(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0119056
(43) 공개일자 2022년08월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *C07K 14/495* (2006.01)
C07K 14/71 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 9/24 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 38/179 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7022987
(22) 출원일자(국제) 2020년12월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년07월05일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/063319
(87) 국제공개번호 WO 2021/113642
국제공개일자 2021년06월10일
(30) 우선권주장
62/944,027 2019년12월05일 미국(US)

(71) 출원인
프레지던트 앤드 펠로우즈 오브 하바드 칼리지
미합중국, 메사추세츠 02138, 캠브리지, 퀸시스트리트17
솔크 인스티튜트 포 바이올로지칼 스터디즈
미국 캘리포니아 92037-1002 라졸라 노쓰 토리 파인즈 로드10010
(72) 발명자
레돈도, 팔로마 마르티네즈
미국 92111 캘리포니아주 샌 디에고 오팔로 웨이 2351
길렌-길렌, 이자벨
미국 92130 캘리포니아주 샌 디에고 카멜 크릭 로드 11686 유닛 107
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

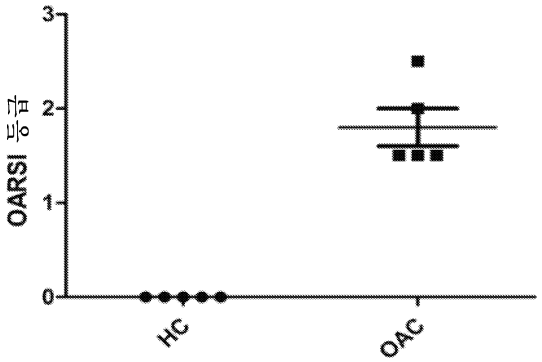
전체 청구항 수 : 총 103 항

(54) 발명의 명칭 **골관절염 치료 방법**

(57) 요 약

무릎 관절과 같은 골관절염 증상을 나타내는 포유동물 내의 부위에 α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질을 투여함으로써 골관절염을 치료하는 방법이 제공된다. α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질은 모두 골관절염 부위에 존재한다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61P 19/02 (2018.01)
C07K 14/495 (2013.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 9/2402 (2013.01)
C12Y 302/01031 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)
(72) 발명자
이즈피수아 벨몬테, 후안 카를로스
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 아베니다 드 라스 온다스 8435
다비드손, 노아
미국 02446 매사추세츠주 브루클라인 프리먼 스트리트 235 아파트먼트 3
처치, 조지 엠.
미국 02446 매사추세츠주 브루클라인 켄트 스트리트 218
길렌 가르시아, 페드로
미국 92037 캘리포니아주 라 졸라 노쓰 토리 파인즈 로드 10010 솔크 인스티튜트 포 바이올로지칼 스터디즈 내

명 세 서

청구범위

청구항 1

골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법이며, 대상체에게

sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열

을 포함하는 제1 바이러스 벡터를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 폴리시스트론 요소에 의해 분리되는 것인 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 폴리시스트론 요소가 IRES 또는 2A 서열인 방법.

청구항 4

골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법이며, 대상체에게

sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 바이러스 벡터

를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 서열이 제1 조절 서열에 작동가능하게 연결되고/되거나 제2 핵산 서열이 제2 조절 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 제1 조절 서열이 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 유도하고/하거나 제2 조절 서열이 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 유도하는 것인 방법.

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열이 각각 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 프로모터가 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터인 방법.

청구항 9

제5항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열이 각각 세포-특이적 프로모터 또는 조직-특이적 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열이 각각 간-특이적 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제5항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 조절 서열이 hEf1α 프로모터, shEf1α 프로모터 (또는 말단절단된 hEf1α 프로모터), CAG 프로모터 (예컨대, 시토메갈로바이러스, 닭 베타-액틴 인트론, 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 억셉터), CMV 프로모터, hAAT 프로모터, 갑상선 호르몬-결합 글로불린 프로모터, 알부민 프로모터, 티록신-결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 간 제어 영역 (HCR)-ApoCII 하이브리드 프로모터, CASI 프로모터, HCR-hAAT 하이브리드 프로모터, 마우스 알부민 유전자 인핸서 (Ealb) 요소와 조합된 hAAT 프로모터, 및 아포지단백질 E 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로모터를 포함하는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 핵산 서열이 포유동물 세포에서의 RNA 안정성 및 발현을 위해 3' 비번역 영역에 작동가능하게 연결되는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 3' 비번역 영역이 WPRE 서열, WPRE3 서열, SV40 후기 폴리아데닐화 신호 (예컨대, 말단절단됨), HBG 폴리아데닐화 신호, 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 신호, 소 bgpA, ETC 폴리아데닐화 신호, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터가 아데노-연관된 바이러스 (AAV) 벡터인 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, AAV 벡터가 AAV-DJ인 방법.

청구항 16

제14항에 있어서, AAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV, 11, AAV12, AAV2.5, 및 AAVrh10.XX 바이러스 벡터로부터 선택되는 AAV 혈청형으로부터 유래되는 것인 방법.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 sTGFβ-R2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 인간 sTGFβ-R2 단백질인 방법.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 개 sTGFβ-R2 단백질인 방법.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 α클로토 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질이 인간 sTGFβ-R2 단백질인 방법.

청구항 23

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질이 개 sTGFβ-R2 단백질인 방법.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질이 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질 및/또는 α클로토 단백질이 Ig Fc 도메인을 포함하는 Fc 융합 단백질인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, Ig Fc 도메인이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 Fc 또는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 이의 아유형으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, Ig Fc 도메인이 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 방법.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질 및/또는 α클로토 단백질이 전신적으로 발현되고 분포되는 것인 방법.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터가 정맥내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터가 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터가 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시키는 것인 방법.

청구항 32

제1항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함하는 것인 방법.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 35

제1항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 36

제35항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 37

제35항에 있어서, 포유동물이 개인 방법.

청구항 38

골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법이며, 대상체에게

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편; 및

sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편

의 조합의 치료 유효량을 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 39

제38항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편이 가용성 단백질로 투여되고 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 가용성 단백질로 투여되는 것인 방법.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, α클로토 단백질 및/또는 sTGFβ-R2 단백질이 정맥내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 41

제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질 및/또는 sTGFβ-R2 단백질이 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 42

제38항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 43

제38항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함하는 것인 방법.

청구항 44

제38항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 45

골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법이며, 대상체에게

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및

sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열

을 포함하는 핵산 분자를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 46

제45항에 있어서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 폴리시스트론 요소에 의해 분리되는 것인 방법.

청구항 47

제46항에 있어서, 폴리시스트론 요소가 IRES 또는 2A 서열인 방법.

청구항 48

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 정맥내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 49

제45항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여되는 것인 방법.

청구항 50

제45항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 51

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함하는 것인 방법.

청구항 52

제45항 내지 제51항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것이 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 53

제45항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 분자가 DNA, RNA, 또는 이들의 조합을 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제45항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 포유동물인 방법.

청구항 55

제54항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

청구항 56

제54항에 있어서, 포유동물이 개인 방법.

청구항 57

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및

가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 58

제57항에 있어서, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열이 폴리시스트론 요소에 의해 분리되는 것인 벡터.

청구항 59

제58항에 있어서, 폴리시스트론 요소가 IRES 또는 2A 서열인 벡터.

청구항 60

제58항 또는 제59항에 있어서, 제1 프로모터가 포유동물 세포에서 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결되고; 제2 프로모터가 포유동물 세포에서 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터.

청구항 61

제60항에 있어서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터가 세포 또는 조직 특이적인 것인 벡터.

청구항 62

제60항 또는 제61항에 있어서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터가 구성적 또는 유도성인 벡터.

청구항 63

제57항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 벡터.

청구항 64

제57항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 개 단백질인 벡터.

청구항 65

제57항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 인간 단백질인 벡터.

청구항 66

제57항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, α클로토 단백질이 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 67

제57항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 것인 벡터.

청구항 68

제57항 내지 제67항 중 어느 한 항의 벡터 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제형.

청구항 69

골관절염의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 골관절염을 치료하는 방법이며, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 조합의 치료 유효량을 포유동물에게 골관절염을 나타내는 포유동물 내의 부위에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 골관절염의 진행은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소되거나, 골관절염 부위에서 연골은 치료되지 않은 병태와 비교하여 증가, 재생, 또는 재성장되거나, 염증은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소되는 것인 방법.

청구항 70

제69항에 있어서, 포유동물이 개 또는 인간인 방법.

청구항 71

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편이 가용성 단백질로 투여되고 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 가용성 단백질로 투여되는 것인 방법.

청구항 72

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편이 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여되고 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여되는 것인 방법.

청구항 73

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열이 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고 제2 핵산 서열이 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되는 것인 방법.

청구항 74

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터가 관절내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열이 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열이 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되는 것인 방법.

청구항 75

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열이 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열이 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되는 것인 방법.

청구항 76

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터가 관절내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열이 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열이 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되는 것인 방법.

청구항 77

제73항 또는 제74항에 있어서, 벡터가 재조합 바이러스인 방법.

청구항 78

제73항 또는 제74항에 있어서, 벡터가 파르보바이러스인 방법.

청구항 79

제73항 또는 제74항에 있어서, 벡터가 AAV 벡터인 방법.

청구항 80

제73항 또는 제74항에 있어서, AAV 벡터가 AAV-DJ인 방법.

청구항 81

제73항 또는 제74항에 있어서, 벡터가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터인 방법.

청구항 82

제73항 또는 제74항에 있어서, 벡터가 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시키는 것인 방법.

청구항 83

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 재조합 바이러스인 방법.

청구항 84

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 파르보바이러스인 방법.

청구항 85

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 AAV 벡터인 방법.

청구항 86

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 AAV-DJ 벡터인 방법.

청구항 87

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터인 방법.

청구항 88

제75항 또는 제76항에 있어서, 제1 벡터 및 제2 벡터가 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시키는 것인 방법.

청구항 89

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 인간 단백질인 방법.

청구항 90

제69항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 개 단백질인 방법.

청구항 91

제69항에 있어서, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 92

제69항에 있어서, α클로토 단백질이 서열식별번호: 1에 상응하는 α클로토 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 것인 방법.

청구항 93

제69항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 서열식별번호: 3에 상응하는 sTGFβ-R2 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 것인 방법.

청구항 94

α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터.

청구항 95

제94항에 있어서, 제1 프로모터가 포유동물 세포에서 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결되고, 제2 프로모터가 포유동물 세포에서 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결되는 것인 벡터.

청구항 96

제95항에 있어서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터가 세포 또는 조직 특이적인 것인 벡터.

청구항 97

제95항에 있어서, 제1 프로모터 및 제2 프로모터가 구성적 또는 유도성인 벡터.

청구항 98

제94항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 인간 단백질인 벡터.

청구항 99

제94항에 있어서, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편이 개 단백질인 벡터.

청구항 100

제94항에 있어서, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질이 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 벡터.

청구항 101

제94항에 있어서, α클로토 단백질이 서열식별번호: 1에 상응하는 α클로토 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 것인 벡터.

청구항 102

제94항에 있어서, sTGFβ-R2 단백질이 서열식별번호: 3에 상응하는 sTGFβ-R2 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 것인 벡터.

청구항 103

제약상 허용되는 부형제에 제94항의 벡터를 포함하는 제약 제형.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 노화 동안, 관절 연골은 기질 구조, 분자 조성, 대사 활성 및 기계적 특성에서 상당한 변화를 겪는 조직이다 (참조: Rahmati M, Nalesso G, Mobasheri A, Mozafari M. Aging and osteoarthritis: Central role of the extracellular matrix. Ageing Research Reviews. 2017 Nov 1;40:20-30; Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2016 Jul;12(7):412-20). 그 결과, 관절 연골은 항상성 손상 및 제한된 복구 능력을 경험하여 골관절염 (OA) 발병에 기여한다 (Loeser RF, Collins JA, Diekman BO. Aging and the pathogenesis of osteoarthritis. Nat Rev Rheumatol. 2016 Jul;12(7):412-20). 골관절염은 노인들 사이에서 가장 널리 퍼진 근골격 장애이며 질환과 관련된 통증으로 인해 미국에서 신체 장애의 주요 원인이다 (Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of Osteoarthritis. Clin Geriatr Med. 2010 Aug;26(3):355-69). 이 질환에 대해 증상적 통증 완화가 가능하지만 (Zhang W, Ouyang H, Dass CR, Xu J. Current research on pharmacologic and regenerative therapies for osteoarthritis. Bone Research. 2016 Mar 1;4:15040), 이 병리를 치유하기 위한 치료는 아직 이용 가능하지 않다.

[0002] 골관절염에 대한 효과적인 임상 치료의 결여는 전 세계적으로 이 병리의 발병률 증가에 조력한다 (참조: Wittenauer R, Smith L, Aden K. Background Paper 6.12 Osteoarthritis. Background Paper. 2004;31). 현재, 골관절염에 대한 가장 효과적인 치료는 관절 성형술 외에 자가 연골세포 이식이다. 그러나, 이 치료는 독립적인 수술 절차를 통해 건강한 공여자 연골을 추출해야 하고, 1차 연골세포의 확장 능력이 제한적이며, 대규모 결함을 치료하기 어렵다는 것을 포함한 여러 제한이 있다.

[0003] 따라서, 수수 절차를 피할 수 있고 노화 뿐만 아니라 관절 외상과 관련된 이 병리를 치료할 수 있는 효과적인 요법을 찾을 필요가 여전히 있다. 또한, 성인기 동안 나타나는 낮은 재생 능력 및 노화에 따른 악화를 개선할

뿐만 아니라 골관절염 후 관절 연골 구조 및 기능을 회복시키는데 도움이 되는 치료 목표의 개발이 더 필요하다.

발명의 내용

[0004] 본 개시내용은 치료 유효량의 α클로토 (αKlotho) 단백질 또는 이의 활성 단편 및 치료 유효량의 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편 또는 이들의 조합을 골관절염의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 골관절염을 나타내는 포유동물 내의 부위에 투여함으로서 포유동물에서 골관절염을 치료하는 방법을 제공하며, 여기서 골관절염의 진행은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소되거나, 골관절염 부위에서 연골은 치료되지 않은 병태와 비교하여 증가, 재생, 또는 재성장되거나, 염증은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소된다. 골관절염 부위는 골관절염의 증상을 나타내는 부위이다. 골관절염은 전 세계적으로 수백만 명의 사람들에게 영향을 미치는 가장 흔한 형태의 관절염이다. 이는 뼈의 끝 부분을 보호하는 보호 연골이 시간 경과에 따라 마모될 때 발생한다. 골관절염은 임의의 관절을 손상시킬 수 있지만, 장애는 가장 일반적으로 손, 무릎, 엉덩이 및 척추의 관절에 영향을 미친다. 골관절염의 증상은 통증, 강직, 압통, 유연성 손실, 격자 감각, 뼈돌기 및 부종을 포함한다.

[0005] 본원에 기재된 기능적 단백질은 전장 단백질 또는 전장 단백질과 다르지만 전장 단백질의 활성을 전체적으로 또는 부분적으로 보유하는 단백질일 수 있다.

[0006] 본 발명의 특정 실시양태의 추가 특색 및 이점은 하기의 실시양태 및 도면의 설명, 및 청구범위로부터 보다 완전히 명백해질 것이다.

도면의 간단한 설명

[0007] 본 특허 또는 출원 파일은 색상으로 실행된 도면을 함유한다. 색상 도면을 갖는 본 특허 또는 특허 출원 공개문의 사본은 요청 및 필요한 수수료 지불 시 청에 의해 제공될 것이다. 본 실시양태의 상기 및 다른 특색 및 이점은 첨부 도면과 함께 취해진 하기의 예시적인 실시양태의 상세한 설명으로부터 더 완전히 이해될 것이다.

도 1a-1f는 래트 모델에서 초기-단계 골관절염 표현형의 재현 결과를 도시한다. 도 1a는 OARSI 득점 시스템 (HC, n=5; OAC, *n*=5)에 기초한 래트에서의 관절 골관절염 등급의 그래프를 도시한다. 데이터는 평균으로 표현되며 각각의 데이터 포인트는 개별 래트를 나타낸다. 양측 t-시험 (독립표본)이 통계 분석에 이용되었다. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. 도 1b는 무릎 관절의 대표적인 사프라닌-O/패스트 그린 이미지를 나타낸다 (HC, n=5; OAC, *n*=5). 축척 바, 500 μm. 이미지는 OAC 그룹에서 파파인 주사 4주 후 연골 및 기질 분해를 나타낸다. 도 3c는 제자리 세포 사멸의 대표적인 이미지를 도시한다 (HC, n=3; OAC). 청색 세포는 아폽토시스 세포를 나타낸다. 축척 바, 20 μm. 이미지는 OAC 그룹에서 더 많은 수의 청색 세포를 나타낸다. 도 1d는 무릎 절편에서 비대 마커 Col10a 및 RUNX2의 면역염색 검출로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (HC, n=3; OAC, *n*=3). 축척 바, 200 μm. Col10 이미지만 DAPI 공동-염색 (청색)을 포함한다. Col10a 이미지에서의 화살표는 비-병리적 관절에서 Col10a 부재를 특징으로 하는 연골 영역을 나타낸다. 도 1e는 무릎 절편에서 면역염색 검출 MMP13으로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (HC, n=3; OAC, *n*=3). 축척 바, 200 μm. 이미지는 두 그룹 모두에 대해 핵의 녹색 염색을 나타내지만 OAC 그룹만 핵 영역 외부의 염색을 나타낸다. 도 1f는 무릎 절편에서 Sox9, Col2a, 및 ACAN의 면역염색 검출로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (HC, n=3; OAC, *n*=3). 축척 바, 200 μm. ACAN 이미지만 DAPI 공동-염색 (청색)을 포함한다.

도 2a-2c는 연골세포 비대를 억제하고 연골세포 마커 상향조절을 촉진하는 생체내 sTGFβR2 및 α클로토 처리의 결과를 도시한다. 도 2a는 본원에 기재된 바와 같이 sTGFβR2 및 α클로토 처리 후 연골 분해의 방지 및 연골 마커의 회복을 나타내는 조직 절편에서 Sox9, Col2a 및 ACAN의 면역염색 정량화 결과를 도시한다. 연골 영역을 따라 400x500 μm 영역 내에서 정량화를 수행하였다. 피지 (Fiji) 소프트웨어를 사용하여 정량화를 수행하였다: HC=건강 (청색), OAC=질환 (적색), SHAM=비처리 (녹색), KT=처리 (자주색) (HC, n=3; OAC, n=3; KT, n=3, 및 SHAM, n=3). 양측 t-시험 (독립표본)을 통계 분석에 사용하였다. $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$. 도 2b는 골관절염 실험에 대한 시간 경과의 도식도를 도시한다. 파파인 매개된 골관절염을 앓고 있는 암컷 래트는 4주 후 희생되거나 (OAC) AAVDJ-GFP (SHAM) 또는 AAV-DJ-sTGFβR2 및 AAV-DJ-α클로토 (KT)로 관절내 주사되었다. 도 2c는 sTGFβR2 및 α클로토 처리가 어떻게 유리질 연골 파괴를 피하고 이의 형성을 촉진하는지를 입증하는 4개 그룹을 비교한 관절융기 연골 두께의 정량화 결과를 도시한다 (HC, n=5; OAC; n=5; KT, n= 5, 및 SHAM, n=5). 두께는 연골 영역 전체에 걸쳐 3개의 상이한 위치에서 관절융기 연골을 측정하여 결정되었다. 정량화는 피지 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 양측 t-시험 (독립표본)을 통

계 분석에 사용하였다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

도 3a-3c는 sTGFβR2 및 α클로토가 AAV-DJ 혈청형에 의해 전달된 실험에 관한 것이다. 도 3a는 AAV-DJ-루시페라제 (LUC) 또는 AAV-DJ-Empty (sham) 관절내 주사 후 제14일에 대표적인 전신 발광 이미지 (LUC, n=3; Sham, n=3) (왼쪽) 및 발광의 정량화를 도시한다 (임의 단위, A.U.). 도 3b는 15% 초과의 형질도입 효율을 나타내는 AAV-DJ-GFP 시험관내 형질도입된 래트 활막 세포의 유동 세포측정 분석을 도시한다 (상부, 비-형질도입된 세포; 하부, AAV-DJ-GFP 형질도입된 세포) (n=3). 도 3c는 4% 미만의 형질도입 효율을 나타내는 AAV-DJ-GFP 시험관내 형질도입된 래트 연골세포의 유동 세포측정 분석을 도시한다 (왼쪽, 비-형질도입된 세포; 오른쪽, AAV-DJ-GFP 형질도입된 세포) (n=3).

도 4a-4f는 sTGFβR2 및 α클로토 관절내 주사가 ECM 복구를 촉진하고 아폽토시스를 피한다는 것을 나타내는 이미지를 도시한다. 도 4a는 무릎 관절의 대표적인 사프라닌-O/패스트 그린 이미지를 나타내며 (SHAM, n=5; KT, n=5) (축척 바, 500 μm), 이는 SHAM 그룹에서 높은 연골 및 기질 분해를 나타내며, OAC 그룹보다 더 크다. KT 처리된 무릎은 높은 사프라닌-O 염색을 갖는 완전한 연골 구조를 나타낸다. 도 4b는 무릎 절편에서 연골세포 특이적 마커 Sox9, Col2a 및 ACAN의 면역염색 검출로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (SHAM, n=3; KT, n=3). 축척 바, 200 μm. 도 4c는 제자리 세포 사멸의 대표적인 이미지를 도시한다 (SHAM, n=4; KT, n=5). 청색 세포는 아폽토시스 세포를 나타낸다. 축척 바, 20 μm. 이미지는 SHAM 그룹에서 더 많은 수의 청색 세포를 나타낸다. 도 4d는 무릎 절편에서 비대 마커 Col10a 및 RUNX2의 면역염색 검출로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (SHAM, n=3; KT, n=3). 축척 바, 200 μm. Col10 이미지만 DAPI 공동-염색 (청색)을 포함한다. 도 4e는 무릎 절편에서 면역염색 검출 MMP13으로부터의 대표적인 이미지를 도시한다 (SHAM, n=3; KT, n=3). 축척 바, 200 μm. 이미지는 두 그룹 모두에 대해 핵에서 녹색 염색을 나타내지만 SHAM 그룹만 핵 영역 외부의 염색을 나타낸다. 도 4f는 OARSI 득점 시스템에 기초한 래트에서의 관절 골관절염 등급 결과를 도시한다 (SHAM, n=5; KT, n=5). 데이터는 평균으로 표현되며 각각의 데이터 포인트는 개별 래트를 나타낸다. 양측 t-시험 (독립표본)이 통계 분석에 이용되었다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

도 5a-5e는 생체내에서 골관절염-관련된 면역 반응을 억제하는 sTGFβR2 및 α클로토의 결과를 도시한다. 도 5a는 유전자 온톨로지 (Gene Ontology) 농축 분석에 따른 [KT 대 SHAM]와 [HC 대 OAC] 사이의 공통된 DE 유전자 (KT 및 HC에서 공통된 변화를 공유하지만 다른 그룹에서는 상이하게 거동하는 유전자)의 통계적 농축 점수의 바플롯을 나타낸다. FDR (오발견율) < 0.01인 생물학적 공정 조건만 플롯에 나타내었다. 도 5b는 유전자 온톨로지 농축 분석에 따른 KT 대 SHAM DE 유전자 (HC 대 OAC로부터 DE로 확인되지 않은 유전자)로부터의 통계적 농축 점수의 바플롯을 도시한다. FDR (오발견율) < 0.01인 생물학적 공정 조건만 플롯에 나타내었다. FDR 값은 -log10 척도로 나타내었다. 도 5c는 KT 및 HC에서 공통된 변화를 공유하지만 다른 두 그룹에서는 상이하게 거동하는 하향조절된 DE 유전자에 대한 유전자 발현의 히트맵을 도시한다. 색상은 조건에 따른 유전자별 상대적 발현 값을 나타낸다 (낮음=청색, 높음=적색). 열 (row) 덴드로그램은 유전자 발현 프로파일의 유사성을 기반으로 한 계층적 클러스터링 결과를 나타내었다. 도 5d는 (도 5c 및 도 7로부터) 선택된 유전자의 유전자 발현 플롯을 도시한다. 유전자 발현은 FPKM 값 (백만 매핑 판독당 킬로베이스당 단편)으로 정규화되었으며, 평균은 막대로 표시되고 각각의 개별 레플리케이트는 점으로 표시된다. 색상은 상이한 조건을 표시하였다: HC (청색), OAC (적색), SHAM (녹색), 및 KT (자주색) (HC, n=2; KT, n=2; OAC, n=3; 및 SHAM, n=3). 도 5e는 (도 7로부터의) Nos2의 유전자 발현 플롯을 도시한다. 유전자 발현은 FPKM 값 (백만 매핑 판독당 킬로베이스당 단편)으로 정규화되었으며, 평균은 막대로 표시되고 각각의 개별 레플리케이트는 점으로 표시된다. 색상은 상이한 조건을 표시하였다: HC (청색), OAC (적색), SHAM (녹색), 및 KT (자주색) (HC, n=2; KT, n=2; OAC, n=3; 및 SHAM, n=3).

도 6a-6d는 sTGFβR2 및 α클로토에 의한 연골세포 마커의 시험관내 회복 결과를 도시한다. 도 6a는 인간 섬유모세포 및 인간 연골세포를 사용한 공동-배양 검정의 도식도를 도시한다 (n=3). 축척 바, 200 μm. 도 6b는 공동-배양 실험에 사용된 연골세포로부터의 Sox9 및 Col2a의 대표적인 면역염색 이미지를 도시한다 (SHAM, n=3; KT, n=3). 축척 바, 200 μm. 도 6c는 중간엽 세포가 AAV-DJ-sTGFβR2 및 AAV-DJ-α클로토로 형질도입되었을 때 Sox9, Col2a 및 Ki67의 면역염색 정량화가 연골세포 개선을 입증하였음을 도시한다. 정량화는 피지 소프트웨어를 사용하여 수행되었다 (SHAM, n=3; KT, n=3). 도 6d는 Sox9, Col2a 및 EdU의 면역염색 정량화가 sTGFβR2 및 α클로토 재조합 단백질로 처리된 것에서 연골세포 항상성 개선을 나타내었음을 도시한다. 정량화는 피지 소프트웨어를 사용하여 수행되었다 (BSA, n=3; KT, n=3). 양측 t-시험 (독립표본)은 b 및 c의 통계 분석에 사용되었다. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

도 7은 sTGFβR2 및 α클로토가 골관절염과 관련된 면역 반응 메커니즘의 활성화를 방지함을 나타내는 히트맵을

도시한다. SHAM과 KT 사이에서 차등적으로 발현된 (그러나, HC와 OAC 사이에서는 차등적으로 발현되지 않은) DE 유전자에 대한 유전자 발현의 히트맵. 색상은 조건에 따른 유전자별 상대적 발현 값을 나타낸다 (낮음=청색, 높음=적색). 열 덴드로그램은 유전자 발현 프로파일의 유사성을 기반으로 한 계층적 클러스터링 결과를 나타내었다.

도 8은 본원에 기재된 바와 같이 전신 주사에 의해 유전자 요법으로 처리된 마우스 무릎에서 골관절염의 등급 (깊이)과 관련된 데이터를 도시한다. 그룹 평균 +/- 평균의 표준 오차 (SEM). 파파인 후 2개월 대조군 (그룹 2) 및 STGFbR2 + FGF21 (그룹 4)이 가장 높은 등급을 나타내었고, 파파인 후 1개월 대조군 (그룹 1)이 가장 낮은 등급을 나타내었다. 파파인 후 2개월 대조군 (그룹 2)과 비교할 때 STGFbR2 + α클로토 (그룹 3)에서 약간의 등급 감소가 관찰되었다.

도 9는 본원에 기재된 바와 같이 전신 주사에 의해 유전자 요법으로 처리된 마우스 무릎에서 골관절염의 단계 (범위)와 관련된 데이터를 도시한다. 그룹 평균 +/- SEM. 파파인 후 2개월 대조군 (그룹 2)은 가장 높은 평균 OA 단계를 나타내었고; 유사한 평균 단계가 STGFbR2 + FGF21 (그룹 4)에서 관찰되었다. 더 낮은 평균 OA 단계는 2개월 대조군 (그룹 2)과 비교하여 파파인 후 1개월 대조군 (그룹 1)에서 관찰되었다. 가장 낮은 평균 OA 단계는 STGFbR2 + α클로토 (그룹 3)에서 관찰되었으며, 두 대조군 (그룹 1 및 2)과 비교할 때 병변 중증도 감소를 나타낸다.

도 10은 본원에 기재된 바와 같이 전신 주사에 의해 유전자 요법으로 처리된 마우스 무릎에서 골관절염의 점수 (등급 x 단계)와 관련된 데이터를 도시한다. 그룹 평균 +/- SEM. 파파인 후 2개월 그룹 (그룹 2) 및 STGFbR2 + FGF21 (그룹 4)이 가장 높은 점수를 나타내었고; 이들 그룹 간에 차이가 관찰되지 않았다. 파파인 후 1개월 그룹 (그룹 1)은 파파인 후 2개월 그룹 (그룹 2)과 비교하여 더 낮은 점수를 가졌다. STGFbR2 + α클로토 (그룹 3)는 가장 낮은 점수를 나타내었으며, 두 대조군 (그룹 1 및 2)과 비교하여 병변 중증도 감소를 나타낸다.

