



등록특허 10-2775350



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월05일

(11) 등록번호 10-2775350

(24) 등록일자 2025년02월26일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 7/00 (2006.01) A61K 35/76 (2015.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 7/00 (2013.01)  
A61K 35/76 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7027807
- (22) 출원일자(국제) 2018년02월27일  
심사청구일자 2021년02월22일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월23일
- (65) 공개번호 10-2019-0132639
- (43) 공개일자 2019년11월28일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2018/019992
- (87) 국제공개번호 WO 2018/160582  
국제공개일자 2018년09월07일
- (30) 우선권주장  
62/591,002 2017년11월27일 미국(US)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
W02005033321 A2\*  
W02007127264 A2\*  
W02015164757 A1\*  
W02016049230 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌
- (73) 특허권자  
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아  
미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 씨빅 센터  
블러바드 3600, 9플로어
- (72) 발명자  
윌슨 제임스 엠.  
미국 펜실베이니아 19103 필라델피아 텔란시 스트리트 1831  
왕 치앙  
미국 펜실베이니아 19144 필라델피아 웨스트 위노나 스트리트 228 1층  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 17 항

심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 아데노-연관 바이러스(AAV) 클레이드 F 벡터 및 이의 용도

## (57) 요약

서열번호 1의 뉴클레오타이드 서열, 또는 서열번호 2를 암호화하는 이와 적어도 75% 동일한 서열을 포함하는 생산 시스템에서 생산된 AAVhu68 캡시드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터. 상기 AAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 아미노산 서열에서 아스파라긴-글리신 쌍에서 고도로 탈아미드화된 아스파라긴 잔기의 하위 집단을 포함한다. 또한 상기 rAAV를 함유하는 조성물 및 이의 용도가 또한 제공된다. 추가로, AAVhu68 vp1 넘버링과 관련하여 157번 아미노산 위치에서 Val을 갖는 vp1 또는 vp2 단백질의 적어도 하나의 하위집단을 포함하는 조작된 AAV 캡시드를 갖는 rAAV가 제공된다.

## 대표도

AAV6	(1)	1	100
AAV6	(1)	101	200
AAV6	(1)	201	300
AAV6	(1)	301	400
AAV6	(1)	401	500
AAV6	(1)	501	600
AAV6	(1)	601	700
AAV6	(1)	701	800
AAV6	(1)	801	900
AAV6	(1)	901	1000
AAV6	(1)	1001	1100
AAV6	(1)	1101	1200
AAV6	(1)	1201	1300
AAV6	(1)	1301	1400
AAV6	(1)	1401	1500
AAV6	(1)	1501	1600
AAV6	(1)	1601	1700
AAV6	(1)	1701	1800
AAV6	(1)	1801	1900
AAV6	(1)	1901	2000
AAV6	(1)	2001	2100
AAV6	(1)	2101	2200
AAV6	(1)	2201	2300
AAV6	(1)	2301	2400
AAV6	(1)	2401	2500
AAV6	(1)	2501	2600
AAV6	(1)	2601	2700
AAV6	(1)	2701	2800
AAV6	(1)	2801	2900
AAV6	(1)	2901	3000
AAV6	(1)	3001	3100
AAV6	(1)	3101	3200
AAV6	(1)	3201	3300
AAV6	(1)	3301	3400
AAV6	(1)	3401	3500
AAV6	(1)	3501	3600
AAV6	(1)	3601	3700
AAV6	(1)	3701	3800
AAV6	(1)	3801	3900
AAV6	(1)	3901	4000
AAV6	(1)	4001	4100
AAV6	(1)	4101	4200
AAV6	(1)	4201	4300
AAV6	(1)	4301	4400
AAV6	(1)	4401	4500
AAV6	(1)	4501	4600
AAV6	(1)	4601	4700
AAV6	(1)	4701	4800
AAV6	(1)	4801	4900
AAV6	(1)	4901	5000
AAV6	(1)	5001	5100
AAV6	(1)	5101	5200
AAV6	(1)	5201	5300
AAV6	(1)	5301	5400
AAV6	(1)	5401	5500
AAV6	(1)	5501	5600
AAV6	(1)	5601	5700
AAV6	(1)	5701	5800
AAV6	(1)	5801	5900
AAV6	(1)	5901	6000
AAV6	(1)	6001	6100
AAV6	(1)	6101	6200
AAV6	(1)	6201	6300
AAV6	(1)	6301	6400
AAV6	(1)	6401	6500
AAV6	(1)	6501	6600
AAV6	(1)	6601	6700
AAV6	(1)	6701	6800
AAV6	(1)	6801	6900
AAV6	(1)	6901	7000
AAV6	(1)	7001	7100
AAV6	(1)	7101	7200
AAV6	(1)	7201	7300
AAV6	(1)	7301	7400
AAV6	(1)	7401	7500
AAV6	(1)	7501	7600
AAV6	(1)	7601	7700
AAV6	(1)	7701	7800
AAV6	(1)	7801	7900
AAV6	(1)	7901	8000
AAV6	(1)	8001	8100
AAV6	(1)	8101	8200
AAV6	(1)	8201	8300
AAV6	(1)	8301	8400
AAV6	(1)	8401	8500
AAV6	(1)	8501	8600
AAV6	(1)	8601	8700
AAV6	(1)	8701	8800
AAV6	(1)	8801	8900
AAV6	(1)	8901	9000
AAV6	(1)	9001	9100
AAV6	(1)	9101	9200
AAV6	(1)	9201	9300
AAV6	(1)	9301	9400
AAV6	(1)	9401	9500
AAV6	(1)	9501	9600
AAV6	(1)	9601	9700
AAV6	(1)	9701	9800
AAV6	(1)	9801	9900
AAV6	(1)	9901	10000

(52) CPC특허분류

C12N 2750/14121 (2013.01)

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14141 (2013.01)

(72) 발명자

**자일스 에이프릴**

미국 펜실베이니아 19130 필라델피아 노스 29 스트리트 844 아파트먼트 121

**터너 케빈**

미국 펜실베이니아 19073 뉴타운 스퀘어 비치우드 로드 124

---

(30) 우선권주장

62/614,002 2018년01월05일 미국(US)

62/464,748 2017년02월28일 미국(US)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

AAVhu68 캡시드 및 AAVhu68 캡시드 내의 벡터 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(recombinant adeno-associated virus: rAAV)로서,

(A) 벡터 게놈은 포유동물 표적 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하고, 및

(B) AAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 1 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터 생성된 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질을 포함하고, 여기서, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, AAVhu68 vp1 단백질은 위치 67에 글루탐산 및 위치 157에 발린을 포함하고, AAVhu68 vp2 단백질은 위치 157에 발린을 포함하는, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 2

제1 항에 있어서, AAVhu68 캡시드는 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질 및 AAVhu68 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고,

AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질 및 AAVhu68 vp3 단백질의 하위집단은 서열번호 2의 아미노산에 비해, 각각의 위치 57, 329, 452, 512에서 아스파라긴-글리신 쌍 내에서 50% 내지 100%는 탈아마이드화(deamidated)된 아스파라긴 (N)을 포함하고,

탈아마이드화된 아스파라긴은 질량 분석법을 사용하여 측정된 결과, 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합으로 탈아마이드화되는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 3

AAVhu68 캡시드 및 AAVhu68 캡시드 내의 벡터 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)로서,

(A) 벡터 게놈은 포유동물 표적 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하고, 및

(B) AAVhu68 캡시드는 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질 및 AAVhu68 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하고,

AAVhu68 vp1 단백질(vp1)은 67번 위치에서 글루탐산 및 157번 위치에서 발린을 포함하는 서열번호 2의 1 내지 736의 아미노산을 포함하고, 서열번호 2의 아미노산 위치를 기준으로 변형된 아미노산을 포함하는 vp1 단백질의 하위집단을 추가로 포함하고,

AAVhu68 vp2 단백질(vp2)은 157번 위치에서 발린을 포함하는 서열번호 2의 138 내지 736의 아미노산을 포함하고, 서열번호 2의 아미노산 위치를 기준으로 변형된 아미노산을 포함하는 vp2 단백질의 하위집단을 추가로 포함하고,

AAVhu68 vp3 단백질(vp3)은 서열번호 2의 203 내지 736의 아미노산을 포함하고, 서열번호 2의 아미노산 위치를 기준으로 변형된 아미노산을 포함하는 vp3 단백질의 하위집단을 추가로 포함하고,

추가로, AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질 및 AAVhu68 vp3 단백질의 하위집단은 서열번호 2의 아미노산에 비해, 각각의 위치 57, 329, 452, 512에서 아스파라긴-글리신 쌍 내에서 50% 내지 100%는 탈아마이드화(deamidated)된 아스파라긴 (N)을 포함하고, 여기서 탈아마이드화된 아스파라긴은 질량 분석법을 사용하여 측정된 결과, 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합으로 탈아마이드화되는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 4

- 제2 항 또는 제3 항에 있어서, AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질 및 AAVhu68 vp3 단백질의 하위집단은,
- (i) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 아세틸화된 라이신, 포스포릴화된 세린, 포스포릴화된 트레오닌, 이성질체화된 아스파르트산, 탈아미드화된 글루타민, 산화된 트립토판, 산화된 메티오닌, 아미드화된 아미노산 또는 이들의 조합으로부터 선택된 하나 이상의 변형; 또는
  - (ii) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709번 위치, 또는 이들의 조합 중 하나 이상에서 아스파라긴의 1% 내지 40% 탈아미드화; 또는
- (i)과 (ii)의 조합을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 5

- 제2 항 또는 제3 항에 있어서, AAVhu68 vp1, vp2, 및 vp3 캡시드 단백질의 AAVhu68 캡시드 하위집단은,
- (a) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 57번 위치에 위치한 아스파라긴-글리신 쌍 내의 아스파라긴 (N)의 적어도 65%는 탈아미드화되거나;
  - (b) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, vp2 및 vp3 단백질의 329번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍 내의 N의 적어도 75%는 탈아미드화되거나;
  - (c) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, vp2 및 vp3 단백질의 452번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍 내의 N의 적어도 50%는 탈아미드화되거나;
  - (d) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, vp2 및 vp3 단백질의 512번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍 내의 N의 적어도 75%는 탈아미드화되거나; 또는
- (a), (b), (c) 및 (d)의 조합을 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 6

- 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, AAVhu68 캡시드는,
- (a) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, vp1 단백질의 57번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함하고;
  - (b) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 329번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, vp3 단백질, 또는 이들의 조합의 하위집단을 포함하고;
  - (c) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 452번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, vp3 단백질, 또는 이들의 조합의 하위집단을 포함하고;
  - (d) 질량 분석법을 사용하여 측정한 결과, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 512번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, vp3 단백질, 또는 이들의 조합의 하위집단을 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 7

- 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, AAVhu68 vp1을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 1인 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 8

- 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 계놈은 AAV2로부터의 5' ITR 및 3' ITR을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV).

#### 청구항 9

- 재조합 아데노-연관 바이러스 hu68(rAAVhu68)의 혼합된 집단을 포함하며, rAAVhu68 각각은 제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 rAAV로부터 독립적으로 선택되는, 조성물.

#### 청구항 10

제9 항에 있어서, 조성물은 식염수를 추가로 포함하는 현탁액인 것을 특징으로 하는 조성물.

#### 청구항 11

제1 항 내지 제3 항 중 어느 한 항의 재조합 AAV를 생산하기에 유용한 rAAV 생산 시스템으로서, 생산 시스템은

(a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 캡시드 핵산 서열;

(b) AAVhu68 캡시드 내에 패키징하기 위한 핵산 분자로서, 적어도 하나의 AAV 반전 말단 반복부 (ITR) 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는, 핵산 분자; 및

(c) 재조합 AAVhu68 캡시드 내에 핵산 분자를 패키징하는 것을 허용하기 위한 AAV rep 기능 및 헬퍼 기능을 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 12

제11 항에 있어서,

(i) (a)의 핵산 서열은 서열번호 1을 포함하고; 또는

(ii) 시스템은 서열번호 2의 aa 203 내지 아미노산 736의 AAVhu68 vp3을 암호화하는 서열번호 1의 nt 607 내지 nt 2211의 핵산 서열을 더 포함하고; 또는

(i) 및 (ii)의 조합인 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 13

제11 항에 있어서, 세포 배양물은 인간 배아 신장 293 세포를 포함하는 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 14

제11 항에 있어서, AAV rep는

(i) AAV2로부터 유래되거나;

(ii) 서열번호 4의 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 AAVhu68rep이거나; 또는

(iii) 서열번호 3의 핵산 서열에 의해서 암호화되는 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 15

제11 항에 있어서, AAV rep 암호 서열 및 cap 유전자는 동일한 핵산 분자 상에 존재하는 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 16

제15 항에 있어서, rep 서열과 cap 유전자 사이에 스페이서가 존재하는 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 17

제16 항에 있어서, 스페이서는 atgacttaaacagggt 서열번호 9인 것을 특징으로 하는 시스템.

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

삭제

#### 청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 연방 후원 연구 또는 개발에 관한 진술

[0002] 본 출원은 미국 국방 고등 연구 계획국(Defense Advanced Research Projects Agency: DARPA)에 의해서 W911NF-13-2-0036 하에 지원된 연구를 포함한다. 미국 정부는 본 발명에서 특정 권리를 가질 수 있다.

## 배경 기술

[0003] 파보바이러스 과의 구성원인 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus: AAV)는, 약 4.7킬로베이스(kb) 길이의 단일 가닥 선형 DNA(ssDNA) 게놈을 갖는 작은 비봉합된 20면체 바이러스이다. 야생형 게놈은 DNA 가닥의 양 단부의 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR), 및 2개의 오픈 리딩 프레임(ORF): rep 및 cap을 포함한다. Rep는 AAV 삶 주기에 필요한 rep 단백질을 암호화하는 4개의 중첩 유전자로 구성되며, cap는 캡시드 단백질의 중첩 뉴클레오타이드 서열: VP1, VP2 및 VP3을 포함하는데, 이것은 자가 조립되어 20면체 대칭의 캡시드를 형성한다.

[0004] AAV는 데펜도바이러스(*Dependovirus*) 속에 할당되는데, 그 이유는 이 바이러스가 정제된 아데노바이러스 스톱 중에 오염물로서 발견되었기 때문이다. AAV의 삶 주기는 감염 후에 AAV 게놈이 숙주 염색체 내에 특이적으로 통합되는 잠복기 및 아데노바이러스 또는 단순 포진 바이러스 감염 이후에, 통합된 게놈이 그 다음 구체, 복제되고, 감염성 바이러스 내에 패키징되는 감염기를 포함한다. 비-병원성, 감염성의 넓은 숙주 범위, 예컨대, 분열되지 않는 세포, 및 잠재적인 부위-특이적 염색체 통합의 특성이, AAV를 유전자 전달을 위한 매력적인 톨로 만든다.

