 투여하였다. NAb가 1:5 미만인 1마리의 NHP 및 NAb가 1:40인 또 다른 NHP를 각각 NAb-음성 및 NAb-양성 대조군으로 사용하였으며, 이는 IV 벡터만 받았지만 M281 mAb 전처리를 받았다. NAb는 혈청 총 IgG 및 AAV-결합 항체와 함께 M281로 처리된 NHP에서 제0일에 감소되어 1:5에 도달하였다. 벡터 주사 시, 이들 동물에서 AAV 후 7일 후에 1:1280에 도달하는 NAb 역가의 강력한 증가가 있었다. 제7일에 1:2560을 나타낸 NAb-양성 대조군 원숭이보다 1-희석에서 더 낮았지만, 제7일에 1:160을 나타낸 NAb-음성 대조군 원숭이와 비교하면 훨씬 더 높았다. 제30일에 부검 후 심장, 간, 비장, 및 골격근에서 벡터 게놈 생체분포를 분석하였다. NAb 음성 원숭이와 비교하여 NAb 양성 대조군 원숭이의 심장, 간, 및 골격근에서 벡터 게놈 복제 수가 감소하였다. 이는 M281-처리 원숭이의 간과 골격근에서 개선되었다. 심장의 경우, 기준선에서 NAb가 1:40인 M281-처리 원숭이 중 하나에서 복제 수가 약간 개선되었다. 벡터 게놈은 항체-매개 면역 반응으로 인해 NAb-양성 원숭이의 비장에 축적되는 경향이 있다.

[0196] 도 5A 내지 도 5B는 M281 주입이 NHP에서 IgG와 함께 기존의 NAb 역가를 감소시켰음을 나타낸다(연구 2). 도 5A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 히말라야 원숭이 IgG(rhIgG)의 수준을 나타내며, 여기서 M281의 투여(제-5일, 제-4일 및 제-3일) 및 AAV의 투여(제0일)는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 5B는 제-5일의 백분율로 플로팅된 혈청 알부민의 수준을 나타내며, 여기서 M281 투여는 그래프에서 화살표로 표시되어 있다. 도 6A 내지 도 6B는 AAV-결합 항체 역가(연구 2)를 나타낸다. 도 6A는 연구 제-15일 내지 제0일 동안의 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타내며, 여기서 M281은 제-5일, 제-4일 및 제-3일에 투여되고 AAV는 제0일에 투여된다. 도 6B는 연구 제0일 내지 제30일 동안 AAVhu68-비-중화 결합 항체(BAb) 역가를 나타낸다.

[0197] AAVhu68-NAb 역가는 하기 표 4에 요약되어 있다.

표 4

	M281	BSL	제-5일	제-4일	제-3일	제0일	제7일	제14일	제21일	제30일
NHP3	-	<1:5				<1:5	1:160	1:640	1:640	1:640
NHP4	-	1:40				1:40	1:2560	1:1280	1:2560	1:1280
NHP5	+	1:40	1:20	1:20	<1:5	1:5	1:1280	1:1280	1:1280	1:1280
NHP6	+	1:80	1:40	1:40	1:20	1:5	1:1280	1:640	1:320	1:320

[0198]

[0199] 도 7A 내지 도 7E는 마이크로그램(μg) DNA당 게놈 복제수(GC)로 플로팅된, 연구 2에서 수확한 다양한 조직에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7A는 심장에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7B는 골격근에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7C는 간의 우엽에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7D는 간의 좌엽에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다. 도 7E는 비장에서의 벡터 게놈 생체분포를 나타낸다.

[0200] 또 다른 연구에서 본 발명자들은 FcRn 차단이 있거나 없는 NHP에서 AAV-TT3(테스트 이식유전자 3)의 IV 투여 후 형질도입 효능에 대한 기존 NAb의 효과를 테스트할 것이다. 간략하게, 등록된 동물을 기존 NAb의 평가된 수준 및 확인된 역가 수준을 기반으로 하여 두 그룹으로 나눈다. NAb(중화 결합 항체)의 혈청 수준, 기준선 바이오마커, 및 혈장, 심장, 근육 및 간에서의 이식유전자 발현을 연구의 판독값으로 측정한다. TT2 동일계내 혼성화는 M281로 처리된 원숭이의 간 및 심장에서 TT2 mRNA의 개선된 발현을 나타낼 것으로 예상된다.

[0201] 도 8A 및 도 8B는 연구 2에서 수확한 심장 및 간 조직에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내 혼성화 결과를 양성 면적비로 플로팅하여 나타낸다. 도 8A는 연구 2에서 수확한 간 조직(좌엽 및 우엽)에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내 혼성화 결과를 나타낸다. 도 8B는 연구 2에서 수확한 심장 조직(좌심실, 심실 및 중

격)에서 TT2 mRNA 발현 수준을 조사한 동일계내 혼성화의 결과를 나타낸다.

[0202] 실시예 3. 정맥내 전달을 위한 M281 항체 생성, 정제 및 제형.

[0203] 본 명세서에서 제공된 실시예는 면역글로불린 작제물의 시험관 내 생산을 기재한다.

[0204] M281-LC(경쇄) 및 M281-HC(중쇄)로 구성된 M281을 인코딩하는 핵산 분자를 표준 기법, 즉 ThermoFisher Life Technologies의 Gene Synthesis Services를 사용하여 얻는다. M281-LC 또는 M281-HC를 인코딩하는 추가의 핵산 서열은 생산 숙주 세포주에서 발현하기에 적합한 벡터 게놈을 보유하는 적합한 플라스미드로 클로닝된다. 벡터 게놈을 보유하는 플라스미드는 CMV 프로모터(서열번호 1의 뉴클레오타이드 47 내지 726), 하기 기재된 바와 같은 M281 작제물을 인코딩하는 핵산 서열, WRPE 요소(서열번호 1의 뉴클레오타이드 1514 내지 2111), 및 티미딘 키나제(TK) 폴리 A 신호(서열번호 1의 뉴클레오타이드 2115 내지 2386)로 구성된다:

[0205] (a) 서열번호 2의 M281-LC 단백질을 인코딩하는 M281-LC 핵산 서열(서열번호 1의 뉴클레오타이드 754 내지 1467), 및/또는

[0206] (b) 서열번호 4의 M281-HC 단백질을 인코딩하는 M281-HC 핵산 서열(서열번호 3의 뉴클레오타이드 754 내지 2154).

[0207] 항체 작제물은 적합한 플라스미드로 클로닝된 다음 숙주 세포에서 발현을 위해 사용되고, 생산 숙주 세포주로부터 정제된 다음 정맥내 전달을 위해 제형화된다.

[0208] 실시예 4. 기존 중화 항체를 이용한 비-인간 영장류의 항-FcRN 항체 처리

[0209] 이 연구에서, 본 발명자들은 대체 M281 요법을 사용하여 NHP에서 기존 AAV8 NAb에 대한 M281의 효과를 테스트하였다. NHP는 이전에 2015년에 정맥내 투여에 의해 AAV8을 투여받았다. 역사적인 AAV8 대조군을 참조용으로 사용하였다. 기준선 AAV8 NAb 수준은 NHP 연구 대상체의 경우 1:40으로, 역사적 대조군의 경우 1:5 미만으로 측정되었다. M281은 최대 13 mg/kg의 용량으로 투여되었다. 도 9는 1×10^{13}개 GC/kg의 용량으로 AAV8.TT3(테스트 이식 유전자 3)의 재투여 후 기존 FcRn NAb의 역가를 차단하는 효과를 평가하기 위한 연구 설계를 나타낸다. 제14일에 TT3 발현의 혈청 수준을 측정하였다. 제14일에 NHP 연구 대상체에 대해 부검을 수행하였고, 역사적 대조군 대상체에 대해 간 생검을 수행하였다. 수집된 조직을 TT3 발현 분석(ISH/IHC)에 사용하였다. 연구 대상체로부터 수집한 조직 및 샘플을 또한 TT3 발현 및 벡터 생체분포의 혈청 수준에 대해 분석하였다.

[0210] 도 10A 및 도 10B는 M281 투여가 NHP(이전에 AAV8.TT3을 투여받음)에서 IgG와 함께 기존 NAb 역가(AAV8)를 감소시킨 AAV8.TT3 재투여 연구의 결과를 나타낸다. 도 10A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 히말라야 원숭이 IgG(rhIgG)의 혈청 수준을 나타내며, 여기서 NHP에게 제-5일, 제-4일, 제-3일 및 제-2일에 M281을 투여하고 제0일에 AAV8.TT3을 투여하였다. 도 10B는 mg/mℓ로 플로팅된 M281의 측정된 혈청 수준을 나타낸다.

[0211] 하기 표 5는 상기에서 조사한 바와 같은 AAV8 NAb 수준의 요약을 나타낸다. 하기 표 6은 AAV8 결합 ELISA 분석 결과의 요약을 나타낸다.

표 5

[0212]

동물 ID	연구일	HEK293 세포 중 AAV8 NAb				
		복제 1	복제 2	복제 3	복제 4	RLU/s의 평균
RA1476	스크리닝전	40	N/A	N/A	N/A	40
	기준선	80	40	40	40	80
	제-5일	40	40	40	40	40
	제-4일	80	40	40	40	40
	제-3일	40	40	40	20	40
	제-2일	40	20	20	40	40
	제0일	10	10	10	10	10

표 6

동물 ID	연구일	AAV8 결합 Elisa	
		복제 1	복제 2
RA1476	스크리닝전	N/A	N/A
	기준선	400	400
	제-5일	400	400
	제-4일	200	200
	제-3일	200	200
	제-2일	200	200
	제0일	100	100

[0213]

[0214] 도 11A 및 도 11B는 M281 투여가 자연 감염에 의해 기존 NAb+(1:20)를 갖는 NHP에서 IgG와 함께 기존 NAb 역가(AAV8)를 감소시킨 또 다른 AAV8.TT3 연구의 결과를 나타낸다. 도 11A는 제-5일의 백분율로 플로팅된 총 히말라야 원숭이 IgG 수준(rhIgG)을 나타내며, 여기서 NHP에게 제-5일, 제-4일, 제-3일 및 제-2일에 M281을 투여하고 제0일에 AAV8.TT3을 투여하였다. 도 11B는 mg/mℓ로 플로팅되고 ELISA를 사용하여 측정된 혈청 M281 수준(hIgG)을 나타낸다. 표 7은 상기 조사한 바와 같은 AAV8 NAb 수준의 요약을 나타낸다. 하기 표 8은 AAV8 결합 ELISA 분석 결과의 요약을 나타낸다.