도 11은 본원에 기재된 바와 같이 전신 주사에 의해 유전자 요법으로 처리된 마우스 무릎에서 골관절염의 반월상 연골 연축과 관련된 데이터를 도시한다. 그룹 평균 +/- SEM. 반월상 연골 연축은 두 대조군 (그룹 1 및 2) 및 STGFbR2 + FGF21 (그룹 4)에서 관찰되었으며; 그룹 4는 반월상 연골 연축 점수의 가장 높은 중증도를 나타내었다. 반월상 연골 연축은 STGFbR2 + α클로토 (그룹 3)에서 부재하였다.

도 12a는 sTGFβR2 및 α클로토의 조합 대 sTGFβR2 개별 및 α클로토 개별 처리에 대한 반응으로 다양한 유전자의 유전자 발현을 나타내는 데이터를 도시한다. 조합은 개별 처리와 비교하여 상승적으로 더 큰 처리 효과를 달성하였다. 도 12b는 두 인자 모두로 처리된 연골세포가 각각의 인자로 따로 처리된 것보다 ACAN의 더 높은 단백질 발현을 나타내었음을 입증하는 겔 데이터를 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0008] 본 개시내용은 골관절염의 치료 또는 예방을 필요로 하는 포유동물에게 가용성 단백질 또는 가용성 단백질을 발현하는데 사용되는 벡터로서 골관절염을 나타내는 포유동물 내의 부위에 투여되는 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 가용성 종양 성장 인자 β 수용체 2 (sTGFβR2) 단백질 또는 이의 활성 단편의 조합의 치료 유효량을 사용하여 관절 연골과 함께 발생하는 것과 같은 골관절염을 치료 또는 예방하기 위한 방법 및 조성물을 제공한다. 한 측면에 따라, 가용성 종양 성장 인자 β 수용체 2 (sTGFβR2)는 관절 연골이 존재하는 무릎과 같은 관절에서 골관절염을 치료 또는 예방하기 위해 α클로토 단백질과 함께 투여된다. 한 측면에 따라, 가용성 종양 성장 인자 β 수용체 2 (sTGFβR2) 및 α클로토는 각기 또는 동시에 투여되어 가용성 종양 성장 인자 β 수용체 2 (sTGFβR2) 및 α클로토가 모두 투여 부위에 존재한다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 하나 이상의 벡터에 포함되거나 단일 바이러스 벡터, 예컨대 AAV로 조합되는 핵산에 의해 코딩되고, 이는 골관절염 및/또는 골관절염과 관련된 질환 또는 병태를 치료 또는 예방하기 위해 투여된다.

[0009] 한 측면에 따라, sTGFβR2는 TGFβ1을 억제하여 프로테오글리칸 분해 증가에도 불구하고 골극 형성을 억제하는 작용을 한다 (참조: Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. J Immunol. 2002 Jul 1;169(1):507-14). TGFβ1 경로는 균형 및 다운스트림 이펙터가 연골 유지에 필수적인 방식으로 연골 항상성을 조절한다. 한편으로, TGFβ1은 연골세포 비대를 피하면서 연골세포 증식 및 성숙에서의 역할로 인해 연골 형성에 필수적인 것으로 간주되었다 (Yang X, Chen L, Xu X, Li C, Huang C, Deng CX. TGF-beta/Smad3 signals repress chondrocyte hypertrophic

differentiation and are required for maintaining articular cartilage. J Cell Biol. 2001 Apr 2;153(1):35-46). 그러나, 다른 한편으로, ALK1/ALK5 수용체 비율의 증가 (참조: Blaney Davidson EN, Remst DFG, Vitters EL, van Beuningen HM, Blom AB, Goumans M-J, et al. Increase in ALK1/ALK5 ratio as a cause for elevated MMP-13 expression in osteoarthritis in humans and mice. J Immunol. 2009 Jun 15;182(12):7937-45); 또는 TGF-β1에의 장기간 노출은 연골세포 비대를 급격히 증가시킨다 (참조: Pohlers D, Beyer A, Koczan D, Wilhelm T, Thiesen H-J, Kinne RW. Constitutive upregulation of the transforming growth factor-β pathway in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. Arthritis Research & Therapy. 2007 Jun 26;9(3):R59; Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, et al. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. Osteoarthr Cartil. 2001 Feb;9(2):128-36).

[0010] 이 한 측면에 따라, 막 결합 도메인이 없고 TGF-β1 및 β3에 대해 높은 친화성을 갖는 가용성 TGFβR2 (sTGFβR2) (De Crescenzo G, Pham PL, Durocher Y, O'Connor-McCourt MD. Transforming Growth Factor-beta (TGF-β) Binding to the Extracellular Domain of the Type II TGF-β Receptor: Receptor Capture on a Biosensor Surface Using a New Coiled-coil Capture System Demonstrates that Avidity Contributes Significantly to High Affinity Binding. Journal of Molecular Biology. 2003 May;328(5):1173-83)는 관절에서 TGF-β1의 효과를 조정할 수 있다.

[0011] 이 한 측면에 따라, α클로토는 세포외 기질 (ECM) 분해를 억제 또는 방지한다 (참조: Chuchana P, Mausset-Bonnefont A-L, Mathieu M, Espinoza F, Teigell M, Toupet K, et al. Secreted α-Klotho maintains cartilage tissue homeostasis by repressing NOS2 and ZIP8-MMP13 catabolic axis. Aging (Albany NY). 2018 Jun 19;10(6):1442-53). 원래 마우스에서 노화-억제자 유전자로 확인되었고 (참조: Kurosu H, Yamamoto M, Clark JD, Pastor JV, Nandi A, Gurnani P, et al. Suppression of aging in mice by the hormone Klotho. Science. 2005 Sep 16;309(5742):1829-33) 노화 및 골관절염 시 연골 및 활막에서 하향조절되는 것으로 나타났으며 (참조: Pαsztoi M, Nagy G, Geher P, Lakatos T, Toth K, Wellinger K, et al. Gene expression and activity of cartilage degrading glycosidases in human rheumatoid arthritis and osteoarthritis synovial fibroblasts. Arthritis Research & Therapy. 2009;11(3):R68), 클로토는 세포외 도메인이 단백질분해 절단에 의해 순환계로 방출되는 I형 막-결합된 단백질을 코딩한다 (참조: Xu Y, Sun Z. Molecular basis of Klotho: from gene to function in aging. Endocr Rev. 2015 Apr;36(2):174-93). 분비 단백질인 α클로토는 말단 시알산을 제거함으로써 이온 채널, 인슐린-유사 성장 인자 1 (IGF-1)/인슐린 및 N-연결된 글리칸으로부터의 Wnt와 같은 표면 당단백질을 조절한다 (참조: Dalton GD, Xie J, An S-W, Huang C-L. New Insights into the Mechanism of Action of Soluble Klotho. Front Endocrinol (Lausanne). 2017 Nov 17;*8*). α클로토는 특정 기관에서 아폽토시스, 산화 스트레스, 및 면역 반응을 방지한다 (*Fan* J, Sun Z. The Antiaging Gene Klotho Regulates Proliferation and Differentiation of Adipose-Derived Stem Cells. Stem Cells. 2016 Jun;34(6):1615-25; Tilly EL, Vinatier C, Ong T, Guicheux J, Beck L. Role of the anti-aging protein Klotho in the autophagy and senescence-associated development of osteoarthritis. Osteoarthritis and Cartilage. 2016 Apr 1;24:S64-5; Salech F, Varela-Nallar L, Arredondo SB, Bustamante DB, Andaur GA, Cisneros R, et al. Local Klotho enhances neuronal progenitor proliferation in the adult hippocampus. J Gerontol A Biol Sci Med Sci. 2017 Dec 30).

[0012] 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 조합의 치료 유효량을 골관절염의 치료를 필요로 하는 포유동물에게 골관절염을 나타내는 포유동물 내의 부위에 투여하는 단계를 포함하는, 상기 포유동물에서 골관절염을 치료하는 방법이 제공되며, 여기서 골관절염의 진행은 치료되지 않은 병태에 비해 감소되거나, 골관절염 부위에서 연골은 치료되지 않은 병태와 비교하여 증가, 재생, 또는 재성장되거나, 염증은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소된다. 한 측면에 따라, 포유동물은 개 또는 인간이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여되고, sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편은 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여되고, sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터는 관절

내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터는 관절내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, 벡터는 재조합 바이러스이다. 한 측면에 따라, 벡터는 파르보바이러스이다. 한 측면에 따라, 벡터는 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, AAV 벡터는 AAV-DJ이다. 한 측면에 따라, 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX (여기서 xx는 상이한 AAVrh10.01 내지 AAV rh 10.99와 같은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 상이한 변이체를 나타내고, 이의 예는 AAVrh10.32임) 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 벡터는 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시킨다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 재조합 바이러스이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 파르보바이러스이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV-DJ 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX (여기서 xx는 상이한 공지된 변이체를 나타냄) 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시킨다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 인간 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 개 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 하기와 같은 서열식별번호 (SEQ ID NO:): 1에 상응하는 α클로토 단백질의 아미노산 서열에 대한 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

MATCILQMRFLRLGKILFHSSPQSTGGSGGTRGPRAPAQLRTQRGTDKLVAKSELKAKT

AHRALADHFRDYAELCFRHFCGQVKYWITIDNPYVVAWHGYATGRLAPGVRGSPRLG

YLVAHNLLLAHAKIWHLYNTSFRPTQGGQVSIALSSHWINPRRMTDHSIKECQKSLDFV

LGWFAKPIFIDGDYPESMKNNLSSLLPVFTESEKKFIKGTADFFALSFGPTLSFQLLDPHM

KFHQLESPSLRQLLSWIDLEYNHPQIFIVENGWFVSGTTKRDDAKYMYYLKKFIMETLK

AIRLDGVDVIGYTAWSLMDGFEWHRGYSIRRGLFYVDFLSQDKKLLPKSSALFYQKLIE

KNGFPPLPENQPLEGTFPCDFAWGIVDNYIQVDTTLSQFTDPNVYLWDVHHSKRLIKVD

GLRAKKRKPYCVDFAAIGPQVALLQEMHVSHFHFSLDWALLLPLGNQSRVNHAALHY

YGCVASELLRANITPVVALWRPAAAHQGLPGPLAQRGAWENPRTALAFAEYARLCFRA

LGRHVKVWITLREPPTRNLTLRAGHNLLRAHALAWRVYDEQFRGSQQGKVSIALQAD

WVEPACPSSQKDREVAERVLEFDVGWLAEPIFGSGDYPRLMRDWLTRRDHSLLPYFTD

EEKRLIRGSFDFLALSHYTTILVDWEKEDPVKYNDYLEVQEMTDITWLNSPSQVAVVPW

GLRKVLNWLKFKYGDLPMYIVSNGIDDDPRAAQDSLRVYYMQNYVNEALKAYVLDGI

NLCGYFAYSFNDRTAPKFGLYHYAANQFEPKPSVKHYRKIIDNNGFPGPETLGRFCPEEF

TLCTECSFFHTRKSLLAFIAFLLFAFIISLSLIFYYSRKGRRSYKGGSGGSDYKDHDGDYK

DHDIDYKDDDDK**.

[0013] .

[0014] 한 측면에 따라, α클로토 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같은 서열식별번호: 2에 상응하는 α클로토 단백질을 코딩하는 핵산 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

ATGGCCACCTGCATTTTACAGATGAGATTCCTAAGGCTGGGGAAGATACTGTTCCAC

TCCAGCCCACAAAGCACAGGTGGCAGTGGTGGGACCCGGGGACCTCGAGCTCCGGC

ACAGCTGCGAACGCAGCGTGGCACAGATAAGTTAGTTGCTAAGTCAGAGCTCAAGG

CTAAAACGGCCCACCGCGCGCTGGCCGACCACTTCAGGGACTACGCCGAGCTCTGC

TTCCGCCACTTCTGCGGCCAGGTCAAGTACTGGATCACCATCGACAACCCCTACGTG

GTGGCCTGGCACGGCTACGCCACCGGTCGCCTGGCACCCGGAGTCAGAGGCAGCCC

GCGGCTCGGGTACCTGGTGGCGCACAACCTCCTCCTGGCTCACGCCAAAATCTGGCA

TCTCTACAATACTTCTTTCCGCCCAACTCAGGGAGGCCAGGTATCCATTGCCCTAAG

CTCCCACTGGATCAATCCTCGAAGAATGACCGACCATAGCATCAAAGAATGTCAAA

AATCTCTTGACTTTGTACTAGGCTGGTTTGCCAAGCCCATATTTATTGATGGTGACTA

TCCTGAGAGCATGAAGAATAACCTGTCATCTCTTCTGCCTGTTTTTACTGAATCTGAG

AAAAAGTTCATCAAGGGAACAGCTGACTTTTTTGCTCTTTCTTTTGGACCAACTTTGA

GTTTTCAACTCTTGGACCCTCATATGAAGTTCCACCAATTAGAATCTCCCAGCCTGA

GGCAACTCCTTTCTTGGATTGACCTTGAATATAACCACCCTCAAATATTTATTGTGGA

AAATGGCTGGTTTGTCTCAGGGACCACCAAGAGAGATGATGCCAAATATATGTATTA

CCTCAAAAAATTCATAATGGAAACCTTAAAAGCCATCAGGCTGGATGGGGTGGATG

TCATAGGATACACAGCGTGGTCCCTTATGGATGGCTTCGAGTGGCACAGAGGCTACA

GCATCAGACGTGGACTCTTCTACGTGGACTTTCTAAGCCAGGATAAGAAACTGTTGC

CAAAGTCTTCAGCCTTGTTCTACCAAAAGCTGATAGAGAAAAATGGCTTCCCTCCTT

TACCTGAAAATCAGCCCCTAGAAGGGACATTTCCCTGTGACTTTGCTTGGGGAATTG

TTGACAACTACATTCAAGTGGACACCACTCTGTCTCAGTTTACCGACCCGAACGTTT

[0015] ACCTGTGGGACGTCCATCACAGCAAGAGGCTGATTAAGGTGGACGGGCTGCGGGCC

AAGAAGAGGAAGCCCTACTGCGTGGACTTTGCCGCCATCGGGCCCCAGGTGGCCCT

GCTGCAGGAGATGCACGTCTCGCATTTTCACTTCTCGCTGGACTGGGCCCTGCTCCT

GCCGCTGGGCAACCAGTCCCGGGTGAACCACGCGGCCCTGCACTACTACGGCTGCG

TGGCCAGCGAGCTCCTGCGCGCCAACATCACCCCGGTGGTGGCGCTCTGGAGACCA

GCCGCTGCGCACCAGGGTCTGCCTGGACCGCTGGCACAGCGCGGTGCCTGGGAGAA

CCCACGCACCGCCCTGGCGTTCGCCGAGTACGCGCGCCTGTGCTTCCGCGCCCTGGG

CCGCCACGTCAAGGTGTGGATCACGCTGCGCGAGCCGCCCACGCGGAACCTGACGC

TCCGCGCCGGGCACAACCTGCTGCGGGCGCACGCGCTGGCCTGGCGCGTGTACGAC

GAGCAGTTCCGGGGCTCGCAGCAGGGGAAGGTGTCCATCGCCCTGCAGGCCGACTG

GGTGGAGCCCGCCTGCCCCTCCTCCCAGAAGGACCGCGAAGTGGCCGAGAGGGTTC

TGGAGTTCGACGTCGGCTGGCTGGCCGAGCCCATCTTCGGCTCCGGGGACTACCCGC

GGCTGATGCGCGACTGGCTCACCCGGAGAGACCATTCCCTCCTGCCCTATTTCACTG

ACGAAGAGAAGAGGCTAATCCGGGGTTCCTTTGACTTCCTGGCCTTGAGCCATTACA

CCACCATCCTCGTGGACTGGGAAAAGGAAGACCCAGTCAAATACAATGATTACCTG

GAAGTGCAGGAGATGACCGACATCACCTGGCTCAACTCCCCCAGTCAGGTGGCCGT

AGTGCCCTGGGGCCTGCGCAAAGTGCTCAACTGGCTCAAGTTCAAGTACGGAGACC

TCCCCATGTATATCGTATCCAACGGCATAGATGACGATCCGCGGGCAGCCCAGGACT

CGTTGAGGGTGTATTACATGCAGAACTATGTAAATGAAGCTCTGAAAGCCTACGTAT

TGGATGGTATCAATCTTTGTGGATACTTTGCCTACTCATTTAATGATCGCACAGCTCC

GAAGTTTGGCCTCTATCATTATGCTGCAAACCAGTTTGAGCCCAAACCGTCGGTGAA

GCATTACAGGAAAATTATTGACAACAATGGCTTCCCAGGCCCTGAAACTTTGGGGCG

GTTTTGTCCAGAGGAATTCACCCTGTGCACCGAATGCAGCTTTTTTCACACCCGAAA

GTCTTTACTGGCTTTCATAGCTTTCCTACTTTTTGCTTTTATTATTTCTCTTTCTCTGAT

[0016] TTTCTACTACTCTAGGAAAGGCAGAAGAAGTTATAAAGGAGGGAGTGGTGGGTCCG

ATTACAAAGATCACGATGGGGACTATAAAGATCACGACATCGACTATAAGGATGAC

[0017] GATGATAAATGATAG.

[0018] 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 하기와 같은 서열식별번호: 3에 상응하는 sTGFβR2 수용체 단백질의 아미노산 서열 (여기서, sTGFbR2 AA 서열은 IGG FC 도메인에서 굵게 표시된 서열이고, MGRGLLRGLWPLHIVLWTRIAST는 분비 신호임)과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

NNDMMVTDSNGVIKFPQLCKFCDVRSSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPHEVCLAVWRK

NDENITLETLCHDPKDTYHGIVLEDAASSKCIMKEKKVLGETFFMCSCSSDECNDYIIFSE

EYATNNPDLLLVIFQ**PKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIAR**

TPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGH

QDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLT

CLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRG

DTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK.

[0019]

[0020] 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 하기와 같은 서열식별번호: 4에 상응하는 sTGFβ-R2 단백질을 코딩하는 핵산 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성을 갖는다:

ATGGGTCGGGGGCTGCTCCGGGGCCTGTGGCCGCTGCATATCGTCCTGTGGACGCGC

ATCGCCAGCACGAATAATGACATGATGGTCACTGACAGCAATGGTGTCATCAAATTT

CCACAATTGTGTAAATTTTGTGATGTGAGATCTTCCACCTGTGACAACCAGAAATCT

TGCATGAGCAACTGCAGCATTACATCCATCTGTGAGAAGCCACATGAAGTCTGTCTG

GCTGTCTGGAGAAAGAATGATGAGAACATAACACTAGAGACTCTCTGCCATGACCC

CAAGGATACCTACCATGGAATTGTTCTCGAAGATGCTGCCTCTTCGAAGTGCATTAT

GAAAGAAAAGAAGGTGCTGGGGGAGACTTTCTTTATGTGTTCCTGTAGCTCCGACGA

GTGCAACGACTACATCATCTTCTCTGAAGAATATGCCACCAACAACCCTGACTTGTT

GTTAGTCATATTCCAACCCAAAAGAGAAAATGGAAGAGTTCCTCGCCCACCTGATTG

TCCCAAATGCCCAGCCCCTGAAATGCTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCC

GAAACCCAAGGACACCCTCTTGATTGCCCGAACACCTGAGGTCACATGTGTGGTGGT

GGATCTGGACCCAGAAGACCCTGAGGTGCAGATCAGCTGGTTCGTGGACGGTAAGC

AGATGCAAACAGCCAAGACTCAGCCTCGTGAGGAGCAGTTCAATGGCACCTACCGT

GTGGTCAGTGTCCTCCCCATTGGGCACCAGGACTGGCTCAAGGGGAAGCAGTTCAC

GTGCAAAGTCAACAACAAAGCCCTCCCATCCCCGATCGAGAGGACCATCTCCAAGG

CCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTATGTCCTGCCGCCATCCCGGGAGGAG

TTGAGCAAGAACACAGTCAGCTTGACATGCCTGATCAAAGACTTCTTCCCACCTGAC

ATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCAGGAGCCTGAGAGCAAGTACCGCAC

GACCCCGCCCCAGCTGGACGAGGACGGGTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCTCTGT

GGACAAGAGCCGCTGGCAGCGGGGAGACACCTTCATATGTGCGGTGATGCATGAAG

CTCTACACAACCACTACACACAGGAATCCCTCTCCCATTCTCCGGGTAAAGGAGGGA

GTGGTGGGTCCGATTACAAAGATCACGATGGGGACTATAAAGATCACGACATCGAC

[0021] TATAAGGATGACGATGATAAATGA.

[0022] 한 측면에 따라, 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질 및/또는 α클로토 단백질은 Ig Fc 도메인을 포함하는 Fc 융

합 단백질이다. 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 Fc 또는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 이의 아유형으로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0023] 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 하기와 같은 서열식별번호: 5에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성을 갖는 인간 Ig Fc 도메인이다:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG

PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY

NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR

DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK

[0024] SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK.

[0025] 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 하기와 같은 서열식별번호: 6에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성을 갖는 마우스 Ig Fc 도메인이다:

PRGPTIKPCPPCKCPAPNLEGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISW

FVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKAFACAVNNKDLPAPIERT

ISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKN

[0026] TEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK.

[0027] 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 하기와 같은 서열식별번호: 7에 상응하는 아미노산 서열과 적어도 85% 서열 동일성, 86% 서열 동일성, 87% 서열 동일성, 88% 서열 동일성, 89% 서열 동일성, 90% 서열 동일성, 91% 서열 동일성, 92% 서열 동일성, 93% 서열 동일성, 94% 서열 동일성, 95% 서열 동일성, 96% 서열 동일성, 97% 서열 동일성, 98% 서열 동일성, 99% 서열 동일성 또는 99.5% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성을 갖는 개 Ig Fc 도메인이다:

PKRENGRVPRPPDCPKCPAPEMLGGPSVFIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEV

QISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSP

IERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESK

[0028] YRTTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVMHEALHNHYTQESLSHSPGK.

[0029] 한 측면에 따라, α클로토 단백질 아미노산 서열 또는 sTGFβ-R2 단백질 아미노산 서열과 기재된 상동성 백분율을 갖는 아미노산 서열은 α클로토 단백질 또는 sTGFβ-R2 단백질에 대한 결정 구조를 수득하고 결합 또는 활성을 담당하는 활성 부위 또는 또는 부위들을 결정하고 유용한 결합 또는 활성을 유지하는 상동성 구조 백분율을 결정함으로써 결정될 수 있다. 비활성으로 확인되는 단백질 부분은 청구된 상동성 백분율을 갖는 단백질을 생성하기 위한 아미노산 치환 또는 변형 또는 돌연변이에 적합하다. 활성 부분은 또한 유용한 결합 또는 활성이 초래되는 정도로 변형되거나 치환되거나 돌연변이될 수 있다. 원하는 상동성 백분율을 갖는 Ig Fc 서열은 유사한 방식으로 결정될 수 있다. X-선 결정학적 확인을 이용하여 단백질-결합 부위를 결정하는 방법은 관련 기술 분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 문헌 (Newcomer et al., PNAS, Vol. 90, pp. 9223-9227 (October 1993))에 기재된 일반적인 방법을 포함하고, 이는 α클로토 단백질 또는 sTGFβ-R2 단백질에 대한 결합 부위를 결정하기 위해 통상의 기술자에 의해 사용되거나 변형될 수 있다. 하기와 같은 소프트웨어 프로그램을 이용하여 3D 구조, 결합 포켓, 터널 및 채널, 표면 특징 및 공극, 리간드 결합 부위 등을 결정할 수 있다: 메드-수모

(MED-SuMO) (메디트 (MEDIT)에 의해 배포됨), 트라프 (TRAPP) (독일 하이델베르그 이론 연구 연구소의 분자 및 세포 모델링 그룹), 카베르 (CAVER) (마사리크 대학교), 게콤 (GHECOM) (공개된 출처), 리그사이트시에스시 (LIGSITEcsc), 서프네트 (SURFNET), 사이트하운드 (SiteHound), 아이시엠-포켓파인더 (ICM-PocketFinder) (몰소프트 (Molsoft)), 사이트맵 (SiteMap) (슈뢰딩거 (Schrodinger)), 엠에스포켓 (MSPocket) (공개된 출처), 포카사 (POCASA) (홋카이도 대학교), 보이두 (VOIDOO), 푼폴드카 (FunFOLDQA) (레딩 대학교), 이파인드사이트 (eFindSite) (루이지애나 스태타 대학교), 사이트엔진 (SiteEngine) (텔-아비브 대학교) 및 스빌프_리간드 (SVILP_Ligand) (임페리얼 칼리지 런던). 유용한 데이터베이스는 sc-PDB (스트라스부르 대학교), CASTp, 포케톰 (Pocketome) (프로테인 데이터 뱅크 (Protein Data Bank)의 공-결정 구조로부터 실험적으로 확인할 수 있는 모든 약물 가능한 결합 부위의 입체형태 앙상블의 백과사전), PDBe 모티프 및 사이트, 리가사이트 (LigASite), 프로테인 서페이스 익스플로르알 (PROtein SURFace ExploreR), fPOP, 피디비사이트 (PDBSITE) (진네트웍스 (GeneNetworks)) 및 리그베이스 (LigBase) (UCSF)을 포함한다. 유용한 웹 서비스는 3디리간드사이트 (3DLigandSite) (런던 임페리얼 칼리지), 메타포켓 (metaPocket), 포크드럭 (PockDrug) (프랑스 유니버시티 파리-디드로), 포켓쿼리 (PocketQuery) (피츠버그 대학교), 파스 (PASS), 뎁스 (DEPTH), 더블유더블유더블유피디바인더 (wwwPDBinder) (이탈리아 로마 2 대학교), 이소미프 (IsoMIF) (캐나다 셔브룩 대학교), 리세 (LISE) (의생명과학 연구소, 시니카 아카데미), 사이트하운드-웹 (SiteHound-web) (뉴욕 마운트 시나이 의과대학 산체스 랩) 및 멀티바인드 (MultiBind) (텔-아비브 대학교 생물정보학 그룹)을 포함한다.

[0030] 본 개시내용의 측면은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터는 포유동물 세포에서 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결되고, 제2 프로모터는 포유동물 세포에서 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 세포 또는 조직 특이적이다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 구성적 또는 유도성이다.

[0031] 본 개시내용은 제약상 허용되는 부형제에 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터를 포함하는 제약 제형을 제공한다.

[0032] 도면을 포함하는 전술된 일반적인 설명, 및 하기의 상세한 설명은 단지 예시적이고 설명적이며 본 개시내용을 제한하지 않는다.

[0033] 본원에 사용된 섹션 제목은 조직적 목적만을 위한 것이며 설명된 주제를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0034] 본 개시내용과 관련하여, 본원에서의 설명에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 특별히 달리 정의되지 않는 한, 관련 기술분야에서 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 가질 것이다.

[0035] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 명백하게 달리 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상을 포함한다. 따라서, 예컨대 "단백질"에 대한 언급은 하나 초과의 단백질을 포함하고, "부형제"에 대한 언급은 하나 초과의 부형제를 포함한다.

[0036] 또한, "또는"의 사용은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 의미한다는 것을 이해해야 한다. 유사하게, "포함하다 (comprise, include)" 및 "포함하는 (comprising, including)"은 상호교환 가능하며 제한하려는 의도가 아니다. 또한, 다양한 실시양태의 설명이 용어 "포함하는"을 사용하는 경우, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 일부 특정 경우에 실시양태가 용어 "본질적으로 ~로 이루어지는" 또는 "~로 이루어지는"을 사용하여 대안적으로 설명될 수 있음을 이해할 것이다.

[0037] 본원에 사용된 "유전자"는 RNA와 같은 폴리뉴클레오티드를 발현하는, 전사된 영역으로도 지칭되는 핵산 영역을 지칭한다. 전사된 폴리뉴클레오티드는 기능적 단백질과 같은 폴리펩티드를 코딩하는 서열을 가질 수 있으며, 이는 적절한 조절 영역의 제어 하에 놓일 때 코딩된 폴리펩티드로 번역될 수 있다. 유전자는 프로모터, 5' 리더 서열, 코딩 서열 및 폴리아데닐화 부위와 같은 3' 비번역 서열과 같은 작동가능하게 연결된 여러 단편을 포함할 수 있다. 키메라 또는 재조합 유전자는, 예컨대 프로모터가 자연에서는 전사된 DNA 영역의 일부 또는 전부와 관련되지 않는 유전자와 같이 자연에서 정상적으로 발견되지 않는 유전자이다. "유전자의 발현"은 유전자가 RNA로 전사되고/되거나 기능적 단백질로 번역되는 과정을 지칭한다.

[0038] "유전자 전달" 또는 "유전자 전이"는 재조합 또는 외래 DNA를 숙주 세포에 도입하는 방법을 지칭한다. 전이된

DNA는 통합되지 않은 채로 남아 있거나 바람직하게는 숙주 세포의 게놈에 통합될 수 있다. 유전자 전달은, 예컨대 바이러스 벡터를 사용하는 형질도입에 의해 또는 전기천공법, 세포 충격과 같은 공지된 방법을 이용하는 세포 형질전환에 의해 발생할 수 있다.

[0039] "트랜스진"은 숙주 세포에 도입된 유전자를 지칭한다. 트랜스진은 세포에 고유한 서열, 세포에서 자연적으로 발생하지 않는 서열, 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. 트랜스진은 세포에서 코딩 서열의 발현을 위한 적절한 조절 서열에 작동가능하게 연결될 수 있는 하나 이상의 단백질을 코딩하는 서열을 함유할 수 있다.