[0005] 복제 결함 인간 파보바이러스로부터 유래된 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터는 유전자 전달을 위한 적합한 비히클로서 기술되어 있다. 전형적으로, 기능성 rep 유전자 및 cap 유전자는 벡터로부터 제거되어, 복제-부적격 벡터를 생성한다. 이러한 기능은 벡터 생산 시스템 동안 제공되지만, 최종 벡터에는 존재하지 않는다.

[0006] 지금까지, 인간 또는 비인간 영장류(NHP)로부터 단리된 몇몇 상이한 양호하게 특징규명된 AAV가 존재하였다. 상이한 항원형의 AAV는 상이한 형질주입 효율을 나타내고, 상이한 세포 또는 조직에 대한 향성(tropism)을 나타내는 것이 밝혀져 있다. 단지 3종의 구성원 AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32를 갖는 것으로 식별된 클레이드 F를 비롯한, 다수의 상이한 AAV 클레이드가 국제 특허 제WO 2005/033321호에 기술되어 있다. AAV9의 구조 분석은 문헌[M. A. DiMattia et al, J. Virol. (June 2012) vol. 86 no. 12 6947-6958]에 제공되어 있다. 이 문헌에는,

AAV9가 cap 유전자에 의해서 암호화되고, 중첩 서열을 갖는 3개의 가변 단백질(vp)의 (총) 60개의 카피를 갖는다고 보고되어 있다. 이것은 VP1(87kDa), VP2(73kDa) 및 VP3(62kDa)을 포함하며, 이것은 각각 1:1:10의 예측된 비로 존재한다. VP3의 전체 서열은 VP2에 포함되고, VP2 모두는 VP1에 포함된다. VP1은 고유한 N-말단 도메인을 갖는다. 정제된 좌표 및 구조 인자는 수탁 번호 3UX1 하에 RCSB PDB 데이터베이스로부터 입수 가능하다.

[0007] 몇몇 상이한 AAV9 변이체가 상이한 조직을 표적화 또는 표적화하기 위해서 조작되었다(문헌[N. Pulicheria, "Engineering Liver-detargeted AAV9 Vectors for Cardiac and Musculoskeletal Gene Transfer", Molecular Therapy, Vol, 19, no. 6, p. 1070-1078 (June 2011)] 참고). 혈액 뇌 장벽을 통해서 유전자를 전달하기 위한 AAV9 변이체의 개발이 보고되어 있다(예를 들어, 문헌[B.E. Deverman et al, Nature Biotech, Vol. 34, No. 2, p 204-211 (published online 1 Feb 2016) 및 Caltech press release, A. Wetherston, [www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/](http://www.neurology-central.com/2016/02/10/successful-delivery-of-genes-through-the-blood-brain-barrier/), accessed 10/05/2016], 또한 국제 특허 제WO 2016/0492301호 및 미국 특허 제8,734,809호 참고].

[0008] 목적하는 것은 이중 분자의 전달을 위한 AAV-기반 작제물이다.

### 발명의 내용

[0009] 신규 AAVhu68 캡시드 및 rep 서열이 기술되는데, 이것은 숙주 세포에 핵산 분자를 전달하기 위한 벡터의 제조에 유용하다. 특정 실시형태에서, 서열번호 1의 핵산 서열, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 동일한, 서열번호 1과 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 또는 적어도 99% 동일한 핵산 서열에 의해서 암호화되는 AAVhu68 캡시드를 갖는 재조합 AAV가 제공된다.

[0010] 일 실시형태에서, 하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)가 제공된다: (A) 하기 중 하나 이상을 포함하는 AAV68 캡시드: (1) 서열번호 2의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, 서열번호 1로부터 생산된 vp1 단백질 또는 서열번호 2의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp1 단백질; 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp2 단백질, 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp2 단백질 또는 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp2 단백질, 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp3, 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp3 단백질 또는 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp3 단백질을 포함하는 AAV hu68; 및/또는 (2) 선택적으로 157번 위치에 발린 및/또는 67번 위치에 글루탐산을 포함하는 vp1 단백질의 이중 집단, 선택적으로 157번 위치에 발린을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단, 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAV 캡시드 단백질(여기서 적어도 vp1 단백질 및 vp2 단백질의 하위집단은 서열번호 2의 vp1 캡시드의 넘버링을 기준으로 157번 위치에 발린을 포함하고, 선택적으로 67번 위치에 글루탐산을 추가로 포함함); 및/또는 (3) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백질의 이중 집단, 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp2 단백질의 이중 집단 및 서열번호 2의 적어도 아미노산 203 내지 736을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp3 단백질의 이중 집단(여기서 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질은 서열번호 2에서 아스파라긴-글리신 쌍 내에 적어도 2개의 고도로 탈아미드화된(deamidated) 아스파라긴(N)을 포함하는 아미노산 변형을 갖는 하위 집단을 함유하고, 선택적으로 추가로 다른 탈아미드화된 아미노산을 포함하는 하위집단을 포함하며, 여기서 탈아미드화는 아미노산 변화를 초래함); 및 (B) AAVhu68 캡시드 내의 벡터 게놈으로서, 상기 벡터 게놈은 AAV 반전 말단 반복부 서열 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 상기 벡터 게놈. 예를 들어, 4개의 잔기(N57, N329, N452, N512)는 일상적으로 높은 수준의 탈아미드화를 나타낸다. 추가 잔기(N94, N253, N270, N304, N409, N477 및 Q599)는 또한 다양한 로트에 걸쳐서 최대 약 20%의 탈아미드화 수준을 나타낸다.

[0011] 특정 실시형태에서, 탈아미드화된 아스파라긴은 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합물로 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 탈아미드화된 글루타민(들)은 (α)-글루탐산, γ-글루탐산, 상호전환 (α)-글루탐산/γ-글루탐산 쌍, 또한 이들의 조합물로



탈아마이드화된다.

[0012] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 하기 중 하나 이상을 갖는 하위집단을 포함한다: (a) 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 57번 위치에 위치한 아스파라긴-글리신 쌍 내의 아스파라긴(N)의 적어도 65%는 탈아마이드화됨; (b) 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 329번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍에서 N의 적어도 75%는 탈아마이드화됨; (c) 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 452번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍에서 N의 적어도 50%는 탈아마이드화됨; 및/또는 (d) 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 512번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍에서 N의 적어도 75%는 탈아마이드화됨. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 질량 분석법을 사용하여 결정되는 경우(질량 분석법으로 측정된 결과) vp1 단백질의 57번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아마이드화된 vp1의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서 hu68 캡시드는 질량 분석법을 사용하여 결정되는 경우 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 329번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아마이드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서 hu68 캡시드는 질량 분석법을 사용하여 결정되는 경우 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 452번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아마이드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 512번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아마이드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 1이거나, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 80% 내지 적어도 99% 동일한 서열이다. 특정 실시형태에서, 서열은 서열번호 1과 적어도 80% 내지 97% 동일하다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68 캡시드는 N57, 329, 452, 512 또한 이들의 조합물 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 4개의 위치에서 적어도 약 50 내지 100%의 탈아마이드화를 포함하는 서열번호 2로부터의 아미노산 변형을 갖는 적어도 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709번 위치, 또한 이들의 조합물 중 적어도 하나 이상에서 1% 내지 약 40%의 탈아마이드화를 추가로 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 아세틸화된 라이신, 포스포릴화된 세린 및/또는 트레오닌, 이성질체화된 아스파르트산, 산화된 트립토판 및/또는 메티오닌, 또는 아마이드화된 아미노산 중 하나 이상에서의 하나 이상의 변형으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 9의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 벡터 계놈은 AAVhu68이 아닌 AAV 공급원으로부터의 AAV ITR 서열을 포함한다.

[0013] 특정 실시형태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스 hu68(rAAVhu68)의 혼합된 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 rAAVhu68 각각은 본 명세서에 기술된 바와 같은 rAAVhu68로부터 독립적으로 선택된다. 특정 실시형태에서, 평균 AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 평균 AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 6의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화되고, 그리고 벡터 계놈은 중추 신경계에 대한 전달을 위한 산물을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 정맥내 전달을 위해서 제형화된다. 특정 실시형태에서, 벡터 계놈은 항-HER2 항체를 암호화하는 핵산 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 비강내 또는 근육내 전달을 위해서 제형화된다. 특정 실시형태에서, 조성물은 적어도 rAAVhu68 벡터 스톱 및 선택적인 담체, 부형제 및/또는 보존제를 포함한다.

[0014] 특정 실시형태에서, 목적하는 유전자 산물의 전달을 필요로 하는 대상체에게 목적하는 유전자 산물을 전달하기 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 rAAVhu68 또는 조성물의 용도가 제공된다.

[0015] 특정 실시형태에서, 재조합 AAVhu68을 생산하는 데 유용한 rAAV 생산 시스템이 제공된다. 이러한 생산 시스템은 (a) 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 캡시드 핵산 서열; (b) AAVhu68 캡시드 내에 패키징하기에 적합한 핵산 분자(상기 핵산 분자는 적어도 하나의 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함함); 및 (c) 재조합 AAVhu68 캡시드 내에 핵산 분자를 패키징하는 것을 허용하기 위한 충분한 AAV rep 기능 및 헬퍼 기능을 포함한다. 특정 실시형태에서, (a)의 핵산 서열은 적어도 서열번호 1, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 시스템은 서열번호

호 2의 약 aa 203 내지 약 아미노산 736의 AAVhu68 vp3을 암호화하는 서열번호 1의 약 nt 607 내지 약 nt 2211의 핵산 서열을 선택적으로 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 시스템은 인간 배아 신장 293 세포 또는 바쿨로바이러스 시스템을 포함한다.

[0016] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드의 탈아미드화를 감소시키는 방법이 제공된다. 이 방법은 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열로부터 AAVhu68 캡시드를 생산하는 단계를 포함하며, 핵산 서열은 서열번호 2에서 58, 330, 453 및/또는 513번 위치에 위치한 아르기닌-글리신 쌍 중 1 내지 3개에서 독립적으로 변형된 글리신 코돈을 포함하여, 변형된 코돈은 글리신 이외의 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 이 방법은 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열로부터 AAVhu68 캡시드를 생산하는 단계를 포함하며, 핵산 서열은 서열번호 2에서 57, 329, 452 및/또는 512번 위치에 위치한 아르기닌-글리신 쌍 중 1 내지 3개에서 독립적으로 변형된 아르기닌 코돈을 포함하여, 변형된 코돈은 아르기닌이 아닌 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 각각의 변형된 코돈은 상이한 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 2개 이상의 변형된 코돈은 동일한 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 아르기닌-글리신 쌍에서 돌연변이를 함유하여, 글리신은 알라닌 또는 세린으로 변화된다. 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 1개, 2개 또는 3개의 돌연변이체를 함유할 수 있고, 여기서 참조 AAVhu68은 본래 4개의 NG 쌍을 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 NG 쌍 내에 단일 돌연변이를 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAV 캡시드는 2개의 상이한 NG 쌍 내에 돌연변이를 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 AAVhu68 캡시드에서 구조적으로 분리된 위치에 위치한 2개의 상이한 NG 쌍이다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 VP1-고유 영역에 존재하지 않는다. 특정 실시형태에서, 돌연변이 중 하나는 VP1-고유 영역에 존재한다. 선택적으로, 돌연변이체 AAVhu6 캡시드는 NG 쌍 내에 어떠한 변형도 함유하지 않지만, NG 쌍의 외부에 위치한 하나 이상의 아스파라긴 또는 글루타민에서 탈아미드화를 최소화 또는 제거하기 위해서 돌연변이를 함유한다.

[0017] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 생산된, 변형된 AAVhu68 캡시드와 비교할 때 감소된 탈아미드화를 갖는 변형된 rAAVhu68 캡시드를 포함하는 돌연변이체 rAAVhu68가 제공된다.

[0018] 더 추가의 실시형태에서, 재조합 아데노-연관(rAAV) 벡터의 수율 및/또는 패키징 효율을 증가시키는 방법이 제공된다. 방법은 157번 아미노산 위치(여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 AAVhu68의 전장 vp1[서열번호 2]을 기준으로 함)에서 vp1 단백질 Val을 발현하도록 AAV 캡시드 유전자를 조작하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로 67번 아미노산 위치에서 글루탐산(Glu 또는 E)을 갖는 클레이드 F rAAV가 제공된다.

[0019] 더 추가의 실시형태에서, 본 발명에 따라서 생산된 조작된 rAAV가 제공된다.

[0020] 추가 실시형태에서, HER2+ 암의 치료 및/또는 예방에 유용한 항-HER2 항체를 발현하는 AAVhu68 입자가 제공된다.

[0021] 더 추가의 실시형태에서, 숙주 세포에서 발현을 지시하는 외인성 조절 제어 서열의 제어 하에서 AAVhu68 rep 단백질 또는 이의 기능성 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자가 핵산 분자가 제공된다. 일 실시형태에서, rep 단백질은 서열번호 4의 아미노산 서열, 또는 이의 기능성 단편을 갖는다.

[0022] 본 발명의 이러한 양상 및 다른 양상은 하기 본 발명의 상세한 설명으로부터 자명할 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 AAV9[서열번호 6], AAVhu31(정렬에서 hu.31이라고 표지됨)[서열번호 10] 및 AAVhu32(정렬에서 hu.32라고 표지됨)[서열번호 11]와 함께, AAVhu68[서열번호 16](정렬에서 hu.68.vp1이라고 표지됨)의 vp1 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 보여주는 정렬을 제공한 도면. AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32와 비교할 때, 2개의 돌연변이(A67E 및 A157V)가 AAVhu68에서 중요한 것으로 발견되었으며, 도면에서 원으로 나타난다.

도 2a 내지 도 2c는 AAV9, AAVhu31[서열번호 12] 및 AAVhu32[서열번호 13]와 함께, AAVhu68의 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 정렬을 제공한 도면.

도 3A 및 도 3B는 AAV9의 수율과 비교된 AAVhu.68의 수율을 나타낸 그래프. 실험을 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. n=6. P 값을 계산하였고, 도면에 나타내었다.

도 3A는 총 용해물로부터의 AAVhu.68 및 AAV9의 수율을 나타낸 도면. P 값은 0.4173으로 계산되었고, 유의하지 않은 것으로 결정되었다.

도 3B는 배양 상청액으로부터의 AAVhu.68 및 AAV9의 수율을 나타낸 도면. 상청액에서 AAVhu.68의 수율은 AAV9의 수율보다 상당히 더 높았고, p값은 0.0003이었다.

도 4a 내지 도 4c는  $5 \times 10^{11}$  GC의 AAVhu68.CB7.nLacZ가 투여된 마우스로부터의 다양한 기관(심장, 간, 폐 및 근육)의 면역조직화학 염색을 제공한 도면. 샘플을 실시예 3에 기술된 바와 같이 준비 및 처리하였다. 샘플을 적색으로 나타나는 에오신에 의해서 대비염색하였다. 청색으로 나타나는 LacZ에 대한 양성 염색은 AAVhu68의 성공적인 형질도입을 나타낸다.