표 7

동물 ID	연구일	HEK293 세포 중 AAV8 NAb				
		복제 1	복제 2	복제 3	복제 4	RLU/s의 평균
181262	스크리닝전	10	20	N/A	N/A	20
	기준선	10	20	20	10	20
	제-5일	10	10	10	10	10
	제-4일	5	10	5	5	5
	제-3일	10	10	10	10	10
	제-2일	<5	<5	<5	<5	<5
	제0일					<5

[0215]

표 8

동물 ID	연구일	AAV8 결합 Elisa	
		복제 1	복제 2
181262	스크리닝전	N/A	N/A
	기준선	N/A	N/A
	제-5일	20	20
	제-4일	20	20
	제-3일	10	10
	제-2일	<10	<10

[0216]

[0217] 표(서열 목록 자유 텍스트)

[0218] 숫자 식별자 <223> 하의 자유 텍스트를 포함하는 서열에 대한 하기 정보가 제공된다.

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
1	<220> <223> M281-LC expression plasmid <220> <221> promoter <222> (47)..(726) <223> CMV Promoter <220> <221> CDS <222> (754)..(1467) <223> M281_LC <220> <221> misc_feature <222> (1514)..(2111) <223> WRPE <220> <221> misc_feature <222> (2115)..(2386) <223> TK pA signal <220>

[0219]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<221> promoter <222> (2855)..(3224) <223> SV40 early promoter <220> <221> misc_feature <222> (3260)..(4054) <223> Neo-R <220> <221> polyA_signal <222> (4230)..(4360) <223> SV40 pA signal <220> <221> rep_origin <222> (4743)..(5416) <223> pUC ori <220> <221> misc_feature <222> (5561)..(6421) <223> Amp-R <220> <221> promoter <222> (6422)..(6520) <223> bla promoter
2	<220>

[0220]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<223> Synthetic Construct
3	<220> <223> M281-HC expression plasmid <220> <221> promoter <222> (47)..(726) <223> CMV promoter <220> <221> CDS <222> (754)..(2154) <223> M281_HC <220> <221> misc_feature <222> (2201)..(2798) <223> WRPE <220> <221> misc_feature <222> (2802)..(3073) <223> TK pA signal <220> <221> promoter <222> (3542)..(3911) <223> SV40 ealry promoter

[0221]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<220> <221> misc_feature <222> (3947)..(4741) <223> Neo-R <220> <221> polyA_signal <222> (4917)..(5047) <223> SV40 pA signal <220> <221> rep_origin <222> (5430)..(6103) <223> pUC ori <220> <221> misc_feature <222> (6248)..(7108) <223> Amp-R <220> <221> promoter <222> (7109)..(7207) <223> bla promoter
4	<220> <223> Synthetic Construct
5	<220> <223> M281_LC nucleic acid sequence

[0222]

[0223]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
6	<220> <223> M281_HC nucleic acid sequence
7	<220> <223> M281_LC amino acid sequence
8	<220> <223> M281_HC amino acid sequence
9	<220> <223> CDR-L1 nucleic acid sequence
10	<220> <223> CDR-L1 amino acid sequence
11	<220> <223> CDR-L2 nucleic acid sequence
12	<220> <223> CDR-L2 amino acid sequence
13	<220> <223> CDR-L3 nucleic acid sequence
14	<220> <223> CDR-L3 amino acid sequence
15	<220> <223> CDR-H1 nucleic acid sequence
16	<220> <223> CDR-H1 amino acid sequence
17	<220> <223> CDR-H2 nucleic acid sequence
18	<220> <223> CDR-H2 amino acid sequence
19	<220> <223> CDR-H3 nucleic acid sequence
20	<220>

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<223> CDR-H3 amino acid sequence
21	<220> <223> CDR-H1variant 1
22	<220> <223> CDR-H1 variant 2
23	<220> <223> CDR-H2 variant 1
24	<220> <223> CDR-H2 variant 2
25	<220> <223> CDR-H2 variant 3
26	<220> <223> Z_FcRn-2
27	<220> <223> Z_FcRn-4
28	<220> <223> Z_FcRn-16
29	<220> <223> SYN746
30	<220> <223> SYN1327
31	<220> <223> SYN1327-modified <220> <221> MOD_RES <222> (3)..(3) <223> Pen

[0224]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<220> <221> MOD_RES <222> (9)..(9) <223> Sar <220> <221> MOD_RES <222> (10)..(10) <223> NMeLeu
32	<220> <223> 98420-1 amino acid sequence
33	<220> <223> 98420-2
34	<220> <223> 98420-3
35	<220> <223> 98420-4
36	<220> <223> 98420-5
37	<220> <223> DX2504LC
38	<220> <223> DX2504HC
39	<220> <223> DX2507LC
40	<220> <223> DX2507HC
41	<220>

[0225]

서열번호 (자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
	<223> DX-CDR-L3
42	<220> <223> DX-CDR-L2
43	<220> <223> DX-CDR-H1
44	<220> <223> DX-CDR-H2
45	<220> <223> hFcRN amino acid sequence

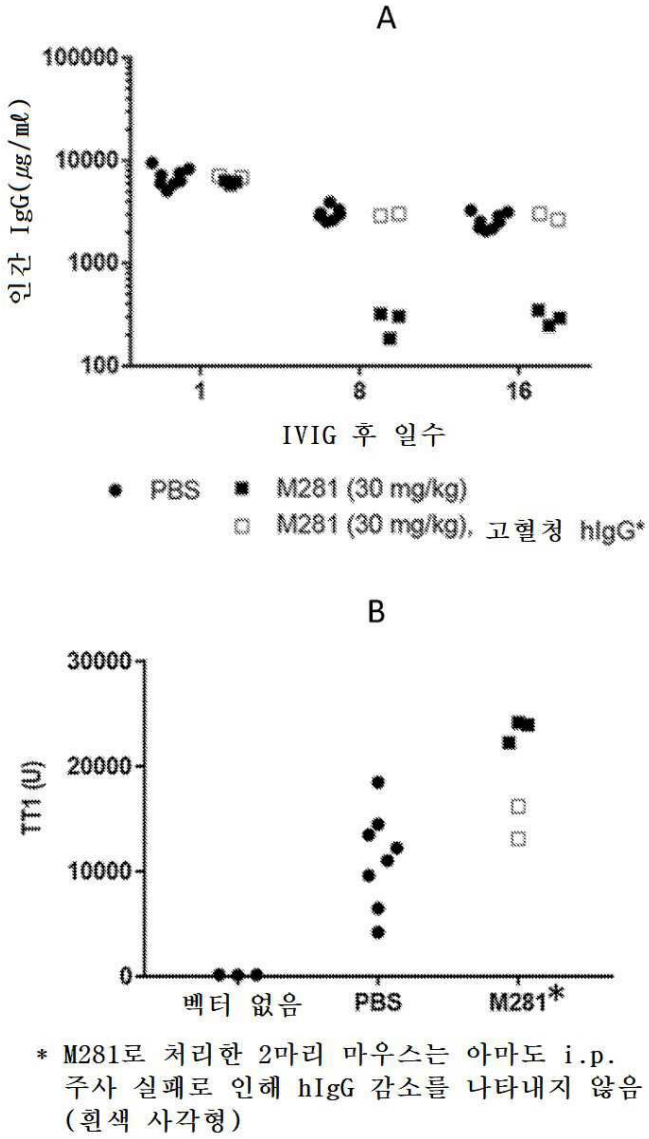
[0226]

[0227] 본 명세서에 인용된 모든 간행물은 본 명세서에 전문이 참조에 의해 원용된다. 2020년 6월 17일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/040,381호, 2021년 1월 11일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/135,998호, 및 2021년 2월 22일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/152,085호는 본 명세서에 참조에 의해 원용된다. "UPN-20-

9394PCT_ST25"로 표시된 첨부된 서열목록은 참조에 의해 원용된다. 본 발명은 특정 실시형태에 관련하여 기재되었지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 이와 같은 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