[0040] "형질도입"은, 예컨대 rAAV와 같은 유전자 전달 벡터에 의한 핵산 분자의 수용 숙주 세포로의 전달을 지칭한다. 예컨대, rAAV 비리온에 의한 표적 세포의 형질도입은 그 비리온에 함유된 rAAV 벡터의 형질도입된 세포로의 전달을 유도한다. "숙주 세포" 또는 "표적 세포"는 핵산 전달이 일어나는 세포를 지칭한다.

[0041] "기능적 단백질"은 전장 단백질의 변이체, 돌연변이물, 상동체 및 기능적 단편을 포함한다. 통상의 기술자는 본 개시내용에 기초하여 전장 단백질의 활성을 전체적으로 또는 부분적으로 보유하는 전장 단백질에 상동성인 단백질을 용이하게 구축할 수 있을 것이다.

[0042] "벡터"는 일반적으로 뉴클레오티드 서열의 클로닝 및 발현에 적합한 핵산 구축물을 지칭한다. 벡터의 한 예는 바이러스 벡터이다. 용어 벡터는 또한 때때로 숙주 세포 내로 및 숙주 세포 사이에서 벡터를 전이할 수 있는 바이러스 또는 비리온과 같은 벡터를 포함하는 수송 비히클을 지칭할 수 있다.

[0043] "AAV 벡터" 또는 "rAAV 벡터"는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, AAvDJ, AAVrh10.XX 등과 같은 아데노-연관된 바이러스 혈청형에서 유래되는 재조합 벡터를 지칭한다. rAAV 벡터는 하나 또는 바람직하게는 모든 야생형 AAV 유전자가 결실될 수 있지만, 여전히 기능적 ITR 핵산 서열을 포함한다. 기능적 ITR 서열은 AAV 비리온의 복제, 구조 및 패키징에 필요하다. ITR 서열은 야생형 서열 또는 실질적으로 동일한 서열 (하기 정의됨)일 수 있거나, 기능적으로 남아 있는 한, 예컨대 뉴클레오티드의 삽입, 돌연변이, 결실 또는 치환에 의해 변경될 수 있다.

[0044] "치료 유효량"은 골관절염 및 관련된 질환 또는 병태에 대한 결과와 같은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 파르보바이러스 비리온 또는 제약 조성물의 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별 및 체중과 같은 요인, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 파르보바이러스 비리온 또는 제약 조성물의 능력에 따라 달라질 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다. 치료 유효량은 또한 전형적으로 파르보바이러스 비리온 또는 제약 조성물의 임의의 독성 또는 유해한 효과보다 치료학적으로 유익한 효과가 더 큰 양이다.

[0045] "예방 유효량"은 골관절염의 방지 또는 억제와 같은 원하는 예방적 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 및 기간 동안 효과적인 양을 지칭한다. 예방 용량은 질환 이전 또는 질환의 초기 단계에 있는 대상체에서 사용될 수 있고, 예방 유효량은 일부 경우에 치료 유효량보다 많거나 적을 수 있다.

[0046] "핵산"은 단량체성 뉴클레오티드로 구성되거나 이를 포함하는 임의의 분자를 포함한다. 용어 "뉴클레오티드 서열"은 본원에서 "핵산"과 상호교환적으로 사용될 수 있다. 핵산은 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 핵산은 DNA 또는 RNA일 수 있다. 핵산은 유전자일 수 있다. 핵산은 화학적으로 변형되거나 인공적일 수 있다. 인공 핵산은 펩티드 핵산 (PNA), 모르폴리노 및 잠금 핵산 (LNA) 뿐만 아니라 글리콜 핵산 (GNA) 및 트레오스 핵산 (TNA)을 포함한다. 이들 각각은 분자의 골격에 대한 변화에 의해 자연-발생 DNA 또는 RNA와 구별된다. 또한, 포스포로티오에이트 뉴클레오티드가 사용될 수 있다.

[0047] "핵산 구축물"은 본원에서 재조합 DNA 기술의 이용으로부터 생성되는 인공 핵산 분자를 의미하는 것으로 이해된다. 핵산 구축물은 단일-가닥 또는 이중-가닥의 핵산 분자로, 달리는 자연에 존재하지 않는 방식으로 조합 및 병치된 핵산 분절을 함유하도록 변형되었다. 핵산 구축물은 일반적으로 "벡터", 즉 외인적으로 생성된 DNA를 숙주 세포로 전달하는데 사용되는 핵산 분자이다. 핵산 구축물의 한 유형은 "발현 카세트" 또는 "발현 벡터"이다. 이들 용어는 이러한 서열과 적합한 숙주 세포 또는 숙주 유기체에서 유전자의 발현을 달성할 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 발현 카세트 또는 발현 벡터는 전형적으로 적어도 적합한 전사 조절 서열 및 임의적으로 3' 전사 종결 신호를 포함한다. 발현을 달성하는데 필요하거나 도움이 되는 추가 인자, 예컨대 발현 인핸서 요소가 또한 존재할 수 있다. 핵산 구축물은 또한 DNA 대신 RNA로 작동하여 단백질의 발현 또는 억제를 지시하는 벡터일 수 있다. 표적 단백질의 발현을 증가시키는 경우에, 핵산 구축물은 세포 또는 보다 구체적으로 리보좀이 인식하고 많은 카피의 단백질을 생성하는 mRNA 또는 유사물일 수 있다. 표적 서열의 발현을 억제하는 경우, RNA는 리보좀이 단백질을 생성하는 것을 방지하는 역할을 하는 형태일 수 있다. 이는 RNAi 또는

shRNA 또는 miRNA 또는 Pri-miRNA의 메커니즘을 통해 수행될 수 있다. 특정 측면에 따라, 표적 서열의 공지된 억제인자를 억제하는 것은 표적 서열을 조절하기 위한 mRNA (또는 유사체) 또는 shRNA (또는 유사체)의 전달을 통한 억제를 통해 표적 서열의 증가를 초래할 수 있다. 이는 또한 AAV를 사용할 때와 같이 발현되는 DNA를 제공하는 벡터를 통해서 수행될 수 있다.

[0048] "작동가능하게 연결된"은 기능적 관계에서 폴리뉴클레오티드 (또는 폴리펩티드) 요소의 연결을 지칭한다. 핵산은 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동가능하게 연결"된다. 예컨대, 전사 조절 서열은 코딩 서열의 전사에 영향을 미치는 경우 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 작동가능하게 연결된 것은 연결되는 DNA 서열이 전형적으로 인접하며 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하는데 필요한 경우 인접하고 판독 프레임에 있음을 의미한다.

[0049] "발현 제어 서열"은 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열의 발현을 조절하는 핵산 서열을 지칭한다. 발현 제어 서열은 발현 제어 서열이 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 번역을 제어 및 조절할 때 뉴클레오티드 서열에 "작동가능하게 연결"된다. 따라서, 발현 제어 서열은 프로모터, 인핸서, 내부 리보좀 진입 부위 (IRES), 전사 터미네이터, 단백질-코딩 유전자 앞의 개시 코돈, 인트론에 대한 스플라이싱 신호, 2A 펩티드 서열 (멀티시스트론 발현을 허용함) 및 정지 코돈을 포함할 수 있다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질 및 α클로토를 코딩하는 제1 및 제2 핵산 서열은 폴리시스트론성 요소에 의해 분리된다. 폴리시스트론 요소는 일반적으로 동일한 RNA 분자 내에서 하나 초과의 폴리펩티드를 각기 코딩할 수 있는 메신저 RNA 유형을 설명하는 것으로 이해된다. 용어 "발현 제어 서열"은 최소한 그 존재가 발현에 영향을 미치도록 설계된 서열을 포함하도록 의도되고, 또한 추가적인 유리한 성분을 포함할 수 있다. 예컨대, 리더 서열 및 융합 파트너 서열은 발현 제어 서열이다. 용어는 또한 바람직하지 않은 프레임 안팎의 잠재적 개시 코돈이 서열로부터 제거되도록 핵산 서열의 설계를 포함할 수 있다. 이는 또한 바람직하지 않은 잠재적인 스플라이스 부위가 제거되도록 핵산 서열의 설계를 포함할 수 있다. 이는 폴리A 서열로 지칭될 수 있는 폴리A 테일, 즉 mRNA의 3'-말단에 있는 일련의 아데닌 잔기의 추가를 지시하는 서열 또는 폴리아데닐화 서열 (pA)를 포함한다. 이는 또한 mRNA 안정성을 향상시키도록 설계될 수 있다. 전사 및 번역 안정성에 영향을 미치는 발현 제어 서열, 예컨대 프로모터 뿐만 아니라 번역에 영향을 미치는 서열, 예컨대 곤충 세포에서 사용하기에 적합한 코자크 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다. 발현 제어 서열은 더 낮은 발현 수준 또는 더 높은 발현 수준이 달성되도록 작동가능하게 연결된 뉴클레오티드 서열을 조정하는 것과 같은 성질일 수 있다.

[0050] 이미 공지된 단백질에 기능적 도메인을 융합할 수도 있다. 이는 미토콘드리아 신호가 CAT (카탈라제)에 융합되어 카탈라제가 미토콘드리아로 셔틀되어 이의 천연 위치 대신 미토콘드리아 내부 또는 근처에서 기능을 수행하도록 표적화되는 경우이다. 다른 단백질에 표적화 신호를 추가하여 세포의 다른 부분을 표적으로 하거나 심지어 세포에서 분비되도록 할 수도 있다. 일부 단백질의 경우, 더 우수한 공지된 버전이 TGFbR2에 대한 인간 또는 마우스 분비 신호를 취하고 이를 개 버전의 단백질에 융합하는 것과 같이 향상된 효과를 위해 천연 서열을 대체할 수 있다.

[0051] "프로모터" 또는 "전사 조절 서열"은 하나 이상의 코딩 서열의 전사를 제어하는 기능을 하는 핵산 단편을 지칭하며, 코딩 서열의 전사 개시 부위의 전사 방향에 대해 상류에 위치되고, DNA-의존적 RNA 폴리머라제에 대한 결합 부위, 전사 개시 부위, 및 전사 인자 결합 부위, 억제인자 및 활성인자 단백질 결합 부위를 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 다른 DNA 서열, 및 예컨대 어테뉴에이터 또는 인핸서, 또한 사일런서를 포함한 프로모터로부터 전사의 양을 직접적으로 또는 간접적으로 조절하는 역할을 하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 다른 뉴클레오티드 서열의 존재에 의해 구조적으로 확인된다. "구성적" 프로모터는 대부분의 생리학적 및 발달 조건 하에서 대부분의 조직에서 활성인 프로모터이다. "유도성" 프로모터는, 예컨대 화학적 유도제의 적용에 의해 생리학적으로 또는 발달적으로 조절되는 프로모터이다. "조직 특이적" 프로모터는 특정 유형의 조직 또는 세포에서만 활성이다. 본 개시내용은 포유동물 세포-적합성 발현 제어 서열, 예컨대, 프로모터에 대한 핵산 구축물의 작동 가능한 연결을 제공한다. 많은 이러한 프로모터가 관련 기술분야에 공지되어 있다 (참조: Sambrook and Russell, 2001, 상기 참조). CMV 및 hEf1α 프로모터와 같은 많은 세포 유형에서 광범위하게 발현되는 구성적 프로모터가 개시되어 있다. 더 짧지만 여전히 효과적인 구성적 발현을 제공하는 전장 hEf1α의 변형이 또한 개시되어 있다. 유도성, 조직-특이적, 세포-유형-특이적, 또는 세포 주기-특이적 프로모터가 개시되어 있다. 개시된 실시양태에서, 포르포빌리노겐 데아미나제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 간-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 간-특이적 프로모터는 비-에리스로이드 데아미나제와 함께 사용하기에 특히 바람직하다. 바람직하게는, 본 개시내용의 구축물에서 간-특이적 발현을 위한 발현 제어 서열은, 예컨대 α1-항-트립신 (AAT) 프로모터, 갑상선 호르몬-결합 글로불린 프로모터, 알부민 프로모터, 티록신-결합 글로

불린 (TBG) 프로모터, 간 제어 영역 (HCR)-ApoCII 하이브리드 프로모터, HCR-hAAT 하이브리드 프로모터, 마우스 알부민 유전자 인핸서 (Ealb) 요소와 조합된 AAT 프로모터 및 아포지단백질 E 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 예는 종양-선택적, 특히 신경 세포 종양-선택적 발현을 위한 E2F 프로모터 (Parr et al., (1997) *Nat. Med.* 3:1145-9) 또는 단핵 혈액 세포에 사용하기 위한 IL-2 프로모터 (Hagenbaugh et al., (1997) *J Exp Med;* 185: 2101-10)를 포함한다.

[0052] "3' UTR" 또는 "3' 비-번역 서열" (종종 3' 비번역 영역 또는 3' 말단으로도 지칭됨)은 유전자의 코딩 서열의 하류에서 발견되는 핵산 서열을 지칭하며, 이는, 예컨대 전사 종결 부위 및 (모든 진핵생물 mRNA는 아니지만 대부분에서) 폴리아데닐화 신호 (예컨대, AAUAAA 또는 이의 변이체)를 포함한다. 전사 종결 후, mRNA 전사체는 폴리아데닐화 신호의 하류에서 절단될 수 있고 폴리(A) 테일이 추가될 수 있으며, 이는 mRNA를 세포질 (번역이 일어나는 곳)로 수송하는데 관여한다.

[0053] 본원에 사용된 "자연 발생 서열" 또는 "천연 서열"은 자연 발생 공급원으로부터 단리되는 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산을 지칭한다. "천연 서열"에는 천연 형태와 동일한 서열을 갖는 천연 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드의 재조합 형태가 포함된다.

[0054] 본원에 사용된 "돌연변이체" 또는 "변이체"는 치환, 삽입 및/또는 결실에 의해 변경된 아미노산 또는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 돌연변이체 또는 변이체 서열은 모 서열과 비교하여 증가, 감소 또는 실질적으로 유사한 활성 또는 특성을 가질 수 있다.

[0055] "서열 동일성 백분율 " 및 "상동성 백분율"은 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 간의 비교를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 비교 창에서 2개의 최적으로 정렬된 서열을 비교함으로써 결정되고, 여기서 비교 창에서 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 일부는 2개의 서열의 최적 정렬을 위한 참조 서열과 비교하여 추가 또는 결실 (즉, 갭)을 포함할 수 있다. 백분율은 두 서열에서 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 발생하는 위치의 수를 결정하여 일치된 위치의 수를 산출하고, 일치된 위치의 수를 비교 창의 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 대안적으로, 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 두 서열 모두에서 발생하거나 핵산 염기 또는 아미노산 잔기가 일치된 위치의 수를 산출하도록 갭과 함께 정렬되는 위치의 수를 결정하고, 일치된 위치의 수를 비교 창의 위치의 총 수로 나누고, 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 2개의 서열을 정렬하는데 이용 가능한 많은 확립된 알고리즘이 있음을 인식한다. 비교를 위한 서열의 최적 정렬은, 예컨대 문헌 (Smith and Waterman, (1981) Adv. Appl. Math. 2:482)의 국소적 상동성 알고리즘에 의해, 문헌 (Needleman and Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443)의 상동성 정렬 알고리즘에 의해, 문헌 (Pearson and Lipman, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444)의 유사성 방법에 대한 연구에 의해, 이들 알고리즘의 컴퓨터화 구현에 의해 (GAP, BESTFIT, FASTA, and TFASTA), 또는 육안 검사에 의해 (일반적으로, 문헌 (Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., eds., Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement)) 참조) 수행될 수 있다.

[0056] 서열 동일성 및 서열 유사성 백분율을 결정하는데 적합한 알고리즘의 예는 각각 문헌 (Altschul et al., (1990), J. Mol. Biol. 215: 403-410) 및 문헌 (Altschul et al., (1977) Nucleic Acids Res. 3389-3402)에 기재된 블라스트 (BLAST) 및 블라스트 2.0 알고리즘이다. 블라스트 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 국립생명공학 정보 센터 웹사이트를 통해 공개적으로 이용 가능하다. 이 알고리즘은 먼저 데이터베이스 서열에서 동일한 길이의 단어와 정렬될 때 일부 양의 값 역치 점수 T와 일치하거나 이를 만족하는 쿼리 서열에서 길이 W의 짧은 단어를 확인하여 고득점 서열 쌍 (HSP)을 확인하는 것을 수반한다. T는 이웃 단어 점수 역치로 지칭된다 (Altschul et al, 상기 참조). 이들 초기 이웃 단어 히트는 검색을 시작하여 이를 함유하는 더 긴 HSP를 찾기 위한 시드 역할을 한다. 이어서, 누적 정렬 점수가 증가할 수 있는 한 단어 히트는 각각의 서열을 따라 양방향으로 확장된다. 누적 점수는 뉴클레오티드 서열에 대해 파라미터 M (일치하는 잔기 쌍에 대한 보상 점수, 항상 >0) 및 N (불일치하는 잔기에 대한 벌점 점수, 항상 <0)을 사용하여 계산된다. 아미노산 서열의 경우, 득점 매트릭스를 사용하여 누적 점수를 계산한다. 누적 정렬 점수가 최대 달성 값으로부터 수량 X만큼 떨어지거나; 하나 이상의 음수-득점 잔기 정렬의 누적으로 인해 누적 점수가 0 이하가 되거나; 서열의 끝에 도달하는 경우, 각각의 방향으로의 단어 히트의 확장이 중단된다. 블라스트 알고리즘 파라미터 W, T 및 X는 정렬의 민감도 및 속도를 결정한다. 블라스튼 (BLASTN) 프로그램 (뉴클레오티드 서열용)은 디폴트로서 단어 길이 (W) 11, 기대값 (E) 10, M=5, N=-4, 및 두 가닥의 비교를 사용한다. 아미노산 서열의 경우, 블라스트프 (BLASTP) 프로그램은 디폴트로서 단어 길이 (W) 3, 기대값 (E) 10, 블로섬62 (BLOSUM62) 득점 매트릭스를 사용한다 (참조:

Henikoff and Henikoff, (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915).

[0057] 아미노산 서열 동일성 백분율의 정도는 또한 정렬에서 동일한 일치의 수를 계산하고 이러한 동일한 일치의 수를 참조 서열의 길이로 나누고 다음 디폴트 클로스털더블유 (ClustalW) 파라미터를 사용하여 느린/정확한 쌍별 최적 정렬을 달성함으로써 클로스털더블유 분석 (버전 W 1.8)에 의해 얻을 수 있다 - 갭 오픈 패널티: 10; 갭 확장 패널티: 0.10; 단백질 중량 매트릭스: 코네트 (Gonnet) 시리즈; DNA 중량 매트릭스: IUB; 토글 (Toggle) 느린/빠른 쌍별 정렬 = 슬로우 (SLOW) 또는 풀 (FULL) 정렬.

[0058] "대상체" 또는 "환자"는 비-영장류 동물 (예컨대, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 등) 또는 영장류 (예컨대, 원숭이 또는 인간)와 같은 포유동물을 지칭한다. 포유동물은 개, 고양이, 마우스, 소, 양, 염소, 말, 또는 돼지와 같은 가축일 수 있다. 포유동물은 인간 대상체일 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간은 성인 환자이다. 일부 실시양태에서, 인간은 소아 환자이다.

[0059] **기능적 단백질을 코딩하는 핵산의 전달**

[0060] 대안적으로, 이종 핵산 (즉, 세포의 천연 핵산 조성의 일부가 아닌 것)으로 지칭되는 외래 핵산은 이러한 도입에 대해 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 임의의 방법을 이용하여 세포에 도입될 수 있다. 이러한 방법은 형질감염, 형질도입, 바이러스 형질도입, 마이크로주사, 리포펙션, 뉴클레오펙션, 나노입자 충격, 형질전환, 접합 등을 포함한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본 개시내용에 기초하여 쉽게 확인할 수 있는 문헌 출처를 사용하여 이러한 방법을 쉽게 이해하고 적용할 것이다. 외래 핵산은, 예컨대 정맥내 투여 또는 주사, 관절내 연골 투여 또는 주사, 복강내 투여 또는 주사, 근육내 투여 또는 주사, 두개내 투여 또는 주사, 안내 투여 또는 주사, 피하 투여 또는 주사, 본원에 기재된 바와 같은 핵산 또는 핵산을 포함하는 벡터에 의해 대상체에게 전신적으로 투여하는 것과 같이 대상체에게 투여함으로써 대상체에게 전달될 수 있다.

[0061] 유전자 요법 방법 및 예컨대 아데노-연관된 바이러스를 사용하여 대상체에 유전자를 전달하는 방법은 US 6,967,018, WO2014/093622, US2008/0175845, US 2014/0100265, EP2432490, EP2352823, EP2384200, WO2014/127198, WO2005/122723, WO2008/137490, WO2013/142114, WO2006/128190, WO2009/134681, EP2341068, WO2008/027084, WO2009/054994, WO2014059031, US 7,977,049 and WO 2014/059029에 기재되어 있으며, 이들 각각은 전체, 특히 각각의 특허 또는 특허 출원에 기재된 대상체에게 유전자 전달을 설명하는 방법이 참조로 본원에 포함된다.

[0062] **벡터**

[0063] 벡터는 본원에 기재된 방법 및 구축물과 함께 사용하기 위해 고려된다. 용어 "벡터"는 연결된 또 다른 핵산을 수송할 수 있는 핵산 분자를 포함한다. 본원에 기재된 바와 같이 핵산을 세포에 전달하는데 사용되는 벡터는 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고 이러한 목적을 위해 사용되는 벡터를 포함한다. 특정한 예시적인 벡터는 특히 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 플라스미드, 렌티바이러스, 및 아데노-연관된 바이러스를 포함한다. 벡터는 단일-가닥, 이중 가닥, 또는 부분적으로 이중-가닥인 핵산 분자; 하나 이상의 유리 말단을 포함하거나 유리 말단은 포함하지 않는 (예컨대, 원형) 핵산 분자; DNA, RNA 또는 둘 다를 포함하는 핵산 분자; 및 관련 기술분야에 공지된 다른 종류의 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 벡터의 한 유형은, 예컨대 표준 분자 클로닝 기술에 의해 추가 DNA 분절이 삽입될 수 있는 원형 이중 가닥 DNA 루프를 지칭하는 "플라스미드"이다. 또 다른 유형의 벡터는 바이러스 벡터이며, 여기서 바이러스-유래된 DNA 또는 RNA 서열은 바이러스, 예컨대 레트로바이러스, 렌티바이러스, 복제 결함 레트로바이러스, 아데노바이러스, 복제 결함 아데노바이러스, 및 아데노-연관된 바이러스로 패키징하기 위해 벡터에 존재한다. 바이러스 벡터는 또한 숙주 세포로의 형질감염을 위해 바이러스에 의해 운반되는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 특정 벡터는 이들이 도입된 숙주 세포에서 자율 복제할 수 있다 (예컨대, 박테리아 복제 기점을 갖는 박테리아 벡터 및 에피솜 포유동물 벡터). 다른 벡터 (예컨대, 비-에피솜 포유동물 벡터)는 숙주 세포에 도입 시 숙주 세포의 게놈으로 통합되어 숙주 게놈과 함께 복제된다. 또한, 특정 벡터는 작동가능하게 연결된 유전자의 발현을 지시할 수 있다. 이러한 벡터는 본원에서 "발현 벡터"로 지칭된다. 재조합 DNA 기술에서 유용한 일반적인 발현 벡터는 종종 플라스미드 형태이다. 재조합 발현 벡터는 숙주 세포에서 핵산의 발현에 적합한 형태로 본 발명의 핵산을 포함할 수 있으며, 이는 재조합 발현 벡터가 발현에 사용될 숙주 세포에 기초하여 선택될 수 있고 발현될 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소를 포함함을 의미한다. 재조합 발현 벡터 내에서, "작동가능하게 연결된"은 관심 뉴클레오티드 서열이 (예컨대, 시험관내 전사/번역 시스템에서 또는 벡터가 숙주 세포에 도입될 때 숙주 세포에서) 뉴클레오티드 서열의 발현을 허용하는 방식으로 조절 요소(들)에 연결됨을 의미하는 것으로 의도된다.

[0064] 핵산 또는 천연 DNA 결합 단백질, 천연 가이드 RNA 또는 다른 천연 종의 비-바이러스 전달 방법은 리포펙션, 마이크로주사, 바이오리스틱스, 바이로좀, 리포좀, 면역리포좀, 폴리양이온 또는 지질:핵산 접합체, 네이키드 DNA, 인공 비리온, 및 작용제-향상된 DNA 흡수를 포함한다. 리포펙션은, 예컨대 미국 특허 번호 5,049,386, 4,946,787; 및 4,897,355 (본원에 참조로 포함됨)에 기재되어 있다. 리포펙션 시약은 또한 상업적 공급원 (예컨대, 트랜스펙탐 (Transfectam)™ 및 리포펙틴 (Lipofectin)™)에서 입수 가능하다. 폴리뉴클레오티드의 효율적인 수용체-인식 리포펙션에 적합한 양이온성 및 중성 지질은 펠그너 (Felgner)의 WO 91/17424; WO 91/16024의 것을 포함한다. 전달은 세포 (예컨대, 시험관내 또는 생체외 투여) 또는 표적 조직 (예컨대, 생체내 투여)으로의 것일 수 있다. 용어 천연은 단백질, 효소, 또는 가이드 RNA 종 자체를 포함하며 종을 코딩하는 핵산은 포함하지 않는다.

[0065] 일부 실시양태에서, 본원에서의 방법에 사용하기 위한 유전자 요법 벡터는 포유동물 세포에서 포르포빌리노겐 데아미나제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열의 도입 및/또는 발현을 위한 벡터로 사용하기 위한 파르보바이러스 벡터, 예컨대 동물 파르보바이러스, 특히 데펜도바이러스, 예컨대 감염성 인간 또는 유인원 아데노-연관된 바이러스 (AAV) 및 이의 성분 (예컨대, 동물 파르보바이러스 게놈)이다. 파르보비리대 (Parvoviridae) 과의 바이러스는 작은 DNA 동물 바이러스이다. 파르보비리대 과는 척추동물을 감염시키는 파르보비리내 (Parvovirinae) 및 곤충을 감염시키는 덴소비리내 (Densovirinae)의 두 아과로 나뉠 수 있다. 파르보비리내 아과의 구성원은 본원에서 파르보바이러스로 지칭되고, 데펜도바이러스 (Dependovirus) 속을 포함한다. 속명에서 유추될 수 있는 바와 같이, 데펜도바이러스의 구성원은 일반적으로 세포 배양에서 생산적인 감염을 위해 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스와 같은 헬퍼 바이러스와의 동시감염이 필요하다는 점에서 독특하다. 데펜도바이러스 속은 일반적으로 인간 (예컨대, 혈청형 1, 2, 3A, 3B, 4, 5, 6) 또는 영장류 (예컨대, 혈청형 1 및 4)를 감염시키는 AAV 및 다른 온혈 동물을 감염시키는 관련된 바이러스 (예컨대, 소, 개, 말, 및 양 아데노-연관된 바이러스)를 포함한다. 파르보바이러스 및 파르보비리대의 다른 구성원에 대한 추가 정보는 문헌 (Kenneth 1. Berns, "Parvoviridae: The Viruses and Their Replication," Chapter 69 in Fields Virology (3d Ed. 1996)에 기재되어 있다. 편의를 위해 본 발명은 AAV를 참조하여 본원에 추가로 예시되고 설명된다. 그러나, 본 발명은 AAV에 제한되지 않고 다른 파르보바이러스에도 동일하게 적용될 수 있음이 이해된다.

[0066] 공지된 모든 AAV 혈청형의 게놈 구성은 매우 유사하다. AAV의 게놈은 길이가 약 5,000개 미만의 뉴클레오티드 (nt)인 선형의 단일 가닥 DNA 분자이다. 역위 말단 반복부 (ITR)는 비-구조적 복제 (Rep) 단백질 및 구조적 (VP) 단백질에 대한 고유한 코딩 뉴클레오티드 서열의 측면에 있다. VP 단백질 (VP1, -2 및 -3)은 캡시드를 형성한다. 말단 145nt는 자가-상보적이며 T-형 헤어핀을 형성하는 에너지적으로 안정한 분자내 듀플렉스를 형성할 수 있도록 구성된다. 이들 헤어핀 구조는 세포 DNA 폴리머라제 복합체에 대해 프라이머의 역할을 하는 바이러스 DNA 복제를 위한 기점으로 기능한다. 포유동물 세포에서 야생형 (wt) AAV 감염 후, Rep 유전자 (즉, Rep78 및 Rep52)는 각각 P5 프로모터 및 P19 프로모터로부터 발현되고, 두 Rep 단백질은 바이러스 게놈의 복제에 기능을 갖는다. Rep ORF의 스플라이싱 이벤트는 실제로 4개의 Rep 단백질 (즉, Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40)의 발현을 초래한다. 그러나, 포유동물 세포에서 Rep78 및 Rep52 단백질을 코딩하는 스플라이싱되지 않은 mRNA는 AAV 벡터 생성에 충분한 것으로 나타났다. 또한, 곤충 세포에서 Rep78 및 Rep52 단백질은 AAV 벡터 생성에 충분하다.