도 4a는 정맥내(IV)로  $5 \times 10^{11}$  GC의 AAVhu68.CB7.nLacZ가 투여된 마우스로부터의 다양한 기관(심장, 간, 폐 및 근육)의 면역조직화학 염색을 제공한 도면. 모든 시험된 기관은 AAVhu68 형질도입을 나타내었지만, 폐 및 근육보다 심장 및 간을 선호하는 향성이 관찰되었다.

도 4b는 근육내(IM)로  $5 \times 10^{11}$  GC의 AAVhu68.CB7.nLacZ가 투여된 마우스로부터의 다양한 기관(심장, 간, 폐 및 근육)의 면역조직화학 염색을 제공한 도면. 심장, 간 및 근육은 AAVhu68의 높은 형질도입률을 나타내었지만, 폐에서는 형질도입이 관찰되지 않았다.

도 4c는 비강내(IN)로  $5 \times 10^{11}$  GC의 AAVhu68.CB7.nLacZ가 투여된 마우스로부터의 다양한 기관(심장, 간, 폐 및 근육)의 면역조직화학 염색을 제공한 도면. 산재된 형질도입이 심장, 간, 근육 및 폐에서 관찰되었다.

도 5a 내지 도 5c는  $1 \times 10^{10}$  GC 또는  $1 \times 10^{11}$  GC의 용량으로 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP가 투여된 마우스로부터의 다양한 뇌 영역(해마, 도 5A; 운동 피질, 도 5B; 및 소뇌, 도 5C)의 형광 현미경 영상을 제공한 도면. 샘플을 실시예 4에 기술된 바와 같이 준비 및 처리하였다. 녹색으로 나타나는 GFP로부터의 양성 신호는 AAV 벡터의 성공적인 형질도입을 나타낸다.

도 5a는  $1 \times 10^{10}$  GC 또는  $1 \times 10^{11}$  GC의 용량으로 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP가 투여된 마우스로부터의 해마 슬라이드의 형광 현미경 영상. 청색으로 나타나는 핵산 염료로 염색된 미처리 마우스로부터의 상응하는 샘플을 음성 대조군으로서 제공하였다.  $1 \times 10^{10}$  GC의 AAV9.GFP가 주사된 마우스로부터의 것을 제외한 모든 시험된 샘플에서 AAV 벡터의 형질도입이 관찰되었다.

도 5b는  $1 \times 10^{10}$  GC 또는  $1 \times 10^{11}$  GC의 용량으로 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP가 투여된 마우스로부터의 운동 피질의 형광 현미경 영상. AAV9의 것에 비해서 AAVhu68.GFP의 더 양호한 형질도입이 운동 피질에서 관찰되었다.

도 5c는  $1 \times 10^{10}$  GC 또는  $1 \times 10^{11}$  GC의 용량으로 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP가 투여된 마우스로부터의 소뇌의 형광 현미경 영상. 마우스에  $1 \times 10^{11}$  GC의 벡터를 주사한 경우 AAVhu68.GFP의 성공적인 형질도입이 관찰되었다.

도 6a 내지 도 6d는 정맥내로 AAVhu68.GFP가 투여된 마우스로부터의 다양한 기관(간, 신장, 심장 및 췌장)의 현미경 영상. 샘플을 실시예 4에 기술된 바와 같이 준비 및 처리하였다. 녹색으로 나타나는 GFP로부터의 양성 신호는 상기 AAV 벡터의 성공적인 형질도입을 나타낸다. 기관 형태학을 위해서 흑색과 백색으로 나타나는 명시 야상이 제공되었지만, 상응하는 적색 형광 채널이 가능한 경우 음성 대조군으로서 제공되었다.

도 6a는 정맥내로 AAVhu68.GFP가 투여된 마우스로부터의 대표적인 간 박편의 현미경 영상. 녹색으로 나타나는 양성 신호가 관찰되었다.

도 6b는 정맥내로 AAVhu68.GFP가 투여된 마우스로부터의 대표적인 신장 박편의 현미경 영상. 녹색으로 나타나는 양성 신호가 관찰되었다.

도 6c는 정맥내로 AAVhu68.GFP가 투여된 마우스로부터의 대표적인 심장 박편의 현미경 영상. 녹색으로 나타나는 양성 신호가 관찰되었다.

도 6d는 정맥내로 AAVhu68.GFP가 투여된 마우스로부터의 대표적인 췌장 박편의 현미경 영상. 녹색으로 나타나는 양성 신호가 관찰되었다.

도 7은 동축 삽입 방법을 위한 선택적인 도입기 바늘을 포함하는, 수조내(intracisternal) 전달을 위한 장치의 도면(이것은 10cc의 벡터 주사기, 10cc의 사전 충전된 플러쉬 주사기, T-연결기 연장 세트, 22Gx5" 척추 바늘, 선택적인 18Gx3.5" 도입기 바늘을 포함함).

도 8A 및 도 8B는 상이한 캡시드를 갖는 벡터와 비교된, 작은 규모(도 8A) 및 매우 큰 규모(메가, 도 8B)로 제조된 2종의 상이한 AAVhu68 벡터에 대한 생산 수율을 도시한 도면. AAVhu68, AAV9, AAV8 또는 AAV8트리플 캡시드를 갖고 사이토메갈로바이러스 프로모터(CMV), 파이어플라이 루시퍼라제 암호 서열 및 SV40 폴리 A를 포함하는 벡터 게놈(CMV, ff루시퍼라제, SV40)을 갖는 벡터를 사용하여 작은 규모 벡터 제조에 대한 데이터를 생성하였다. 메가 규모 제조를, CMV 프로모터, 인트론, 면역접착제(immunoadhesin) 암호 서열(201Ig IA) 및 SV40 폴리 A를 갖는 벡터 게놈을 갖는 AAVhu68, AAV9, AAV8 또는 AAV8트리플 벡터를 사용하여 평가하였다.

도 9는 AAV8트리플, AAV9 및 AAV8을 비롯한, 상이한 캡시드를 갖는 벡터와 비교한 메가 규모로 제조된 AAVhu68 벡터에 대한 생산 순도를 제공한 도면. 제제를, CMV 프로모터, 인트론, 면역접착제 암호 서열(201Ig IA) 및 SV40 폴리 A를 갖는 벡터 게놈을 포함하는 AAVhu68, AAV9, AAV8 또는 AAV8트리플 벡터를 사용하여 평가하였다.

도 10A 및 도 10B는 AAV8트리플, AAV9 및 AAV8을 비롯한 상이한 캡시드를 갖는 벡터의 트랜스젠 발현 수준과 비교한,  $3 \times 10^{11}$  GC/마우스(도 10A) 또는  $3 \times 10^{10}$  GC/마우스(도 10B)의 벡터가 근육내로 주사된 수컷 RAG KO 마우스(n=5/군)에서 AAVhu68 벡터의 트랜스젠 발현 수준을 제공한 도면. rAAV 벡터에 의해서 발현되는 트랜스젠은 면역접착제 암호 서열(201Ig IA)이다. 실험을 실시예 8에 상세히 기술된 바와 같이 수행하였다.

도 11A 및 도 11B는 AAV8트리플, AAV9 및 AAV8을 비롯한 상이한 캡시드를 갖는 벡터의 트랜스젠 발현 수준과 비교한,  $3 \times 10^{11}$  GC/마우스로 근육내 주사된 수컷 C57BL/6J 마우스(n=5/군)의 간(도 11A) 또는 근육(도 11B)에서의 AAVhu68 벡터의 트랜스젠 발현 수준을 제공한 도면. rAAV 벡터에 의해서 발현되는 트랜스젠은 파이어플라이 루시퍼라제이다. 실험을 실시예 9에 상세히 기술된 바와 같이 수행하였다.

도 12는 AAV8트리플, AAV9 및 AAV8을 비롯한 상이한 캡시드를 갖는 벡터의 트랜스젠 발현 수준과 비교한  $1 \times 10^{13}$  GC/체중 kg의 벡터가 근육내로 주사된 수컷 및 암컷 시노물거스 마카크에서의 AAVhu68 벡터의 트랜스젠 발현 수준을 제공한 도면. rAAV 벡터에 의해서 발현되는 트랜스젠은 면역접착제 암호 서열(201Ig IA)이다. 실험을 실시예 10에 상세히 기술된 바와 같이 수행하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 클레이드 F에 포함되는, 본 발명에서 AAVhu68이라고 지칭되는, 신규한 단리된 아데노-연관 바이러스(AAV)의 핵산 서열 및 아미노산이 본 명세서에 제공된다. AAVhu68(이전에 본 명세서에 AAV3G2라고 지칭됨)은 vp1, 서열번호 2의 67 및 157번 위치에서의 2개의 암호화된 아미노산이 또 다른 클레이드 F 바이러스 AAV9(서열번호 5)와 상이하다. 이에 반해서, 다른 클레이드 F AAV(AAV9, hu31, hu31)는 67번 위치에 Ala 및 157번 위치에 Ala를 갖는다. 서열번호 2의 넘버링을 기준으로 157번 위치에서 발린(Val 또는 V)을 갖고, 선택적으로 67번 위치에서 글루탐산(Glu 또는 E)을 갖는 신규한 AAVhu68 캡시드 및/또는 조작된 AAV 캡시드가 제공된다. 특정 실시형태에서, vp1 단백질 및 vp2 단백질에 대한 AAVhu68 캡시드 내의 vp3 단백질의 비는 AAV9 및 다른 클레이드 F AAV의 캡시드에 대해서 이미 기술된 것보다 더 낮다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1:1 내지 약 1.5의 vp2:3 내지 약 10의 vp3의 비의 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질로 구성된다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68 바이러스 스톱 또는 rAAVhu68의 집단은, 약 1: 약 1: 약 3 내지 6의 평균 vp1:vp2:vp3 비로 존재하는, AAVhu68 캡시드 내의 평균 총 약 60개의 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 갖는 조성물이다. 본 명세서에 기술된 AAV 캡시드는 양호한 수율 및/또는 패키징 효율을 제공하는 재조합 AAV(rAAV) 벡터를 생성시키고, 다수의 상이한 세포 및 조직 유형을 형질도입하는 데 유용한 rAAV 벡터를 제공하는 데 유용하다. 이러한 세포 및 조직 유형은 폐, 심장, 근육, 간, 췌장, 신장, 뇌, 해마, 운동 피질, 소뇌, 코 상피 세포, 심장 근육 세포 또는 심근세포, 간세포, 폐 내피 세포, 근세포(myocyte), 폐 상피 세포, 도 세포, 세엽 세포, 신장 세포, 및 운동 뉴런을 포함할 수 있지만 이들로 제한되지 않는다.

[0025] "재조합 AAV" 또는 "rAAV"는 2개의 요소, AAV 캡시드 및 AAV 캡시드 내에 패키징된 적어도 비-AAV 암호 서열을 함유하는 벡터 게놈을 함유하는 DNase-내성 바이러스 입자이다. 달리 명시되지 않는 한, 이러한 용어는 구 "rAAV 벡터"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. rAAV는 "복제-결합 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"인데, 그 이유는 그것이 임의의 기능성 AAV rep 유전자 또는 기능성 AAV cap 유전자가 결핍되어 있고, 자손을 생성할 수 없기 때문이다. 특정 실시형태에서, 유일한 AAV 서열은, ITR 사이에 위치한 유전자 및 조절 서열이 AAV 캡시드 내에 패키징되는 것을 가능하게 하기 위해서 벡터 게놈의 극단 5' 및 3' 단부에 전형적으로 위치한, AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)이다.

[0026] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "벡터 게놈"은 바이러스 입자를 형성하는 rAAV 캡시드 내부에 패키징된 핵



산 서열을 지칭한다. 이러한 핵산 서열은 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)을 함유한다. 본 명세서의 예에서, 벡터 계놈은 최소 5' 내지 3', AAV 5' ITR, 암호 서열(들), 및 AAV 3' ITR을 함유한다. 캡시드와 상이한 공급원 AAV인 AAV2로부터의 또는 전장 ITR이 아닌 ITR이 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, ITR은 생산 동안 rep 기능을 제공하는 AAV 또는 트랜스상보성(transcomplementing) AAV와 동일한 AAV 공급원으로부터 유래된다. 추가로, 다른 ITR이 사용될 수 있다. 추가로, 벡터 계놈은 유전자 산물의 발현을 지시하는 조절 서열을 함유한다. 벡터 계놈의 적합한 성분은 본 명세서에 보다 상세하게 논의된다.

[0027] rAAVhu68은 AAVhu68 캡시드 및 벡터 계놈으로 구성된다. AAVhu68 캡시드는 vp1의 이중 집단, vp2의 이중 집단, 및 vp3 단백질의 이중 집단의 조립체이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 vp 캡시드 단백질을 지칭하는 데 사용되는 경우, 용어 "이중" 또는 이의 임의의 문법적 변형은 예를 들어, 상이한 변형된 아미노산 서열을 갖는 vp1, vp2 또는 vp3 단량체(단백질)를 갖는 동일하지 않은 요소로 이루어진 집단을 지칭한다. 서열번호 2는 AAVhu68 vp1 단백질의 암호화된 아미노산 서열을 제공한다.

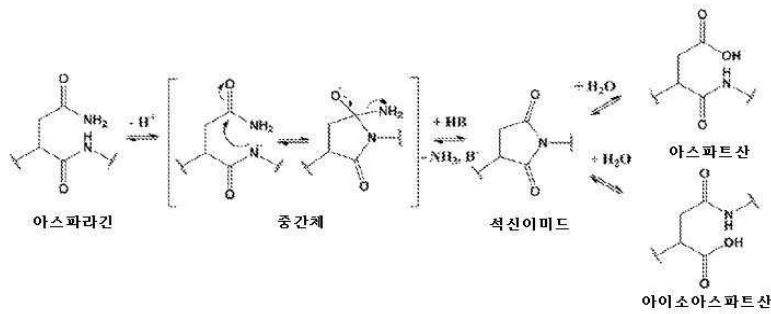
[0028] AAVhu68 캡시드는 서열번호 2에서 예측된 아미노산 잔기로부터 변형을 갖는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질 내의 하위집단을 함유한다. 이러한 하위집단은, 최소한, 특정 탈아미드화된(deamidated) 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 특정 하위집단은 서열번호 2에서 아스파라긴-글리신 쌍 내에 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아미드화된 아스파라긴(N) 위치를 포함하고, 선택적으로 다른 탈아미드화된 아미노산을 추가로 포함하며, 여기서 탈아미드화는 아미노산 변화 및 다른 선택적인 변형을 초래한다. 서열번호 14는 변형된 AAVhu68 캡시드의 아미노산 서열을 제공하며, 이것은 탈아미드화되거나 달리 변형된 아미노산의 일부 백분율을 가질 수 있는 위치를 설명한다. 이들 및 다른 변형의 다양한 조합물이 본 명세서에 기술된다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, vp 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 공통적으로 적어도 하나의 정의된 특징을 갖고, 적어도 하나의 군 구성원 내지 참조군의 모든 구성원보다 적은 수의 군 구성원으로 이루어진 vp 단백질의 군을 지칭한다. 예를 들어, vp1 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 적어도 하나(1)의 vp1 단백질이고, 조립된 AAV 캡시드 내의 모든 vp1 단백질보다 더 적다. vp3 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 하나(1)의 vp3 단백질 내지 조립된 AAV 캡시드 내의 모든 vp3 단백질보다 더 적은 수일 수 있다. 예를 들어, vp1 단백질은 vp 단백질의 하위집단일 수 있고; vp2 단백질은 vp 단백질의 별개의 하위집단일 수 있고, vp3은 조립된 AAV 캡시드 내의 vp 단백질의 더 추가의 하위집단이다. 또다른 예에서, vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질은 예를 들어, 아스파라긴-글리신 쌍에서, 상이한 변형, 예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아미드화된 아스파라긴을 갖는 하위집단을 함유할 수 있다.