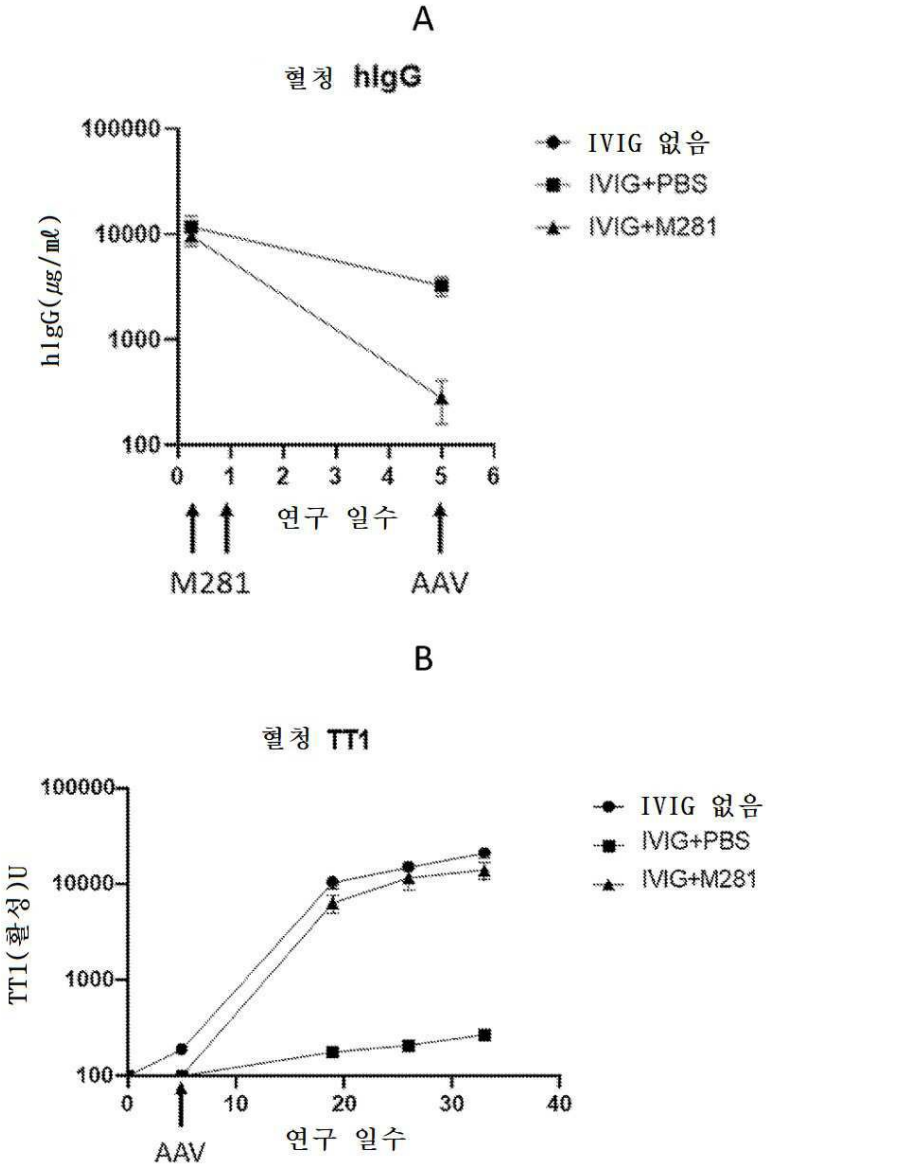
도면

도면1

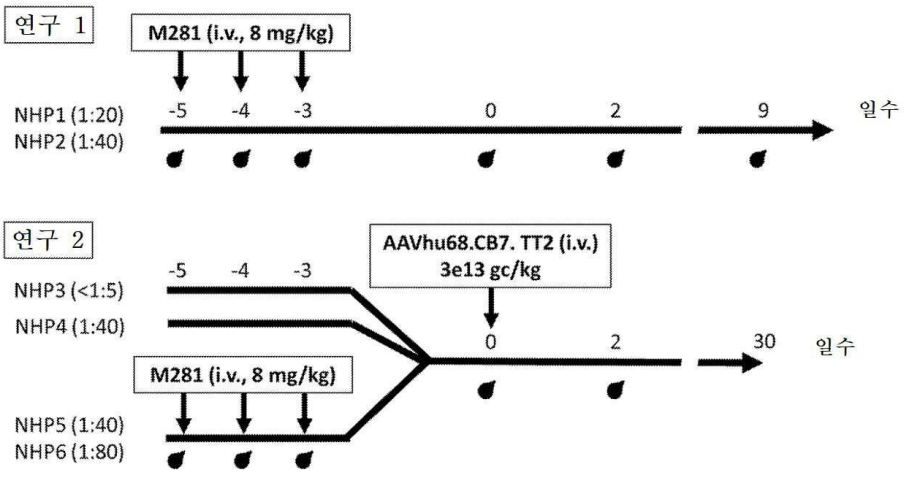


* M281로 처리한 2마리 마우스는 아마도 i.p. 주사 실패로 인해 hIgG 감소를 나타내지 않음 (흰색 사각형)

도면2

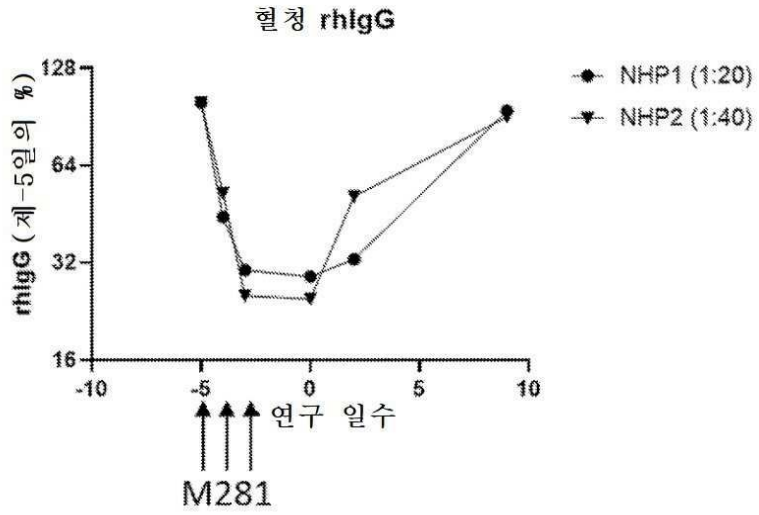

A
혈청 hIgG
100000
10000
1000
100
hIgG(μg/mℓ)
0 1 2 3 4 5 6
연구 일수
M281
AAV
IVIG 없음
IVIG+PBS
IVIG+M281
B
혈청 TT1
100000
10000
1000
100
TT1(활성)U
0 10 20 30 40
연구 일수
AAV
IVIG 없음
IVIG+PBS
IVIG+M281

도면3

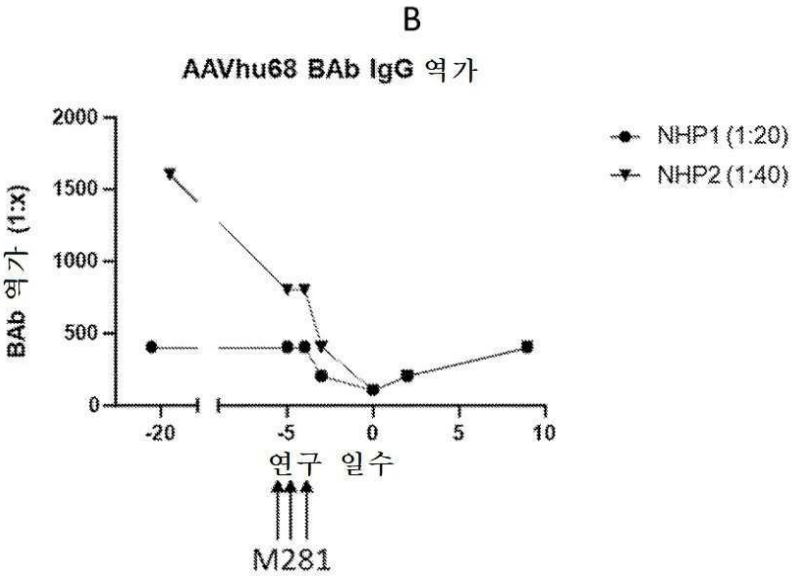

연구 1
M281 (i.v., 8 mg/kg)
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
-5 -4 -3 0 2 9
일수
연구 2
AAVhu68.CB7. TT2 (i.v.)
3e13 gc/kg
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
-5 -4 -3
0 2 30
일수
M281 (i.v., 8 mg/kg)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

도면4ab

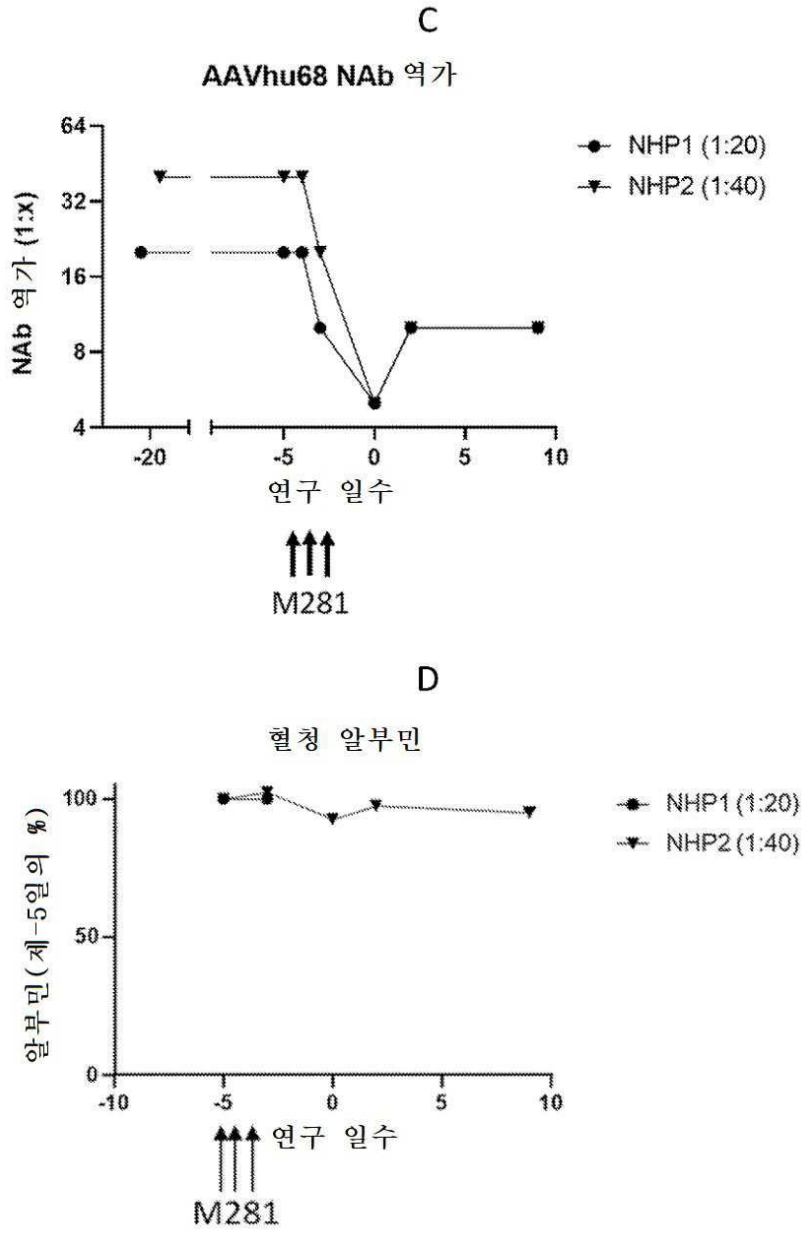
A


혈청 rhIgG
rhIgG (제-5일의 %)
128
64
32
16
-10
-5
0
5
10
연구 일수
M281
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)