[0067] 본원에서 "재조합 파르보바이러스" 또는 "AAV 벡터" 또는 "rAAV 벡터"는 하나 이상의 관심 폴리뉴클레오티드 서열, 관심 유전자 또는 적어도 하나의 파르보바이러스 또는 AAV 역위 말단 반복부 서열 (ITR)이 측면에 있는 "트랜스진"을 포함하는 벡터를 지칭한다. 이러한 rAAV 벡터는 AAV rep 및 cap 유전자 생성물 (즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 곤충 숙주 세포에 존재할 때 감염성 바이러스 입자로 복제 및 패키징될 수 있다. rAAV 벡터가 더 큰 핵산 구축물 (예컨대, 염색체 또는 클로닝 또는 형질감염에 사용되는 플라스미드 또는 배큘로바이러스와 같은 또 다른 벡터)에 통합되는 경우, rAAV 벡터는 전형적으로 AAV 패키징 기능 및 필요한 헬퍼 기능의 존재 하에서 복제 및 캡슐화에 의해 "구조"될 수 있는 "프로-벡터 (pro-vector)"로 지칭된다. 따라서, 추가 측면에서, 본 발명은 본원에서 상기 정의된 바와 같은 포르포빌리노겐 데아미나제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 구축물에 관한 것이며, 여기서 핵산 구축물은 재조합 파르보바이러스 또는 AAV 벡터이고, 따라서 적어도 하나의 파르보바이러스 또는 AAV ITR을 포함한다. 바람직하게는, 핵산 구축물에서 포르포빌리노겐 데아미나제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 양쪽에 파르보바이러스 또는 AAV ITR이 측면에 있다.

[0068] AAV는 많은 포유동물 세포를 감염시킬 수 있다. 예컨대, 문헌 (Tratschin et al., (1985) *Mol. Cell Biol.* 5:3251-3260) and Grimm et al., (1999) *Hum. Gene Ther.* 10:2445-2450))을 참조한다. 그러나, 인간 활막 섬유모세포의 AAV 형질도입은 유사한 뮤린 세포에서보다 훨씬 더 효율적이며 (Jennings et al., (2001)

Arthritis Res, 3:1), AAV의 세포 트로피시티 (tropicity)는 혈청형에 따라 다르다. 예컨대, 포유동물 CNS 세포 향성 및 형질도입 효율과 관련하여 AAV2, AAV4, and AAV5 간의 차이를 논의하는 문헌 (Davidson et al. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:3428-3432) 및 AAV 향성의 변형에 대한 접근법을 논의하는 문헌 (Goncalves, (2005) *Virol J.* 2(1):43)을 참조한다. 일부 실시양태에서, 간 세포의 형질도입을 위해, AAV1, AAV8 및 AAV5 캡시드 단백질을 갖는 rAAV 비리온이 바람직하며 (Nathwani et al., (2007) *Blood* 109(4):1414-1421; Kitajima et al., (2006) *Atherosclerosis* 186(1):65-73), 그 중 AAV5 캡시드 단백질을 갖는 rAAV 비리온이 가장 바람직할 수 있다.

[0069] AAV는 인간 집단 내에서 매우 널리 퍼져 있으며 (참조: Gao, G., et al., (2004) *J Virol.* 78(12):6381-8; and Boutin, S., et al., (2010) *Hum Gene Ther.* 21(6):704-12), 바이러스 벡터로서 유용하다. 많은 혈청형이 존재하며, 각각은 조직 유형에 대해 상이한 향성을 가지며 (참조: Zincarelli, C., et al., (2008) *Mol Ther.* 16(6):1073-80), 이는 특정 조직이 적절한 슈도타이핑으로 우선적으로 표적화되도록 한다. 혈청형 8, 9 및 rh10과 같은 일부 혈청형은 포유동물의 신체를 형질도입한다 (참조: Zincarelli, C., et al., (2008) *Mol Ther.* 16(6):1073-80, Inagaki, K., et al., (2006) *Mol Ther.* 14(1):45-53; Keeler, A.M., et al., (2012) Mol Ther. 20(6):1131-8; Gray, S.J. et al., (2011) Mol Ther. 19(6):1058-69; Okada, H., et al., (2013) *Mol Ther Nucleic Acids*. 2:e95; and Foust, K.D., et al., (2009) *Nat Biotechnol*. 27(1):59-65). AAV9는 많은 바이러스 벡터 및 생물제제가 접근하기 어려운 혈액-뇌 장벽을 통과하는 것으로 입증되었다 (참조: Foust, K.D., et al., (2009) *Nat Biotechnol.* 27(1):59-65; and Rahim, A.A. et al., (2011) *FASEB J.* 25(10):3505-18). 특정 AAV는 바이러스 패키징을 위해 시스에 필요한 바이러스 역위 말단 반복부 (ITR)를 포함하는 4.7-5.0 kb의 페이로드를 갖는다 (참조: Wu, Z. et al., (2010) Mol Ther. 18(1):80-6; and Dong, J.Y. et al., (1996) *Hum Gene Ther.* 7(17):2101-12; 모든 공개문은 참조로 본원에 포함됨).

[0070] AAV VP 단백질은 AAV 비리온의 세포 트로피시티를 결정하는 것으로 공지되어 있다. VP 단백질-코딩 서열은 상이한 AAV 혈청형 중에서 Rep 단백질 및 유전자보다 훨씬 덜 보존된다. 다른 혈청형의 상응하는 서열을 교차-보완하는 Rep 및 ITR 서열의 능력은 하나의 혈청형 (예컨대, AAV5)의 캡시드 단백질 및 또 다른 AAV 혈청형 (예컨대, AAV2)의 Rep 및/또는 ITR 서열을 포함하는 슈도타이핑된 rAAV 입자의 생성을 가능하게 한다. 이러한 슈도타이핑된 rAAV 입자는 본 발명의 일부이다. 본원에서, 슈도타이핑된 rAAV 입자는 "x/y" 유형인 것으로 지칭될 수 있으며, 여기서 "x"는 ITR의 공급원을 나타내고 "y"는 캡시드의 혈청형을 나타내며, 예컨대 2/5 rAAV 입자는 AAV2로부터의 ITR 및 AAV5로부터의 캡시드를 갖는다. 변형된 "AAV" 서열은 또한 본 개시내용의 맥락에서, 예컨대 곤충 세포에서 rAAV 벡터의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 변형된 서열은, 예컨대 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV 10, AAV11, AAV12, AAV2.5, AAvDJ, AAVrh10.XX와 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 그 초과의 뉴클레오티드 및/또는 아미노산 서열 동일성을 갖는 서열 (예컨대, 약 75% 내지 약 99% 뉴클레오티드 서열 동일성을 갖는 서열)을 포함한다. ITR, Rep, 또는 VP는 야생형 AAV ITR, Rep, 또는 VP 서열 대신 사용될 수 있다. 바람직한 아데노바이러스 벡터는 숙주 반응을 감소시키기 위해 변형된다. 예컨대, 문헌 (Russell (2000) *J. Gen. Virol.* 81:2573-2604; US patent publication no. 20080008690; and Zaldumbide et al. (2008) *Gene Therapy* 15(4):239-46; 모든 공개문은 본원에 참조로 포함됨)을 참조한다.

[0071] **조절 요소 및 터미네이터**

[0072] 조절 요소는 본원에 기재된 유전자 요법 벡터 구축물과 함께 사용하기 위해 고려된다. 용어 "조절 요소"는 프로모터, 인핸서, 내부 리보좀 진입 부위 (IRES) 및 다른 발현 제어 요소 (예컨대, 전사 종결 신호, 예컨대 폴리아데닐화 신호 및 폴리-U 서열)를 포함하는 것으로 의도된다. 이러한 조절 요소는, 예컨대 문헌 (Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185*, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))에 기재되어 있다. 조절 요소는 많은 유형의 숙주 세포에서 뉴클레오티드 서열의 구성적 발현을 지시하는 요소 및 특정 숙주 세포에서만 뉴클레오티드 서열의 발현을 지시하는 요소 (예컨대, 조직-특이적 조절 서열)를 포함한다. 조직-특이적 프로모터는 주로 근육, 뉴런, 뼈, 피부, 혈액, 특정 기관 (예컨대, 간, 췌장) 또는 특정 세포 유형 (예컨대, 림프구)과 같은 원하는 관심 조직에서 발현을 지시할 수 있다. 조절 요소는 또한 세포-주기 의존적 또는 발달 단계-의존적 방식과 같은 시간-의존적 방식으로 발현을 지시할 수 있으며, 이는 조직 또는 세포-유형 특이적일 수도 있고 아닐 수도 있다. 일부 실시양태에서, 벡터는 하나 이상의 pol III 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 pol III 프로모터), 하나 이상의 pol II 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 pol II 프로모터), 하나 이상의 pol I 프로모터 (예컨대, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과의 pol I 프로모터), 또는 이들의 조합을 포함할 수 있다. pol III 프로모터의 예는 U6 및 H1 프로모터

를 포함하지만 이에 제한되지는 않는다. pol II 프로모터의 예는 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의적으로 RSV 인핸서를 가짐), 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의적으로 CMV 인핸서를 가짐; 예컨대, 문헌 (Boshart et al, (1985) *Cell* 41:521-530) 참조) SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터, 및 본원에 기재된 EF1α 프로모터 및 Pol II 프로모터를 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 또한, 용어 "조절 요소"는 인핸서 요소, 예컨대 WPRE; CMV 인핸서; HTLV-I의 LTR에서 R-U5' 분절 (Takebe, Y. (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8(1):466-472); SV40 인핸서; 및 토끼 β-글로빈의 엑손 2와 3 사이의 인트론 서열 (O'Hare K. et al., (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78(3):1527-31)을 포괄한다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 발현 벡터의 설계가 형질전환될 숙주 세포의 선택, 원하는 발현 수준 등과 같은 인자에 의존할 수 있다는 것을 이해할 것이다. 벡터가 숙주 세포에 도입됨으로써 본원에 기재된 바와 같은 핵산에 의해 코딩되는 융합 단백질 또는 펩티드를 포함하는 전사체, 단백질, 또는 펩티드 (예컨대, 클러스터링된 규칙적 간격의 짧은 회문 반복부 (CRISPR) 전사체, 단백질, 효소, 이의 돌연변이 형태, 이의 융합 단백질 등)를 생성할 수 있다.

[0073] 본원에 기재된 방법의 측면은 터미네이터 서열을 사용할 수 있다. 터미네이터 서열은 전사 동안 게놈 DNA에서 유전자 또는 오페론의 말단을 표시하는 핵산 서열의 섹션을 포함한다. 이 서열은 전사 복합체로부터 mRNA를 방출하는 과정을 촉발하는 새로 합성된 mRNA에 신호를 제공함으로써 전사 종결을 매개한다. 이들 과정은 mRNA 2차 구조와 모집된 종결 인자의 복합적 및/또는 간접적인 활성과의 직접적인 상호작용을 포함한다. 전사 복합체의 방출은 RNA 폴리머라제 및 관련된 전사 기구를 유리시켜 새로운 mRNA의 전사를 시작한다. 터미네이터 서열은 관련 기술분야에 공지되어 있고 본원에서 확인 및 설명된 것을 포함한다.

[0074] **투여, 용량 및 치료**

[0075] 다양한 실시양태에서, 바이러스 벡터를 포함하는 하나 이상의 유전자 전달 벡터, 및 바이러스 벡터를 함유하는 패키징된 바이러스 입자는 약제 또는 제약 조성물의 형태일 수 있고, 약제 또는 제약 조성물의 제조에 사용될 수 있다. 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 바람직하게는, 담체는 비경구 투여에 적합하다. 특정 실시양태에서, 담체는 정맥내, 관절내, 복강내 또는 근육내 투여에 적합하다. 제약상 허용되는 담체 또는 부형제는, 예컨대 문헌 (*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*, Alfonso R. Gennaro (Editor) Publishing Company (1997))에 기재되어 있다. 예시적인 제약 형태는 멸균 식염수, 덱스트로스 용액, 또는 완충 용액, 또는 다른 제약상 허용되는 멸균 유체와 조합될 수 있다. 대안적으로, 예컨대 마이크로담체 비드와 같은 고체 담체가 사용될 수 있다.

[0076] 제약 조성물은 전형적으로 제조 및 저장 조건 하에서 멸균되고 안정하다. 제약 조성물은 용액, 마이크로에멀젼, 리포좀, 또는 유전자 요법 벡터의 전달에 적합한 다른 정렬된 구조로서 제형화될 수 있다. 담체는, 예컨대 물, 에탄올, 폴리올 (예컨대, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예컨대 레시틴과 같은 코팅의 사용에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예컨대 슈가, 폴리알콜, 예컨대 만니톨, 소르비톨, 또는 염화나트륨을 조성물에 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사 가능한 조성물의 연장된 흡수는 조성물에 흡수를 지연시키는 작용제, 예컨대 모노스테아레이트 염 및 젤라틴을 포함함으로써 야기될 수 있다. 본 개시내용의 벡터는 시간 또는 제어된 방출 제형, 예컨대 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하는 신속 방출에 대해 화합물을 보호할 서방출 중합체 또는 다른 담체를 포함하는 조성물로 투여될 수 있다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르, 폴리락트산 및 폴리락트산, 폴리글리콜산 공중합체 (PLG)가 사용될 수 있다.

[0077] 일부 실시양태에서, 임의의 허용되는 담체와 함께 제형화된 유전자 요법 벡터는 비경구로, 예컨대 정맥내, 관절내, 복강내, 피하, 근육내 투여, 사지 관류 또는 이들의 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 유전자 전달 벡터가 대상체의 신체를 통해 전달되도록 전신적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 전달 벡터는 표적화된 조직 내로 직접적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 전달 벡터는 국소적으로, 예컨대 카테터로 투여될 수 있다. 투여 경로는, 예컨대 표적 조직의 성질, 유전자 전달 벡터, 의도된 치료 효과, 및 표적화된 조직(들)에 의해 투여 및 흡수될 수 있는 최대 부하를 고려하여 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 결정될 수 있다.

[0078] 일반적으로, 유전자 전달 벡터의 유효량, 특히 치료 유효량은 이를 필요로 하는 대상체에게 투여된다. "치료 유효량"은 골관절염의 치료 또는 개선과 같은 원하는 치료 결과를 달성하기 위해 필요한 용량에서 및 기간 동안

효과적인 양을 지칭한다. 벡터의 유효량 또는 치료 유효량은 개체의 질환 상태, 연령, 성별, 및 체중, 및 개체에서 원하는 반응을 이끌어내는 바이러스 벡터의 능력과 같은 인자에 따라 달라질 수 있다. 투여 요법은 최적의 치료 반응을 제공하도록 조정될 수 있다.

[0079] 특정 실시양태에서, 핵산, 핵산 구축물, 파르보바이러스 비리온 또는 제약 조성물의 치료 또는 예방 유효량의 범위는 $1x10^{11}$ 및 $1x10^{14}$ 게놈 카피 (gc)/kg 또는 $1x10^{12}$ 및 $1x10^{13}$ 게놈 카피 (gc)/kg일 수 있다. 용량 값은 완화될 병태의 중증도에 따라 달라질 수 있다는 점에 유의해야 한다. 용량은 또한 사용되는 비리온의 효능에 기초하여 달라질 수 있다. 임의의 특정 대상체에 대해, 특정 투여 요법은 개체의 필요 및 조성물의 투여를 투여하거나 감독하는 사람의 전문적인 판단에 따라 시간 경과에 따라 조정될 수 있다. 본원에 기재된 용량 범위는 예시일 뿐이며 의료 종사자가 선택할 수 있는 용량 범위를 제한하지 않는다.

[0080] 조직 표적은 예를 들어 골관절염과 관련된 관절 연골과 같이 특이적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 작은 동물 (마우스)에 대한 유효 용량 범위는 $1x10^{12}$ 내지 $1x10^{13}$ 게놈 카피 (gc)/kg일 수 있고, 더 큰 동물 (고양이 또는 개) 및 인간 대상체에 대해서는 $1x10^{11}$ 내지 $1x10^{12}$ gc/kg 또는 $1x10^{11}$ 내지 $1x10^{14}$ 게놈 카피 (gc)/kg일 수 있다.

[0081] 다양한 실시양태에서, 유전자 전달 벡터는 일시 투여 또는 시간 경과에 따른 연속 주입에 의해 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 여러 분할 용량이 시간 경과에 따라 투여될 수 있거나, 치료 상황의 긴급성에 의해 지시되는 바와 같이 용량이 비례적으로 감소 또는 증가될 수 있다. 일부 실시양태에서, 유전자 전달 벡터는 매일, 매주, 격주 또는 매월 투여될 수 있다. 치료 기간은 적어도 1주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 또는 8개월 또는 그 초과일 수 있다. 일부 실시양태에서, 치료 기간은 최대 1년 이상, 2년 이상, 3년 이상 또는 무기한 동안일 수 있다.

[0082] 일부 실시양태에서, 치료 유효량의 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 관절 연골에 의해 나타나는 것과 같은 골관절염을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 본원에 기재된 방법은 골관절염 또는 골관절염의 증상과 관련된 장애를 치료 또는 예방하거나, 달리 관절 연골 구조 및 기능의 회복을 개선한다. α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 직접적으로 또는 본원에 기재된 바와 같은 유전자 요법 방법을 통해 투여함으로써 제공되는 골관절염의 개선은 치료되지 않은 대상체와 비교하여 대상체에서 증상의 감소를 특징으로 한다. 추가 측면에서, 골관절염의 대상체에서 치료 또는 예방에 사용하기 위한 상기 기재된 바와 같은 유전자 요법 방법 또는 핵산 벡터의 용도가 제공된다. 한 측면에 따라, α클로토 및 sTGFβR2의 투여는, 예컨대 면역 반응을 하향조절하고 관절 조직 항상성 및 복구를 촉진함으로써 골관절염 진행을 협력적으로 억제 또는 방지한다.

[0083] **실시예 I**

[0084] **래트 모델에서 골관절염 관련된-조직학적 변화의 진행**

[0085] 본 개시내용은 본원에 기재된 실험에 사용하기 위한 골관절염의 동물 모델을 제공한다. 골관절염은 연골 마이크로-구조를 파괴하고 무릎 관절의 통합성에 영향을 미치는 프로테오글리칸 분해를 촉진하는 화학적으로 유도된 모델인 파파인의 관절내 주사에 의해 모방되었다 (참조: Pritzker KP. Animal models for osteoarthritis: processes, problems and prospects. Ann Rheum Dis. 1994 Jun;53(6):406-20). 이 효소는 콜라겐 및 연골세포에 직접적인 영향을 미치지 않으며; 따라서 시험된 처리에 의해 촉진될 수 있는 연골의 재생 메커니즘을 손상시키지 않는다. 모델은 동물 및 인간의 병리와 관련된 여러 골관절염 표현형을 재현하였다. 예컨대, MMP13과 같은 프로테오글리칸-분해 효소에 의해 유발되는 ECM 항상성의 손실은 OA 환자에서 설명되는 주요 병리학적 특색 중 하나이다 (참조: Troeberg L, Nagase H. Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis. Biochim Biophys Acta. 2011 Jul 8;1824(1):133-45).

[0086] 래트 무릎 관절은 파파인 주사 4주 후에 분석되었다. 사프라닌-O 염색은 정규화된 국제골관절염학회 (Osteoarthritis Research Society International (OARSI)) 점수에 따른 골관절염의 초기-단계의 명확한 징후를 나타내었다 (참조: Pritzker KPH, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier J-P, Revell PA, et al. Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. Osteoarthr Cartil. 2006 Jan;14(1):13-29). 파파인 처리 결과로서, 분석은 ECM 내에 MMP13의 존재 뿐만 아니라 연골 구조의 부분적 파괴를 나타내었다.

[0087] 래트 (여기서, 골관절염 대조군, OAC)는 분석된 파라미터에 의해 정의된 바와 같이 2등급 골관절염 (도 1a

참조)을 나타내었다. 사프라닌-O 염색은 연골 내에 중단된 근섬유 표면 및 세포 클러스터와 함께 감소된 연골 두께를 나타내었다 (도 1b 참조). 이들 샘플에서 골관절염 등급은 세포 사멸의 존재 뿐만 아니라 (도 1c 참조) 연골세포 마커 Sox9의 하향조절과 함께 (도 1f 및 도 2a 참조) Col10a 및 Runx2의 더 높은 수준에 따라 관절 내 비대 연골세포의 존재 (도 1d 참조)를 입증하는 투넬 및 면역염색 분석에 의해 추가로 지지되었다.

[0088] Col10a 및 Runx2는 연골세포에서 발견될 때 세포외 기질 (ECM)의 석회화를 지칭하는 널리 공지된 뼈 마커이다 (참조: Chen D, Shen J, Zhao W, Wang T, Han L, L Hamilton J, et al. Osteoarthritis: toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. Bone Research. 2017 Jan 17). 또한, 기질 내 MMP13과 같은 단백질분해 효소의 존재는 연골 손상 및 관절 기능 손실을 나타낸다 (참조: Xie Y, Mustafa A, Yerzhan A, Merzhakupova D, Yerlan P, N Orakov A, et al. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. Cell Death Discov. 2017 Aug 14;3:17036). 그 결과로서, 아그레칸 (ACAN) 및 콜라겐 II형 (Col2a) 염색 (도 1f 및 도 2a 참조)은 비-파파인 처리된 건강한 무릎 (여기서, 건강한 대조군 그룹, HC)과 비교할 때 연골 내 두 기질 성분의 함량과 관련하여 명확한 불균형을 나타내었다. 이들 결과는 파파인 처리 4주 후에 래트에서 골관절염이 발병하였음을 입증한다.

[0089] **실시예 II**

[0090] **AAV-DJ 바이러스 혈청형을 사용한 관절내 주사**

[0091] 골관절염 진행 및 복구에 대한 α클로토 및 sTGFβR2의 조합 효과를 시험하기 위해, 이들 가용성 인자를 AAV 벡터 매개된 유전자 요법의 형태로 무릎 관절에 직접적으로 주사하였다. 각각의 인자 또는 이의 활성 단편은 개별 핵산에 의해 코딩되고 개별 벡터에 제공될 수 있거나, 각각의 인자는 단일 핵산에 의해 코딩되고 단일 벡터에 제공될 수 있음을 이해해야 한다. 단일 핵산은 개별 가용성 인자를 생성하도록 발현되거나 가용성 인자의 융합 단백질로 발현될 수 있다.

[0092] 본 개시내용의 측면은 치료를 필요로 하는 환자에게 가용성 인자 α클로토 (또는 이의 활성 단편) 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)를 직접적으로 주사하거나 달리 전달 또는 투여하는 것을 고려하는 것으로 이해되어야 한다. α클로토 (또는 이의 활성 단편) 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)는 제형으로 개별적으로, 예컨대 연속으로 하나씩 투여될 수 있거나, 동일한 제형으로 공동-투여되는 것과 같이 함께 투여될 수 있다. 본 개시내용의 측면은 치료를 필요로 하는 환자에게 가용성 인자 α클로토 (또는 이의 활성 단편) 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)를 코딩하는 핵산, 예컨대 유전자 요법으로서 본원에 기재된 AAV와 같은 벡터 내의 핵산을 직접적으로 주사하거나 달리 전달 또는 투여하는 것을 고려하는 것으로 이해되어야 한다. α클로토 (또는 이의 활성 단편)를 코딩하는 핵산 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)를 코딩하는 핵산은 개별 제형으로 개별적으로, 예컨대 연속으로 하나씩 투여될 수 있거나, 동일한 제형으로 공동-투여되는 것과 같이 함께 투여될 수 있다.

[0093] 특정 측면에 따라, α클로토 (또는 이의 활성 단편) 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)의 용량은 $1x10^{12}$ 내지 $100x10^{12}$ GC (AAV-DJ)의 범위이다. $2.5x10^{12}$ GC (AAV-DJ)의 예시적인 용량이 50 μl의 PBS에서 무릎과 같은 원하는 부위에 주사됨으로써 국소 주사 방법을 제공할 수 있다.

[0094] AAV-DJ-루시페라제의 관절내 주사는 절차의 안전성을 시험하기 위해 먼저 수행되었다. 루시페라제 판독에 따르면, 관절내 주사는 주사가 혈류에 들어가지 않고 다른 조직의 질환을 피하면서 AAV 감염을 무릎 관절로 제한하게 하였으며 (도 3a 참조), 이는 부작용 유발을 피하는데 도움이 된다. AAV-DJ 혈청형의 감염 효능을 시험하기 위해, 먼저 시험관내에서 AAD-DJ-GFP를 사용한 시험관내 분석을 수행하였다. 유동 세포측정에 의해 분석된 결과는 두 집단 모두 형질도입되었지만 연골세포와 비교할 때 활막 중간엽 세포에서 상당히 더 높은 효율을 나타내었다 (도 3b 및 3c 참조). 중간엽 줄기세포 감염의 더 높은 효능은 직접적인 AAV 감염의 결과로 연골세포에 대한 임의의 유해한 세포 효과를 피하는데 도움이 될 것이다 (참조: Hermanns J, SCHULZE A, RR PJ-D, KLEINSCHMIDT JA, SCHMIDT R, HAUSEN HZ. Infection of Primary Cells by Adeno-Associated Virus Type 2 Results in a Modulation of Cell Cycle-Regulating Proteins. J Virol. 1997;71:8; Raj K, Ogston P, Beard P. Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. Nature. 2001 Aug;412(6850):914-7; Yang GS, Schmidt M, Yan Z, Lindbloom JD, Harding TC, Donahue BA, et al. Virus-Mediated Transduction of Murine Retina with Adeno-Associated Virus: Effects of Viral Capsid and Genome Size. J Virol. 2002 Aug;76 (15): 7651-60). 한 측면에 따라, α클로토 및 sTGFβR2는 모두 관절에 국한된 인접 중간엽 세포에 의해 방출되어 관절 전체에 효과를 발휘할 것이다.

[0095] **실시예 III**

[0096] **α클로토 및 sTGFβR2는 골관절염 표현형을 방지하고 역전시킴으로써 골관절염 래트에서 임상 점수를 개선한다.**

[0097] 연골 복구에서 α클로토 및 sTGFβR2의 가능한 효율성을 시험하기 위해, 파파인으로 처리된 래트에게 4주 동안 초기-단계 골관절염이 발병하도록 한 다음, AAV-DJ-GFP (SHAM 그룹) 또는 AAV-DJ-α클로토 및 -sTGFβR2 (여기서, KT 그룹)를 관절내 주사하여 처리하였다 (도식 표현은 도 2b에서 찾을 수 있음).

[0098] AAV-DJ-GFP로 주사된 래트는 6주 후에 연골이 훨씬 더 악화된 것으로 나타났다. 사프라닌-O, Col2a 및 ACAN 염색은 연골 구조의 명확한 부식 및 손실 뿐만 아니라 나머지 단편에서 ECM 성분의 급격한 하향조절에 의해 입증된 바와 같이 기질의 석회화를 나타내었다 (도 4a 및 도 4b 및 도 2a 참조). 면역조직학적 분석은 Sox9+ 세포 (도 4b 및 도 2a 참조)의 수가 급격히 감소한 반면 아폽토시스 세포 (도 4c 참조), 비대 마커 (도 4d 참조) 및 MMP13 (도 4e 참조)은 나머지 연골 분절에서 여전히 발견되었음을 나타내었다. 그 결과, 연골의 두께가 급격하게 감소되었고 (도 2c 참조) (즉, 골관절염의 증상으로 연골이 얇아짐), OARSI 점수 분석 결과 손상은 4등급으로 분류되었으며 (도 4f 참조), 이는 명확한 골관절염 병리로의 진행을 나타낸다.

[0099] AAV-DJ-α클로토 및 -sTGFβR2로 처리된 래트는 6주 후에 표현형이 크게 개선되었다. 개별적인 AAV-DJ 바이러스를 만들기 위해 개별 벡터를 사용하였다. 관절에 총 $2.5x10^{12}$ GC, 50% sTGFβR2 및 50% α클로토가 주사되었다. α클로토 및 sTGFβR2를 발현하는 AAV의 관절내 주사는 MMP13의 ECM으로의 방출을 피할 뿐만 아니라 연골 두께의 유지를 촉진하였다. OAC 그룹과 비교할 때, 사프라닌-O 염색 (도 4a 참조)은 연골 두께 (도 2c 참조) 및 구조의 회복을 나타내었다. 첫째, 세포가 관절 표면에 평행한 수평 클러스터로 배열되고 일렬, 쌍 및 단일 세포로 구성된 표면 구역. 둘째, 수직 기둥으로 배열된 이중 또는 다중 연골세포를 함유하는 중간 및 깊은 구역. Col2a 및 ACAN 양성 염색은 관절 내 ECM 성분의 재생과 함께 연골세포 기능 회복을 지지한다 (도 1b 및 도 2a 참조). α클로토에 의한 ECM 분해 억제는 KT 처리 후 Col2a, ACAN 및 사프라닌-O 염색의 증가를 지지한다. 이는 조직 절편 분석에서 추가로 평가되었다. 데이터는 관절 내에서 아폽토시스 세포의 완전한 부재 뿐만 아니라 (도 4c 참조) 비대 마커 분포의 복원도 나타낸다. OAC 및 SHAM 그룹과 달리, KT 처리된 관절에서, Col10a 및 Runx2 양성 세포는 HC 그룹과 유사하게 연골의 규칙적인 비대층에 상응하는 연골층의 더 낮은 수준에 대부분 위치된다 (도 4d 참조). 또한, HC 및 KT 처리된 무릎의 ECM 내에서 단백질분해 효소 MMP13의 부재가 발견되었다 (도 4e 참조). 강력한 관절 개선을 기반으로 하여, OARSI 분류는 α클로토 및 sTGFβR2로 처리된 래트는 2등급으로부터 1등급 골관절염으로 회복된 반면, AAV-DJ-GFP로 처리된 래트는 4등급 골관절염으로 더 진행되었음을 나타낸다 (도 4f 참조).