[0030] 달리 명시되지 않는 한, 고도로 탈아미드화된 참조 아미노산 위치에서 예측된 아미노산 서열과 비교할 때, 참조된 아미노산 위치에서 적어도 45%의 탈아미드화된, 적어도 50%의 탈아미드화된, 적어도 60%의 탈아미드화된, 적어도 65%의 탈아미드화된, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 97%, 99%, 최대 약 100%의 탈아미드화된 것을 지칭한다(예를 들어, 서열번호 2의 아미노산 57에서 아스파라긴의 적어도 80%가 총 vp1 단백질을 기준으로 탈아미드화될 수 있거나 또는 서열번호 2의 아미노산 409에서 아스파라긴의 20%가 총 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질을 기준으로 탈아미드화될 수 있다). 이러한 백분율은 2D-젤, 질량 분석법 기술, 또는 다른 적합한 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0031] 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, AAVhu68 캡시드 내의 vp 단백질에서의 적어도 고도로 탈아미드화된 잔기의 탈아미드화는 본래 주로 비효소적이라고 여겨지는데, 이는 선택된 아스파라긴, 더 적은 정도로는, 글루타민 잔기를 탈아미드화시키는 캡시드 단백질 내의 작용기에 의해서 유발된다. 대부분의 탈아미드화 vp1 단백질의 효율적인 캡시드 조립은, 이러한 사건이 캡시드 조립 이후에 일어나거나 개별 단량체(vp1, vp2 또는 vp3)에서의 탈아미드화는 구조적으로 양호하게 용인되고, 조립 동력학에 크게 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 일반적으로, 세포 유입 이전에 내부에 위치될 것이라고 간주되는 VP1-고유한(VP1-u) 영역(약 aa 1 내지 137)에서의 대규모의 탈아미드화는, VP 탈아미드화가 캡시드 조립 이전에 일어날 수 있음을 시사한다.

[0032] 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, N의 탈아미드화는, 이의 C-말단 잔기의 골격 질소 원자가 Asn의 측쇄 아미드기 탄소 원자에 대한 친핵성 공격을 수행함으로써 일어날 수 있다. 중간체 폐환(ring-closed) 석신이미드 잔기가 형성되는 것으로 여겨진다. 이어서 석신이미드 잔기는 신속한 가수분해가 수행되어 최종 산물 아스파르트산(Asp) 또는 아이소 아스파르트산(IsoAsp)이 생성된다. 따라서, 특정 실시형태에서, 아스파라긴(N 또는 Asn)의 탈아미드화는 Asp 또는 IsoAsp를 생성하고, 이것은 하기에 설명되는 바와 같이, 예를 들어 석신이미드 중간체를 통해서 상호 전환될 수 있다.



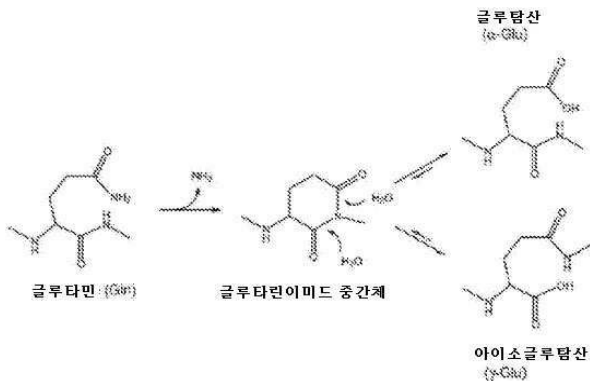
[0033]

[0034]

본 명세서에 제공된 바와 같이, 서열번호 2의 각각의 탈아미드화된 N은 독립적으로 아스파르트산(Asp), 아이소아스파르트산(isoAsp), 아스파테이트 및/또는 Asp와 isoAsp의 상호전환 블렌드 또는 이들의 조합물일 수 있다.  $\alpha$ -와 아이소아스파르트산의 임의의 적합한 비가 존재할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비는 10:1 내지 1:10의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 약 50:50의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 또는 약 1:3의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 또는 또 다른 선택된 비율일 수 있다.

[0035]

특정 실시형태에서, 서열번호 2 내의 하나 이상의 글루타민(Q)은 글루탐산(Glu), 즉,  $\alpha$ -글루탐산,  $\gamma$ -글루탐산(Glu), 또는  $\alpha$ -글루탐산과  $\gamma$ -글루탐산의 블렌드로 탈아미드화되며, 이것은 일반적인 글루타민이미드 중간체를 통해서 상호전환될 수 있다.  $\alpha$ -글루탐산과  $\gamma$ -글루탐산의 임의의 적합한 비가 존재할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비는 10:1 내지 1:10의  $\alpha$  대  $\gamma$ , 약 50:50의  $\alpha$ :  $\gamma$ , 또는 약 1:3의  $\alpha$ :  $\gamma$ , 또는 또 다른 선택된 비율일 수 있다.



[0036]

[0037]

따라서, rAAVhu68은 최소한, 적어도 하나의 고도로 탈아미드화된 아스파라긴을 포함하는 적어도 하나의 하위 집단을 포함하는, 탈아미드화된 아미노산을 갖는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 rAAVhu68 캡시드 내의 하위 집단을 포함한다. 또한, 다른 변형은 특히 선택된 아스파르트산(D 또는 Asp) 잔기 위치에서 이성질체화를 포함할 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, 변형은 Asp 위치에서의 아미드화를 포함할 수 있다.

[0038]

특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 적어도 4 내지 적어도 약 25개의 탈아미드화된 아미노산 잔기 위치를 갖는 vp1, vp2 및 vp3의 하위집단을 함유하며, 서열번호 2의 암호화된 아미노산 서열과 비교할 때 이의 적어도 1 내지 10%는 탈아미드화된다. 이들 대부분은 N 잔기일 수 있다. 그러나, Q 잔기가 또한 탈아미드화될 수 있다.

[0039]

특정 실시형태에서, AAV68 캡시드는 하기 중 하나 이상을 추가로 특징으로 한다. AAV hu68 캡시드 단백질은 하기를 포함한다: 서열번호 2의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, 서열번호 1로부터 생산된 vp1 단백질 또는 서열번호 2의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp1 단백질; 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp2 단백질, 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp2 단백질 또는 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp2 단백질, 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해

서 생산된 AAVhu68 vp3, 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp3 단백질 또는 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp3 단백질.

[0040] 추가로 또는 대안적으로, 선택적으로 157번 위치에서 발린을 포함하는 vp1 단백질의 이중 집단, 선택적으로 157번 위치에서 발린을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAV 캡시드가 제공되며, 여기서 적어도 vp1 단백질 및 vp2 단백질의 하위집단은 서열번호 2의 vp1 캡시드의 넘버링을 기준으로 157번 위치에 발린을 포함하고, 선택적으로 67번 위치에 글루탐산을 추가로 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백질의 이중 집단, 서열번호 2의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp2 단백질의 이중 집단 및 서열번호 2의 적어도 아미노산 203 내지 736을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAVhu68 캡시드가 제공되며, 여기서 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질은 아미노산 변형을 갖는 하위집단을 함유한다.

[0041] AAVhu68 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질은 전형적으로 서열번호 2의 전장 vp1 아미노산 서열(아미노산 1 내지 736)을 암호화하는 동일한 핵산 서열에 의해서 암호화된 대안적인 스플라이스 변이체로서 발현된다. 선택적으로 vp1-암호 서열은 단독으로 사용되어 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질을 발현한다. 대안적으로, 이러한 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 약 nt 607 내지 약 nt 2211), 또는 서열번호 2의 aa 203 내지 736을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열 중 하나 이상과 함께 공동 발현될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, vp1-암호 및/또는 vp2-암호 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 nt 412 내지 nt 22121), 또는 서열번호 2의 aa 138 내지 736을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열과 함께 공동 발현될 수 있다.

[0042] 본 명세서에 기술된 바와 같이, rAAVhu68은 서열번호 2의 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 핵산, 및 선택적으로 예를 들어, vp1 및/또는 vp2-고유 영역이 없는 vp 3 단백질을 암호화하는 추가 핵산 서열로부터 캡시드를 발현하는 생산 시스템에서 생산된 rAAVhu68 캡시드이다. 단일 핵산 서열 vp1을 사용한 제조로부터 유래된 rAAVhu68은 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질의 이중 집단을 생산한다. 보다 특별하게는, AAVhu68 캡시드는 서열번호 2에서 예측된 아미노산 잔기로부터 변형을 갖는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질 내의 하위 집단을 함유한다. 이러한 하위집단은, 최소한, 탈아미드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴-글리신 쌍 내의 아스파라긴은 고도로 탈아미드화된다.

[0043] 일 실시형태에서, AAVhu68 vp1 핵산 서열은 서열번호 1의 서열, 또는 이와 상보성인 가닥, 예를 들어, 상응하는 mRNA 또는 tRNA를 갖는다. 특정 실시형태에서, vp2 및/또는 vp3 단백질은 추가로 또는 대안적으로 예를 들어, 선택된 발현 시스템에서 vp 단백질의 비를 변경하기 위해서, vp1과 상이한 핵산 서열로부터 발현될 수 있다. 특정 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 약 nt 607 내지 약 nt 2211)을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다. 특정 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 nt 412 내지 2211)을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다.

[0044] 그러나, 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 다른 핵산 서열이 rAAVhu68 캡시드를 제조하는 데 사용하기 위해서 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 1의 핵산 서열 또는 서열번호 2를 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 99% 동일한, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 1의 핵산 서열 또는 서열번호 2의 vp2 캡시드 단백질(약 aa 138 내지 736)을 암호화하는 서열번호 1의 약 nt 412 내지 약 nt 2211과 적어도 70% 내지 99%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 1의 약 nt 607 내지 약 nt 2211의 핵산 서열 또는 서열번호 2의 vp3 캡시드 단백질(약 aa 203 내지 736)을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지

99.%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0045] DNA(게놈 또는 cDNA), 또는 RNA(예를 들어, mRNA)를 비롯한, 이러한 AAVhu68 캡시드를 암호화하는 핵산 서열을 설계하는 것은 관련 기술 분야의 기술에 포함된다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 서열번호 1에 제공된다(또한 도 1B 내지 도 1D 참고). 다른 실시형태에서, 서열번호 1과 70% 내지 99.9%의 동일성의 핵산 서열은 AAVhu68 캡시드 단백질을 발현하도록 선택될 수 있다. 특정 다른 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 1과 적어도 약 75% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 동일하거나, 또는 적어도 99% 내지 99.9% 동일하다. 이러한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해서 설계될 수 있는 선택된 시스템(즉, 세포 유형)에서의 발현에 대해서 코돈-최적화될 수 있다. 이러한 최적화는 입수 가능한 온라인(예를 들어, 젠아트(GeneArt)) 방법, 공개된 방법 또는 코돈 최적화 서비스를 제공하는 회사, 예를 들어, DNA2.0(미국 캘리포니아주 멘로 파크 소재)을 사용하여 수행될 수 있다. 한 코돈 최적화 방법은 예를 들어, 본 명세서에 참고로 전문이 포함된 미국 국제 특허 공개 제W0 2015/012924호에 기술되어 있다(또한, 예를 들어, 미국 특허 공개 제2014/0032186호 및 미국 특허 공개 제2006/0136184호 참고). 적합하게는, 이러한 산물에 대한 오픈 리딩 프레임(ORF)의 전체 길이는 변형된다. 그러나, 일부 실시형태에서, ORF의 단편이 변경될 수 있다. 이러한 방법 중 하나를 사용함으로써, 임의의 주어진 폴리펩타이드 서열에 빈도를 적용할 수 있고, 폴리펩타이드를 암호화하는 코돈-최적화된 암호 영역의 핵산 단편을 생산할 수 있다. 코돈에 대한 실제 변화를 수행하기 위해서 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 코돈-최적화된 암호 영역을 합성하기 위해서 다수의 선택이 사용 가능하다. 이러한 변형 또는 합성은 당업자에게 널리 공지된 표준 및 일상적인 분자 생물학 조작을 사용하여 수행될 수 있다. 한 접근법에서, 각각 80 내지 90개 뉴클레오타이드 길이의 일련의 상보성 올리고뉴클레오타이드 쌍 및 목적하는 서열의 길이의 스페닝은 표준 방법에 의해서 합성된다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 쌍은, 어닐링 시, 이것이 응집성(cohesive) 단부를 함유하는, 80 내지 90개의 염기 쌍의 이중 가닥 단편을 형성하도록 합성되고, 예를 들어, 쌍 내의 각각의 올리고뉴클레오타이드는 쌍 내의 다른 올리고뉴클레오타이드와 상보적인 영역을 넘어서서 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과 염기를 연장하도록 합성된다. 올리고뉴클레오타이드의 각각의 쌍의 단일 가닥 단부는 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 쌍의 단일 가닥 단부와 어닐링하도록 설계된다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링되는 것이 허용되며, 이어서 이러한 이중 가닥 단편 중 대략 5 내지 6개는 응집성 단일 가닥 단부를 통해서 함께 어닐링되는 것이 허용되고, 이어서 이것은 함께 결합되고, 표준 박테리아 클로닝 벡터, 예를 들어, 인비트로젠사(Invitrogen Corporation)(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)로부터 입수 가능한 TOP0(등록상표) 벡터 내에 클로닝된다. 이어서 작제물은 표준 방법에 의해서 서열결정된다. 함께 결합된 80 내지 90개의 염기 쌍 단편의 5 내지 6개의 단편, 즉, 약 500개의 염기 쌍의 단편으로 이루어진 이러한 작제물 중 몇몇이 제조되어, 전체 목적하는 서열이 일련의 플라스미드 작제물에서 표현된다. 이어서, 이러한 플라스미드의 삽입물은 적절한 제한 효소로 절단되고, 함께 결합되어 최종 작제물을 형성한다. 이어서, 최종 작제물은 표준 박테리아 클로닝 벡터 내에 클로닝되고, 서열결정된다. 추가 방법은 당업자에게 즉시 자명할 것이다. 또한, 유전자 합성법은 상업적으로 쉽게 입수 가능하다.