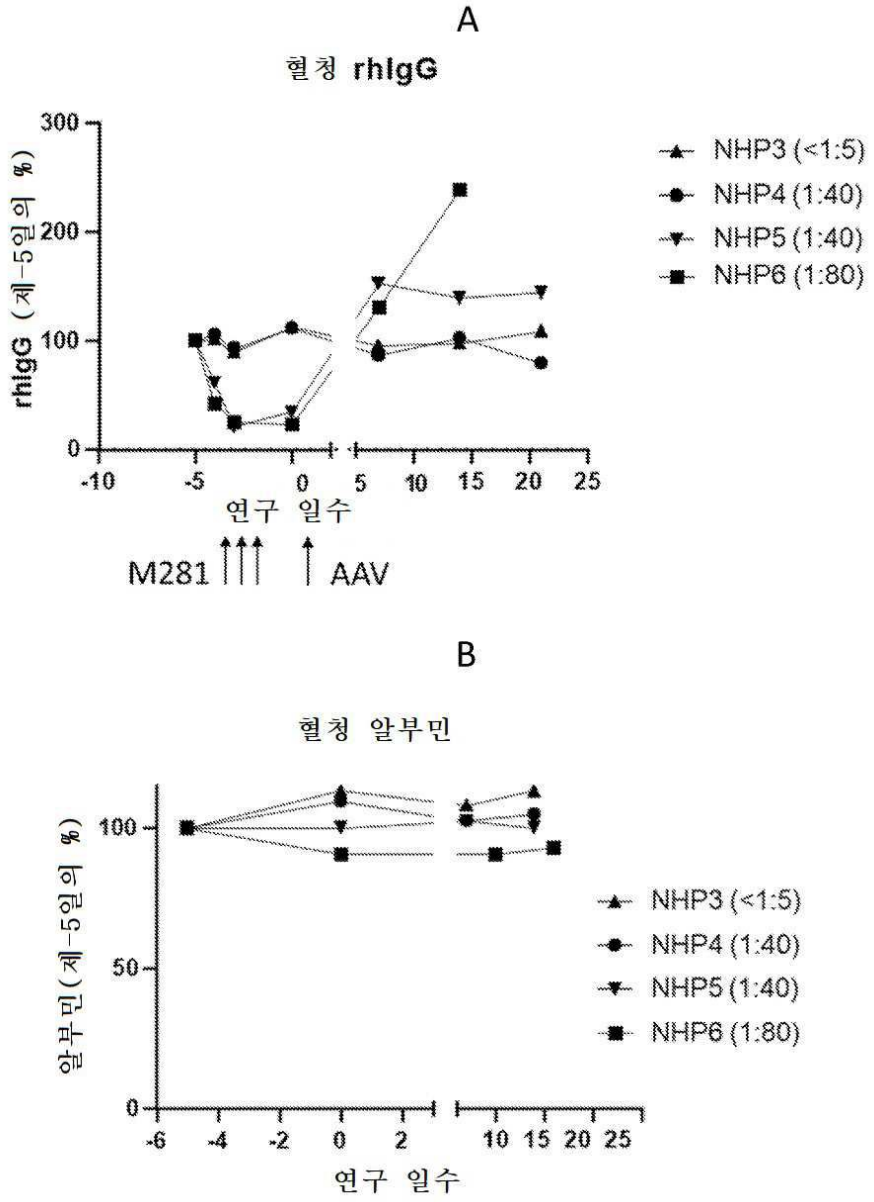
B


AAVhu68 BAb IgG 역가
BAb 역가 (1:x)
2000
1500
1000
500
0
-20
-5
0
5
10
연구 일수
M281
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)

도면4cd

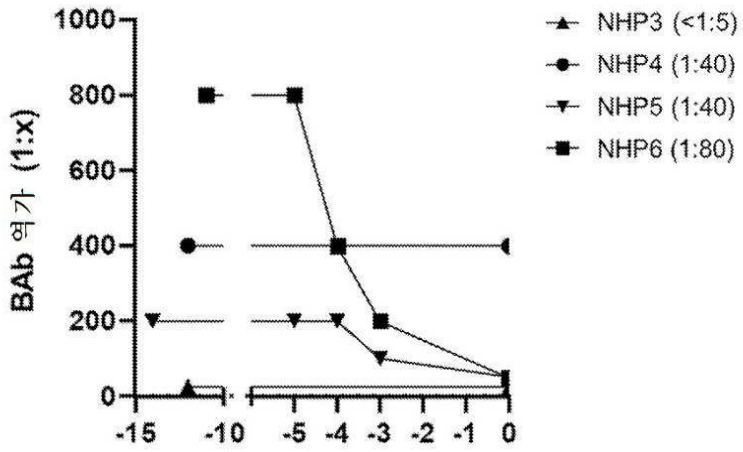

C
AAVhu68 NAb 역가
NAb 역가 (1:x)
64
32
16
8
4
-20
-5
0
5
10
연구 일수
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
M281
D
혈청 알부민
알부민 (제-5일의 %)
100
50
0
-10
-5
0
5
10
연구 일수
NHP1 (1:20)
NHP2 (1:40)
M281

도면5

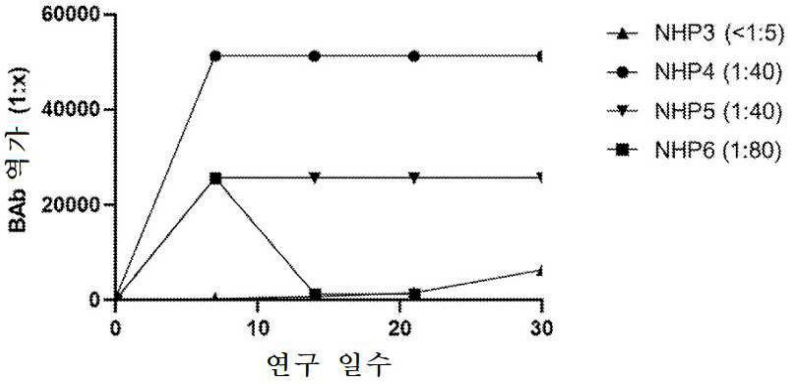

A
혈청 rhIgG
rhIgG (제-5일의 %)
300
200
100
0
-10
-5
0
5
10
15
20
25
연구 일수
M281
AAV
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)
B
혈청 알부민
알부민 (제-5일의 %)
100
50
0
-6
-4
-2
0
2
10
15
20
25
연구 일수
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

도면6

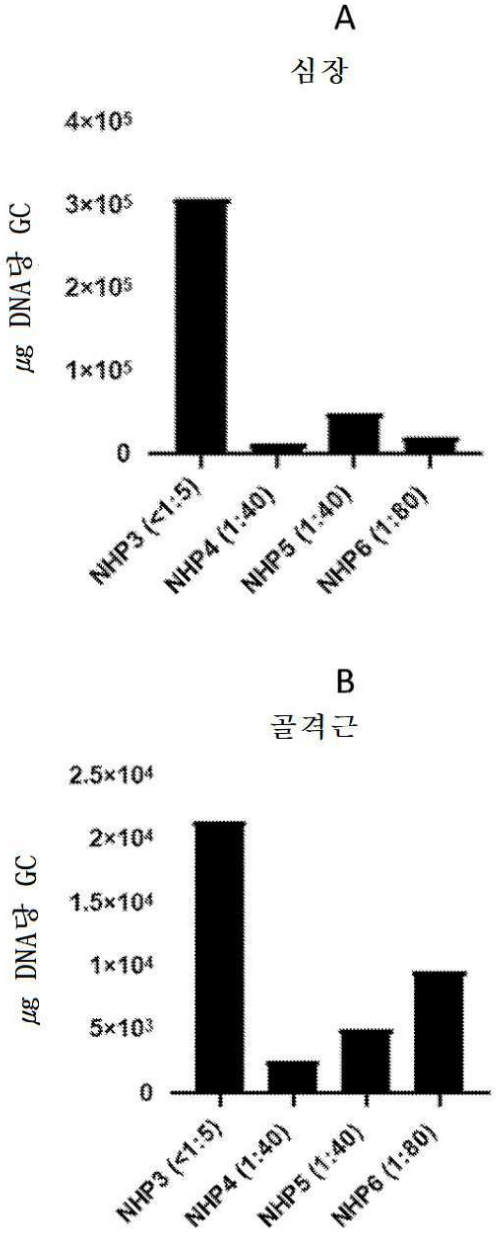
A


1000
800
600
400
200
0
BAb 역가 (1:x)
-15
-10
-5
-4
-3
-2
-1
0
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

B


60000
40000
20000
0
BAb 역가 (1:x)
0
10
20
30
연구 일수
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

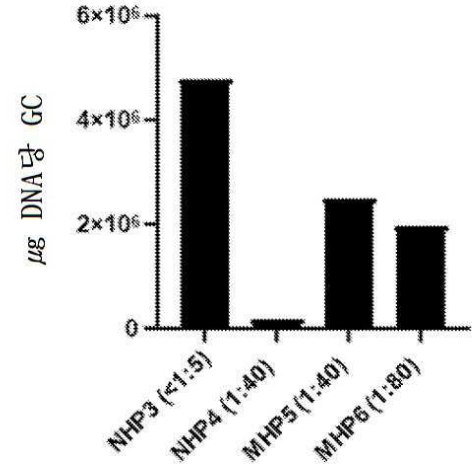
도면7ab


A
심장
4×10⁵
3×10⁵
2×10⁵
1×10⁵
0
μg DNA당 GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)
B
골격근
2.5×10⁴
2×10⁴
1.5×10⁴
1×10⁴
5×10³
0
μg DNA당 GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
NHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

도면7cd

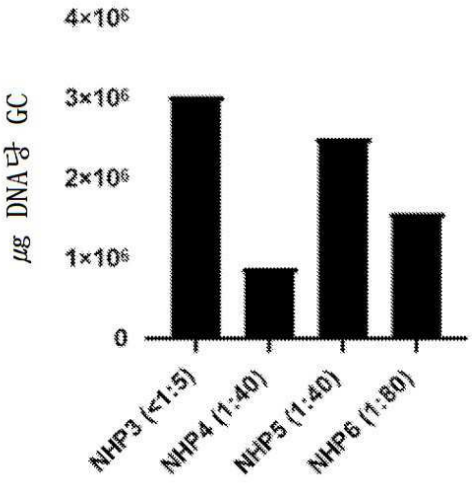
C

간(우엽)