[0100] TGF-β/Smad 신호전달은 또한 골관절염 발병 및 진행에 기여한다 (참조: Shen J, Li S, Chen D. TGF-β signaling and the development of osteoarthritis. Bone Research. 2014 May 27;2:14002). 연골세포 비대는 노화 동안 ALK1/ALK5 수용체 비율의 증가 또는 TGF-β1에 대한 긴 노출에 의해 촉진되며, 이는 균형 잡힌 TGFβ 경로를 유지하는 것의 중요성을 나타낸다. 따라서, TGFβ1 및 TGFβ3에 대한 TGFβR2 수용체의 높은 친화성은 KT 처리 후 연골세포 비대를 억제하고 비대 마커를 하향조절한다.

[0101] 한 측면에 따라, α클로토 및 sTGFβR2의 사용은, 예컨대 동화작용 및 이화작용 경로의 균형을 유지함으로써 ECM 회복에 기여한다. TGFβ1 경로는 연골세포 증식을 자극함으로써 회복 매개체로 간주된다. 한 측면에 따라, TGFβ1을 격리하기 위한 sTGFβR2의 사용은 동화작용 효과를 향상시키면서 이화작용 경로를 감소시킨다.

[0102] **실시예 IV**

[0103] **α클로토 및 sTGFβR2는 골관절염 표현형의 염증 반응 특징을 개선한다.**

[0104] 골관절염은 초기에는 비-염증성 관절염으로 분류되었음에도 불구하고 활막 염증을 특징으로 한다 (참조: Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone. 2012 Aug;51(2):249-57). 염증은 골관절염 관절의 상당한 연골 손실 및 관절 공간 협소에 선행한다 (Sokolove J, Lepus CM. Role of inflammation in the pathogenesis of osteoarthritis: latest findings and interpretations. Ther Adv Musculoskelet Dis. 2013 Apr;5(2):77-94).

[0105] 골관절염에 대한 α클로토 및 sTGFβR2의 효과 이면에 있는 일부 메커니즘을 조사하기 위해, 연골 조직을 RNA-seq 분석을 위한 모든 그룹으로부터 단리하였다. RNA-seq 분석은 OAC 및 SHAM 그룹과 비교할 때 KT 그룹에서 차등적으로 발현된 (DE) 유전자를 밝혀내었다. 구체적으로, 489개의 유전자가 KT vs SHAM에서 차등적으로 발현되었고, 그 중 156개는 KT와 HC 사이에서 유사한 발현 패턴을 나타낸다. 유전자 온톨로지 (GO) 분석은 이들 차

별적으로 발현된 유전자 중 염증 반응 및 면역 반응에 관여하는 유전자가 KT 처리에 가장 강력한 효과를 나타내는 것으로 나타났다 (도 5a 및 5b 참조).

[0106] 한 측면에 따라, 연골세포는 골관절염과 같은 병리학적 병태 하에서 전염증성 시토카인을 분비하는 것으로 공지되어 있다 (참조: Akkiraju H, Nohe A. Role of Chondrocytes in Cartilage Formation, Progression of Osteoarthritis and Cartilage Regeneration. J Dev Biol. 2015 Dec;3(4):177-92). 핵 인자 (NF)-κB 및 인터루킨-1 (IL)-1β와 관련된 전염증성 시토카인은 세포외 기질 분해에 기여하는 MMP의 작용을 촉진하는 것으로 기재되었다 (참조: Raymond L, Eck S, Hays E, Tomek I, Kantor S, Vincenti. M. RelA is Required for IL-1β Stimulation of Matrix Metalloproteinase-1 Expression In Chondrocytes. Osteoarthritis Cartilage. 2007 Apr;15(4):431-41; Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, et al. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. Exp Cell Res. 2003 Aug 1;288(1):208-17). 따라서, OAC 및 SHAM 그룹을 KT와 비교할 때, 데이터는 (1) Il1rn과 같은 인터루킨-관련된 유전자 (도 5d 및 도 7 참조); (2) Tnfaip2와 같은 Tnf-관련된/NF-κB 의존적 유전자 (도 5d 및 도 7 참조); (3) Ifit 유전자와 같은 인터페론-관련된 유전자 (도 5c 및 5d 참조); 및 (4) Ccl6과 같은 시토카인 또는 케모카인 (도 5c 및 5d 참조)의 하향조절을 나타내었다 (참조: Appleton CTG, Pitelka V, Henry J, Beier F. Global analyses of gene expression in early experimental osteoarthritis. Arthritis Rheum. 2007 Jun;56(6):1854-68; Jeyakumar V, Halbwirth F, Niculescu-Morzsa E, Bauer C, Zwickl H, Kern D, et al. Chondrogenic Gene Expression Differences between Chondrocytes from Osteoarthritic and Non-OA Trauma Joints in a 3D Collagen Type I Hydrogel. Cartilage. 2017 Apr;8(2):191-8).

[0107] 따라서, 데이터는 파파인 처리 4주 후에 연골세포가 이미 전-염증성 시토카인 및 면역 반응 관련된 인자의 상향조절을 나타낸다는 것을 입증한다. α클로토 및 sTGFβR2 처리는 이미 발현된 일부 유전자의 발현을 하향조절하였을 뿐만 아니라 다른 면역 반응 인자의 이후 상향조절을 피하였으며, 이는 골관절염 동안 염증에서 TGFβ의 역할을 입증한다. TGFβ는 활막 관벽 세포가 염증 인자를 생성하도록 유도하여 유리질 연골세포 비대를 추가로 자극할 수 있다 (참조: Scanzello CR, Goldring SR. The role of synovitis in osteoarthritis pathogenesis. Bone. 2012 Aug;51(2):249-57). TGFβ 신호전달 차단은 골관절염의 발병기전과 관련된 활막 비후를 상당히 약화시켰다 (참조: see Scharstuhl A, Vitters EL, Kraan PM van der, Berg WB van den. Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor β/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis. Arthritis & Rheumatism. 2003 Dec 1;48(12):3442-51). 또한, 가용성 클로토는 세포 염증 반응에 관여하는 PI3K/Akt 및 Wnt/β-카테닌 경로를 조정한다. 상이한 연구는 재조합 클로토 처리가 어떻게 신장 및 심장 질환과 관련된 시토카인 수준을 감소시킬 수 있는지를 입증하였다 (참조: Zhao Y, Banerjee S, Dey N, LeJeune WS, Sarkar PS, Brobey R, et al. Klotho Depletion Contributes to Increased Inflammation in Kidney of the db/db Mouse Model of Diabetes via RelA (Serine)536 Phosphorylation. Diabetes. 2011 Jul;60(7):1907-16; Hui H, Zhai Y, Ao L, Cleveland JC, Liu H, Fullerton DA, et al. Klotho suppresses the inflammatory responses and ameliorates cardiac dysfunction in aging endotoxemic mice. Oncotarget. 2017 Feb 1;8(9):15663-76). 한 측면에 따라, α클로토 및 sTGFβR2 둘 다의 협력 활성은 골관절염-관련된 염증 반응을 감소시켰다.

[0108] 골관절염 동안 발생하는 염증 반응 동안, Nos2에 의해 생성되는 산화질소 (NO)는 연골세포 사멸로 이어지는 파괴적인 영향을 갖는다 (참조: Vuolteenaho K, Moilanen T, Knowles R, Moilanen E. The role of nitric oxide in osteoarthritis. Scandinavian Journal of Rheumatology. 2009 Jul 12;Vol 36(4):247-58). NO는 반응성 산소종 (ROS)과 함께 골관절염 동안 연골세포 사멸의 주요 유도제인 것으로 보인다 (참조: Del Carlo M, Loeser RF. Nitric oxide-mediated chondrocyte cell death requires the generation of additional reactive oxygen species. Arthritis Rheum. 2002 Feb;46(2):394-403).

[0109] 결과적으로, 본 개시내용의 측면은 전염증 반응에 의해 유발되는 후속적인 파괴적인 과정을 피하거나 낮추기 위해 직접적으로 또는 유전자 요법을 통해 가용성 인자로서 α클로토 (또는 이의 활성 단편) 및 sTGFβR2 (또는 이의 활성 단편)의 사용에 관한 것이다. 한 측면에 따라 (도 5e 및 도 7 참조), KT 처리는 AAV 주사 후 어떤 시점에서든 SHAM 동물에서 급격히 증가하는 이 효소의 상향조절을 방지하였다. AAV-매개된 α클로토 및 sTGFβR2 발현은 연골세포에서 Il1rn 및 Nos2 mRNA 수준 감소 동안 내내 IL-1β-유발된 NO 생성을 감소시킴으로써 연골 분해를 피하였다. 한 측면에 따라, α클로토는 KT 처리 시 산화 스트레스를 감소시키고 아폽토시스를 하향조절한다 (참조: Song S, Gao P, Xiao H, Xu Y, Si LY. Klotho Suppresses Cardiomyocyte Apoptosis in Mice

with Stress-Induced Cardiac Injury via Downregulation of Endoplasmic Reticulum Stress. PLOS ONE. 2013 dic;8(12):e82968; Lin Y, Sun Z. Antiaging Gene Klotho Attenuates Pancreatic β-Cell Apoptosis in Type 1 Diabetes. Diabetes. 2015 Dec 1;64(12):4298-311; Maekawa Y, Ohishi M, Ikushima M, Yamamoto K, Yasuda O, Oguro R, et al. Klotho protein diminishes endothelial apoptosis and senescence via a mitogen-activated kinase pathway. Geriatr Gerontol Int. 2011 Oct;11(4):510-6).

[0110] **실시예 V**

[0111] **α클로토 및 sTGFβR2는 시험관내에서 인간 연골세포 마커의 발현을 촉진한다.**

[0112] 인간 연골에 대한 KT 처리의 가능한 효율성을 평가하기 위해, 인간 1차 관절 연골세포를 사용하여 시험관내에서 α클로토 및 sTGFβR2의 효과를 시험하였다. 관절 연골세포 표현형은 연골-특이적 세포외 기질 성분, 주로 Col2a 및 연골-특이적 전사 인자 Sox9의 발현을 특징으로 한다. Sox9의 발현은 중간엽 세포가 연골발생 계통에 참여하는데 필요하다 (참조: Lefebvre V, Dvir-Ginzberg M. SOX9 and the many facets of its regulation in the chondrocyte lineage. Connect Tissue Res. 2016 Apr 29;58(1):2-14). 시험관내에서 이 분화된 표현형의 유지는 배양 조건에 크게 의존한다. 이들 세포의 단층 배양에 수반되는 주요 장애물 중 하나는 유리질 연골세포 표현형의 손실로 연골세포 탈분화 또는 비대를 초래하는 것이다 (참조: Ma B, Leijten JCH, Wu L, Kip M, van Blitterswijk CA, Post JN, et al. Gene expression profiling of dedifferentiated human articular chondrocytes in monolayer culture. Osteoarthr Cartil. 2013 Apr;21(4):599-603).

[0113] 따라서, 두 인자 α클로토 및 sTGFβR2의 효과는 본원에 기재된 바와 같이 2개의 개별 벡터를 사용하여 단층 배양 조건에서 인간 유리질 연골세포의 표현형 특징에 대해 시험되었다. 첫째, 생체 내 모델을 모방하기 위해, 중간엽 세포를 바이러스로 연골세포 근처에서 감염시켰다. 이 목적을 위해, 인간 섬유모세포가 AAV-DJ-α클로토 및 AAV-DJ-sTGFβR2 (KT), 또는 대조군으로서 AAV-DJ-GFP로 효율적으로 감염되는 공동-배양 실험이 본원에 기재된 바와 같이 설계되었다 (도 6a 참조). 결과는 KT로 형질도입된 중간엽 세포가 각각 세포 정체성 및 ECM 형성에 필수적인 연골세포-특이적 마커 Sox9 및 Col2a를 발현하는 연골세포를 더 높은 백분율로 나타낸다는 것을 보여주었다 (도 6b 참조). 세포 증식에 대한 α클로토의 효과를 지지하는 배양물 내 순환 세포의 수도 증가하는 것으로 관찰되었다 (도 6b 및 6c 참조). 따라서, α클로토 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβR2 또는 이의 활성 단편을 투여하거나 AAV-DJ-α클로토 및 AAV-DJ- sTGFβR2 처리와 같은 발현용 벡터로 유전자를 투여하여 연골을 재성장시키는 방법이 제공된다.

[0114] 또한, 인간 관절 연골세포를 10일 동안 α클로토 및 sTGFβR2를 사용하여 시험관내에서 처리하였다. 결과는 Sox9 및 Col2a 단백질 발현의 유도 및 세포 증식의 향상에 의해 입증된 동일한 명확한 개선을 나타내었다 (도 6d 참조). 따라서, α클로토 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβR2 또는 이의 활성 단편을 투여하거나 AAV-DJ-α클로토 및 AAV-DJ- sTGFβR2 처리와 같은 발현용 벡터로 유전자를 투여하여 인간 유리질 연골을 치료하는 방법이 제공된다. 따라서, α클로토 및 sTGFβR2는 인간에서 연골세포 표현형을 유지하기 위해 투여된다.

[0115] **실시예 VI**

[0116] **방법 및 시약**

[0117] **세포 단리 및 배양**

[0118] 인간 관절 연골은 의학 연구에 사용하기 위한 사전 동의를 받은 후 건강한 공여자로부터 수득되었고, 래트 관절 연골은 멸균 조건 하에서 건강한 래트로부터의 대퇴 및 경골 관절융기로부터 떼어내었다. 연골세포 단리 및 배양은 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다 (참조: Gosset M, Berenbaum F, Thirion S, Jacques C. Primary culture and phenotyping of murine chondrocytes. Nat Protoc. 2008;3(8):1253-60).

[0119] 인간 섬유모세포 (IMR90)는 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 기본 배양 배지에서 성장되었다. 래트의 중간엽 세포는 관절낭 결합 조직으로부터 단리되었다. 간략하게, 결합 조직을 (문헌 (Yu G, Wu X, Kilroy G, Halvorsen Y-DC, Gimble JM, Floyd ZE. Isolation of murine adipose-derived stem cells. Methods Mol Biol. 2011;702:29-36)에 기재된 바와 같이) 효소 처리로 분해한 후, 기질 혈관 분획을 원심분리에 의해 단리하고 기본 배양 배지에 유지하였다.

[0120] **AAV 클로닝 및 생성**

[0121] AAV 플라스미드는 표준 클로닝 기술에 따라 구축되었다. α-클로토 및 sTGFβR2는 하기와 같은 프라이머를 사

용하여 PCR 증폭되었다. α-클로토-fwd-5'-cctgaa**cacctgcaacg**ggcctgccaccATGCTAGCCCGCGCCCCTCC α-클로토-rev-cctgaacgtctc**gctagc**ttaTTACTTATAACTTCTCTGGCC sTGFβR2-fwd-5'-cctgaa**cacctgcaacg**ggcctgccaccATGGGTCGGGGGTGCTCCGG-3' (대문자는 TGFβR2 수용체의 분비 신호에 대한 중첩부이고, 굵은 글씨체는 NotI 돌출부를 생성하는 AarI 인식 부위임). sTGFβR2-Rev-5'-ggcttgattgtgggccctctgggGTCGGGACTGCTGGTGGTGTATTC-3' (굵은 글씨체는 TGFβR2 수용체의 세포외 도메인에 대한 중첩부이고, 소분자는 중첩 PCR에 사용되는 igg2a 서열과 일치함). Igg2a-Fwd-5'-gaatacaccaccagcagtcccgacCCCAGAGGGCCCACAATCAAGCC-3' (굵은 글씨체는 마우스 Igg2a FC 영역에 대한 중첩부이고, 소분자는 중첩 PCR에 사용되는 TGFβR2 서열의 세포외 도메인과 일치함). Igg2a-Rev 5'-cctgaa**cacctgccttac**tagcTCATTTACCCGGAGTCCGGGAGAAG-3' (굵은 글씨체는 NheI 돌출부를 생성하는 AarI 인식 부위임).

[0122] AAV는 약간의 변형으로 기재된 바와 같이 293AAV 세포 (셀 바이로랩스, 인크. (Cell Biolabs, Inc.))를 사용하여 제조되었다 (참조: Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adeno-associated viral vectors. Nat Protoc. 2006;1(3):1412-28). 간략히, 세포를 인산칼슘을 사용하여 형질감염시키고, 바이러스를 CsCl 구배에 의해 정제하였다. 바이러스 역가를 프라이머: ITR-F:5' GGAACCCCTAGTGATGGAGTT 3' 및 ITR-R: 5' CGGCCTCAGTGAGCGA 3'를 사용하여 qPCR을 통해 결정하였다.

[0123] **골관절염 손상 모델**

[0124] 실험적 골관절염의 유도는 PBS에서 제조된 100 μl의 4% 파파인 (시그마-알드리치 (Sigma-Aldrich), P4762)에 이어 또한 PBS 중의 50 μl의 0.03 M L-시스테인 (시그마)을 관절내 주사하여 수행되었다. 두 용액 모두 0.22 μm 필터를 통해 주사하기 전에 여과되었다. 주사는 3회 (제1, 4 및 7일) 수행되었다. 모든 동물 절차는 IACUC 및 솔크 생물학 연구소 (Salk Institute for Biological Studies)의 동물자원부에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0125] **동물 실험 설계**

[0126] 20마리의 250 g 스프래그 다우리 (Sprague Dawley: SD) 암컷 래트를 그룹당 8마리씩 4그룹으로 나누었다: 건강한 대조군 (HS), 골관절염 그룹 대조군 (OAC), α클로토 및 sTGFβR2로 처리된 4주 골관절염 그룹 (KT) 및 4주 골관절염 SHAM 그룹 (SHAM). OAC, KT 및 SHAM 래트는 파파인/시스테인으로 처리되었다.

[0127] OAC 래트를 마지막 파파인/시스테인 주사 4주 후에 희생시켜 해당 시점에 도달된 골관절염의 등급을 결정하였다. 다른 2개 그룹은 관절내 AAV 처리를 받았다: AAV-DJ-GFP는 SHAM 그룹에 주사되고, AAV-DJ-α클로토+AAV-DJ- sTGFβR2는 KT 그룹에 주사되었다. 50 μl의 PBS 중의 총 $2.5x10^{12}$ GC가 무릎당 주사되었다. 이들 2개의 마지막 그룹은 바이러스 주사 6주 후에 희생되었다. 양쪽 무릎 관절을 각각의 래트로부터 수거하였다: 조직학적 분석을 위한 하나의 무릎 및 RNA 단리를 위한 다른 무릎. 모든 동물 절차는 IACUC 및 솔크 생물학 연구소의 동물자원부에 의해 승인된 프로토콜에 따라 수행되었다.

[0128] **RNA 추출**

[0129] 연골 표면을 식염수로 세정한 다음 블레이드로 관절 표면으로부터 해부하였다. 혈액, 뼈 또는 활막에 의한 오염을 피하기 위해 주의를 기울였다. 조직을 작은 조각으로 자르고, 트리졸 (TRIzol) (암비온 (Ambion))에 담그고, 즉시 급속 동결하고, 나중에 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다. 총 RNA를 트리졸 방법을 이용하여 연골 조직으르부터 단리하였다. 총 RNA 샘플 (RIN)의 품질 및 통합성을 결정하기 위해, 각각의 RNA 샘플은 제조업체의 지침에 따라 테이프스테이션 (TapeStation) 자동 전기영동 분석 시스템 (2200 테이프스테이션)에서 실시되었다. RNA 농도는 퀴비트 플루오로미터 (Qubit Fluorometer) 2.0을 사용하여 결정되었다.

[0130] **조직학 및 면역형광**

[0131] 전체 무릎 관절은 카와모토 (Kawamoto) 및 시미주 (Shimizu), 2000에 기재된 바와 같이 조직학을 위해 준비되었다 (참조: Kawamoto T, Shimizu M. A method for preparing 2- to 50-μm-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. Histochem Cell Biol. 2000 May 1;113(5):331-9). 카와모토 및 카와모토, 2014에 기재된 방법을 이용하여 샘플을 7 μm 두께로 절단하였다 (참조: Kawamoto T, Kawamoto K. Preparation of thin frozen sections from nonfixed and undecalcified hard tissues using Kawamot's film method (2012). Methods Mol Biol. 2014;1130:149-64). 이어서, 절편을 상이한 방법을 이용하여 염색하였다. 사프라닌-O/패스트 그린 염색은 표준 절차에 따라 수행되었다. 관절 연골의 병리학적 변화는 고급 방법론(23)

에 따라 국제골관절염학회 (OARSI) 득점 시스템을 사용하여 등급이 매겨졌다: 정상 및 건강한 연골은 0등급을 받았고; 1등급은 연골 표면은 온전하지만 찰과상 영역, 비대 및 세포 클러스터를 함유하는 경우 적용되었고; 1.5등급은 세포 사멸을 포함하는 1등급을 지칭하고; 2등급 연골은 중단된 근섬유 표면을 나타내었고; 2.5등급은 사프라닌-O 염색의 1/3 미만으로 나타나는 기질 손실을 포함하는 2등급으로 이루어지고; 3등급은 중간 구역까지 균열이 나타나고 연골의 2/3 미만이 사프라닌-O 염색되었을 때 고려되었고; 3.5 등급은 중간 구역으로 더 깊은 균열을 나타내었고; 4등급은 표면 구역의 박리에 의한 매트릭스 손실을 나타내었고; 4.5등급은 중간 구역으로의 함몰을 나타내었고; 5등급 연골은 완전히 부식된 비광물화 연골을 나타내었고; 5.5등급은 부식 후 비대 연골의 성장을 나타내었고; 6등급 및 더 높은 등급은 관절융기 변형이 나타나는 더 심각한 연골 손상을 나타낸다.

[0132] 전체 관절융기 연골의 두께는 이미지 분석 소프트웨어 이미지 J를 사용하여 측정되었다. 샘플은 2명의 맹검 조사자에 의해 연골 길이를 따라 3개의 상이한 영역을 고려하여 평가되었다

[0133] 면역형광 분석을 위해, 절편을 항체로 면역염색하고, 4,6-디아미디노-2-페닐인돌 (DAPI)로 대조염색하였다. 슬라이드 스캐닝 현미경 (올림푸스 (Olympus) VS-120 가상 슬라이드 스캐닝 현미경)을 사용하여 이미징을 수행하였다.

[0134] 아폽토시스 검출은 제조업체의 프로토콜에 따라 제자리 세포 사멸 검출 AP 키트 (로슈 (Roche))를 사용하여 래트의 무릎 절편에서 수행되었다.

[0135] **항체**

[0136] 1:100 (v/v) 희석의 콜라겐 II (네오마커스 (NeoMarkers)), 1:100 (v/v) 희석의 Runx2 (산타 크루즈 바이오테크놀로지 (Santa Cruz Biotechnology)), 1:100 (v/v) 희석의 MMP13 (애브캄 (Abcam)), 1:100 (v/v) 희석의 MMP3 (애브캄), 1:100 (v/v) 희석의 Sox9 (애브캄), 1:50 (v/v)의 콜라겐 X (애브캄), 1:100 (v/v) 희석의 Ki67 (바이오레전드 (BioLegend)). 항원 검색은 37℃에서 1시간 동안 아세테이트 버퍼에서 열 매개 5% 히알루로니다제에 의해 수행되었다. 면역반응성은 제조업체의 프로토콜에 따라 아비딘/바이오틴 블로킹 키트 (벡터 라보라토리즈, 인크. (Vector Laboratories, Inc))를 사용하여 바이오틴화된 항-마우스 IgG 2차 항체로 시각화되었다.

[0137] **생체내 루시페라제 검출**

[0138] 6마리의 300 g 롱 에반스 (Long Evans) 래트를 사용하여 AAV-DJ 관절내 주사를 시험하였다: AAV-DJ-Luc 또는 AAV-DJ (공 벡터, 음성 대조군). 루시페라제는 IVIS 키네틱 2200 (칼리퍼 라이프 사이언스 (Caliper Life Sciences))을 사용하여 주사 2주 후에 검출되었다. 50 mg/kg D-루시페린 (바이오신스 (Biosynth))을 관절내 및 복강내 주사하였다. 이미징은 D-루시페린 주사 10분 후에 포착되었다.

[0139] **RNA 시퀀싱 및 데이터 분석**

[0140] 판독값은 디폴트 파라미터와 함께 STAR [v2.5.1b (Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. Bioinformatics. 2013 Jan 1;29(1):15-21)]에 의해 rn6 참조 (일루미나 아이게놈즈 (Illumina iGenomes))에 대해 매핑되었다. 특출하게 매핑된 판독값만 다운스트림 분석에 사용되었다. 유전자 발현 수준은 HOMER [v4.8 (호머 소프트웨어 및 데이터 다운로드 [인터넷]. 전세계 웹사이트 homer.ucsd.edu/homer에서 이용 가능)]에 의해 RefSeq 유전자의 모든 엑손에 걸쳐 매핑된 판독값을 합산하여 계산되었다. 차등적으로 발현된 (DE) 유전자는 logFC (로그 배수-변화) > 0.5 및 FDR (오발견율) < 0.05의 컷오프와 함께 DESeq2 [v1.18.1 (DESeq2를 사용한 RNA-seq 데이터의 배수 변화 및 분산에 대한 가감된 추정 [인터넷]. 전세계 웹사이트 ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4302049/에서 이용 가능)]를 사용하여 확인되었다.

[0141] 농축 시험은 DAVID (v6.8)에 의해 수행되었으며 (참조: Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. Nucleic Acids Res. 2009 Jan;37(1):1-13), 이 경우 관심 유전자는 입력 신호로 사용되고 rn6의 전체 게놈은 배경으로 사용되었다. 벤자미니-호크베르그 (Benjamini-Hochberg) FDR < 0.01을 갖는 생물학적 공정 조건만 사용되었다. GEO 수탁 번호 GSE118559를 통해 데이터에 액세스할 수 있다.

[0142] RNA-Seq의 모든 통계 분석은 특별히 언급되지 않는 한 R 환경에서 수행되었다 [v3.4.3, (R: 통계 컴퓨팅을 위한 언어 및 환경 [인터넷]. 전세계 웹사이트 gbif.org/tool/81287/r-a-language-and-environment-for-statistical-computing에서 이용 가능)]. R 패키지 ggplot2 (ggplot2 - 데이터 분석을 위한 세련된 그래픽 |

하들리 위크함 (Hadley Wickham) | 스프링거 (Springer) [인터넷]. 전세계 웹사이트 springer.com/us/book/9780387981413에서 이용 가능) 및 gplots (참조: Wickham H, Chang W, Henry L, Pedersen TL, Takahashi K, Wilke C, et al. ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics [인터넷]. 전세계 웹사이트 CRAN.R-project.org/package=ggplot2에서 이용 가능)가 도면을 플로팅하는데 사용되었다.

[0143] **시험관내 실험**

[0144] 공동-배양 실험: 4 μm 기공 크기의 코닝 (Corning)® 트랜스웰 (Transwell)® 폴리에스테르 막 세포 배양 삽입물 (시그마)을 사용하여 인간 연골세포에 대한 sTGFβR2 및 α클로토의 트랜스-시험관내 효과를 평가하였다. 간략히, 인간 섬유모세포의 p100 플레이트를 $3x10^{12}$의 AAV-DJ-α클로토 및 AAV-DJ-TGFβR2로 형질도입하였다. 형질도입 2일 후, 세포를 공동-배양 챔버의 상부 웰에 재시딩하고, 같은 날 연골세포를 챔버의 하부 웰에 시딩하였다. 세포 챔버를 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 10일 동안 인큐베이션하였다.

[0145] 가용성 인자 실험: 연골세포를 60% 합류로 플레이팅하고, BSA 또는 5 ng/ml 및 10 ng/ml의 α클로토 (애브캄 ab84072) 및 sTGFβR2 (R&D 시스템스 241R2025)로 10일 동안 처리하였다. 세포를 37℃ 및 5% CO_2 조건에서 인큐베이션하고, 인자 또는 BSA를 갖는 배지를 3일마다 교체하였다.

[0146] **세포 배양물의 면역형광**

[0147] 고정 전에 표준 프로토콜에 따라 세포를 EdU와 함께 2시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 세포를 4% PFA를 사용하여 고정하였다. 세포는 실온 (RT)에서 20분 동안 PBS 중의 0.1% 트리톤 (Triton) X-100으로 투과화되었다. PBS로 세척한 후, 세포를 PBS 중의 1% BSA를 사용하여 1시간 동안 차단하고, 1차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다 (콜라겐 II 희석 1:150 및 Sox9 1:300). 2차 항체를 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. EdU 염색은 클릭-아이티 (Click-iT)™ EdU 알렉사 플루오르 (Alexa Fluor)™ 488 이미징 키트 (인비트로겐 (Invitrogen))를 사용하여 수행되었다. DAPI를 사용하여 대조염색을 수행하였다. 이미지는 자이스 (Zeiss) LSM 880 후면 포트 레이저 스캐닝 공초점을 사용하여 수득하였다.

[0148] **유동 세포측정 분석**

[0149] GFP 양성 세포는 여과 (70 μm)하고 2% FBS/PBS로 세척한 후 FACS 칸토 (Canto) II (BD 바이오사이언시스 (BD Biosciences))를 사용하여 검출되었다.

[0150] **통계**

[0151] 정량화 데이터는 평균 ± s.e로 표시된다. 통계적 유의성 (*P 값)은 웰치 (Welch) 보정을 사용하여 독립표본의 양측 스튜던츠 t-시험에 의해 결정되었다 (각각의 그룹에서 동일한 s.d.에 대한 가정이 없음). 모든 분석은 그래프패드 (GraphPad) (미국 캘리포니아주 샌디에고)의 프리즘 (Prism) 7 소프트웨어로 수행되었다. 통계적 유의성은 $P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.0001$로 결정되었다.