[0046] 특정 실시형태에서, AAVhu68 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질에서 N-G 쌍 내의 아스파라긴(N)은 고도로 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 고도로 탈아미드화된 AAVhu68 캡시드 단백질 내에 적어도 4개의 아스파라긴(N) 위치를 갖는 AAV vp1, vp2 및/또는 vp3 캡시드 단백질의 하위집단을 함유한다. 특정 실시형태에서, N-N 쌍(N-N-N 삼중 제외) 중 약 20 내지 50%는 탈아미드화를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 제1 N은 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 제2 N은 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 탈아미드화는 약 15% 내지 약 25%의 탈아미드화이다. 서열번호 2의 259번 위치의 Q에서의 탈아미드화는 AAVhu68 단백질의 AAVhu68 vp1, vp2 및 vp3 캡시드 단백질의 약 8% 내지 약 42%이다.

[0047] 특정 실시형태에서, rAAVhu68 캡시드는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질의 D297에서의 아미드화를 추가로 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, AAVhu68 캡시드에서 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 297번 위치에서 D의 약 70% 내지 약 75%는 아미드화된다.

[0048] 특정 실시형태에서, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 Asp는 D-Asp로 이성질체화된다. 이러한 이성질체는 일반적으로 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 97, 107, 384번 잔기 위치 중 하나 이상에서 Asp의 약 1% 미만의 양으로 존재한다.

[0049] 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 하기 표에 언급된 위치에서 1개, 2개, 3개, 4개 또는 그 초과 탈아미드화된 잔기의 조합물을 포함하는 하위집단을 갖는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질을 갖는 AAVhu68 캡시드를 갖는다. rAAV에서의 탈아미드화는 2D 젤 전기영동법, 및/또는 질량 분석법, 및/또는 단백질 모델링 기술을 사용



하여 결정될 수 있다. 온라인 크로마토그래피는 Acclaim PepMap 칼럼 및 NanoFlex 소스를 갖는 Q Exactive HF (써모 피셔 사이언티픽사(Thermo Fisher Scientific))에 커플링된 Thermo UltiMate 3000 RSLC 시스템(써모 피셔 사이언티픽사)을 사용하여 수행될 수 있다. MS 데이터는 조사 스캔(200 내지 2000m/z)으로부터의 가장 풍부한 서열결정전(not-yet-sequenced) 전구체 이온을 동력학적으로 선택하는 Q Exactive HF에 대한 데이터 의존적인 탑-20 방법을 사용하여 획득된다. 서열결정은 예측된 자동 이득 제어로 결정된  $1e5$  이온의 목표 값을 사용하고 에너지 충돌 분열 단편화를 통해서 수행되고, 전구체의 단리는  $4m/z$ 의 창으로 수행되었다. 조사 스캔은  $m/z$  200에서 120,000의 분해능으로 획득되었다. HCD 스펙트럼에 대한 분해능은 50ms의 최대 이온 주입 및 30의 정규화된 충돌 에너지를 사용하여  $m/z$  200에서 30,000으로 설정될 수 있다. S-렌즈 RF 수준은 50에서 설정되어, 소화로부터 펩타이드에 의해서 점유된  $m/z$  영역의 최적의 전달을 제공할 수 있다. 전구체 이온은 단편화 선택으로부터 단일, 비배정, 또는 6 및 더 높은 전하 상태로 제외될 수 있다. BioPharma Finder 1.0 소프트웨어(써모 피셔 사이언티픽사)가 획득된 데이터의 분석을 위해서 사용될 수 있다. 펩타이드 맵핑을 위해서, 고정된 변형으로서 설정된 카바마이드메틸화; 및 가변 변형으로서 설정된 산화, 탈아미드화, 및 포스포릴화, 10-ppm 질량 정확도, 높은 프로테아제 특이성 및 MS/MS 스펙트럼에 대한 0.8의 신뢰 수준을 갖는 단기식 단백질 FASTA 데이터베이스를 사용하여 탐색을 수행한다. 적합한 프로테아제의 예는 예를 들어, 트립신 또는 키모트립신을 포함할 수 있다. 탈아미드화된 펩타이드의 질량 분석법적 식별은 비교적 간단한데, 그 이유는 탈아미드화가 무손상 분자 +0.984Da의 질량(-OH와 -NH<sub>2</sub>기 간의 질량 차이)에 추가되기 때문이다. 특정 펩타이드의 백분율 탈아미드화는 탈아미드화된 펩타이드의 질량 면적을, 탈아미드화된 펩타이드와 네이티브 펩타이드의 면적의 합으로 나눈으로써 결정된다. 가능한 탈아미드화 부위의 수를 고려하여, 상이한 부위에서 탈아미드화된 동중 원소 종(isobaric species)이 단일 피크에서 동시에 이동할 수 있다. 결론적으로, 다수의 잠재적인 탈아미드화 부위를 갖는 펩타이드로부터 기원한 단편 이온을 사용하여 탈아미드화의 다수의 부위를 위치시키거나 구별할 수 있다. 이러한 경우에, 관찰된 동위원소 패턴 내의 상대 강도를 사용하여 상이한 탈아미드화된 펩타이드 이성질체의 상대 풍부도를 구체적으로 결정할 수 있다. 이러한 방법은, 모든 이성질체 종에 대한 단편화 효율성이 동일하고, 탈아미드화 부위에 의존적이라고 가정한다. 이러한 예시적인 방법에 대한 다수의 변경이 사용될 수 있음이 당업자에 의해서 이해될 것이다. 예를 들어, 적합한 질량 분석기는, 예를 들어, 사극자 비행 시간 질량 분석기(quadrupole time of flight mass spectrometer: QTOF), 예컨대, Waters Xevo 또는 Agilent 6530 또는 오비트랩 장비(orbitrap instrument), 예컨대, Orbitrap Fusion 또는 Orbitrap Velos(써모 피셔사(Thermo Fisher))를 포함할 수 있다. 적합하게는 액체 크로마토그래피 시스템은 예를 들어, Waters 또는 Agilent 시스템으로부터의 Acquity UPLC 시스템(1100 또는 1200 시리즈)을 포함한다. 적합한 데이터 분석 소프트웨어는 예를 들어, MassLynx(워터스사(Waters)), Pinpoint 및 Pepfinder(써모 피셔 사이언티픽사), Mascot(매트릭스 사이언스사(Matrix Science)), Peaks DB(바이오인포매틱스 솔루션즈사(Bioinformatics Solutions))를 포함할 수 있다. 추가의 다른 기술은 예를 들어, 문헌[X. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, published online June 16, 2017]에 기술될 수 있다.

예측된 AAVHu68[서열번호 2] 을 기초로 하는 탈아미드화	AAVhu68 캡시드 내의 VP1/VP2/VP3 단백질을 기초로 하는 평균 %	
탈아미드화된 잔기 + 1 (이웃하는 AA)	넓은 범위의 백분율 (%)	좁은 범위 (%)
N57 (N-G)	78내지 100%	80 내지 100, 85내지 97
N66 (N-E)	0내지 5	0, 1내지 5
N94 (N-H)	0내지 15,	0, 1내지 15, 5내지 12, 8
N113 (N-L)	0내지 2	0, 1 내지 2
~N253 (N-N)	10내지 25	15내지 22
Q259 (Q-I)	8내지 42	10내지 40, 20 내지 35
~N270 (N-D)	12내지 30	15 내지 28
~N304 (N-N) (303번 위치도 N)	0내지 5	1 내지 4
N319 (N-I)	0내지 5	0, 1 내지 5, 1내지 3
N329 * (N-G)* (328번 위치도 N)	65내지 100	70내지 95, 85내지 95, 80내지 100, 85내지 100,
N336 (N-N)	0 내지 100	0, 1 내지 10, 25내지 100, 30 내지 100, 30내지 95
~N409 (N-N)	15내지 30	20내지 25

[0050]

예측된 AAVHu68[서열번호 2] 을 기초로 하는 탈아미드화	AAVHu68 캡시드 내의 VP1/VP2/VP3 단백질을 기초로 하는 평균 %	
탈아미드화된 잔기 + 1 (이웃하는 AA)	넓은 범위의 백분율(%)	좁은 범위(%)
N452 (N-G)	75 내지 100	80 내지 100, 90 내지 100, 95 내지 100,
N477 (N-Y)	0 내지 8	0, 1 내지 5
N512 (N-G)	65 내지 100	70 내지 95, 85 내지 95, 80 내지 100, 85 내지 100,
~N515 (N-S)	0 내지 25	0, 1 내지 10, 5 내지 25, 15 내지 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 내지 20	2 내지 20, 5 내지 15
N628 (N-F)	0 내지 10	0, 1 내지 10, 2 내지 8
N651 (N-T)	0 내지 3	0, 1 내지 3
N663 (N-K)	0 내지 5	0, 1 내지 5, 2 내지 4
N709 (N-N)	0 내지 25	0, 1 내지 22, 15 내지 25
N735	0 내지 40	0, 1 내지 35, 5 내지 50, 20 내지 35

[0051]

[0052]

특정 실시형태에서, AAVHu68 캡시드는 N 잔기의 적어도 45%가 서열번호 2의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로 N57, N329, N452, 및/또는 N512번 위치 중 적어도 하나에서 탈아미드화된 캡시드 단백질을 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, 이러한 N-G 위치(즉, 서열번호 2의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, N57, N329, N452, 및/또는 N512) 중 하나 이상에서 N 잔기의 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 90%가 탈아미드화된다. 이들 또는 다른 실시형태에서, AAVHu68 캡시드는 추가로 N 잔기의 약 1% 내지 약 20%가 서열번호 2의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, N94, N253, N270, N304, N409, N477, 및/또는 Q599번 위치 중 하나 이상에서 탈아미드화를 갖는 단백질의 집단을 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, AAVHu68은 적어도 서열번호 2의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735번 위치 또는 이들의 조합물 중 하나 이상에서 탈아미드화된 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, 캡시드 단백질은 하나 이상의 아미드화된 아미노산을 가질 수 있다.

[0053]

추가적인 다른 변형이 관찰되며, 이들 중 대부분은 하나의 아미노산을 상이한 아미노산으로 전환시키지 않는다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및 vp3에서 적어도 하나의 Lys은 아세틸화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 Asp는 D-Asp로 이성질체화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 S(Ser, 세린)는 포스포릴화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 T(Thr, 트레오닌)는 포스포릴화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 W(trp, 트립토판)는 산화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 M(Met, 메티오닌)은 산화된다. 특정 실시형태에서, 캡시드 단백질은 하나 이상의 포스포릴화를 갖는다. 예를 들어, 특정 vp1 캡시드 단백질은 149번 위치에서 포스포릴화될 수 있다.

[0054]

특정 실시형태에서, AAVHu68 캡시드는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백

질의 이중 집단(여기서 vp1 단백질은 67번 위치에 글루탐산(Glu) 및/또는 157번 위치에 발린(Val)을 포함함); 선택적으로 157번 위치에 발린(Val)을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단; 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함한다. AAVhu68 캡시드는 적어도 하나의 하위집단을 함유하는데, 여기서 서열번호 2의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 57번 위치에 위치한 아스파라긴-글리신 쌍 내의 아스파라긴(N)의 적어도 65% 및 vp1, v2 및 vp3 단백질의 329, 452 및/또는 512번 위치에서 아스파라긴-글리신 쌍 내의 아스파라긴(N)의 적어도 70%는 탈아미드화되고, 여기서 탈아미드화는 아미노산 변화를 초래한다.

[0055] 본 명세서에 보다 상세하게 논의된 바와 같이, 탈아미드화된 아스파라긴은 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합물로 탈아미드화될 수 있다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 하기 중 하나를 추가로 특징으로 한다: (a) vp2 단백질 각각은 독립적으로 적어도 서열번호 2의 vp2 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 산물임; (b) vp3 단백질 각각은 독립적으로 적어도 서열번호 2의 vp3 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 산물임; (c) vp1 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 1, 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열임. 선택적으로 그 서열은 단독으로 사용되어 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질을 발현한다. 대안적으로, 이러한 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 약 nt 607 내지 약 nt 2211), 또는 서열번호 2의 aa 203 내지 736을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열 중 하나 이상과 함께 공동 발현될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, vp1-암호 및/또는 vp2-암호 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 2의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 1의 nt 412 내지 nt 2211), 또는 서열번호 2의 aa 138 내지 736을 암호화하는 서열번호 1과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열과 함께 공동 발현될 수 있다.

[0056] 추가로 또는 대안적으로, rAAVhu68은 적어도 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709번 위치 또는 이들의 조합물 중 하나 이상에서 탈아미드화된 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (e) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709번 위치, 또한 이들의 조합물 중 하나 이상에서 1% 내지 20%의 탈아미드화를 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (f) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 57번 위치에서의 N의 65% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함하고; (g) rAAVhu68 캡시드는 vp1 단백질의 57번 위치에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함하고; (h) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 329번 위치에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (i) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 452번 위치에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (j) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 2의 넘버링을 기준으로, 512번 위치에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (k) rAAV는 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함하고; (l) rAAV는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 9의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다.

[0057] 특정 실시형태에서, AAVhu68은 탈아미드화를 감소시키기 위해서, 아스파라긴-글리신 쌍에서 글리신을 변화시키도록 변형된다. 다른 실시형태에서, 아스파라긴은 상이한 아미노산, 예를 들어, 더 느린 속도로 아미드화시키는 글루타민으로; 또는 아미드기가 결핍된 아미노산으로(예를 들어, 글루타민 및 아스파라긴은 아미드기를 함유함); 그리고/또는 아민기가 결핍된 아미노산으로(예를 들어, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘은 아미드기를 함유함) 변경된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아미드 또는 아민 측쇄가 결핍된 아미노산은 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 세린, 트레오닌, 시스틴(cystine), 페닐알라닌, 타이로신 또는 트립토판, 및/또는 프롤린을 지칭한다. 예컨대, 기술된 변형은 암호화된 AAVhu68 아미노산 서열에서 발견되는 아스파라긴-글리신 쌍 중 1개, 2개 또는 3개에 존재할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형은 아스파라긴-글리신 쌍 중 4개 모두에서 일어나지는 않는다. 따라서, AAVhu68 및/또는 조작된 AAVhu68 변이체의 탈아미

이드화를 감소시키는 방법은 더 낮은 탈아마이드화 속도를 갖는다. 추가로, 또는 대안적으로 하나 이상의 다른 아마이드 아미노산은 AAVhu68의 탈아마이드화를 감소시키기 위해서 비아마이드 아미노산으로 변화될 수 있다.