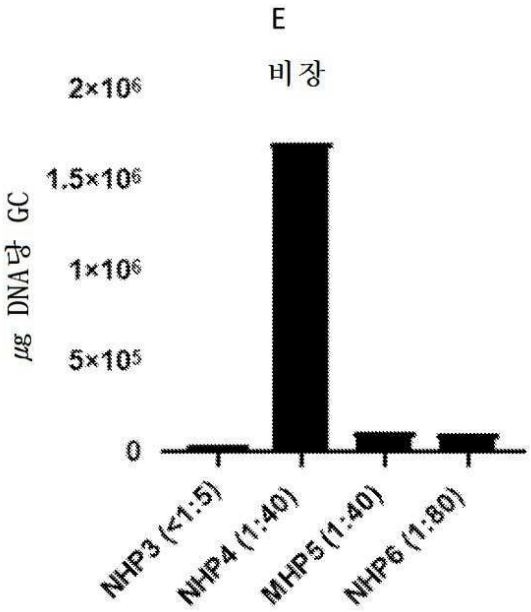


D

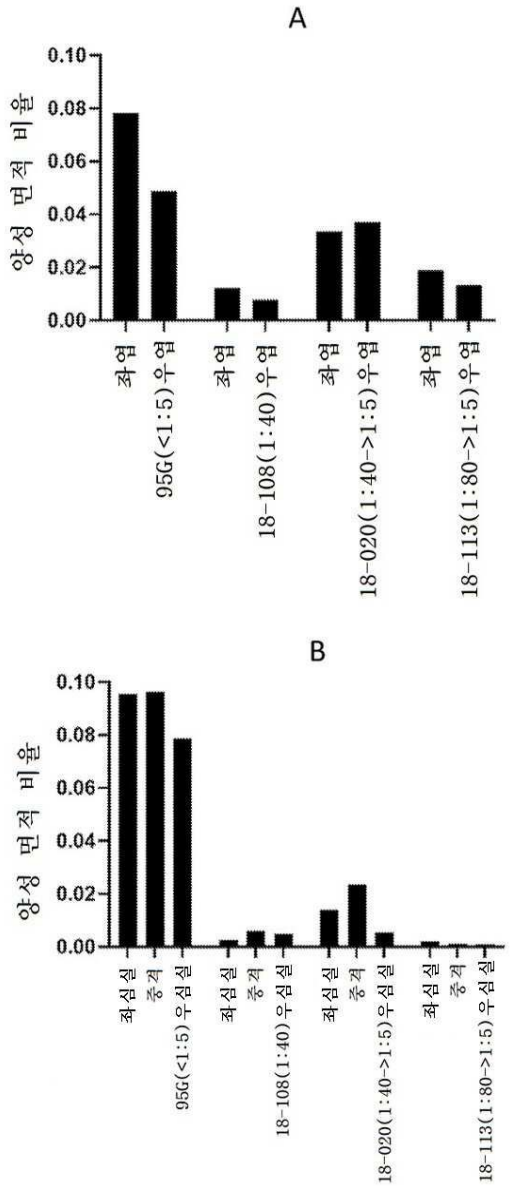
간(좌엽)



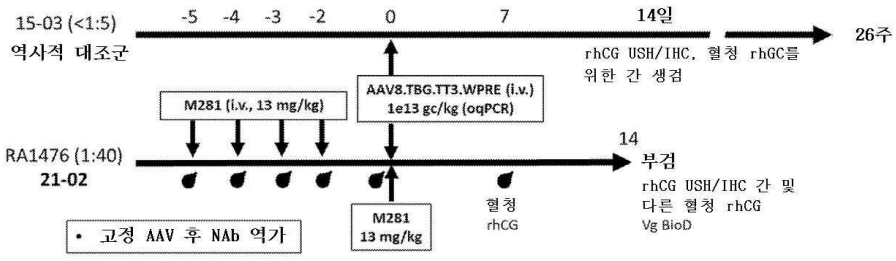
도면7e


E
비장
2×10⁶
1.5×10⁶
1×10⁶
5×10⁵
0
μg DNA당 GC
NHP3 (<1:5)
NHP4 (1:40)
MHP5 (1:40)
NHP6 (1:80)

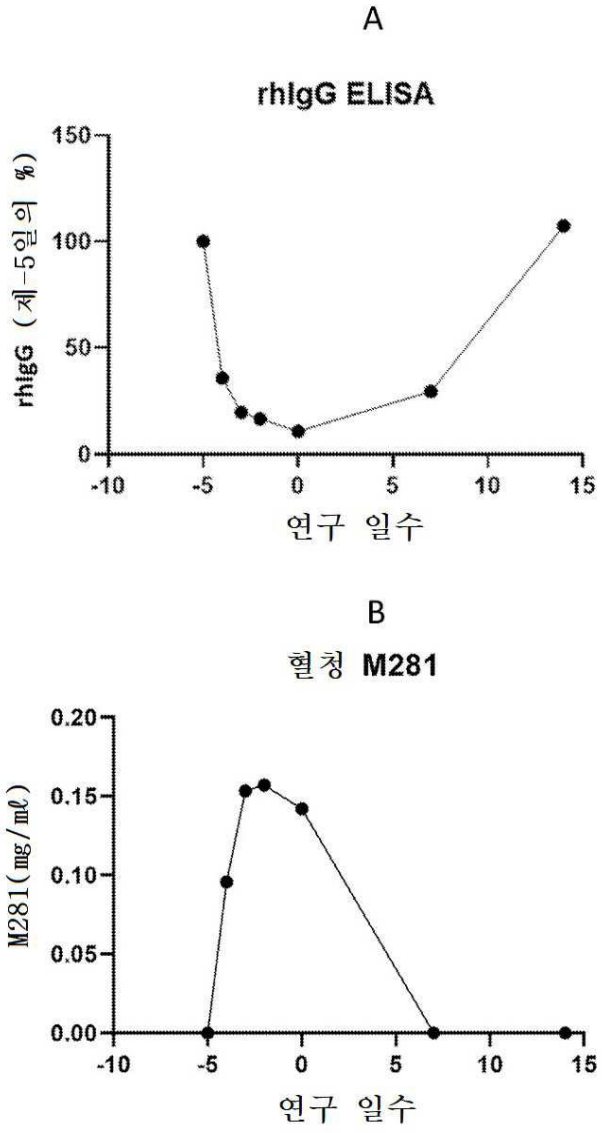
도면8


A
양성 면적 비율
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
좌엽
95G(<1:5)우엽
좌엽
18-108(1:40)우엽
좌엽
18-020(1:40->1:5)우엽
좌엽
18-113(1:80->1:5)우엽
B
양성 면적 비율
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
좌심실
중격
95G(<1:5)우심실
좌심실
중격
18-108(1:40)우심실
좌심실
중격
18-020(1:40->1:5)우심실
좌심실
중격
18-113(1:80->1:5)우심실

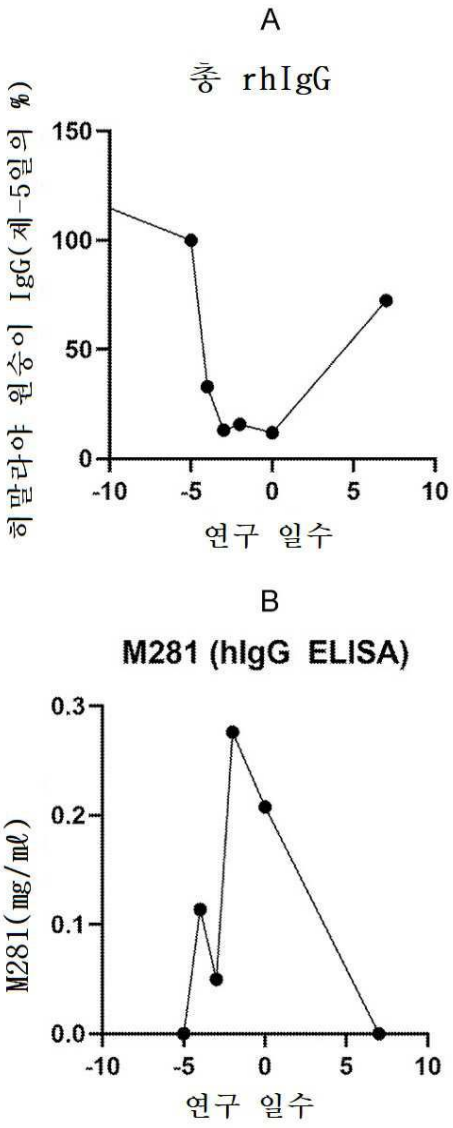
도면9


15-03 (<1:5)
역사적 대조군
-5 -4 -3 -2 0 7 14일
26주
rhCG USH/IHC, 혈청 rhGC를
위한 간 생검
M281 (i.v., 13 mg/kg)
AAV8.TBG.TT3.WPRE (i.v.)
1e13 gc/kg (oqPCR)
RA1476 (1:40)
21-02
14
부검
rhCG USH/IHC 간 및
다른 혈청 rhCG
Vg BioD
혈청
rhCG
M281
13 mg/kg
• 고정 AAV 후 NAb 역가

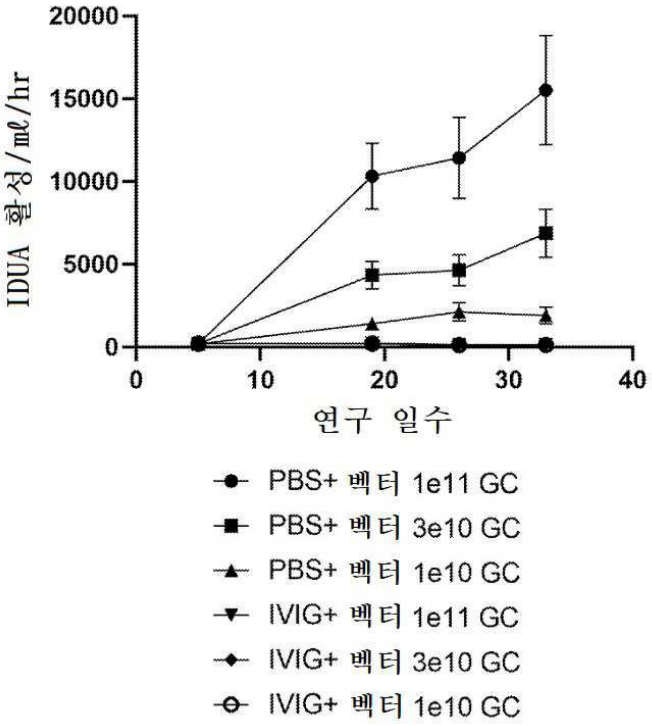
도면10


A
rhIgG ELISA
rhIgG (제-5일의 %)
150
100
50
0
-10
-5
0
5
10
15
연구 일수
B
혈청 M281
M281(mg/mℓ)
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
-10
-5
0
5
10
15
연구 일수

도면11


A
총 rhIgG
허말라야 원숭이 IgG(제-5일의 %)
150
100
50
0
-10
-5
0
5
10
연구 일수
B
M281 (hIgG ELISA)
M281(mg/mℓ)
0.3
0.2
0.1
0.0
-10
-5
0
5
10
연구 일수

도면12



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trutees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR TREATMENT OF GENE THERAPY PATIENTS

<130> UPN-20-9394.PCT

<140> PCT/US2021/037575

<141> 2021-06-16

<150> US 63/040,381

<151> 2020-06-17

<150> US 63/152,085

<151> 2021-02-22

<150> US 63/135,998

<151> 2021-01-11

<160> 45

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6742

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281-LC expression plasmid

<220><221

> promoter

<222> (47)..(726)

<223> CMV Promoter

<220><221> CDS

<222> (754)..(1467)

<223> M281_LC

<220><221> misc_feature

<222> (1514)..(2111)

<223> WRPE

<220><221> misc_feature

<222> (2115)..(2386)

<223> TK pA signal

<220><221> promoter

<222> (2855)..(3224)

<223> SV40 early promoter

<220><221> misc_feature

<222> (3260)..(4054)