[0152] **실시예 VII**

[0153] **sTGFbR2 + α클로토의 전신 주사를 이용한 골관절염의 유전자 요법 치료**

[0154] 골관절염 (OA) 병변은 본원에 기재된 바와 같이 파파인의 관절내 주사에 의해 생성되었고, 주로 표면 연축을 갖는 온전한 연골 표면, 연골세포 사멸/손실 및 증식, 부종, 및/또는 표면 구역에서 프로테오글리칸 기질의 손실로 이루어진다. 때때로 더 깊은 연축, 찰과상 및 균열이 중간 구역으로 확장되는 것이 관찰되었다. 또한, 반월상 연골의 표면을 따라 표면 연축이 관찰되었다. 연축은 표면 구역 또는 반월상 연골 표면에서 연골 기질의 작은 틈 및 불연속을 특징으로 한다. 연골세포 사멸/손실은 연골세포의 부재 또는 연골의 표면 및 중간 구역에 존재하는 "유령" 연골세포를 특징으로 한다. 연골세포 증식은 연골의 표면 및 중간 구역 내에서 종종 와해된 연골세포 수의 증가를 특징으로 한다. 부종은 연골의 표면 및 중간 구역의 연골세포를 둘러싼 증가된 맑은 유체를 특징으로 한다. 프로테오글리칸 기질의 손실은 양이온성 염색 (적색, 사프라닌 O)의 감소 또는 부재를 특징으로 하고; 기질의 손실은 생존 가능한 연골세포에 직접적으로 인접하거나 연골세포 손실 영역에 존재할 수 있으며 전형적으로 상기 기재된 바와 같이 다른 병변을 동반한다. 찰과상은 거친 표면을 남기는 표면 구역의 국소 손실을 특징으로 한다. 균열은 중간 구역 연골로 확장되는 수직 기질 분리를 특징으로 한다. sTGFbR2 및 FGF21을 코딩하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터를 래트에 전신 주사하여 래트 무릎에서 골관절염의 유전자 요

법 치료를 결정하였다.

[0155] 도 8에 나타난 바와 같이, 샘플에서 관찰된 가장 심각한 병변의 깊이 (표면, 중간, 깊은 또는 뼈 연루)를 기준으로 OA 등급을 결정하였다. 파파인 후 2개월 대조군 (그룹 2) 및 sTGFbR2 + FGF21 처리군 (그룹 4)이 가장 높은 등급을 나타내었고, 파파인 후 1개월 대조군 (그룹 1)이 가장 낮은 등급을 나타내었다. 파파인 후 2개월 대조군 (그룹 2)과 비교할 때 sTGFbR2 + α클로토 처리군 (그룹 3)에서 약간의 등급 감소가 관찰되었다.

[0156] 도 9에 나타난 바와 같이, OA 단계는 OA 병변에 의해 영향을 받는 연골의 총 범위에 기초하여 결정되었다. 그룹 간의 경향은 OA 등급에 대해 관찰된 경향과 유사하였지만 OA 단계에 대한 가장 낮은 평균 점수는 sTGFbR2 + α클로토 처리 (그룹 3)에서 관찰되었다.

[0157] 도 10에 나타난 바와 같이, OA 점수는 총 OA 값에 대한 등급 및 단계를 곱하여 결정되었다. 그룹 간의 경향은 OA 단계에 대해 관찰된 경향과 유사하였다. 파파인 후 2개월 그룹 (그룹 2) 및 sTGFbR2 + FGF21 처리군 (그룹 4)은 동일할 뿐만 아니라 가장 높은 점수를 나타내었다. 파파인 후 1개월 그룹 (그룹 1)은 파파인 후 2개월 그룹 (그룹 2)과 비교하여 더 낮은 점수를 가졌다. sTGFbR2 + α클로토 처리군 (그룹 3)은 가장 낮은 점수를 나타내었으며, 이는 2개의 대조군 (그룹 1 및 2)과 비교하여 병변 중증도의 감소를 나타낸다.

[0158] 도 11에 나타난 바와 같이, 2개의 대조군 (그룹 1 및 2) 및 sTGFbR2 + FGF21 처리군 (그룹 4)에서 최소 내지 약한 반월상 연골 연축이 관찰되었고; 그룹 4는 가장 높은 반월상 연골 연축 점수를 나타내었다. 반월상 연골 연축은 sTGFbR2 + α클로토 처리군 (그룹 3)에서 부재하였다.

[0159] **실시예 VIII**

[0160] **<u>α클로토 및 sTGFbR2의 조합을 사용한 처리 대 각각의 처리의 비교</u>**

[0161] ("KT")로 확인되는 α클로토 ("K") 및 sTGFbR2 ("T")의 조합 효과에 대한 분석은 먼저 높은 TGFb1 농도를 사용하는 골관절염 시험관내 모델을 사용하여 분석되었다. qPCR에 의해 분석된 결과는 두 가용성 인자의 조합이 단일 인자 처리와 비교할 때 어떻게 비대 마커 및 ECM 단백질분해 효소의 억제를 상승적으로 지지하는지를 나타내었다 (도 12a, KT 대 K 대 T). 따라서, 두 인자 모두로 처리된 연골세포도 α클로토 또는 sTGFbR2보다 ACAN의 높은 단백질 발현을 나타내었다 (도 12b). 도 12c는 주사의 시각표를 묘사한다.

[0162] **실시예 IX**

[0163] **<u>실시양태</u>**

[0164] 본 개시내용의 실시양태는 골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제1 바이러스 벡터를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 폴리시스트론 요소에 의해 분리된다. 한 측면에 따라, 폴리시스트론 요소는 IRES 또는 2A 서열이다.

[0165] 본 개시내용의 실시양태는 골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 바이러스 벡터; 및 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 바이러스 벡터를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 핵산 서열은 제1 조절 서열에 작동가능하게 연결되고/되거나 제2 핵산 서열은 제2 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 측면에 따라, 제1 조절 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 유도하고/하거나 제2 조절 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 유도한다. 한 측면에 따라, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열은 각각 프로모터를 포함한다. 한 측면에 따라, 프로모터는 구성적 프로모터 또는 유도성 프로모터이다. 한 측면에 따라, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열은 각각 세포-특이적 프로모터 또는 조직-특이적 프로모터를 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 조절 서열 및 제2 조절 서열은 각각 간-특이적 프로모터를 포함한다. 한 측면에 따라, 조절 서열은 hEf1α 프로모터, shEf1α 프로모터 (또는 말단절단된 hEf1α 프로모터), CAG 프로모터 (예컨대, 시토메갈로바이러스, 닭 베타-액틴 인트론, 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 억셉터), CMV 프로모터, hAAT 프로모터, 갑상선 호르몬-결합 글로불린 프로모터, 알부민 프로모터, 티록신-결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 간 제어 영역 (HCR)-ApoCII 하이브리드 프로모터, CASI 프로모터, HCR-hAAT 하이브리드 프로모터, 마우스 알부민 유전자 인핸서 (Ealb) 요소와 조합된 hAAT 프로모터, 및 아포지단백질 E 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로모터를 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 핵산 서열은 포유동물 세포에서의 RNA 안정성 및 발현을 위해

3' 비번역 영역에 작동가능하게 연결된다. 한 측면에 따라, 3' 비번역 영역은 WPRE 서열, WPRE3 서열, SV40 후기 폴리아데닐화 신호 (예컨대, 말단절단됨), HBG 폴리아데닐화 신호, 토끼 베타-글로빈 폴리아데닐화 신호, 소 bgpA, ETC 폴리아데닐화 신호, 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 서열을 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터는 아데노-연관된 바이러스 (AAV) 벡터이다. 한 측면에 따라, AAV 벡터는 AAV-DJ이다. 한 측면에 따라, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV, 11, AAV12, AAV2.5, 및 AAVrh10.XX 바이러스 벡터로부터 선택되는 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 sTGFβ-R2 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 인간 sTGFβ-R2 단백질이다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 개의 sTGFβ-R2 단백질이다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 α클로토 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 인간 α클로토 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 개의 α클로토 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질 및/또는 α클로토 단백질은 Ig Fc 도메인을 포함하는 Fc 융합 단백질이다. 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린, 및 돼지 Fc 또는 IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, 및 IgG4를 포함하는 이의 아유형으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, Ig Fc 도메인은 서열식별번호: 5, 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질 및/또는 α클로토 단백질은 전신적으로 발현되고 분포된다. 한 측면에 따라, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터는 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, 제1 바이러스 벡터 및/또는 제2 바이러스 벡터는 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시킨다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체의 골관절염은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체는 포유동물이다. 한 측면에 따라, 포유동물은 인간이다. 한 측면에 따라, 포유동물은 개이다.

[0166] 본 개시내용의 실시양태는 골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편; 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 조합의 치료 유효량을 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함한다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여되고, sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및/또는 sTGFβ-R2 단백질은 정맥내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및/또는 sTGFβ-R2 단백질은 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함한다.

[0167] 본 개시내용의 실시양태는 골관절염의 치료를 필요로 하는 대상체에서 골관절염을 치료하는 방법에 관한 것이며, 방법은 대상체에게 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 투여하여 대상체에서 골관절염을 치료하는 단계를 포함한다. 한 측면에 따라, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 폴리시스트론 요소에 의해 분리된다. 한 측면에 따라, 폴리시스트론 요소는 IRES 또는 2A 서열이다. 한 측면에 따라, 핵산 분자는 정맥내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, 핵산 분자는 골관절염 부위에서 연골 내로 관절내 주사에 의해 투여된다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체에서 골관절염의 진행을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 증가, 재생, 또는 재성장된 연골을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체에서 골관절염을 치료하는 것은 대조군 대상체와 비교하여 대상체의 골관절염 부위에서 염증을 감소시키는 것을 포함한다. 한 측면에 따라, 핵산 분자는 DNA, RNA, 또는 이들의 조합을 포함한다. 한 측면에 따라, 대상체는 포유동물이다. 한 측면에 따라, 포유동물은 인간이다. 한 측면에 따라, 포유동물은 개이다.

[0168] 본 개시내용의 실시양태는 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열; 및 가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 측면에 따라, 제1 핵산 서열 및 제2 핵산 서열은 폴리시스트론 요소에 의해 분리된다. 한 측면에 따라, 폴리시스트론 요소는 IRES 또는 2A 서열이다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터는 포유동물 세포에서 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결되고; 제2 프로모터는 포유동물 세포에서 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 세포 또는 조직 특이적이다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 구성적 또는 유도성이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 개 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 인간 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 서열식별번호: 1에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 서열식별번호: 3에 제시된 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0169] 본 개시내용의 실시양태는 상기 기재된 바와 같은 벡터 및 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 제약 제형에 관한 것이다.

[0170] 본 개시내용의 실시양태는 골관절염의 치료를 필요로 하는 포유동물에서 골관절염을 치료하는 방법에 관한 것이며, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 조합의 치료 유효량을 포유동물에게 골관절염을 나타내는 포유동물 내의 부위에 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 골관절염의 진행은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소되거나, 골관절염 부위에서 연골은 치료되지 않은 병태와 비교하여 증가, 재생, 또는 재성장되거나, 염증은 치료되지 않은 병태와 비교하여 감소된다. 한 측면에 따라, 포유동물은 개 또는 인간이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여되고, sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 가용성 단백질로 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편은 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여되고, sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 관절내 연골 주사에 의해 가용성 단백질로 투여된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터는 관절내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 벡터가 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열을 포함하는 제1 벡터 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 제2 벡터는 관절내 연골 주사에 의해 투여되고, 제1 핵산 서열은 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현되고, 제2 핵산 서열은 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편을 생성하도록 발현된다. 한 측면에 따라, 벡터는 재조합 바이러스이다. 한 측면에 따라, 벡터는 파르보바이러스이다. 한 측면에 따라, 벡터는 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, AAV 벡터는 AAV-DJ이다. 한 측면에 따라, 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 벡터는 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시킨다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 재조합 바이러스이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 파르보바이러스이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV-DJ 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV2.5, 또는 AAVrh10.XX 또는 이들의 조합에 대해 혈청형이 지정된 AAV 벡터이다. 한 측면에 따라, 제1 벡터 및 제2 벡터는 골관절염 부위에서 중간엽 세포를 감염시킨다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 인간 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 개 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말,

뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 서열식별번호: 1에 상응하는 α클로토 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 서열식별번호: 3에 상응하는 sTGFβ-R2 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다.

[0171] 본 개시내용의 실시양태는 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제1 핵산 서열 및 가용성 형질전환 성장 인자 베타 수용체 II (sTGFβ-R2) 단백질 또는 이의 활성 단편을 코딩하는 제2 핵산 서열을 포함하는 벡터에 관한 것이다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터는 포유동물 세포에서 α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제1 핵산 서열에 작동가능하게 연결되고, 제2 프로모터는 포유동물 세포에서 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편의 발현을 위한 제2 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 세포 또는 조직 특이적이다. 한 측면에 따라, 제1 프로모터 및 제2 프로모터는 구성적 또는 유도성이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 인간 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 또는 이의 활성 단편 및 sTGFβ-R2 단백질 또는 이의 활성 단편은 개 단백질이다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질 및 sTGFβ-R2 단백질은 인간, 개, 고양이, 소, 양, 염소, 말, 뮤린 및 돼지 단백질로 이루어진 군으로부터 선택된다. 한 측면에 따라, α클로토 단백질은 서열식별번호: 1에 상응하는 α클로토 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다. 한 측면에 따라, sTGFβ-R2 단백질은 서열식별번호: 3에 상응하는 sTGFβ-R2 단백질의 아미노산 서열과 적어도 90% 서열 동일성을 갖는다.

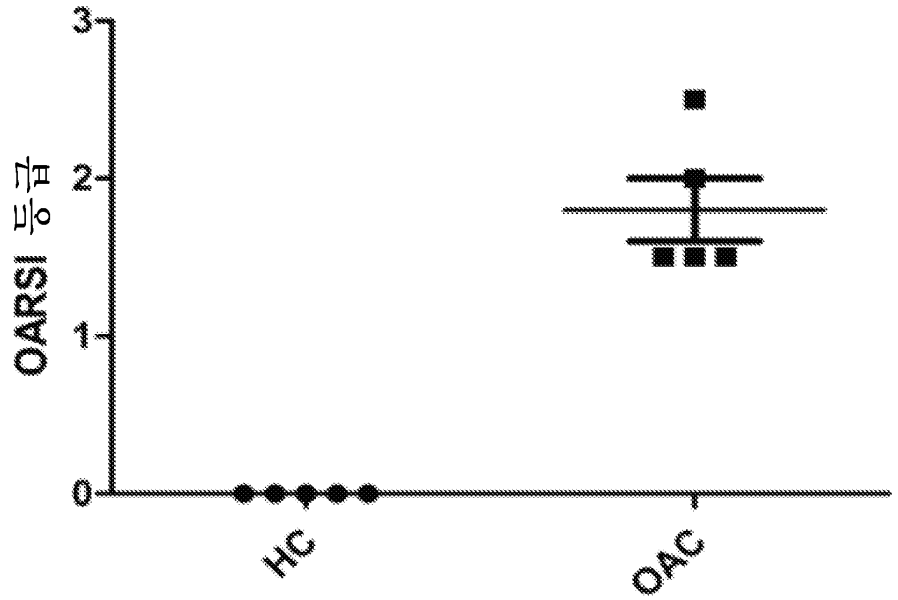
[0172] 본 개시내용의 실시양태는 제약상 허용되는 부형제에 이의 기재된 벡터를 포함하는 제약 제형에 관한 것이다.

[0173] 본 출원에 인용된 모든 공개문, 특허, 특허 출원 및 다른 문서는 각각의 개별 공개문, 특허, 특허 출원 또는 다른 문서가 모든 목적을 위해 참조로 포함되는 것으로 각기 표시되는 것과 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체가 참조로 본원에 포함된다.

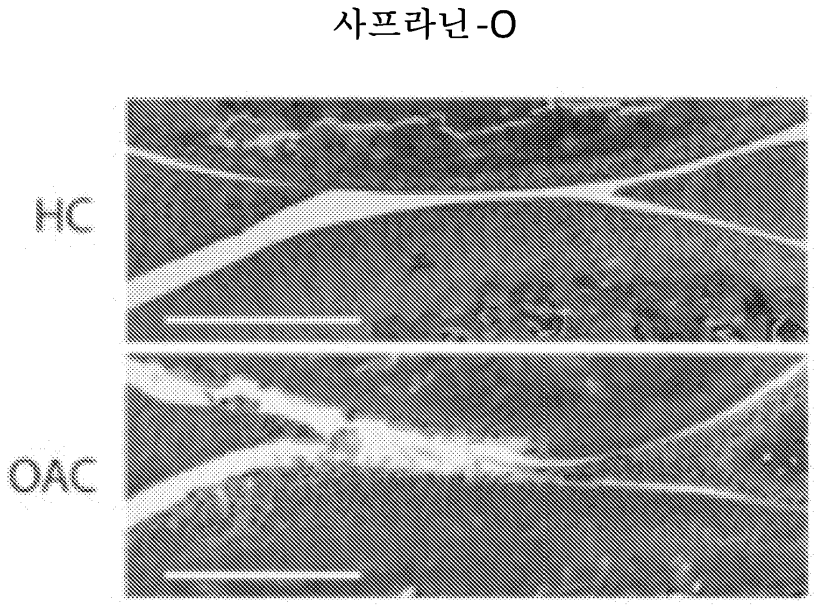
[0174] 다양한 특정 실시양태가 예시되고 설명되었지만, 본 발명(들)의 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 다양한 변경이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

도면

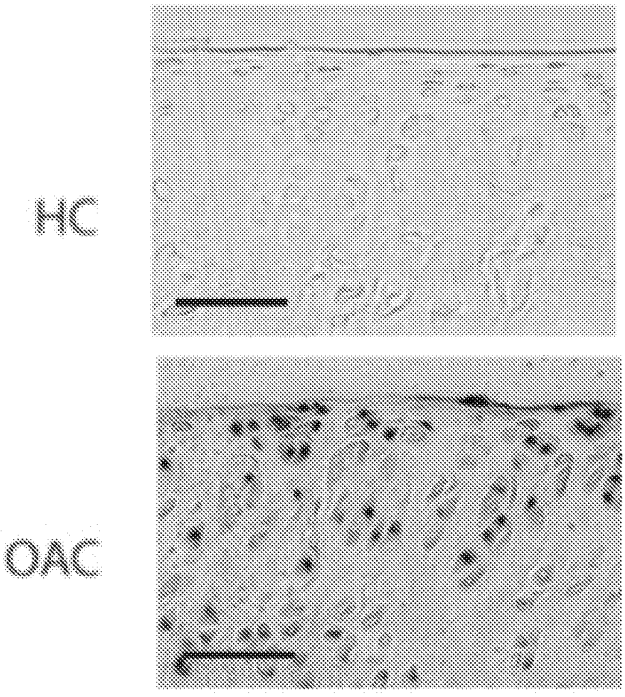
도면1a



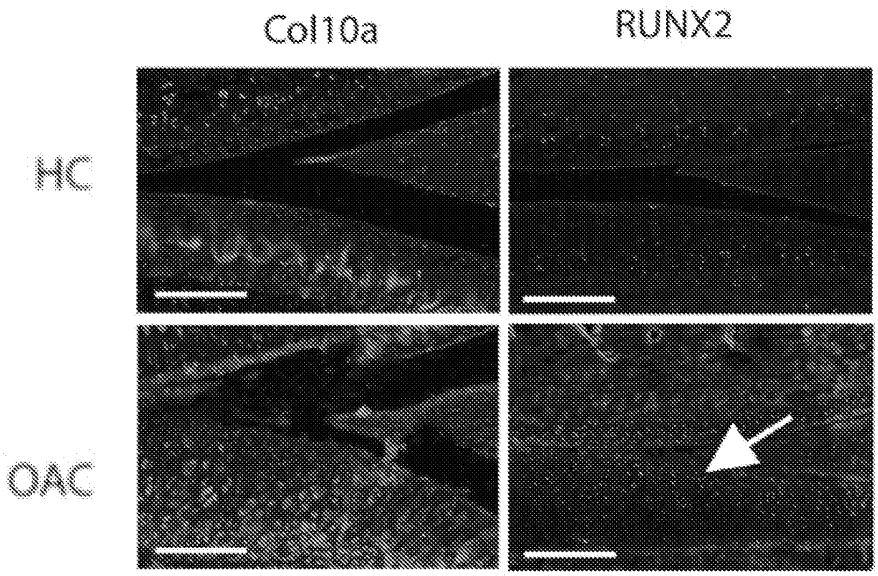
도면1b



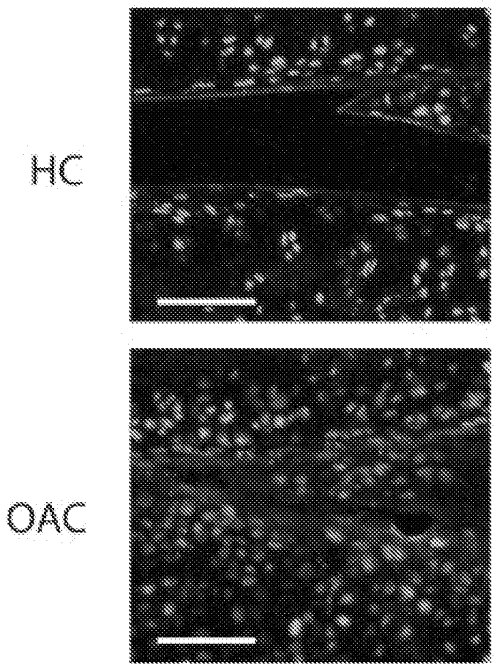
도면1c



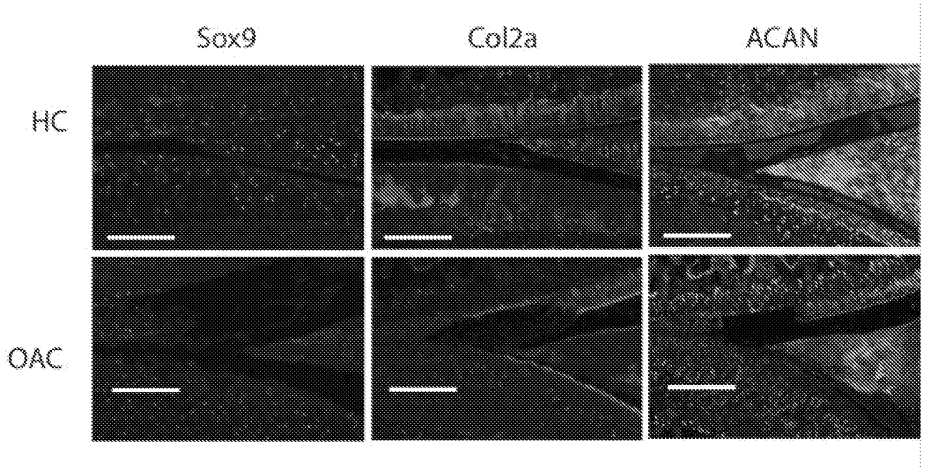
도면1d



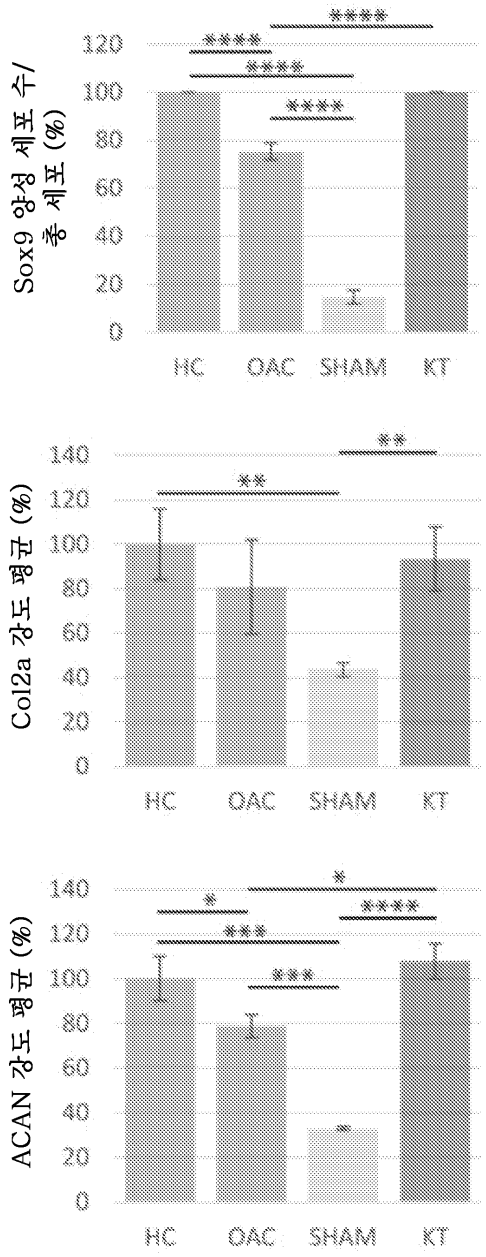
도면1e



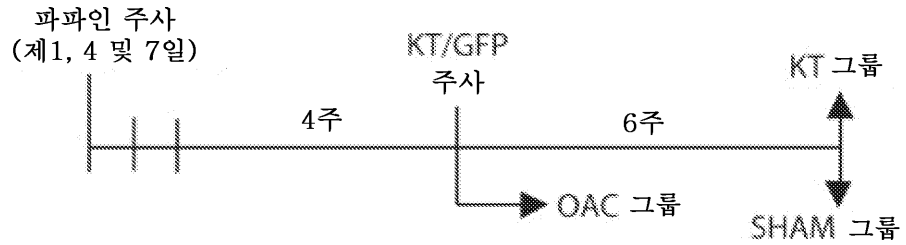
도면1f



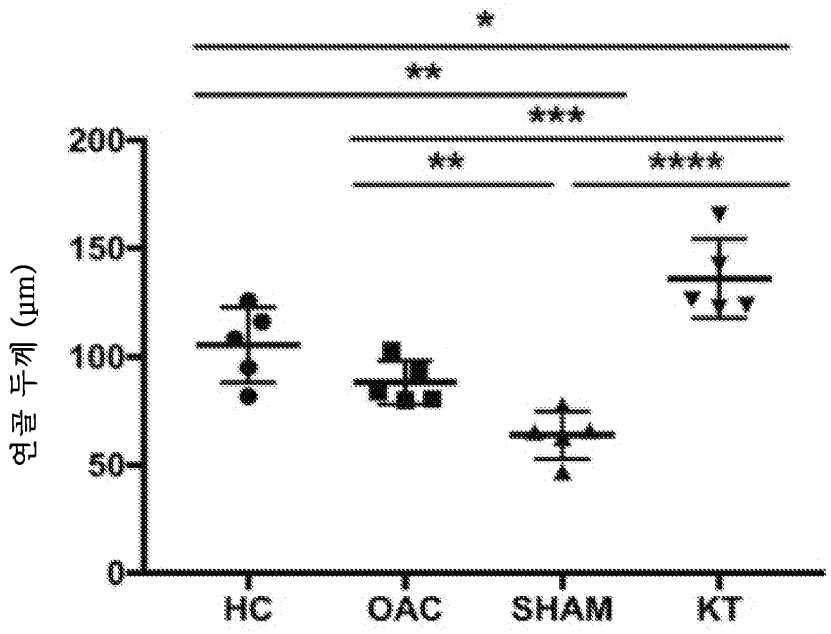
도면2a


Sox9 양성 세포 수/
총 세포 (%)
120
100
80
60
40
20
0
HC
OAC
SHAM
KT
****
Col2a 강도 평균 (%)
140
120
100
80
60
40
20
0
**
ACAN 강도 평균 (%)
*
***
****