[0058] 이러한 아미노산 변형은 종래의 유전자 조작 기술에 의해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열이 생성될 수 있는데, 여기서 서열번호 2(아르기닌-글리신 쌍)에서 58, 330, 453 및/또는 513번 위치의 글리신을 암호화하는 코돈 중 1개 내지 3개가 글리신이 아닌 아미노산을 암호화하도록 변형된다. 특정 실시형태에서, 변형된 아르기닌 코돈을 함유하는 핵산 서열은 서열번호 2에서 57, 329, 452 및/또는 512번 위치에 위치한 아르기닌-글리신 쌍 중 1개 내지 3개가 조작되어, 변형된 코돈은 아르기닌이 아닌 아미노산을 암호화한다. 각각의 변형된 코돈은 상이한 아미노산을 암호화할 수 있다. 대안적으로, 변경된 코돈 중 하나 이상은 동일한 아미노산을 암호화할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형된 AAVhu68 핵산 서열은 네이티브 hu68 캡시드보다 더 낮은 탈아마이드화를 갖는 캡시드를 갖는 돌연변이체 rAAVhu68을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 이러한 돌연변이체 rAAVhu68은 감소된 면역성을 갖고/갖거나 저장, 특히 현탁액 형태의 저장에 대한 안정성을 증가시킬 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "코돈"은 아미노산을 암호화하는 서열의 3개의 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "암호화된 아미노산 서열"은 아미노산으로 번역될 지칭된 핵산 서열의 공지된 DNA 코돈의 번역을 기준으로 예측된 아미노산을 지칭한다. 하기 표는 단일 문자 암호(SLC) 및 3 문자 암호(3LC) 둘 모두를 나타낸, DNA 코돈 및 20개의 일반적인 아미노산을 나타낸다.

아미노산	SLC	3 LC	DNA 코돈
아이소류신	I	Ile	ATT, ATC, ATA
류신	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
발린	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
페닐알라닌	F	Phe	TTT, TTC
메티오닌	M	Met	ATG
시스테인	C	Cys	TGT, TGC
알라닌	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
글리신	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
프롤린	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
트레오닌	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
세린	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
타이로신	Y	Tyr	TAT, TAC
트립토판	W	Trp	TGG
글루타민	Q	Gln	CAA, CAG

[0060]

아스파라긴	N	Asn	AAT, AAC
히스티딘	H	His	CAT, CAC
글루탐산	E	Glu	GAA, GAG
아스파르트산	D	Asp	GAT, GAC
라이신	K	Lys	AAA, AAG
아르기닌	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
정지 코돈	정지		TAA, TAG, TGA

[0061]

[0062] AAVhu68 캡시드는 특정 실시형태에서 유용할 수 있다. 예를 들어, 이러한 캡시드는 유전자 요법 환자에서 AAVhu68 농도 수준을 모니터링하기 위한 검정에서 유용한 단클론성 항체를 생성시키고/시키거나 시약을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 유용한 항-AAVhu68 항체를 생성시키기 위한 기술, 이러한 항체 또는 중공(empty) 캡시드의 표지 및 적합한 검정 포맷은 당업자에게 공지되어 있다.



- [0063] 특정 실시형태에서, 서열번호 1의 핵산 서열 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 변형(예를 들어, 탈아미드화된 아미노산)을 갖는 서열번호 2의 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열이 본 명세서에 제공된다. 특정 실시형태에서, vp1 아미노산 서열은 서열번호 14에 제시된다.
- [0064] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "클레이드"는 그것이 AAV의 군과 관련되는 경우, AAV vp1 아미노산 서열의 정렬을 기초로, (적어도 1000개의 복제부의) 적어도 75%의 부트스트랩 값 및 0.05 이하의 프아송 보정 거리 측정치(Poisson correction distance measurement)에 의한 이웃-연결 알고리즘(Neighbor-Joining algorithm)을 사용하여 결정되는 바와 같이 서로에 계통 발생적으로 관련된 AAV의 군을 지칭한다. 이웃-연결 알고리즘은 문헌에 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)) 참고). 이러한 알고리즘을 구현하는 데 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램이 입수 가능하다. 예를 들어, MEGA v2.1 프로그램은 변형된 Nei-Gojobori 방법을 구현한다. 이러한 기술 및 컴퓨터 프로그램, 및 AAV vp1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당업자는 선택된 AAV가 본 명세서에 식별된 클레이드 중 하나에 또는 또 다른 클레이드에 포함되는지, 또는 이러한 클레이드에 포함되지 않는지를 쉽게 결정할 수 있다(예를 들어, 문헌[G Gao, *et al*, J Virol, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388] 참고(이것은 클레이드 A, B, C, D, E 및 F를 식별하고, 신규 AAV의 핵산 서열, 제뱅크 수탁 번호 AY530553 내지 AY530629를 제공함), 또한 국제 특허 제W02005/033321호 참고).
- [0065] 일 실시형태에서, 본 발명은 AAVhu68 vp1 암호 서열과 AAVhu68 rep 암호 서열 사이에 스페이서 서열을 포함하는 조작된 분자를 제공한다. 이러한 암호 서열은 atgacttaaacaggt, 서열번호 9이다. AAVhu68의 rep52에 대한 암호 서열은 서열번호 3에 제시된다. rep52 단백질 서열은 서열번호 4에 제시된다.
- [0066] 일 실시형태에서, rAAV의 수율을 증가시켜, 세포 용해 이전에 또는 세포 용해를 요구하지 않으면서 상청액에 존재하는 rAAV의 양을 증가시키는 방법이 제공된다. 이 방법은 AAV vp1캡시드 유전자를, AAVhu68 vp1 캡시드 단백질의 아미노산 넘버링을 갖는 정렬을 기준으로 67번 위치에서 Glu를 갖고, 157번 위치에 Val을 갖는 캡시드 단백질을 발현하도록 조작하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 방법은 AAVhu68 vp1 캡시드 유전자를, 157번 위치에서 Val을 갖고, 67번 위치에 Glu를 갖지 않는 캡시드 단백질을 발현하도록 조작하는 단계를 포함한다. 이러한 다른 AAV는 클레이드 A, B, C, D 또는 E의 다른 클레이드 F AAV, 또는 AAV로부터 쉽게 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV는 클레이드 C, D, E 또는 F로부터 선택된다. 다른 실시형태에서, AAV는 클레이드 C, D 또는 E로부터 선택된다.
- [0067] 다른 실시형태에서, 방법은 rAAV의 수율을 증가시켜, 세포 용해 이전에 또는 세포 용해를 요구하지 않으면서 상청액에 존재하는 rAAV의 양을 증가시키는 단계를 포함한다. 이 방법은 AAV vp1캡시드 유전자를, AAVhu68 vp1 캡시드 단백질의 아미노산 넘버링을 갖는 정렬을 기준으로 67번 위치에서의 Glu, 157번 위치에서의 Val 또는 둘 모두를 갖는 캡시드 단백질을 발현하도록 조작하는 단계를 포함한다. 다른 실시형태에서, 방법은 VP2 캡시드 유전자를, 157번 위치에 Val을 갖는 캡시드 단백질을 발현하도록 조작하는 단계를 포함한다. 추가의 다른 실시형태에서, rAAV는 67번 위치에 Glu를 갖고, 157번 위치에 Val을 갖는 vp1 및 vp2 캡시드 단백질 둘 모두를 포함하는 변형된 캡시드를 갖는다.
- [0068] 추가의 다른 실시형태에서, AAVhu68은 157번 위치에 Val을 보유하면서, vp1 넘버링[서열번호 2]을 참고로, 67번 위치에 Ser, Gly, Ser 또는 Thr을 갖도록 조작될 수 있다. 더 추가의 실시형태에서, AAVhu68은 vp1 넘버링[서열번호 2]을 참고로, 157번 위치에 Ile 또는 Leu를 갖도록 조작될 수 있다. 더 추가의 실시형태에서, AAVhu68은 vp1 넘버링[서열번호 2]을 참고로, 67번 위치에 Ser, Gly, Ser 또는 Thr을 갖고, 157번 위치에 Ile 또는 Leu를 갖도록 조작될 수 있다.
- [0069] 추가 실시형태에서, AAV9와 비교할 때 패키징된 벡터의 수율에서 적어도 15% 증가를 제공하는, 트랜스젠을 클레이드 F AAV 내에 패키징하는 방법이 제공되며, 상기 방법은 적합한 조건에 따라서 숙주 세포 배양물을 배양하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 증가는 적어도 90%의 수율 증가이다. 다른 실시형태에서, 증가는 적어도 200%의 수율 증가이다.
- [0070] AAVhu68과 AAVrh10 간의 비교에서, AAVhu68은 뇌혈관내(intracerebroventricular) 투여 이후에 낮은 용량(예를 들어 약  $1 \times 10^9$  GC)에서 AAVrh10보다 더 양호한 형질도입 효율을 제공하는 것을 발견하였다. AAVhu68과 AAV9 간의 추가 비교에서, AAVhu68은 뇌혈관내 투여 이후에 뇌의 소뇌, 운동 피질 및 해마에서(예를 들어 약  $1 \times 10^{11}$  GC에서) AAV9보다 더 양호한 형질도입 효율을 제공하는 것을 발견하였다.

- [0071] 특정 실시형태에서, 본 발명은 HER2 수용체에 대해서 지향되는 항체를 발현하는 벡터 계통을 포함하는 AAVhu68 벡터를 제공한다. 이러한 벡터는 암의 치료 및/또는 예방에 유용하다.
- [0072] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "AAV9 캡시드"는 다수의 AAV9 vp 단백질로 구성된 자가 조립된 AAV 캡시드이다. AAV9 vp 단백질은 전형적으로 서열번호 6의 vp1 아미노산 서열(젠뱅크 수탁: AAS99264)을 암호화하는, 서열번호 5의 핵산 서열 또는 이와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열에 의해서 암호화된 대안적인 스플라이스 변이체로서 발현된다. 이러한 스플라이스 변이체는 서열번호 6의 상이한 길이의 단백질을 생성한다. 특정 실시형태에서, "AAV9 캡시드"는 AAS99264와 99% 동일하거나 또는 서열번호 6과 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 AAV를 포함한다(또한 미국 특허 제US7906111호 및 국제 특허 제W02005/033321호 참고). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "AAV9 변이체"는 예를 들어, 국제 특허 제W02016/049230호, 미국 특허 제US 8,927,514호, 제US 2015/0344911호, 및 제US 8,734,809호에 기술된 것을 포함한다.
- [0073] 캡시드, 이를 위한 암호 서열을 생성하는 방법 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법이 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)] 및 미국 특허 제US 2013/0045186A1호 참고).
- [0074] 용어 "실질적인 상동성" 또는 "실질적인 유사성"은 핵산 또는 이의 단편에 대해서 지칭되는 경우, 또 다른 핵산(또는 이의 상보적 가닥)과 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실을 갖도록 최적 상태로 정렬될 때, 정렬된 서열에 적어도 약 95 내지 99%의 뉴클레오타이드 서열 동일성이 존재한다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 상동성은 전장 서열, 또는 이의 오픈 리딩 프레임, 또는 길이가 적어도 15개의 뉴클레오타이드인 또 다른 적합한 단편에 걸친 것이다. 적합한 단편의 예가 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0075] 핵산 서열과 관련하여 용어 "서열 동일성", "백분율 서열 동일성", 또는 "동일한 백분율"은 최대 관련성을 위해서 정렬되는 경우 동일한 2개의 서열에서의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 계통의 전장, 유전자 암호 서열의 전장, 또는 적어도 약 500 내지 5000개의 뉴클레오타이드의 단편에 대한 것일 수 있으며, 이것이 바람직하다. 그러나, 예를 들어, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 통상적으로 적어도 약 20 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36 또는 그 초과 뉴클레오타이드의 더 작은 단편 간의 동일성이 또한 바람직할 수 있다. 유사하게, "백분율 서열 동일성"은 단백질의 전장 또는 이의 단편에 걸쳐서, 아미노산 서열에 대해서 쉽게 결정될 수 있다. 적합하게는, 단편은 적어도 약 8개의 아미노산 길이일 수 있고, 최대 약 700개의 아미노산이다. 적합한 단편의 예가 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0076] 용어 "실질적인 상동성" 또는 "실질적인 유사성"은 아미노산 또는 이의 단편에 대해서 지칭되는 경우, 또 다른 아미노산(또는 이의 상보적 가닥)과 적절한 아미노산 삽입 또는 결실을 갖도록 최적 상태로 정렬될 때, 정렬된 서열에 적어도 약 95 내지 99 %의 아미노산 서열 동일성이 존재한다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 상동성은 전장 서열, 또는 이의 단백질, 예를 들어, cap 단백질, rep 단백질, 또는 적어도 8개 아미노산, 또는 보다 바람직하게는 적어도 15개 아미노산 길이인 이의 단편에 걸친 것이다. 적합한 단편의 예가 본 명세서에 기술되어 있다.
- [0077] 용어 "고도로 보존된"은 적어도 80% 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 동일성, 더 바람직하게는, 97% 초과 동일성을 의미한다. 동일성은 당업자에게 공지된 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램에 따라서 당업자에게 의해서 쉽게 결정된다.
- [0078] 일반적으로, 2개의 상이한 아데노-연관 바이러스 간의 "동일성", "상동성", 또는 "유사성"을 지칭하는 경우, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열을 참고로 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 보통 참조 서열과 비교할 때 누락되거나 추가된 염기 또는 아미노산에 대한 수정을 함유하는 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다. 예에서, AAV 정렬은 참조 지점으로서, 공개된 AAV9 서열을 사용하여 수행된다. 정렬은 다양한 공공 또는 상업적으로 입수 가능한 다중 서열 정렬 프로그램 중 임의의 것을 사용하여 수행된다. 그러한 프로그램의 예는 "Clustal Omega" "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP", 및 "MEME"를 포함하며, 이들은 인터넷 상의 웹 서버를 통해 접근 가능하다. 그러한 프로그램의 다른 공급원은 당업자에게 공지되어 있다. 대안적으로, 벡터 NTI가 또한 사용된다. 또한 상기에 기술된 프로그램에 함유된 것을 포함하여, 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 다수의 알고리즘이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta<sup>(상표명)</sup>를 사용하여 비교될 수 있다. Fasta<sup>(상표명)</sup>는 의문의 서열과 검색 서열 사이의 최상의 중복 영역의 정렬 및 백분율 서열 동일성을 제공한다. 예를 들

어, 핵산 서열 사이의 백분율 서열 동일성은 GCG 버전 6.1(본 명세서에 참고로 포함됨)에서 제공되는 바와 같이 디폴트 파라미터(6의 워드 크기 및 득점 매트릭스에 대한 NOPAM 인자)와 함께 Fasta<sup>(상표명)</sup>를 사용하여 결정될 수 있다. 다수의 서열 정렬 프로그램, 예를 들어, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME", 및 "Match-Box" 프로그램이 또한 아미노산 서열에 대해서 사용 가능하다. 일반적으로, 이 프로그램 중 임의의 것이 디폴트 설정에서 사용되지만, 당업자는 필요에 따라 이러한 설정을 변경시킬 수 있다. 대안적으로, 당업자는 적어도 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 것과 같은 동일성 또는 정렬의 수준을 제공하는 또 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다(예를 들어, 문헌[J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)] 참고).