<223> Neo-R

<220><221> polyA_signal

<222> (4230)..(4360)

<223> SV40 pA signal

<220><221> rep_origin

<222> (4743)..(5416)

<223> pUC ori

<220><221> misc_feature

<222> (5561)..(6421)

<223> Amp-R

<220><221> promoter

<222> (6422)..(6520)

<223> bla promoter

<400> 1

gttaggcgtt ttgcgctgct tcgcgatgta cgggccagat atacgcgttg acattgatta 60

ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag 120

ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc 180

ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga 240

cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat 300

atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc 360

cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 420

attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca 480

cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcaccaaaat 540

caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg 600

cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca gatcgcctgg 660

agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgg 720

actctagagg atcgaaccct tggatccgcc acc atg gaa acc gat aca ctg ctg 774
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu
1 5

ctg tgg gtg ctg ttg ctc tgg gtg cca gga tct aca ggc cag tct gct 822
Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Gln Ser Ala
10 15 20

ctg act cag cct gcc tct gtt tct ggc tcc cct ggc cag tct atc acc 870

Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr
25 30 35

atc tct tgt acc ggc acc ggc tcc gac gtg ggc tct tat aac ctg gtg 918
Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val
40 45 50 55

tcc tgg tat cag cag cac ccc gga aag gcc cct aag ctg atg atc tac 966
Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr
60 65 70

ggc gac tct gaa cgg cct tcc ggc gtg tcc aat aga ttc tcc ggc tcc 1014
Gly Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser
75 80 85

aag tcc ggc aat acc gcc tct ctg aca atc agt gga ctg cag gcc gag 1062

```
Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu
        90                  95                  100

gac gag gcc gac tac tac tgt tct tct tac gcc ggc tcc ggc atc tac      1110
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr
    105                 110                 115
gtg ttc ggc acc gga aca aaa gtg acc gtg ctg gga cag cct aag gcc      1158
Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala
120                 125                 130                 135
gct cct tct gtg acc ctg ttt cct cca tcc tcc gag gaa ctg cag gct      1206

Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala
                140                 145                 150
aac aag gct acc ctc gtg tgc ctg atc tcc gat ttt tac cct ggc gct      1254
Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala
            155                 160                 165
gtg acc gtg gcc tgg aag gct gat agt tct cct gtg aag gcc ggc gtg      1302
Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly Val

        170                 175                 180
gaa acc acc aca cct tcc aag cag tcc aac aac aaa tac gcc gcc tcc      1350
Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser
    185                 190                 195
tcc tac ctg tct ctg acc cct gaa cag tgg aag tcc cac aag tcc tac      1398
Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr
200                 205                 210                 215

agc tgc caa gtg acc cat gag ggc tcc acc gtg gaa aag aca gtg gcc      1446
Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala
                220                 225                 230
cct acc gag tgc tcc tga tga ctcgagaagg gttcgatccc taccggttag          1497
Pro Thr Glu Cys Ser
            235
```

taatgagttt gatatctcga caatcaacct ctggattaca aaatttgtga aagattgact 1557

ggtattctta actatgttgc tccttttacg ctatgtggat acgctgcttt aatgcctttg 1617

tatcatgcta ttgcttcccg tatggctttc attttctcct ccttgtataa atcctggttg 1677

ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac gtggcgtggt gtgcactgtg 1737

tttgctgacg caacccccac tggttggggc attgccacca cctgtcagct cctttccggg 1797

actttcgctt tccccctccc tattgccacg gcggaactca tcgccgcctg ccttgcccgc 1857

tgctggacag gggctcggct gttgggcact gacaattccg tggtgttgtc ggggaagctg 1917

acgtcctttc catggctgct cgcctgtgtt gccacctgga ttctgcgcgg gacgtccttc 1977

tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg gaccttcctt cccgcggcct gctgccggct 2037

ctgcggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga gtcggatctc cctttgggcc 2097

gcctccccgc ctggaacggg ggaggctaac tgaaacacgg aaggagacaa taccggaagg 2157

aacccgcgct atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg cacgggtgtt gggtcgtttg 2217

ttcataaacg cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt cgatacccca ccgagacccc 2277

attggggcca atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc ccacccccca agttcgggtg 2337

aaggcccagg gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaggccc tgccatagca gatctgcgca 2397

gctggggctc taggggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 2457

tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc cctagcgccc gctcctttcg 2517

ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc ccgtcaagct ctaaatcggg 2577

ggctcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 2637

agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cctttgacgt 2697

tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta 2757

tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa 2817

atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg tggaatgtgt gtcagttagg 2877

gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg caaagcatgc atctcaatta 2937

gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca ggcagaagta tgcaaagcat 2997

gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac 3057

tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccca tggctgacta attttttta tttatgcaga 3117

ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg 3177

cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc ttgtatatcc attttcggat ctgatcaaga 3237

gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga ttgcacgcag gttctccggc 3297

cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa cagacaatcg gctgctctga 3357

tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt ctttttgtca agaccgacct 3417

gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg ctatcgtggc tggccacgac 3477

gggcgttcct tgcgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa gcgggaaggg actggctgct 3537

attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcatctcac cttgctcctg ccgagaaagt 3597

atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct gcatacgctt gatccggcta cctgcccatt 3657

cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact cggatggaag ccggtcttgt 3717

cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg ccagccgaac tgttcgccag 3777

gctcaaggcg cgcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg acccatggcg atgcctgctt 3837

gccgaatatc atggtggaaa atggccgctt ttctggattc atcgactgtg gccggctggg 3897

tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctacccgt gatattgctg aagagcttgg 3957

cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc gccgctcccg attcgcagcg 4017

catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt cttctgagcg ggactctggg gttcgcgaaa 4077

tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat cacgagattt cgattccacc gccgccttct 4137

atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg ctggatgatc ctccagcgcg 4197

gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt tattgcagct tataatggtt 4257

acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttca ctgcattcta 4317

gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt ctgtataccg tcgacctcta 4377

gctagagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt gtgaaattgt tatccgctca 4437

caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa agcctggggt gcctaatgag 4497

tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc tttccagtcg ggaaacctgt 4557

cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag aggcggtttg cgtattgggc 4617

gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt cgttcggctg cggcgagcgg 4677

tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga atcaggggat aacgcaggaa 4737

agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg taaaaaggcc gcgttgctgg 4797

cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa aaatcgacgc tcaagtcaga 4857

ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt tccccctgga agctccctcg 4917

tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct gtccgccttt ctcccttcgg 4977

gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct cagttcggtg taggtcgttc 5037

gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc cgaccgctgc gccttatccg 5097

gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt atcgccactg gcagcagcca 5157

ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc tacagagttc ttgaagtggt 5217

ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat ctgcgctctg ctgaagccag 5277

ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa acaaaccacc gctggtagcg 5337

gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa aaaaggatct caagaagatc 5397

ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga aaactcacgt taagggattt 5457

tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct tttaaattaa aaatgaagtt 5517

ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga cagttaccaa tgcttaatca 5577

gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc catagttgcc tgactccccg 5637

tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg ccccagtgct gcaatgatac 5697

cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat aaaccagcca gccggaaggg 5757

ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat ccagtctatt aattgttgcc 5817

gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg caacgttgtt gccattgcta 5877

caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc attcagctcc ggttcccaac 5937

gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa agcggttagc tccttcggtc 5997

ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc actcatggtt atggcagcac 6057

tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt ttctgtgact ggtgagtact 6117

caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag ttgctcttgc ccggcgtcaa 6177

tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt gctcatcatt ggaaaacgtt 6237

cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag atccagttcg atgtaaccca 6297

ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac cagcgtttct gggtgagcaa 6357

aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc gacacggaaa tgttgaatac 6417

tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca gggttattgt ctcatgagcg 6477

gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg ggttccgcgc acatttcccc 6537

gaaaagtgcc acctgacgtc gacggatcgg gagatctccc gatcccctat ggtcgactct 6597

cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat ctgctccctg cttgtgtgtt 6657

ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca acaaggcaag gcttgaccga 6717

caattgcatg aagaatctgc ttagg 6742

<210> 2

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp
35 40 45

Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr
115 120 125

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
165 170 175

Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser
180 185 190

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln
195 200 205

Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser
210 215 220

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

225 230 235

<210> 3

<211> 7429

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281-HC expression plasmid

<220><221> promoter

<222> (47)..(726)

<223> CMV promoter

<220><221> CDS

<222> (754)..(2154)

<223> M281_HC

<220><221> misc_feature

<222> (2201)..(2798)

<223> WRPE

<220><221> misc_feature

<222> (2802)..(3073)

<223> TK pA signal

<220><221> promoter

<222> (3542)..(3911)

<223> SV40 ealry promoter

<220><221> misc_feature

<222> (3947)..(4741)

<223> Neo-R

<220><221> polyA_signal

<222> (4917)..(5047)

<223> SV40 pA signal

<220><221> rep_origin

<222> (5430)..(6103)

<223> pUC ori

<220><221> misc_feature

<222> (6248)..(7108)

<223> Amp-R

<220><221> promoter

<222> (7109)..(7207)

<223> bla promoter

<400> 3

gttaggcgtt ttgcgctgct tcgcgatgta cgggccagat atacgcgttg acattgatta 60

ttgactagtt attaatagta atcaattacg gggtcattag ttcatagccc atatatggag 120

ttccgcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct gaccgcccaa cgacccccgc 180

ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga 240

cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat 300

atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc 360

cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 420

attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca 480

cggggatttc caagtctcca ccccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcaccaaaat 540

caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaat gggcggtagg 600

cgtgtacggt gggaggtcta tataagcaga gctcgtttag tgaaccgtca gatcgcctgg 660

agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagacacc gggaccgatc cagcctccgg 720

actctagagg atcgaaccct tggatccgcc acc atg gaa acc gat aca ctg ctg 774
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu
1 5

ctg tgg gtg ctg ttg ctc tgg gtt cca gga tct aca ggc gag gtg cag 822
Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln
10 15 20

ctg ttg gaa tct ggc gga gga ttg gtt cag cct ggc ggc tct ctg aga 870
Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg
25 30 35

ctg tct tgt gct gcc tct ggc ttc acc ttc tct acc tac gct atg ggc 918
Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly
40 45 50 55

tgg gtc cga cag gct cct gga aaa gga ctg gaa tgg gtg tcc tct atc 966
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile
60 65 70

ggc gcc tct ggc agc cag acc aga tac gct gat tcc gtg aag ggc aga 1014
Gly Ala Ser Gly Ser Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg