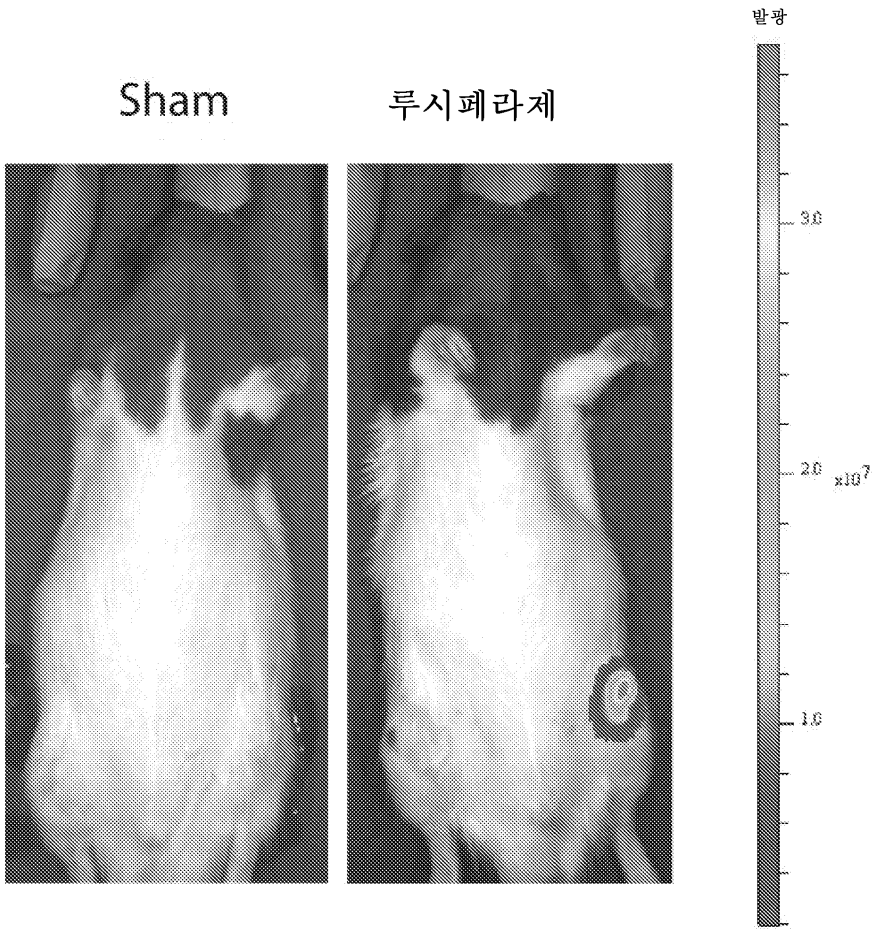
도면2b


파파인 주사
(제1, 4 및 7일)
KT/GFP
주사
KT 그룹
4주
6주
OAC 그룹
SHAM 그룹

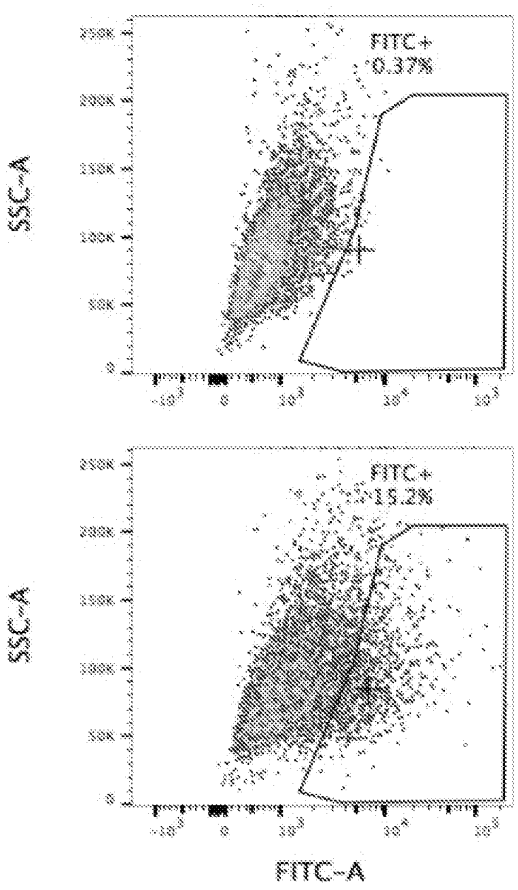
도면2c


*
**
***
**
****
200
150
100
50
0
연골 두께 (μm)
HC
OAC
SHAM
KT

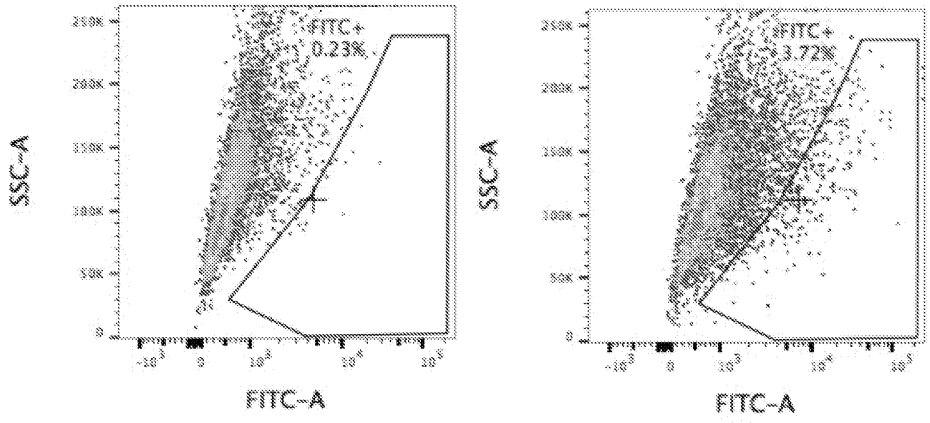
도면3a


Sham
루시페라제
발광
3.0
2.0
x10^7
1.0

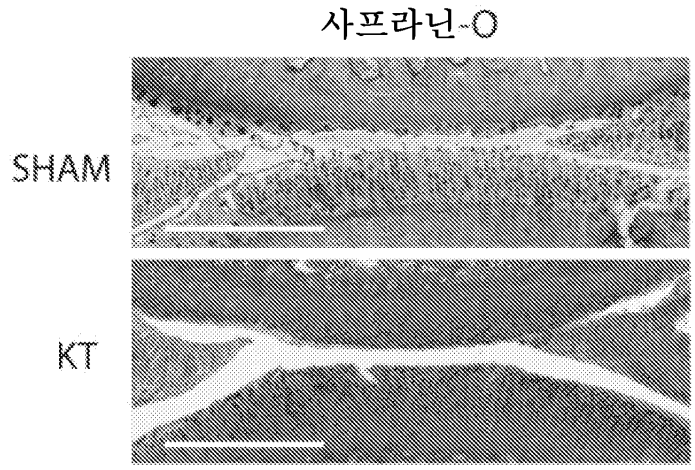
도면3b


FITC+
0.37%
FITC+
15.2%
SSC-A
SSC-A
FITC-A

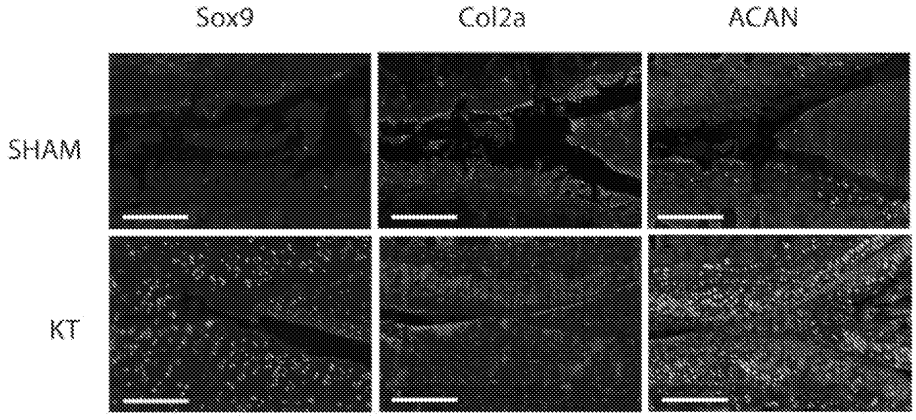
도면3c


FITC+
0.23%
FITC+
3.72%
SSC-A
SSC-A
FITC-A
FITC-A

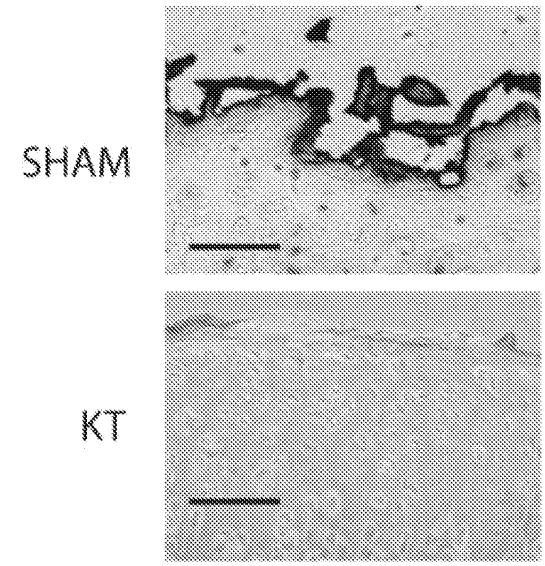
도면4a



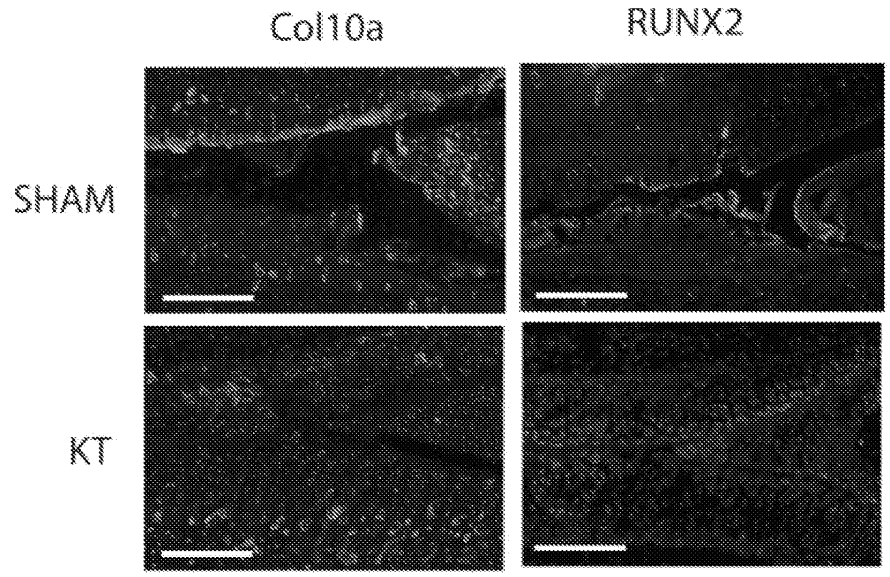
도면4b



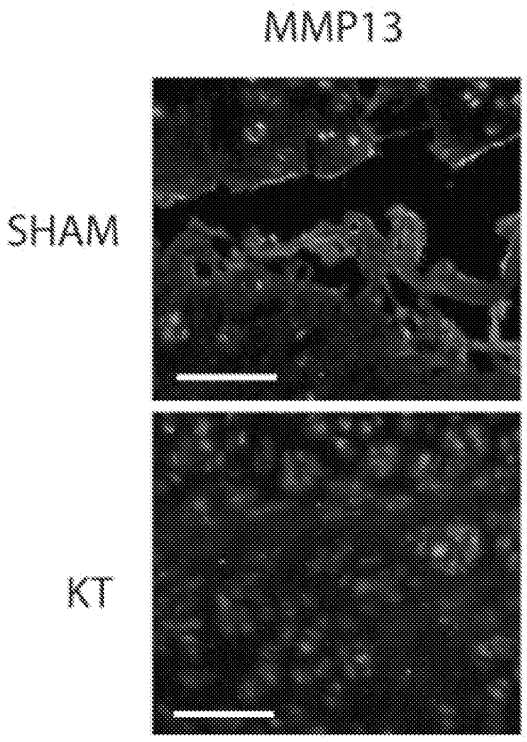
도면4c



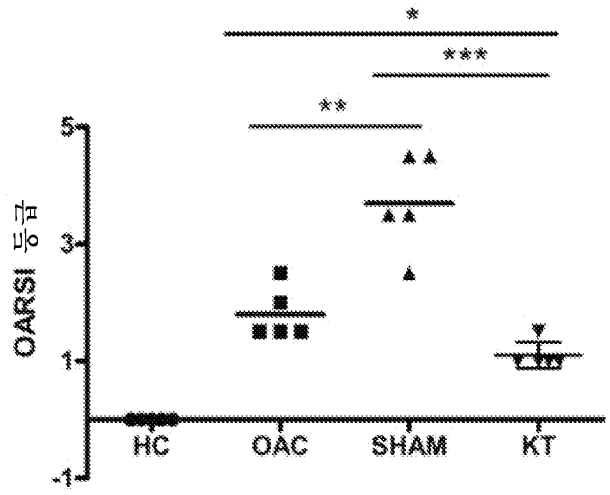
도면4d



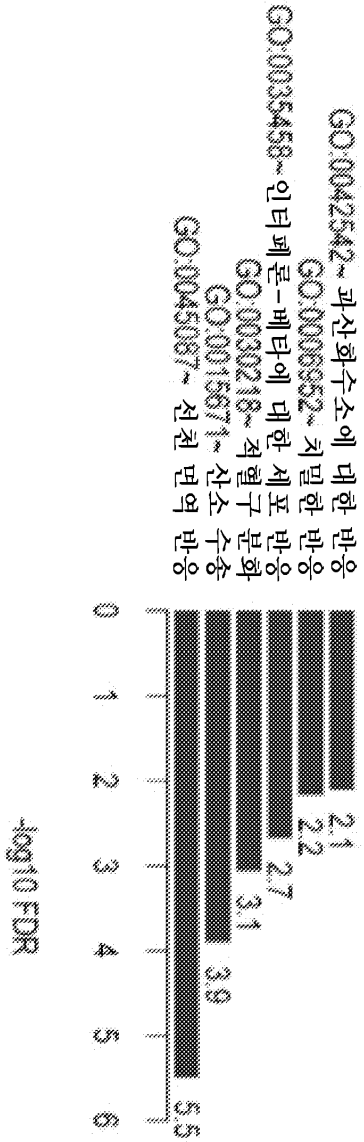
도면4e



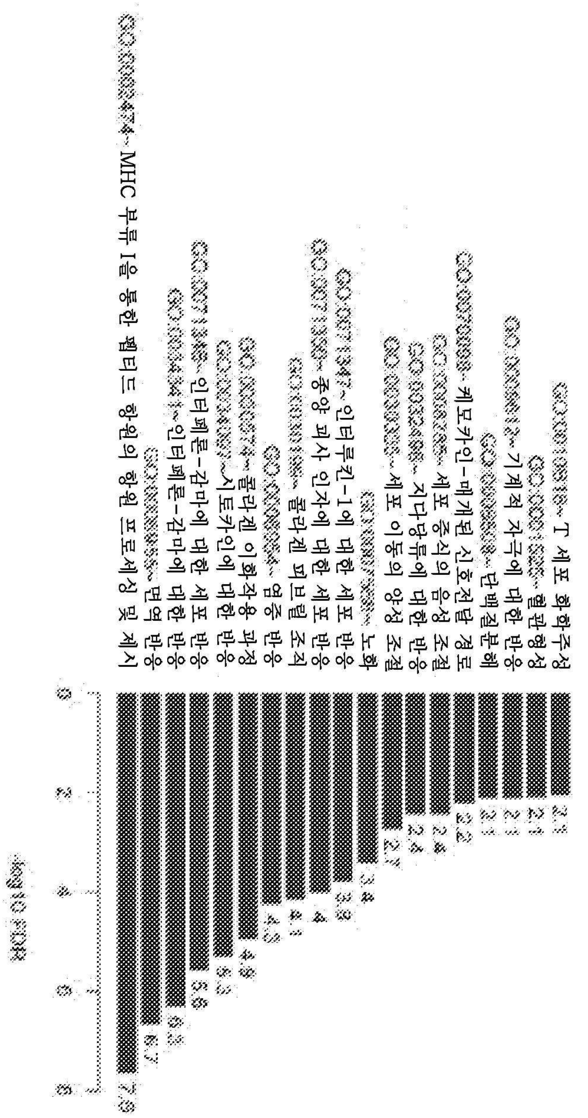
도면4f



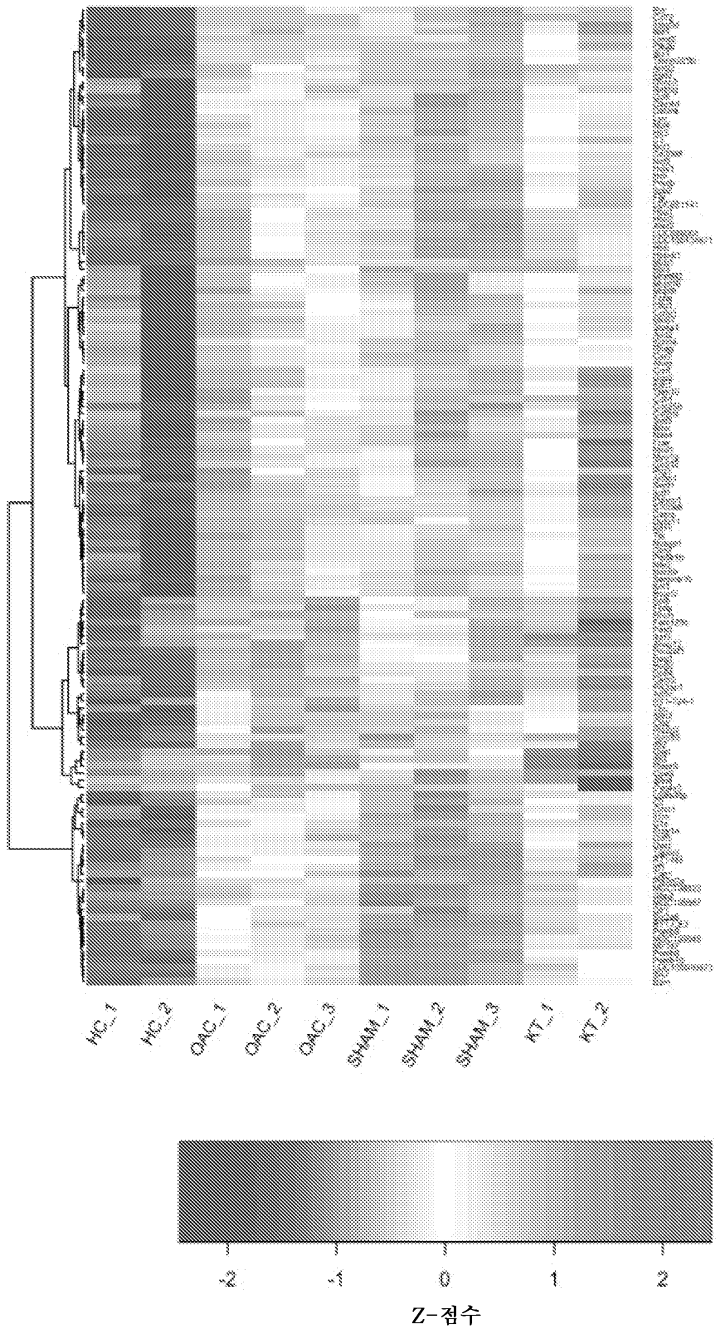
도면5a


GO:0042542~과산화수소에 대한 반응
GO:0000302~치밀한 반응
GO:0035458~인터페론-베타에 대한 세포 반응
GO:0030218~적혈구 분화
GO:0015671~산소 수송
GO:0045087~선천 면역 반응
0
1
2
3
4
5
6
2.1
2.2
2.7
3.1
3.9
5.5
-log10 FDR

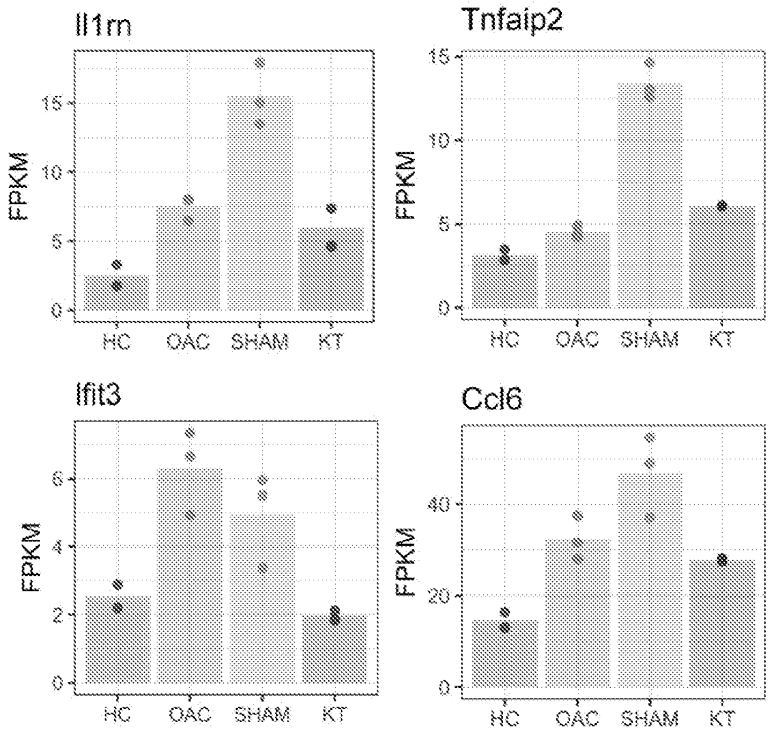
도면5b


T 세포 화학주성
혈관형성
기계적 자극에 대한 반응
단백질분해
케모카인-매개된 신호전달 경로
세포 증식의 음성 조절
지다당류에 대한 반응
세포 이동의 양성 조절
노화
인터루킨-1에 대한 세포 반응
종양 괴사 인자에 대한 세포 반응
콜라겐 피브릴 조직
염증 반응
콜라겐 이화작용 과정
사이토카인에 대한 반응
인터페론-감마에 대한 세포 반응
인터페론-감마에 대한 반응
면역 반응
GO:0002474~MHC 부류 I을 통한 펩티드 항원의 항원 프로세싱 및 제시
2.1
2.1
2.1
2.1
2.2
2.4
2.4
2.7
3.4
3.8
4
4.1
4.5
4.9
5.3
5.8
6.3
6.7
7.9
0
2
4
6
8
-log10 FDR

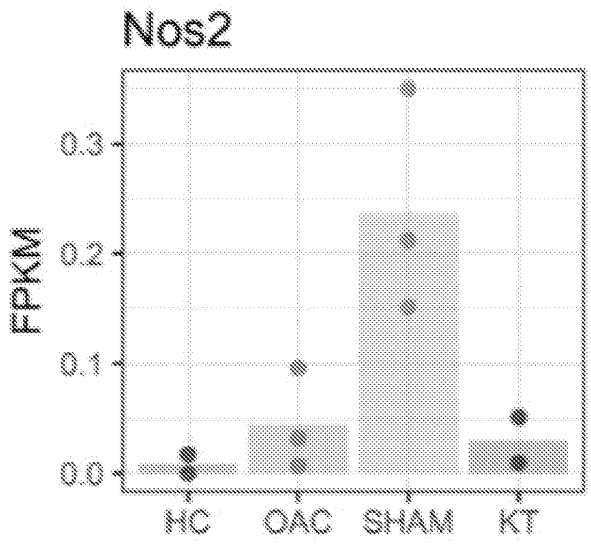
도면5c



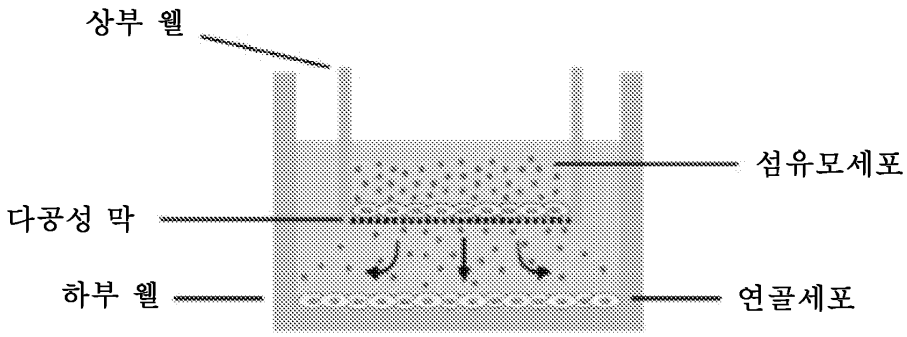
도면5d


Il1rn
Tnfaip2
Ifit3
Ccl6
FPKM
HC
OAC
SHAM
KT

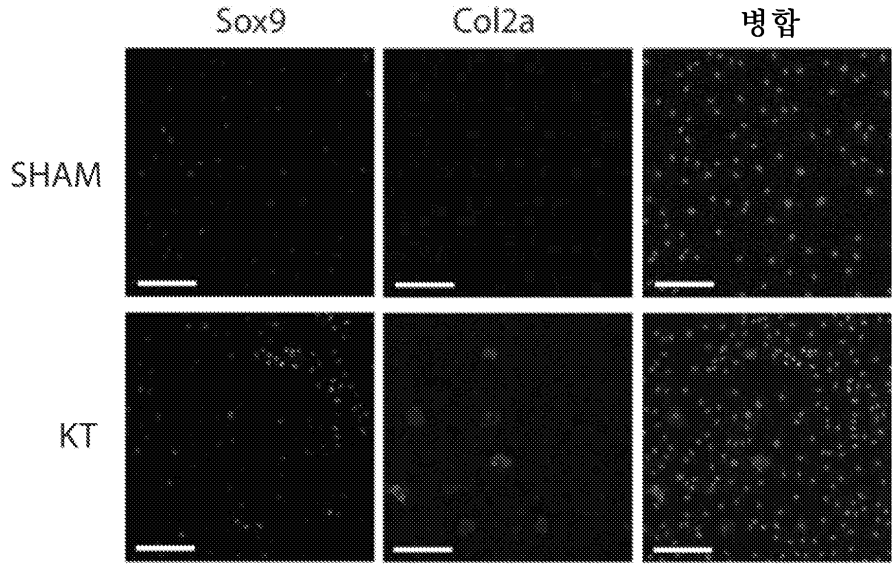
도면5e


Nos2
FPKM
HC
OAC
SHAM
KT

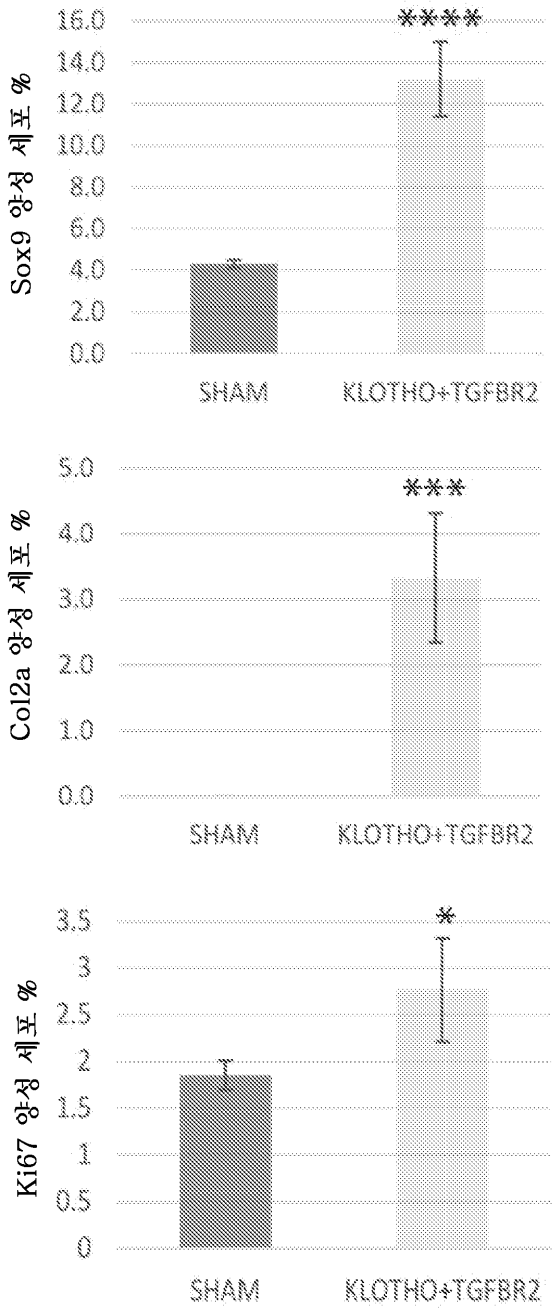
도면6a



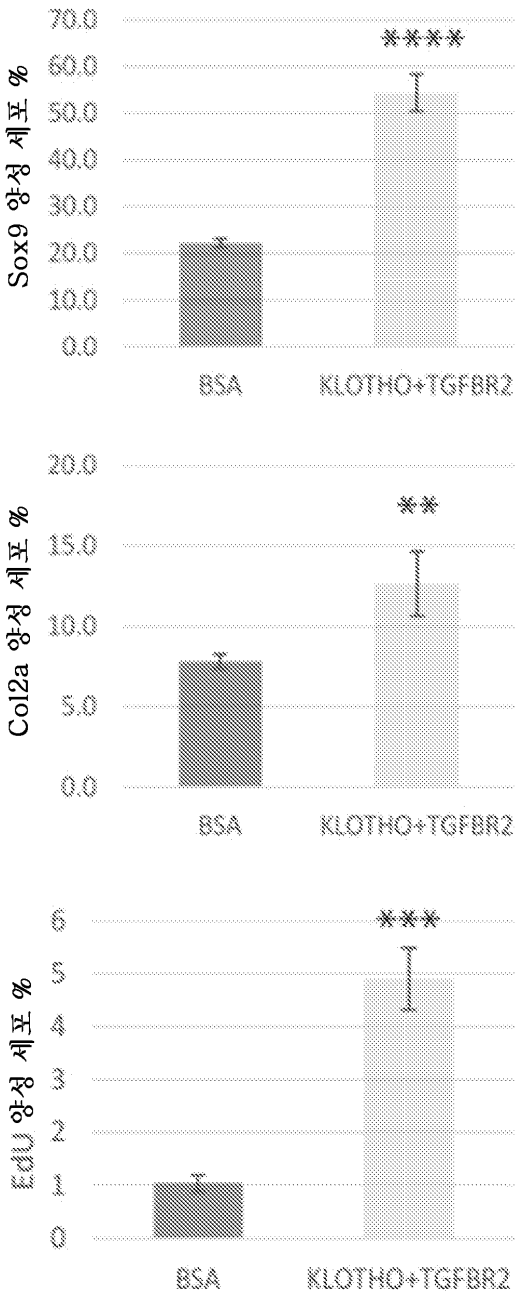
도면6b



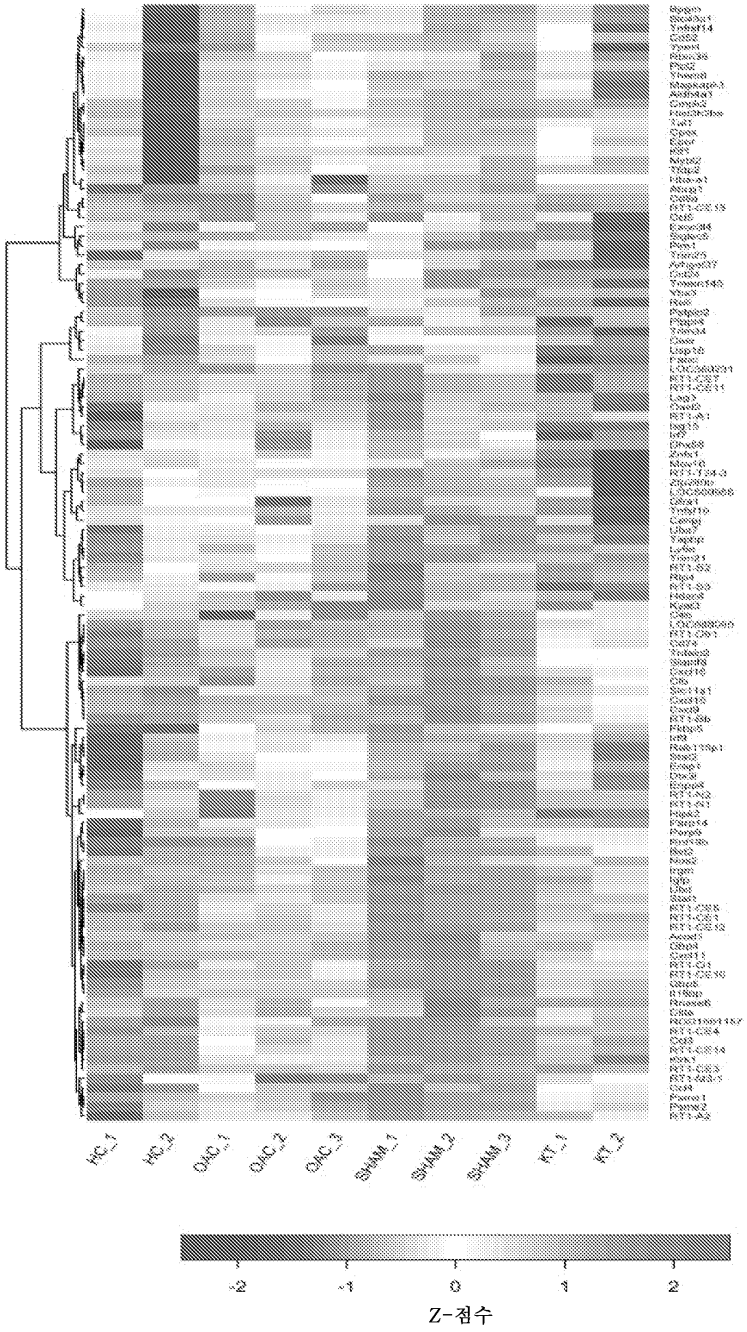
도면6c


Sox9 양성 세포 %
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
****
SHAM
KLOTHO+TGFBR2
Col2a 양성 세포 %
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
***
SHAM
KLOTHO+TGFBR2
Ki67 양성 세포 %
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
*
SHAM
KLOTHO+TGFBR2