[0079] **I. rAAV 벡터**

[0080] 상기에 나타난 바와 같이, 신규한 AAVhu68 서열 및 단백질은 rAAV의 생산에 유용하며, 또한 안티센스 전달 벡터, 유전자 요법 벡터, 또는 백신 벡터일 수 있는 제조용 AAV 벡터에 유용하다. 추가로, 본 명세서에 기술된 조작된 AAV 캡시드, 예를 들어, 서열번호 2에서의 vp1 캡시드 단백질의 넘버링에 대해서 67, 157번 위치 또는 둘 모두에서 돌연변이체 아미노산을 갖는 것을 사용하여 표적 세포 및 조직에 다수의 적합한 핵산 분자를 전달 하기 위해서 rAAV 벡터를 조작할 수 있다.

[0081] AAV 캡시드 내에 패키징되고, 숙주 세포에 전달되는 게놈 서열은 전형적으로, 최소한, 트랜스젠 및 이의 조절 서열 및 AAV 반전 말단 반복부(ITR)로 구성된다. 단일-가닥 AAV 및 자가 상보성(sc) AAV 둘 모두가 rAAV에 포함 된다. 트랜스젠은 벡터 서열에 이중인 핵산 암호 서열인데, 이것은 관심대상 폴리펩타이드, 단백질, 기능성 RNA 분자(예를 들어, miRNA, miRNA 저해제) 또는 다른 유전자를 암호화한다. 핵산 암호 서열은 표적 조직의 세포에서 트랜스젠 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분에 작동 가능하게 연결된다.

[0082] 벡터의 AAV 서열은 전형적으로 시스-작용 5' 및 3' 반전 말단 반복부 서열을 포함한다(예를 들어, 문헌[B. J. Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)] 참고). ITR 서열 은 약 145bp 길이이다. 바람직하게는, ITR을 암호화하는 실질적으로 전체 서열이 이러한 분자에서 사용되지만, 이러한 서열의 어느 정도의 약간의 변형이 허용 가능하다. 이러한 ITR 서열을 변형시키는 능력은 당업자의 기술 이내이다(예를 들어, 문헌[Sambrook et al, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); 및 K. Fisher et al., J. Virol., 70:520 532 (1996)] 참고). 본 발명 에 사용되는 이러한 분자의 예는, 선택된 트랜스젠 서열 및 연관된 조절 요소가 5' 및 3' AAV ITR 서열"에 의해 서 측접된 트랜스젠을 함유하는 시스-작용" 플라스미드이다. 일 실시형태에서, ITR은 캡시드를 공급하는 것과 상이한 AAV로부터 유래된다. 일 실시형태에서, ITR 서열은 AAV2로부터 유래된다. D-서열 및 말단 분해능 부위 (terminal resolution site: trs)가 결실된  $\Delta$ ITR이라 지칭되는 5' ITR의 짧아진 버전이 기술되어 있다. 다른 실시형태에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2로부터 유래되고, AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터 유래된 경우, 생성된 벡터는 위형이라 지칭될 수 있다. 그러나, 이들 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다.

[0083] 제조용 AAV 벡터에 대해서 상기에 식별된 주요 요소에 더하여, 벡터는 또한 본 발명에 의해서 생산된 바이러스 에 의해서 감염되거나 또는 플라스미드 벡터가 형질주입된 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식 으로 트랜스젠에 작동 가능하게 연결되는 것이 필요한 종래의 제어 요소를 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "작동 가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 트랜스로 또는 관심 유전 자를 제어하도록 하는 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 포함한다.

[0084] 조절 제어 요소는 전형적으로 발현 제어 서열의 일부로서, 예를 들어, 선택된 5' ITR 서열과 암호 서열 사이에 위치한 프로모터 서열을 함유한다. 구성 프로모터, 조절 가능한 프로모터[예를 들어, 국제 특허 제WO 2011/126808호 및 제WO 2013/04943호 참고], 조직 특이적 프로모터, 또는 생리학적 신호에 반응성인 프로모터가 본 명세서에 기술된 벡터에 사용되고 활용될 수 있다. 프로모터(들)는 상이한 공급원으로부터, 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 극 초기 인핸서/프로모터, SV40 초기 인핸서/프로모터, JC 폴리모바이러스 프로모터, 미엘린 염기성 단백질(MBP) 또는 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP) 프로모터, 단순 포진 바이러스 (HSV-1) 잠복 관련 프로모터(LAP), 라우스 육종 바이러스(RSV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 뉴런-특이적 프 로모터(NSE), 혈소판 유래된 성장 인자(PDGF) 프로모터, hSYN, 멜라닌-농축 호르몬(MCH) 프로모터, CBA, 매트릭 스 메탈로단백질 프로모터(MPP), 및 닭 베타-액틴 프로모터 등으로부터 선택될 수 있다. 프로모터에 더하여, 벡 터는 하나 이상의 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 효율적인 RNA 처리 신호, 예컨대, 스플라이싱 및



폴리아데닐화(폴리A) 신호; 세포질의 mRNA를 안정화시키는 서열, 예를 들어 WPRE; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 필요에 따라, 암호화된 산물의 분비를 향상시키는 서열을 함유할 수 있다. 적합한 인헨서의 예는 CMV 인헨서이다. 다른 적합한 인헨서는 목적하는 표적 조직 적응 중에 적절한 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 1종 이상의 발현 인헨서를 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 2종 이상의 발현 인헨서를 함유한다. 이러한 인헨서는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 인헨서는 CMV 극 초기 인헨서를 포함할 수 있다. 이러한 인헨서는 서로에 인접하게 위치된 2개의 카피에 존재할 수 있다. 대안적으로, 인헨서의 이중 카피는 하나 이상의 서열에 의해서 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 추가로 인트론, 예를 들어, 닭 베타-액틴 인트론을 함유한다. 다른 적합한 인트론은 관련 기술 분야에 공지된 것을 포함하고, 예를 들어, 예컨대, 국제 특허 제WO 2011/126808호에 기술되어 있다. 적합한 폴리A 서열의 예는, 예를 들어, SV40, SV50, 소 성장 호르몬(bGH), 인간 성장 호르몬, 및 합성 폴리A를 포함한다. 선택적으로, 하나 이상의 서열이 mRNA를 안정화시키기 위해서 선택될 수 있다. 그러한 서열의 예는 변형된 WPRE 서열인데, 그것은 폴리A 서열의 상류에서 그리고 암호 서열의 하류에서 조작될 수 있다[예를 들어, 문헌[MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619] 참고].

[0085] 이러한 rAAV는 치료 목적을 위한 그리고 보호 면역의 유도를 비롯한, 면역을 위한 유전자 전달에 특히 양호하게 적합하다. 추가로, 본 발명의 조성물은 또한 시험관내에서 목적하는 유전자 산물의 생산을 위해서 사용될 수 있다. 시험관내 생산을 위해서, 목적하는 산물(예를 들어, 단백질)은 목적하는 산물을 암호화하는 분자를 함유하는 rAAV를 숙주 세포에 형질주입하고, 세포 배양물을 발현을 허용하는 조건 하에서 배양한 후에 목적하는 배양물로부터 수득될 수 있다. 발현된 산물은 이어서 필요한 경우 정제 및 단리될 수 있다. 형질주입, 세포 배양, 정제 및 단리에 적합한 기술은 관련 기술 분야에 공지되어 있다.

[0086] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 rAAV 또는 조성물은 항-인플루엔자 항체 또는 면역글로불린 작제물을 함유하지 않는다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 rAAV 또는 조성물은 SMN 암호 서열을 함유하지 않는다.

#### [0087] 치료 유전자 및 유전자 산물

[0088] 트랜스젠에 의해서 암호화된 유용한 산물은, 결합 또는 결핍 유전자를 대체하거나, 바람직하지 않은 높은 수준으로 발현되는 유전자의 발현을 불활성화 또는 "넉-아웃" 또는 "넉-다운"시키거나 또는 목적하는 치료 효과를 갖는 유전자 산물을 전달하는 다양한 유전자 산물을 포함한다. 대부분의 실시형태에서, 요법은 "체세포 유전자 요법", 즉, 정자 또는 난자를 생산하지 않는 신체의 세포를 사용한 전달일 것이다. 특정 실시형태에서, 트랜스젠 발현 단백질은 네이티브 인간 서열의 서열을 갖는다. 그러나, 다른 실시형태에서, 합성 단백질이 발현된다. 이러한 단백질은 인간의 치료를 위해서 의도될 수 있거나, 다른 실시형태에서 반려 동물, 예컨대, 개 또는 고양이 집단을 비롯한 동물의 치료, 또는 가축 또는 인간 집단과 접촉하는 다른 동물의 치료를 위해서 설계될 수 있다.

[0089] 적합한 유전자 산물의 예는 가족성 이상지질혈증, 근위축증, 낭성 섬유증, 희귀(rare 또는 orphan) 질환과 연관된 것을 포함할 수 있다. 이러한 희귀 질환의 예는 특히 척수성 근위축(SMA), 헌팅턴병, 레트 증후군(Rett Syndrome)(예를 들어, 메틸-CpG-결합 단백질 2(MeCP2); UniProtKB - P51608), 근위축성측색경화증(근위축성측색경화증: ALS), 뒤시엔느형 근위축증, 프레드리히 운동실조(예를 들어, 프라탁신(frataxin)), 프로그래놀린(PRGN)(비알츠하이머 뇌 퇴화, 예컨대, 전측두엽 치매(FTD), 진행성 비유창성 실어증(progressive non-fluent aphasia: PNFA) 및 의미 치매(semantic dementia)를 포함할 수 있다(예를 들어, [www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease\\_Search\\_List.php?rare Diseases.info.nih.gov/diseases](http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/Disease_Search_List.php?rare Diseases.info.nih.gov/diseases) 참고).

[0090] 적합한 유전자의 예는, 예를 들어, 호르몬 및 성장 및 분화 인자, 예컨대, 비제한적으로, 인슐린, 글루카곤, 글루카곤-유사 펩타이드-1(GLP1), 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 여포 자극 호르몬(FSH), 황체형성 호르몬(LH), 인간 융모성 생식선 자극 호르몬(hCG), 혈관 내피 성장 인자(VEGF), 엔지오포이에틴, 엔지오포스타틴, 과립구 집락 자극 인자(GCSF), 에리트로포이에틴(EPO)(예를 들어, 인간, 개 또는 고양이 예포 포함), 결합 조직 성장 인자(CTGF), 신경영양 인자(예를 들어, 염기성 섬유모세포 성장 인자(basic fibroblast growth factor: bFGF), 산성 섬유모세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II), 형질전환 성장 인자  $\alpha$  상과 중 임의의 하나, 예컨대, TGF  $\alpha$ , 액티빈, 인히빈, 또는 골 형성 단백질(BMP) 중 임의의 것, BMP 1-15, 성장 인자의 헤레글루닌(heregulin)/뉴레글린(neuregulin)/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 과 중 임의의 것, 신경 성장 인자(NGF), 뇌 유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 신경영양 인자(CNTF), 신경교 세포주 유래 신경영양 인

자(GDNF), 뉴르투린, 아그린, 세마포린/콜라프신(collapsin)의 과 중 임의의 하나, 네트린(netrin)-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노긴(noggin), 소닉 헤지호그(sonic hedgehog) 및 타이로신 하이드록실라제를 포함할 수 있다.

[0091] 다른 유용한 트랜스젠 산물은 사이토카인 및 림포카인, 에컨대, 트롬보포이에틴(TPO), 인터류킨(IL) IL-1 내지 IL-36(예를 들어, 인간 인터류킨 IL-1, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-8, IL-12, IL-11, IL-12, IL-13, IL-18, IL-31, IL-35 포함), 단핵구 화학주성 단백질, 백혈병 저해성 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 종양 괴사 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 인터페론  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , 줄기세포 인자, flk-2/flt3 리간드를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 면역계를 조절하는 단백질을 포함한다. 면역계에 의해서 생산되는 유전자 산물이 또한 본 발명에서 유용하다. 이것은 비제한적으로 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화된 항체, 단일쇄 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단일쇄 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자, 뿐만 아니라 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 포함한다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, rAAV 항체는 개 또는 고양이 항체, 예를 들어, 항-IgE, 항-IL31, 항-CD20, 항-NGF, 항-GnRH 등을 전달하도록 설계될 수 있다. 유용한 유전자 산물은 또한 보체 조절 단백질, 예컨대, 보체 조절 단백질, 막공인자 단백질(MCP), 부패 가속화(decay accelerating) 인자(DAF), CR1, CF2, CD59, 및 C1 에스테라제 저해제(C1-INH)를 포함한다.

[0092] 추가의 다른 유용한 유전자 산물은 호르몬, 성장 인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역계 단백질에 대한 수용체 중 임의의 하나를 포함한다. 본 발명은 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 조절을 위한 수용체, 예컨대, 지밀도 지질단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지질단백질(HDL) 수용체, 고저밀도 지질단백질(VLDL) 수용체 및 스캐빈저 수용체를 포함한다. 본 발명은 또한 유전자 산물, 예컨대, 스테로이드 호르몬 수용체 상과의 구성원, 예컨대, 글루코코티코이드 수용체 및 에스트로겐 수용체, 비타민 D 수용체 및 다른 핵 수용체를 포함한다. 또한, 유용한 유전자 산물은 전사 인자, 예컨대, *Jun*, *fos*, *max*, *mad*, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, *myb*, *MyoD* 및 미오제닌, ETS-박스 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-박스 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 빌름스 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-박스 결합 단백질, 예를 들어, GATA-3 및 날개가 있는 헬릭스 단백질의 포크헤드(forkhead) 과를 포함한다.

[0093] 다른 유용한 유전자 산물은, 카바모일 신타제 I, 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC), 아르기노석시네이트 신타제, 아르기노석시네이트 리아제 결핍의 치료를 위한 아르기노석시네이트 리아제(ASL), 아르기나제, 퓨마릴아세테이트 하이드롤라제, 페닐알라닌 하이드록실라제, 알파-1 항트립신, 레서스 알파-페도단백질(AFP), 레서스 옴모 성선 자극 호르몬(CG), 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노겐 데아미나제, 시스타티온 베타-신타제, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 아이소발레릴-coA 데하이드로게나제, 피로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 뮤타제, 글루타릴 CoA 데하이드로게나제, 인슐린, 베타-글루코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 카이나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 남성 섬유증 막관통 조절인자(cystic fibrosis transmembrane regulator: CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 산물[예를 들어, 미니- 또는 마이크로-디스트로핀]을 포함한다. 추가의 다른 유용한 유전자 산물은 효소, 예컨대, 효소 치환 요법에 유용할 수 있는 것을 포함하며, 이것은 효소의 결핍 활성화로부터 초래한 다양한 병태에 유용하다. 예를 들어, 만노스-6-포스페이트를 함유하는 효소가 리소좀 저장 질환을 위한 요법에 사용될 수 있다(예를 들어, 적합한 유전자는  $\beta$ -글루쿠로니다제(GUSB)를 암호화하는 것을 포함함).