75 80 85

ttc acc atc agc cgg gac aac tcc aag aac acc ctg tac ctg cag atg 1062
Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met
90 95 100

aac tcc ctg aga gcc gag gac acc gcc gtg tac tat tgt gct aga ctg 1110
Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu
105 110 115

gcc atc ggc gac tct tat tgg ggc cag gga aca atg gtc acc gtg tcc 1158
Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
120 125 130 135

tct gct tcc acc aag gga cct tcc gtg ttt cct ctg gct cct tcc agc 1206
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
140 145 150

aag tct acc tct ggt gga acc gct gct ctg ggc tgc ctg gtc aag gat 1254
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
155 160 165

tac ttt cct gag cct gtg acc gtg tct tgg aac tcc ggt gct ctg aca 1302
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
170 175 180

tcc ggc gtg cac aca ttt cca gct gtg ctg cag tcc tcc ggc ctg tac 1350
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

185 190 195

tct ctg tcc tct gtc gtg acc gtg cct tct agc tct ctg ggc acc cag 1398
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
200 205 210 215

acc tac atc tgc aac gtg aac cac aag cct tcc aac acc aag gtg gac 1446
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp

220 225 230

aag aag gtg gaa ccc aag tcc tgc gac aag acc cac acc tgt cct cca 1494
Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
235 240 245
tgt cct gct cca gaa ctg ctc ggc gga ccc tct gtg ttc ctg ttt cca 1542
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
250 255 260
cct aag cct aag gac acc ctg atg atc tct cgg acc cct gaa gtg acc 1590

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
265 270 275
tgc gtg gtg gtg gat gtg tct cac gag gac cca gaa gtg aag ttc aat 1638
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
280 285 290 295
tgg tac gtg gac ggc gtg gaa gtg cac aac gcc aag acc aag cct aga 1686
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg

300 305 310
gag gaa cag tac gcc tcc acc tac aga gtg gtg tct gtg ctg acc gtg 1734
Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
315 320 325
ctg cac cag gat tgg ctg aac ggc aaa gag tac aag tgc aag gtg tcc 1782
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
330 335 340

aac aag gcc ctg cct gct cct atc gaa aag acc atc tcc aag gct aag 1830
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
345 350 355
ggc cag cct cgg gaa cct cag gtt tac acc ctg cct cca tct cgg gaa 1878
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
360 365 370 375
gag atg acc aag aac cag gtg tcc ctg acc tgc ctc gtg aag gga ttc 1926

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

380 385 390

tac cct tcc gat atc gcc gtg gaa tgg gag tct aac ggc cag cca gag 1974

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu

395 400 405

aac aac tac aag aca acc cct cct gtg ctg gac tcc gac ggc tca ttc 2022

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

410 415 420

ttc ctg tac tcc aag ctg aca gtg gac aag tct cgg tgg cag cag ggc 2070

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly

425 430 435

aac gtg ttc tcc tgt tct gtg atg cac gag gcc ctg cac aac cac tac 2118

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr

440 445 450 455

aca cag aag tcc ctg tct ctg tcc cct ggc tga tga ctcgagaagg 2164

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

460 465

gttcgatccc taccggttag taatgagttt gatatctcga caatcaacct ctggattaca 2224

aaatttgtga aagattgact ggtattctta actatgttgc tccttttacg ctatgtggat 2284

acgctgcttt aatgcctttg tatcatgcta ttgcttcccg tatggctttc attttctcct 2344

ccttgtataa atcctggttg ctgtctcttt atgaggagtt gtggcccgtt gtcaggcaac 2404

gtggcgtggt gtgcactgtg tttgctgacg caacccccac tggttggggc attgccacca 2464

cctgtcagct cctttccggg actttcgctt tccccctccc tattgccacg gcggaactca 2524

tcgccgcctg ccttgcccgc tgctggacag gggctcggct gttgggcact gacaattccg 2584

tggtgttgtc ggggaagctg acgtcctttc catggctgct cgcctgtgtt gccacctgga 2644

ttctgcgcgg gacgtccttc tgctacgtcc cttcggccct caatccagcg gaccttcctt 2704

cccgcggcct gctgccggct ctgcggcctc ttccgcgtct tcgccttcgc cctcagacga 2764

gtcggatctc cctttgggcc gcctccccgc ctggaacggg ggaggctaac tgaaacacgg 2824

aaggagacaa taccggaagg aacccgcgct atgacggcaa taaaaagaca gaataaaacg 2884

cacgggtgtt gggtcgtttg ttcataaacg cggggttcgg tcccagggct ggcactctgt 2944

cgatacccca ccgagacccc attggggcca atacgcccgc gtttcttcct tttccccacc 3004

ccacccccca agttcgggtg aaggcccagg gctcgcagcc aacgtcgggg cggcaggccc 3064

tgccatagca gatctgcgca gctggggctc taggggggtat ccccacgcgc cctgtagcgg 3124

cgcattaagc gcggcgggtg tggtggttac gcgcagcgtg accgctacac ttgccagcgc 3184

cctagcgccc gctcctttcg ctttcttccc ttcctttctc gccacgttcg ccggctttcc 3244

ccgtcaagct ctaaatcggg ggctcccttt agggttccga tttagtgctt tacggcacct 3304

cgaccccaaa aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac 3364

ggtttttcgc cctttgacgt tggagtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac 3424

tggaacaaca ctcaacccta tctcggtcta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat 3484

ttcggcctat tggttaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attaattctg 3544

tggaatgtgt gtcagttagg gtgtggaaag tccccaggct ccccagcagg cagaagtatg 3604

caaagcatgc atctcaatta gtcagcaacc aggtgtggaa agtccccagg ctccccagca 3664

ggcagaagta tgcaaagcat gcatctcaat tagtcagcaa ccatagtccc gcccctaact 3724

ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt ctccgcccca tggctgacta 3784

atttttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctctgcct ctgagctatt ccagaagtag 3844

tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc tcccgggagc ttgtatatcc 3904

attttcggat ctgatcaaga gacaggatga ggatcgtttc gcatgattga acaagatgga 3964

ttgcacgcag gttctccggc cgcttgggtg gagaggctat tcggctatga ctgggcacaa 4024

cagacaatcg gctgctctga tgccgccgtg ttccggctgt cagcgcaggg gcgcccggtt 4084

ctttttgtca agaccgacct gtccggtgcc ctgaatgaac tgcaggacga ggcagcgcgg 4144

ctatcgtggc tggccacgac gggcgttcct tgcgcagctg tgctcgacgt tgtcactgaa 4204

gcgggaaggg actggctgct attgggcgaa gtgccggggc aggatctcct gtcatctcac 4264

cttgctcctg ccgagaaagt atccatcatg gctgatgcaa tgcggcggct gcatacgctt 4324

gatccggcta cctgcccatt cgaccaccaa gcgaaacatc gcatcgagcg agcacgtact 4384

cggatggaag ccggtcttgt cgatcaggat gatctggacg aagagcatca ggggctcgcg 4444

ccagccgaac tgttcgccag gctcaaggcg cgcatgcccg acggcgagga tctcgtcgtg 4504

acccatggcg atgcctgctt gccgaatatc atggtggaaa atggccgctt ttctggattc 4564

atcgactgtg gccggctggg tgtggcggac cgctatcagg acatagcgtt ggctacccgt 4624

gatattgctg aagagcttgg cggcgaatgg gctgaccgct tcctcgtgct ttacggtatc 4684

gccgctcccg attcgcagcg catcgccttc tatcgccttc ttgacgagtt cttctgagcg 4744

ggactctggg gttcgcgaaa tgaccgacca agcgacgccc aacctgccat cacgagattt 4804

cgattccacc gccgccttct atgaaaggtt gggcttcgga atcgttttcc gggacgccgg 4864

ctggatgatc ctccagcgcg gggatctcat gctggagttc ttcgcccacc ccaacttgtt 4924

tattgcagct tataatggtt acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc 4984
attttttca ctgcattcta gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat cttatcatgt 5044
ctgtataccg tcgacctcta gctagagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt 5104
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 5164
agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 5224
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 5284
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 5344

cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga 5404
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 5464
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc ccccctgacg agcatcacaa 5524
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 5584
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 5644
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 5704
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 5764

cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 5824
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 5884
tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 5944
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 6004
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 6064
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 6124
aaactcacgt taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 6184

tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 6244
cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 6304
catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 6364
ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 6424
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 6484
ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 6544
caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 6604

attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 6664

agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 6724

actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 6784

ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 6844

ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 6904

gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 6964

atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 7024

cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 7084

gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 7144

gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 7204

ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc gacggatcgg gagatctccc 7264

gatcccctat ggtcgactct cagtacaatc tgctctgatg ccgcatagtt aagccagtat 7324

ctgctccctg cttgtgtgtt ggaggtcgct gagtagtgcg cgagcaaaat ttaagctaca 7384

acaaggcaag gcttgaccga caattgcatg aagaatctgc ttagg 7429

<210> 4

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

35 40 45

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Gly Ala Ser Gly Ser Gln Thr Arg Tyr

65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

85 90 95

```
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
            100                 105                 110
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln


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


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


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


305                 310                 315                 320
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
                325                 330                 335
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
```

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

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

450 455 460

Gly

465

<210> 5

<211> 720

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281_LC nucleic acid sequence

<400> 5

atggaaaccg atacactgct gctgtgggtg ctgttgctct gggtgccagg atctacaggc 60

cagtctgctc tgactcagcc tgcctctgtt tctggctccc ctggccagtc tatcaccatc 120

tcttgtaccg gcaccggctc cgacgtgggc tcttataacc tggtgtcctg gtatcagcag 180

caccccggaa aggcccctaa gctgatgatc tacggcgact ctgaacggcc ttccggcgtg 240

tccaatagat tctccggctc caagtccggc aataccgcct ctctgacaat cagtggactg 300

caggccgagg acgaggccga ctactactgt tcttcttacg ccggctccgg catctacgtg 360

ttcggcaccg gaacaaaagt gaccgtgctg ggacagccta aggccgctcc ttctgtgacc 420

ctgtttcctc catcctccga ggaactgcag gctaacaagg ctaccctcgt gtgcctgatc 480

tccgattttt accctggcgc tgtgaccgtg gcctggaagg ctgatagttc tcctgtgaag 540

gccggcgtgg aaaccaccac accttccaag cagtccaaca acaaatacgc cgcctcctcc 600

tacctgtctc tgacccctga acagtggaag tcccacaagt cctacagctg ccaagtgacc 660

catgagggct ccaccgtgga aaagacagtg gcccctaccg agtgctcctg atgactcgag 720

<210> 6

<211> 1407

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281_HC nucleic acid sequence