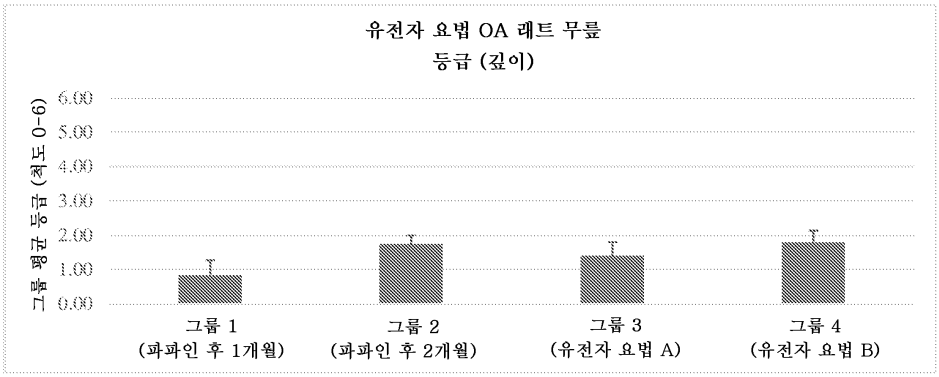
도면6d


Sox9 양성 세포 %
70.0
60.0
50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
****
BSA
KLOTHO+TGFBR2
Col2a 양성 세포 %
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
**
BSA
KLOTHO+TGFBR2
EdU 양성 세포 %
6
5
4
3
2
1
0
***
BSA
KLOTHO+TGFBR2

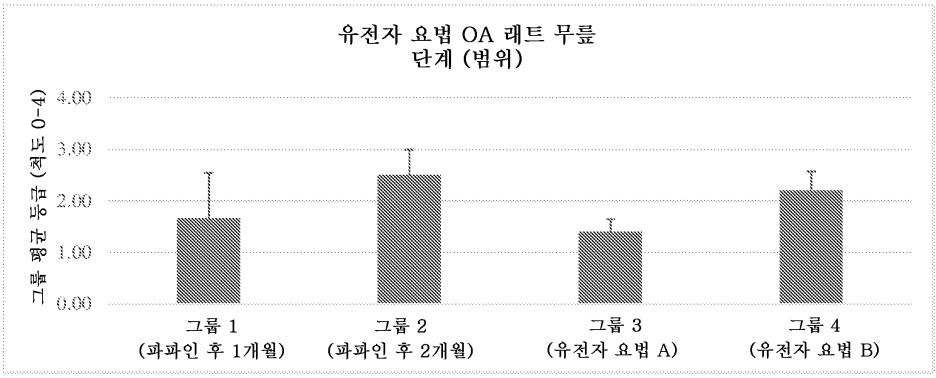
도면7



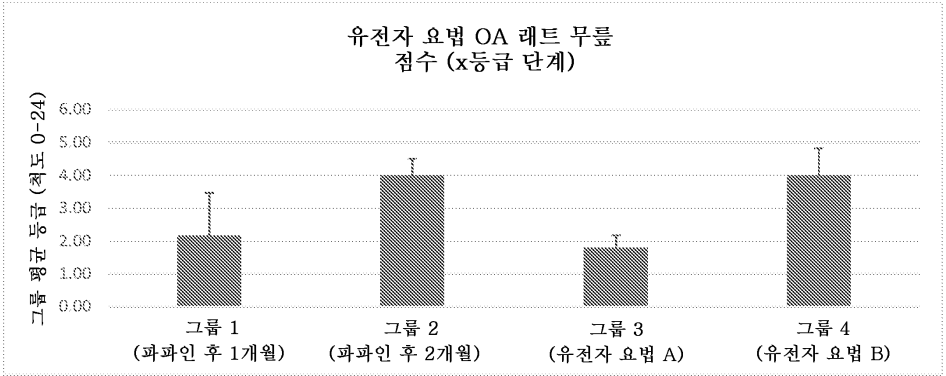
도면8


유전자 요법 OA 래트 무릎
등급 (깊이)
그룹 평균 등급 (척도 0-6)
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
그룹 1
(파파인 후 1개월)
그룹 2
(파파인 후 2개월)
그룹 3
(유전자 요법 A)
그룹 4
(유전자 요법 B)

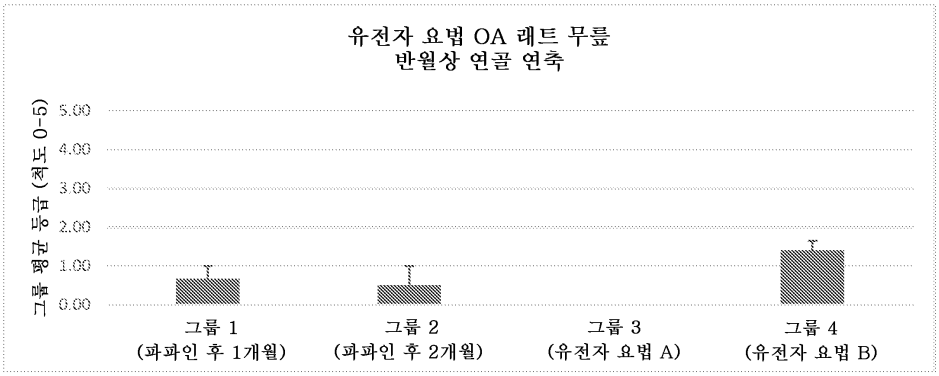
도면9


유전자 요법 OA 래트 무릎
단계 (범위)
그룹 평균 등급 (척도 0-4)
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
그룹 1
(파파인 후 1개월)
그룹 2
(파파인 후 2개월)
그룹 3
(유전자 요법 A)
그룹 4
(유전자 요법 B)

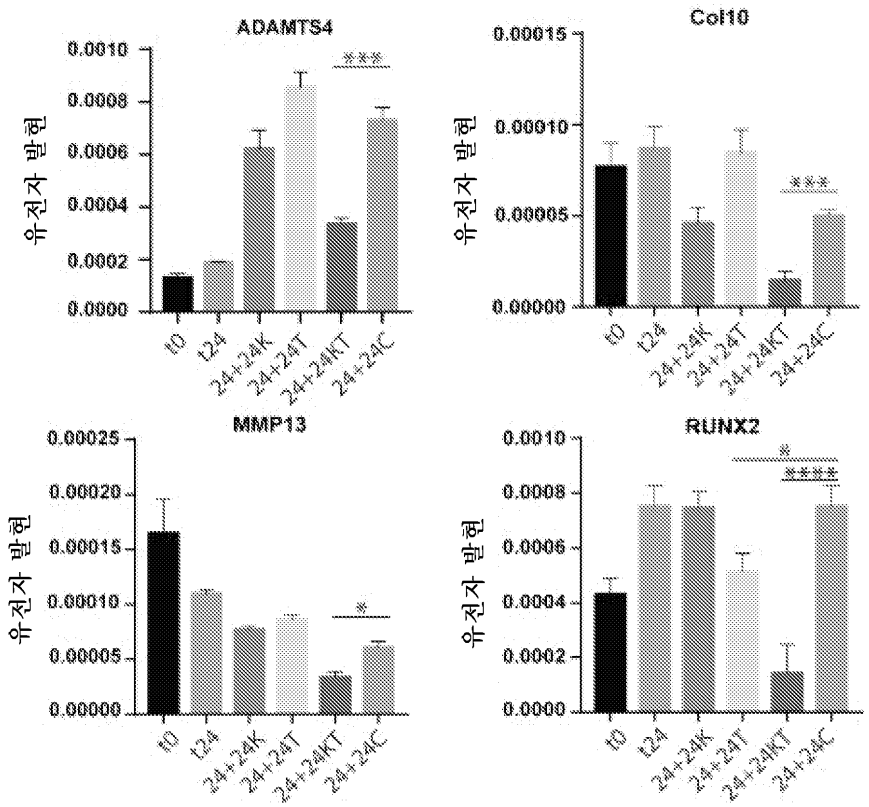
도면10


유전자 요법 OA 래트 무릎
점수 (x등급 단계)
그룹 평균 등급 (척도 0-24)
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
그룹 1
(파파인 후 1개월)
그룹 2
(파파인 후 2개월)
그룹 3
(유전자 요법 A)
그룹 4
(유전자 요법 B)

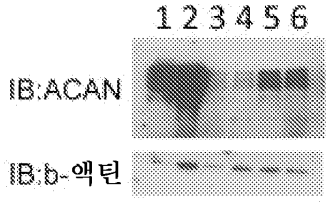
도면11



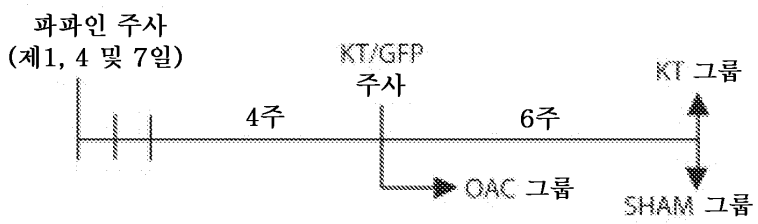
도면12a



도면12b



도면12c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE

SALK INSTITUTE FOR BIOLOGICAL STUDIES

<120> METHODS FOR TREATING OSTEOARTHRITIS

<130> 010498.01389WWO

<140> PCT/US2020/063319

<141> 2020-12-04

<150> 62/944,027

<151> 2019-12-05

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 892

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polypeptide

<400> 1

Met Ala Thr Cys Ile Leu Gln Met Arg Phe Leu Arg Leu Gly Lys Ile

1 5 10 15

Leu Phe His Ser Ser Pro Gln Ser Thr Gly Gly Ser Gly Gly Thr Arg

20 25 30

Gly Pro Arg Ala Pro Ala Gln Leu Arg Thr Gln Arg Gly Thr Asp Lys

35 40 45

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

50 55 60

Ala Asp His Phe Arg Asp Tyr Ala Glu Leu Cys Phe Arg His Phe Cys

65 70 75 80

Gly Gln Val Lys Tyr Trp Ile Thr Ile Asp Asn Pro Tyr Val Val Ala

85 90 95

Trp His Gly Tyr Ala Thr Gly Arg Leu Ala Pro Gly Val Arg Gly Ser

100 105 110

Pro Arg Leu Gly Tyr Leu Val Ala His Asn Leu Leu Leu Ala His Ala

115 120 125

Lys Ile Trp His Leu Tyr Asn Thr Ser Phe Arg Pro Thr Gln Gly Gly

130 135 140

Gln Val Ser Ile Ala Leu Ser Ser His Trp Ile Asn Pro Arg Arg Met

145 150 155 160

Thr Asp His Ser Ile Lys Glu Cys Gln Lys Ser Leu Asp Phe Val Leu

165 170 175

Gly Trp Phe Ala Lys Pro Ile Phe Ile Asp Gly Asp Tyr Pro Glu Ser

180 185 190

Met Lys Asn Asn Leu Ser Ser Leu Leu Pro Val Phe Thr Glu Ser Glu

195 200 205

Lys Lys Phe Ile Lys Gly Thr Ala Asp Phe Phe Ala Leu Ser Phe Gly

210 215 220

Pro Thr Leu Ser Phe Gln Leu Leu Asp Pro His Met Lys Phe His Gln

225 230 235 240

Leu Glu Ser Pro Ser Leu Arg Gln Leu Leu Ser Trp Ile Asp Leu Glu

245 250 255

Tyr Asn His Pro Gln Ile Phe Ile Val Glu Asn Gly Trp Phe Val Ser

260 265 270

Gly Thr Thr Lys Arg Asp Asp Ala Lys Tyr Met Tyr Tyr Leu Lys Lys

275 280 285

Phe Ile Met Glu Thr Leu Lys Ala Ile Arg Leu Asp Gly Val Asp Val

290 295 300

Ile Gly Tyr Thr Ala Trp Ser Leu Met Asp Gly Phe Glu Trp His Arg

305 310 315 320

Gly Tyr Ser Ile Arg Arg Gly Leu Phe Tyr Val Asp Phe Leu Ser Gln

325 330 335

Asp Lys Lys Leu Leu Pro Lys Ser Ser Ala Leu Phe Tyr Gln Lys Leu

340 345 350

Ile Glu Lys Asn Gly Phe Pro Pro Leu Pro Glu Asn Gln Pro Leu Glu

355 360 365

Gly Thr Phe Pro Cys Asp Phe Ala Trp Gly Ile Val Asp Asn Tyr Ile

370 375 380

Gln Val Asp Thr Thr Leu Ser Gln Phe Thr Asp Pro Asn Val Tyr Leu

385 390 395 400

Trp Asp Val His His Ser Lys Arg Leu Ile Lys Val Asp Gly Leu Arg

405 410 415

Ala Lys Lys Arg Lys Pro Tyr Cys Val Asp Phe Ala Ala Ile Gly Pro

420 425 430

Gln Val Ala Leu Leu Gln Glu Met His Val Ser His Phe His Phe Ser

435 440 445

Leu Asp Trp Ala Leu Leu Leu Pro Leu Gly Asn Gln Ser Arg Val Asn

450 455 460

His Ala Ala Leu His Tyr Tyr Gly Cys Val Ala Ser Glu Leu Leu Arg

465 470 475 480

Ala Asn Ile Thr Pro Val Val Ala Leu Trp Arg Pro Ala Ala Ala His

485 490 495

Gln Gly Leu Pro Gly Pro Leu Ala Gln Arg Gly Ala Trp Glu Asn Pro

500 505 510

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

515 520 525

Leu Gly Arg His Val Lys Val Trp Ile Thr Leu Arg Glu Pro Pro Thr

530 535 540

Arg Asn Leu Thr Leu Arg Ala Gly His Asn Leu Leu Arg Ala His Ala
545 550 555 560
Leu Ala Trp Arg Val Tyr Asp Glu Gln Phe Arg Gly Ser Gln Gln Gly
565 570 575
Lys Val Ser Ile Ala Leu Gln Ala Asp Trp Val Glu Pro Ala Cys Pro

580 585 590
Ser Ser Gln Lys Asp Arg Glu Val Ala Glu Arg Val Leu Glu Phe Asp
595 600 605
Val Gly Trp Leu Ala Glu Pro Ile Phe Gly Ser Gly Asp Tyr Pro Arg
610 615 620
Leu Met Arg Asp Trp Leu Thr Arg Arg Asp His Ser Leu Leu Pro Tyr
625 630 635 640
Phe Thr Asp Glu Glu Lys Arg Leu Ile Arg Gly Ser Phe Asp Phe Leu

645 650 655
Ala Leu Ser His Tyr Thr Thr Ile Leu Val Asp Trp Glu Lys Glu Asp
660 665 670
Pro Val Lys Tyr Asn Asp Tyr Leu Glu Val Gln Glu Met Thr Asp Ile
675 680 685
Thr Trp Leu Asn Ser Pro Ser Gln Val Ala Val Val Pro Trp Gly Leu
690 695 700
Arg Lys Val Leu Asn Trp Leu Lys Phe Lys Tyr Gly Asp Leu Pro Met

705 710 715 720
Tyr Ile Val Ser Asn Gly Ile Asp Asp Asp Pro Arg Ala Ala Gln Asp
725 730 735
Ser Leu Arg Val Tyr Tyr Met Gln Asn Tyr Val Asn Glu Ala Leu Lys
740 745 750
Ala Tyr Val Leu Asp Gly Ile Asn Leu Cys Gly Tyr Phe Ala Tyr Ser
755 760 765
Phe Asn Asp Arg Thr Ala Pro Lys Phe Gly Leu Tyr His Tyr Ala Ala

770 775 780
Asn Gln Phe Glu Pro Lys Pro Ser Val Lys His Tyr Arg Lys Ile Ile

785 790 795 800

Asp Asn Asn Gly Phe Pro Gly Pro Glu Thr Leu Gly Arg Phe Cys Pro

805 810 815

Glu Glu Phe Thr Leu Cys Thr Glu Cys Ser Phe Phe His Thr Arg Lys

820 825 830

Ser Leu Leu Ala Phe Ile Ala Phe Leu Leu Phe Ala Phe Ile Ile Ser

835 840 845

Leu Ser Leu Ile Phe Tyr Tyr Ser Arg Lys Gly Arg Arg Ser Tyr Lys

850 855 860

Gly Gly Ser Gly Gly Ser Asp Tyr Lys Asp His Asp Gly Asp Tyr Lys

865 870 875 880

Asp His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

885 890

<210> 2

<211> 2682

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 2

atggccacct gcattttaca gatgagattc ctaaggctgg ggaagatact gttccactcc 60

agcccacaaa gcacaggtgg cagtggtggg acccggggac ctcgagctcc ggcacagctg 120

cgaacgcagc gtggcacaga taagttagtt gctaagtcag agctcaaggc taaaacggcc 180

caccgcgcgc tggccgacca cttcagggac tacgccgagc tctgcttccg ccacttctgc 240

ggccaggtca agtactggat caccatcgac aacccctacg tggtggcctg gcacggctac 300

gccaccggtc gcctggcacc cggagtcaga ggcagcccgc ggctcgggta cctggtggcg 360

cacaacctcc tcctggctca cgccaaaatc tggcatctct acaatacttc tttccgccca 420

actcagggag gccaggtatc cattgcccta agctcccact ggatcaatcc tcgaagaatg 480

accgaccata gcatcaaaga atgtcaaaaa tctcttgact ttgtactagg ctggtttgcc 540

aagcccatat ttattgatgg tgactatcct gagagcatga agaataacct gtcatctctt 600

ctgcctgttt ttactgaatc tgagaaaaag ttcatcaagg gaacagctga ctttttgct 660

ctttcttttg gaccaacttt gagttttcaa ctcttggacc ctcatatgaa gttccaccaa 720

ttagaatctc ccagcctgag gcaactcctt tcttggattg accttgaata taaccaccct 780

caaatattta ttgtggaaaa tggctggttt gtctcaggga ccaccaagag agatgatgcc 840

aaatatatgt attacctcaa aaaattcata atggaaacct taaaagccat caggctggat 900

ggggtggatg tcataggata cacagcgtgg tcccttatgg atggcttcga gtggcacaga 960

ggctacagca tcagacgtgg actcttctac gtggactttc taagccagga taagaaactg 1020

ttgccaaagt cttcagcctt gttctaccaa aagctgatag agaaaaatgg cttccctcct 1080

ttacctgaaa atcagcccct agaagggaca tttccctgtg actttgcttg gggaattgtt 1140

gacaactaca ttcaagtgga caccactctg tctcagttta ccgacccgaa cgtttacctg 1200

tgggacgtcc atcacagcaa gaggctgatt aaggtggacg ggctgcgggc caagaagagg 1260

aagccctact gcgtggactt tgccgccatc gggccccagg tggccctgct gcaggagatg 1320

cacgtctcgc attttcactt ctcgctggac tgggccctgc tcctgccgct gggcaaccag 1380

tcccgggtga accacgcggc cctgcactac tacggctgcg tggccagcga gctcctgcgc 1440

gccaacatca ccccggtggt ggcgctctgg agaccagccg ctgcgcacca gggtctgcct 1500

ggaccgctgg cacagcgcgg tgcctgggag aacccacgca ccgccctggc gttcgccgag 1560

tacgcgcgcc tgtgcttccg cgccctgggc cgccacgtca aggtgtggat cacgctgcgc 1620

gagccgccca cgcggaacct gacgctccgc gccgggcaca acctgctgcg ggcgcacgcg 1680

ctggcctggc gcgtgtacga cgagcagttc cggggctcgc agcaggggaa ggtgtccatc 1740

gccctgcagg ccgactgggt ggagcccgcc tgcccctcct cccagaagga ccgcgaagtg 1800

gccgagaggg ttctggagtt cgacgtcggc tggctggccg agcccatctt cggctccggg 1860

gactacccgc ggctgatgcg cgactggctc acccggagag accattccct cctgccctat 1920

ttcactgacg aagagaagag gctaatccgg ggttcctttg acttcctggc cttgagccat 1980

tacaccacca tcctcgtgga ctgggaaaag gaagacccag tcaaatacaa tgattacctg 2040

gaagtgcagg agatgaccga catcacctgg ctcaactccc ccagtcaggt ggccgtagtg 2100

ccctggggcc tgcgcaaagt gctcaactgg ctcaagttca agtacggaga cctccccatg 2160

tatatcgtat ccaacggcat agatgacgat ccgcgggcag cccaggactc gttgagggtg 2220

tattacatgc agaactatgt aaatgaagct ctgaaagcct acgtattgga tggtatcaat 2280

ctttgtggat actttgccta ctcatttaat gatcgcacag ctccgaagtt tggcctctat 2340

cattatgctg caaaccagtt tgagcccaaa ccgtcggtga agcattacag gaaaattatt 2400

gacaacaatg gcttcccagg ccctgaaact ttggggcggt tttgtccaga ggaattcacc 2460

ctgtgcaccg aatgcagctt ttttcacacc cgaaagtctt tactggcttt catagctttc 2520

ctacttttttg cttttattat ttctctttct ctgattttct actactctag gaaaggcaga 2580

agaagttata aaggagggag tggtgggtcc gattacaaag atcacgatgg ggactataaa 2640

gatcacgaca tcgactataa ggatgacgat gataaatgat ag 2682

<210> 3

<211> 371

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic polypeptide

<400> 3

Asn Asn Asp Met Met Val Thr Asp Ser Asn Gly Val Ile Lys Phe Pro
1 5 10 15

Gln Leu Cys Lys Phe Cys Asp Val Arg Ser Ser Thr Cys Asp Asn Gln
20 25 30

Lys Ser Cys Met Ser Asn Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro
35 40 45

His Glu Val Cys Leu Ala Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr
50 55 60

Leu Glu Thr Leu Cys His Asp Pro Lys Asp Thr Tyr His Gly Ile Val
65 70 75 80

Leu Glu Asp Ala Ala Ser Ser Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Val
85 90 95

Leu Gly Glu Thr Phe Phe Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn
100 105 110

Asp Tyr Ile Ile Phe Ser Glu Glu Tyr Ala Thr Asn Asn Pro Asp Leu
115 120 125

Leu Leu Val Ile Phe Gln Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg
130 135 140

Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro
145 150 155 160

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala
165 170 175
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp
180 185 190
Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr
195 200 205

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

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

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

<210> 4

<211> 1269

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 4

atgggtcggg ggctgctccg gggcctgtgg ccgctgcata tcgtcctgtg gacgcgcatc 60

gccagcacga ataatgacat gatggtcact gacagcaatg gtgtcatcaa atttccacaa 120

ttgtgtaaat tttgtgatgt gagatcttcc acctgtgaca accagaaatc ttgcatgagc 180

aactgcagca ttacatccat ctgtgagaag ccacatgaag tctgtctggc tgtctggaga 240

aagaatgatg agaacataac actagagact ctctgccatg accccaagga tacctaccat 300

ggaattgttc tcgaagatgc tgcctcttcg aagtgcatta tgaaagaaaa gaaggtgctg 360

ggggagactt tctttatgtg ttcctgtagc tccgacgagt gcaacgacta catcatcttc 420

tctgaagaat atgccaccaa caaccctgac ttgttgttag tcatattcca acccaaaaga 480

gaaaatggaa gagttcctcg cccacctgat tgtcccaaat gcccagcccc tgaaatgctg 540

ggagggcctt cggtcttcat ctttcccccg aaacccaagg acaccctctt gattgcccga 600

acacctgagg tcacatgtgt ggtggtggat ctggacccag aagaccctga ggtgcagatc 660

agctggttcg tggacggtaa gcagatgcaa acagccaaga ctcagcctcg tgaggagcag 720

ttcaatggca cctaccgtgt ggtcagtgtc ctccccattg ggcaccagga ctggctcaag 780

gggaagcagt tcacgtgcaa agtcaacaac aaagccctcc catccccgat cgagaggacc 840

atctccaagg ccagagggca agcccatcag cccagtgtgt atgtcctgcc gccatcccgg 900

gaggagttga gcaagaacac agtcagcttg acatgcctga tcaaagactt cttcccacct 960

gacattgatg tggagtggca gagcaatgga cagcaggagc ctgagagcaa gtaccgcacg 1020

accccgcccc agctggacga ggacgggtcc tacttcctgt acagcaagct ctctgtggac 1080

aagagccgct ggcagcgggg agacaccttc atatgtgcgg tgatgcatga agctctacac 1140

aaccactaca cacaggaatc cctctcccat tctccgggta aaggagggag tggtgggtcc 1200

gattacaaag atcacgatgg ggactataaa gatcacgaca tcgactataa ggatgacgat 1260

gataaatga 1269

<210> 5

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

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

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

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

305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 6
<211> 232
<212> PRT
<213> Mus musculus
<400> 6
Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala
1 5 10 15
Pro Asn Leu Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile
20 25 30
Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val

35 40 45
Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val
50 55 60
Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp
65 70 75 80
Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln
85 90 95
Asp Trp Met Ser Gly Lys Ala Phe Ala Cys Ala Val Asn Asn Lys Asp

100 105 110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val
115 120 125
Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr

130 135 140

Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr

195 200 205

Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys

210 215 220

Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys

225 230

<210> 7

<211> 237

<212> PRT

<213> Canis lupus familiaris

<400> 7

Pro Lys Arg Glu Asn Gly Arg Val Pro Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys

1 5 10 15

Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro

20 25 30

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr

35 40 45

Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser

50 55 60

Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg

65 70 75 80

Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Pro Ile

85 90 95

Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn

100 105 110

Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg

115 120 125

Gly Gln Ala His Gln Pro Ser Val Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu

130 135 140

Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe

145 150 155 160

Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu

165 170 175

Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Pro Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly

180 185 190

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

195 200 205

Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met His Glu Ala Leu His Asn

210 215 220

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

225 230 235

<210> 8

<211> 23

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223>

Description of Artificial Sequence: Synthetic

peptide

<400> 8

Met Gly Arg Gly Leu Leu Arg Gly Leu Trp Pro Leu His Ile Val Leu

1 5 10 15

Trp Thr Arg Ile Ala Ser Thr

20

<210> 9

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 9

cctgaacacc tgcaacgggc ctgccaccat gctagcccgc gcccctcc 48

<210> 10

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 10

cctgaacgtc tcgctagctt attacttata acttctctgg cc 42

<210> 11

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 11

cctgaacacc tgcaacgggc ctgccaccat gggtcggggg tgctccgg 48

<210> 12

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 12

ggcttgattg tgggccctct ggggtcggga ctgctggtgg tgtattc 47

<210> 13

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 13

gaatacacca ccagcagtcc cgaccccaga gggcccacaa tcaagcc 47

<210> 14

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 14

cctgaacacc tgccttacta gctcatttac ccggagtccg ggagaag 47

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 15

ggaaccccta gtgatggagt t 21

<210> 16

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic primer

<400> 16

cggcctcagt gagcga 16