<400> 6

atggaaaccg atacactgct gctgtgggtg ctgttgctct gggttccagg atctacaggc 60

gaggtgcagc tgttggaatc tggcggagga ttggttcagc ctggcggctc tctgagactg 120

tcttgtgctg cctctggctt caccttctct acctacgcta tgggctgggt ccgacaggct 180

cctggaaaag gactggaatg ggtgtcctct atcggcgcct ctggcagcca gaccagatac 240

gctgattccg tgaagggcag attcaccatc agccgggaca actccaagaa caccctgtac 300

ctgcagatga actccctgag agccgaggac accgccgtgt actattgtgc tagactggcc 360

atcggcgact cttattgggg ccagggaaca atggtcaccg tgtcctctgc ttccaccaag 420

ggaccttccg tgtttcctct ggctccttcc agcaagtcta cctctggtgg aaccgctgct 480

ctgggctgcc tggtcaagga ttactttcct gagcctgtga ccgtgtcttg gaactccggt 540

gctctgacat ccggcgtgca cacatttcca gctgtgctgc agtcctccgg cctgtactct 600

ctgtcctctg tcgtgaccgt gccttctagc tctctgggca cccagaccta catctgcaac 660

gtgaaccaca agccttccaa caccaaggtg gacaagaagg tggaacccaa gtcctgcgac 720

aagacccaca cctgtcctcc atgtcctgct ccagaactgc tcggcggacc ctctgtgttc 780

ctgtttccac ctaagcctaa ggacaccctg atgatctctc ggacccctga agtgacctgc 840

gtggtggtgg atgtgtctca cgaggaccca gaagtgaagt tcaattggta cgtggacggc 900

gtggaagtgc acaacgccaa gaccaagcct agagaggaac agtacgcctc cacctacaga 960

gtggtgtctg tgctgaccgt gctgcaccag gattggctga acggcaaaga gtacaagtgc 1020

aaggtgtcca acaaggccct gcctgctcct atcgaaaaga ccatctccaa ggctaagggc 1080

cagcctcggg aacctcaggt ttacaccctg cctccatctc gggaagagat gaccaagaac 1140

caggtgtccc tgacctgcct cgtgaaggga ttctaccctt ccgatatcgc cgtggaatgg 1200

gagtctaacg gccagccaga gaacaactac aagacaaccc ctcctgtgct ggactccgac 1260

ggctcattct tcctgtactc caagctgaca gtggacaagt ctcggtggca gcagggcaac 1320

gtgttctcct gttctgtgat gcacgaggcc ctgcacaacc actacacaca gaagtccctg 1380

tctctgtccc ctggctgatg actcgag 1407

<210> 7

<211> 236

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281_LC amino acid sequence

<400> 7

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly
20 25 30

Ser Pro Gly Gln Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp
35 40 45

Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys

50 55 60

Ala Pro Lys Leu Met Ile Tyr Gly Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val
65 70 75 80

Ser Asn Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr
85 90 95

Ile Ser Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser
100 105 110

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

115 120 125

Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro
130 135 140

Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile
145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser
165 170 175

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

180 185 190

Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln

195 200 205

Trp Lys Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser

210 215 220

Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

225 230 235

<210> 8

<211> 465

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> M281_HC amino acid sequence

<400> 8

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro

1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val

20 25 30

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr

35 40 45

Phe Ser Thr Tyr Ala Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly

50 55 60

Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Gly Ala Ser Gly Ser Gln Thr Arg Tyr

65 70 75 80

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys

85 90 95

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

100 105 110

Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr Trp Gly Gln

115 120 125

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly

245 250 255

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His

435 440 445

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

450 455 460

Gly

465

<210> 9

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 nucleic acid sequence

<400> 9

accggcaccg gctccgacgt gggctcttat aacctggtgt cc 42

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L1 amino acid sequence

<400> 10

Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr Asn Leu Val Ser

1 5 10

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 nucleic acid sequence

<400> 11

ggcgactctg aacggccttc c 21

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L2 amino acid sequence

<400> 12

Gly Asp Ser Glu Arg Pro Ser

1 5

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 nucleic acid sequence

<400> 13

tcttcttacg ccggctccgg catctacgtg 30

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-L3 amino acid sequence

<400> 14

Ser Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Tyr Val

1 5 10

<210> 15

<211> 15

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 nucleic acid sequence

<400> 15

acctacgcta tgggc 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 amino acid sequence

<400> 16

Thr Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 17

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 nucleic acid sequence

<400> 17

tctatcggcg cctctggcag ccagaccaga tacgctgatt cc 42

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 amino acid sequence

<400> 18

Ser Ile Gly Ala Ser Gly Ser Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 19

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 nucleic acid sequence

<400> 19

ctggccatcg gcgactctta t 21

<210> 20

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H3 amino acid sequence

<400> 20

Leu Ala Ile Gly Asp Ser Tyr

1 5

<210> 21

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1variant 1

<400> 21

Asp Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 22

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H1 variant 2

<400> 22

Asn Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 variant 1

<400> 23

Ser Ile Gly Ala Ser Gly Ala Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 variant 2

<400> 24

Ser Ile Gly Ala Ser Gly Gly Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> CDR-H2 variant 3

<400> 25

Ser Ile Gly Ser Ser Gly Ala Gln Thr Arg Tyr Ala Asp Ser

1 5 10

<210> 26

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Z_FcRn-2

<400> 26

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Gln Asp Ala Ala Ala His Glu Ile

1 5 10 15

Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Phe Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His

20 25 30

Lys Leu Ala Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 27

<211> 58

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Z_FcRn-4

<400> 27

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Trp Met Arg Ala Ala His Glu Ile

1 5 10 15

Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Phe Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His

20 25 30

Lys Leu Glu Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 28

<211> 58

<212>

PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Z_FcRn-16

<400> 28

Val Asp Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Phe Glu Ser Ala Ala His Glu Ile

1 5 10 15

Arg Trp Leu Pro Asn Leu Thr Tyr Asp Gln Arg Val Ala Phe Ile His

20 25 30

Lys Leu Ser Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala

35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys

50 55

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYN746

<400> 29

Arg Phe Thr Gly His Phe Gly Leu Tyr Pro Cys

1 5 10

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SYN1327

<400> 30

Arg Phe Cys Thr Gly His Phe Gly Gly Leu Tyr Pro Cys

1 5 10

<210> 31

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220

><223> SYN1327-modified

<220><221> MOD_RES

<222> (3)..(3)

<223> Pen

<220><221> MOD_RES

<222> (9)..(9)

<223> Sar

<220><221> MOD_RES

<222> (10)..(10)

<223> NMeLeu

<400> 31

Arg Phe Xaa Thr Gly His Phe Gly Xaa Leu Tyr Pro Cys

1 5 10

<210> 32

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 98420-1 amino acid sequence

<400> 32

Gln Arg Phe Cys Thr Gly His Phe Gly Gly Leu Tyr Pro Cys Asn Gly

1 5 10 15

Pro

<210> 33

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 98420-2

<400> 33

Gly Gly Gly Cys Val Thr Gly His Phe Gly Gly Ile Tyr Cys Asn Tyr

1 5 10 15

Gln

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 98420-3

<400> 34

Lys Ile Ile Cys Ser Pro Gly His Phe Gly Gly Met Tyr Cys Gln Gly

1 5 10 15

Lys

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 98420-4

<400> 35

Pro Ser Tyr Cys Ile Glu Gly His Ile Asp Gly Ile Tyr Cys Phe Asn

1 5 10 15

Ala

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> 98420-5

<400> 36

Asn Ser Phe Cys Arg Gly Arg Pro Gly His Phe Gly Gly Cys Tyr Leu

1 5 10 15

Phe

<210> 37

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX2504LC

<400> 37

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30
Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45
Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80
Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95
Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110
Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160
Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190
Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys
195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

210 215

<210> 38

<211> 446

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX2504HC

<400> 38

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Leu Ala Ile Gly Asp Ser 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 Arg 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 Glu Glu Met 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> 39

<211> 216

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX2507LC

<400> 39

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Gly Ser Asp Val Gly Ser Tyr
20 25 30

Asn Leu Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Ala Gly Ser
85 90 95

Gly Ile Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
100 105 110

Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu
115 120 125

Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr
130 135 140

Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys
145 150 155 160

Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr
165 170 175

Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His
180 185 190

Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys

195 200 205

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 40
<211> 445
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> DX2507HC
<400> 40

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

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

435 440 445

<210> 41

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX-CDR-L3

<400> 41

Ala Ser Tyr Ala Gly Ser Gly Ile Val Tyr

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX-CDR-L2

<400> 42

Gly Asp Ser Gln Arg Pro Ser

1 5

<210> 43

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX-CDR-H1

<400> 43

Glu Tyr Ala Met Gly

1 5

<210> 44

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> DX-CDR-H2

<400> 44

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

1 5 10 15

Gly

<210> 45

<211> 365

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> hFcRN amino acid sequence

<400> 45

Met Gly Val Pro Arg Pro Gln Pro Trp Ala Leu Gly Leu Leu Leu Phe

1 5 10 15

Leu Leu Pro Gly Ser Leu Gly Ala Glu Ser His Leu Ser Leu Leu Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Val Ser Gly Trp Leu Gly Pro Gln Gln Tyr Leu Ser Tyr Asn Ser Leu

50 55 60

Arg Gly Glu Ala Glu Pro Cys Gly Ala Trp Val Trp Glu Asn Gln Val

65 70 75 80

Ser Trp Tyr Trp Glu Lys Glu Thr Thr Asp Leu Arg Ile Lys Glu Lys

85 90 95

Leu Phe Leu Glu Ala Phe Lys Ala Leu Gly Gly Lys Gly Pro Tyr Thr

100 105 110

Leu Gln Gly Leu Leu Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Asn Thr Ser Val

115 120 125

Pro Thr Ala Lys Phe Ala Leu Asn Gly Glu Glu Phe Met Asn Phe Asp

130 135 140

Leu Lys Gln Gly Thr Trp Gly Gly Asp Trp Pro Glu Ala Leu Ala Ile

145 150 155 160

Ser Gln Arg Trp Gln Gln Gln Asp Lys Ala Ala Asn Lys Glu Leu Thr

165 170 175

Phe Leu Leu Phe Ser Cys Pro His Arg Leu Arg Glu His Leu Glu Arg
180 185 190
Gly Arg Gly Asn Leu Glu Trp Lys Glu Pro Pro Ser Met Arg Leu Lys

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

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

325 330 335
Gly Asp Asp Thr Gly Val Leu Leu Pro Thr Pro Gly Glu Ala Gln Asp
340 345 350
Ala Asp Leu Lys Asp Val Asn Val Ile Pro Ala Thr Ala
355 360 365