[0094] 특정 실시형태에서, rAAV는 유전자 편집 시스템에 사용될 수 있는데, 이 시스템은 하나의 rAAV 또는 다수의 rAAV 스톡의 공동 투여를 포함할 수 있다. 예를 들어, rAAV는 SpCas9, SaCas9, ARCUS, Cpf1, 및 다른 적합한 유전자 편집 작제물을 전달하도록 조작될 수 있다.

[0095] 추가의 다른 유용한 유전자 산물은 혈우병, 예컨대, 혈우병 B(인자 IX 포함) 및 혈우병 A(인자 VIII 및 이종이량체의 경쇄 및 중쇄 및 B-결손 도메인과 같은 이의 변이체 포함; 미국 특허 제6,200,560호 및 미국 특허 제6,221,349호)의 치료를 위해서 사용되는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 꼬마유전자는 먼저 10 아미노산 신호 서열뿐만 아니라 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열을 암호화하는 인자 VIII 중쇄의 첫 번째 57개 염기쌍을 포함한다. 대안적인 실시형태에서, 꼬마유전자는 A1 도메인 및 A2 도메인뿐만 아니라 B 도메인의 N-말단으로부터의 5개 아미노산, 및/또는 B 도메인뿐만 아니라 A3, C1 및 C2 도메인의 C-말단의 85개 아미노산을 추가로 포함한다. 추가의 다른 실시형태에서, 인자 VIII 중쇄 및 경쇄를 암호화하는 핵산은 B 도메인의 14개 아미노산에 대한 42개 핵산 암호에 의해서 분리된 단일 꼬마유전자로 제공된다[미국 특허 제6,200,560],

- [0096] 다른 유용한 유전자 산물은 비자연 발생 폴리펩타이드, 예컨대, 삽입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비자연 발생 아미노산 서열을 갖는 키메라 또는 혼성 폴리펩타이드를 포함한다. 예를 들어, 단일쇄 조작된 면역글로불린이 면역력이 약화된 특정 환자에 유용할 수 있다. 비자연 발생 유전자 서열의 다른 유형은 안티센스 분자 및 촉매적 핵산, 예컨대, 표적의 과발현을 감소시키는 데 사용될 수 있는 리보자임을 포함한다.
- [0097] 유전자의 발현의 감소 및/또는 조절은 암 및 건선에서와 같이 세포를 과증식시키는 것을 특징으로 하는 과증식성 병태의 치료에 특히 바람직하다. 표적 폴리펩타이드는 정상 세포와 비교할 때 과증식성 세포에서 독점적으로 또는 더 높은 수준으로 생산되는 폴리펩타이드를 포함한다. 표적 항원은 종양유전자, 예컨대, myb, myc, fyn 및 전좌 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF에 의해서 암호화되는 폴리펩타이드를 포함한다. 표적 항원으로서의 종양유전자 산물에 더하여, 항암 치료 및 예방 요법을 위한 표적 폴리펩타이드는 B 세포 림프종에 의해서 제조된 항체의 가변 영역 및 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변 영역을 포함하며, 이것은 또한, 일부 실시형태에서, 자가면역 질환을 위한 표적 항원으로서 사용된다. 다른 종양 연관 폴리펩타이드, 예컨대, 단클론성 항체 17-1A 및 엽산염 결합 폴리펩타이드에 의해서 인식되는 폴리펩타이드를 비롯하여 종양 세포에서 더 높은 수준으로 발견되는 폴리펩타이드가 표적 폴리펩타이드로서 사용될 수 있다.
- [0098] 다른 적합한 치료 폴리펩타이드 및 단백질은 세포 수용체 및 "자가"-유도된 항체를 생산하는 세포를 비롯하여 자가면역과 연관된 표적에 대해서 광범위한 보호 면역 반응을 부여함으로써 자가면역 질환 및 장애를 앓고 있는 개체를 치료하는 데 유용할 수 있는 것을 포함한다. T 세포 매개된 자가면역 질환은 류마티스 관절염(Rheumatoid arthritis: RA), 다발성 경화증(multiple sclerosis: MS), 쇼그렌 증후군, 사르코이드증, 인슐린 의존성 진성 당뇨병(insulin dependent diabetes mellitus: IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직성 척추염, 피부 경화증, 다발성근염, 피부근육염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증(Wegener's granulomatosis), 크론병 및 궤양성 대장염을 포함한다. 이러한 질환 각각은 내인성 항원에 결합하여, 자가면역 질환과 연관된 염증성 캐스케이드를 개시하는 T 세포 수용체(TCR)를 특징으로 한다.
- [0099] rAAV를 통해서 전달될 수 있는 추가의 예시적인 유전자는 비제한적으로 글리코젠 저장 질환 또는 결핍 유형 1A(GSD1)와 연관된 글루코스-6-포스파타제, PEPCK 결핍과 연관된 포스포엔올피루베이트-카복시카이나제(PEPCK); 발작 및 중증 신경발달 손상과 연관된 세린/트레오닌 카이나제 9(STK9)라고도 공지된 사이클린-의존성 카이나제-유사 5(CDKL5); 갈락토스혈증과 연관된 갈락토스-1 포스페이트 우리딜 트랜스퍼라제; 페닐케톤뇨증(PKU)과 연관된 페닐알라닌 하이드록실라제; 메이플 시럽뇨병과 연관된 분지쇄 알파-케토산 데하이드로게나제; 타이로신혈증 타입 1과 연관된 퓨마릴아세토아세테이트 하이드롤라제; 메틸말론산혈증과 연관된 메틸말론일-CoA 뮤타제; 중간쇄 아세틸 CoA 결핍과 연관된 중간쇄 아실 CoA 데하이드로게나제; 오르니틴 트랜스카바밀라제 결핍과 연관된 오르니틴 트랜스카바밀라제(OTC); 시트룰린혈증과 연관된 아르기노석신산 신테타제(ASS1); 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제(LCAT) 결핍; 메틸말론산혈증(MMA); 니만-픽병(Niemann-Pick disease), 타입 C1); 프로피온산혈증(PA); 가족성 이상지질혈증(FH)과 연관된 저밀도 지방단백질 수용체(LDLR) 단백질; 크리글러-나자르병(Crigler-Najjar disease)과 연관된 UDP-글루쿠로노실트랜스퍼라제; 중증 조합 면역 결핍 질환과 연관된 아데노신 데아미나제; 고트 및 레쉬-니안 증후군(Gout and Lesch-Nyan syndrome)과 연관된 하이포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제; 바이오티니다제 결핍과 연관된 바이오티니다제; 파브리병과 연관된 알파-갈락토시다제 A( $\alpha$ -Gal A)); 윌슨병과 연관된 ATP7B; 고셔병 타입 2 및 3과 연관된 베타-글루코세레브로시다제; 젤웨거 증후군(Zellweger syndrome)과 연관된 퍼옥시좀 막 단백질 70kDa; 이염성 백질디스트로피와 연관된 아릴설페타제 A(ARSA), 크라베병과 연관된 갈락토세레브로시다제(GALC) 효소, 폰페병과 연관된 알파-글루코시다제(GAA); 니만 픽병 타입 A와 연관된 스펅고이멜리나제(SMPD1) 유전자; 성인 발병 타입 II 시트룰린혈증(CTLN2)과 연관된 아르기노석시네이트 신타제; 요소 회로 장애와 연관된 카바모일-포스페이트 신타제 1(CPS1); 척수성 근위축과 연관된 생존 운동 뉴런(SMN) 단백질; 파버 지방육아종증과 연관된 세라미다제; GM2 gangliosidosis 증 및 테이-삭스병(Tay-Sachs disease) 및 샌드호프병(Sandhoff disease)과 연관된 b-헥소사미니다제; 아스파틸-글루코사민노와 연관된 아스파틸글루코사미니다제; 푸코사이드 축적증과 연관된  $\alpha$ -푸코시다제; 알파-만노사이드축적증과 연관된  $\alpha$ -만노시다제; 급성 간혈성 포르피린증(AIP)과 연관된 포르포빌리노겐 데아미나제; 알파-1 항트립신 결핍(폐기종)의 치료를 위한 알파-1 항트립신; 지중해빈혈 또는 신부전으로 인한 빈혈의 치료를 위한 에리트로포이에틴; 허혈성 질환의 치료를 위한 혈관 내피 성장 인자, 엔지오포이에틴-1, 및 섬유모세포 성장 인자; 예를 들어, 죽상 경화증, 혈전증 또는 색전증에서 인지되는 바와 같은 폐색 혈관의 치료를 위한 트롬보모듈린 및 조직 인자 경로 저해제; 파킨슨병의 치료를 위한 방향족 아미노산 데카복실라제(AADC), 및 타이로신 하이드록실라제(TH); 근소포체 아데노신 트라이포스파타제-2인 포스포람반(SERCA2)에 대한 베타 아드레날린 수용체, 안티센스 또는 이의 돌연변이체 형태 및 울혈성 심부전의 치료를 위한 심장 아데닐릴 사이클라제; 다양한 암의 치료를



위한 중앙 억제인자 유전자, 예컨대, p53; 염증 및 면역 장애 및 암의 사망 치료를 위한 사이토카인, 예컨대, 다양한 인터루킨 중 하나; 근 디스트로피의 치료를 위한 디스트로핀 또는 미니디스트로핀 및 유트로핀 또는 미니유트로핀; 및 당뇨병의 치료를 위한 인슐린 또는 GLP-1을 포함한다.

[0100] 관심대상의 추가 유전자 및 질환은 예를 들어, 디스토닌(dystonin) 유전자 관련 질환, 예컨대, 유전성 감각 및 자율신경병증 타입 VI(DST 유전자는 디스토닌을 암호화하고; 이중 AAV 벡터는 단백질(약 7570 aa)의 크기로 인해 필요할 수 있음); SCN9A 관련 질환(기능 돌연변이체의 손실이 통증 무감각을 유발하고, 기능 돌연변이체의 획득은 통증 상태, 예컨대, 피부홍통증을 유발함)을 포함한다. 또 다른 병태는 가변적인 임상 및 전기생리학적 발현을 갖는 진행성 말초 운동 및 감각 신경병증을 특징으로 하는 NEFL 유전자(신경필라멘트 경쇄)의 돌연변이로 인한 사리코 마리 투스병(Charcot-Marie-Tooth) 타입 1F 및 2E이다.

[0101] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 rAAV는 뮤코다당증(MPS) 장애의 치료에 사용될 수 있다. 이러한 rAAV는 MPS I(휠러, 휠러 샤이에 및 샤이에 증후군(Hurler, Hurler-Scheie and Scheie syndromes))의 치료를 위한 α-L-이두로니다제(IDUA)를 암호화하는 핵산 서열; MPS II(헌터 증후군)의 치료를 위한 이두로네이트-2-설패타제(IDS)를 암호화하는 핵산 서열; MPSIII A, B, C, 및 D(산필리포 증후군)의 치료를 위한 설패미다제(SGSH)를 암호화하는 핵산 서열; MPS IV A 및 B(모르키오 증후군(Morquio syndrome))의 치료를 위한 N-아세틸갈락토사민-6-설패이트 설패타제(GALNS)를 암호화하는 핵산 서열; MPS VI(마로토-라미 증후군(Maroteaux-Lamy syndrome))의 치료를 위한 아릴설패타제 B(ARSB)를 암호화하는 핵산 서열; MPSIIX(히알루로니다제 결핍)의 치료를 위한 히알루로니다제를 암호화하는 핵산 서열 및 MPS VII(슬라이 증후군(Sly syndrome))의 치료를 위한 베타글루쿠로니다제를 암호화하는 핵산 서열을 함유할 수 있다.

[0102] 면역원성 트랜스젠

[0103] 일부 실시형태에서, 암과 연관된 유전자 산물(예를 들어, 종양 억제인자)을 암호화하는 핵산을 포함하는 rAAV 벡터를 사용하여, 암을 갖는 대상체에게 rAAV 벡터를 보유하는 rAAV를 투여함으로써 암을 치료할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암과 연관된 유전자 산물(예를 들어, 종양유전자)의 발현을 저해하는 작은 간섭 핵산(예를 들어, shRNA, miRNA)을 암호화하는 핵산을 포함하는 rAAV 벡터를 사용하여, 암을 갖는 대상체에게 rAAV 벡터를 보유하는 rAAV를 투여함으로써 암을 치료할 수 있다. 일부 실시형태에서, 암과 연관된 유전자 산물(또는 암과 연관된 유전자의 발현을 저해하는 기능성 RNA)을 암호화하는 핵산을 포함하는 rAAV 벡터는, 예를 들어, 암을 연구하거나, 또는 암을 치료하는 치료제를 식별하기 위한 연구 목적을 위해서 사용될 수 있다. 하기는 암의 발달과 연관된다고 공지된 예시적인 유전자(예를 들어, 종양유전자 및 종양 억제인자)의 비제한적인 목록이다: AARS, ABCB1, ABCC4, ABI2, ABL1, ABL2, ACK1, ACP2, ACY1, ADSL, AK1, AKR1C2, AKT1, ALB, ANPEP, ANXA5, ANXA7, AP2M1, APC, ARHGAP5, ARHGEF5, ARID4A, ASNS, ATF4, ATM, ATP5B, ATP5O, AXL, BARD1, BAX, BCL2, BHLHB2, BLMH, BRAF, BRCA1, BRCA2, BTK, CANX, CAP1, CAPN1, CAPNS1, CAV1, CBFB, CBLB, CCL2, CCND1, CCND2, CCND3, CCNE1, CCT5, CCYR61, CD24, CD44, CD59, CDC20, CDC25, CDC25A, CDC25B, CDC2L5, CDK10, CDK4, CDK5, CDK9, CDKL1, CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2D, CEBPG, CENPC1, CGRRF1, CHAF1A, CIB1, CKMT1, CLK1, CLK2, CLK3, CLNS1A, CLTC, COL1A1, COL6A3, COX6C, COX7A2, CRAT, CRHR1, CSF1R, CSK, CSNK1G2, CTNNA1, CTNNB1, CTPS, CTSC, CTSD, CUL1, CYR61, DCC, DCN, DDX10, DEK, DHCR7, DHRS2, DHX8, DLG3, DVL1, DVL3, E2F1, E2F3, E2F5, EGFR, EGR1, EIF5, EPHA2, ERBB2, ERBB3, ERBB4, ERCC3, ETV1, ETV3, ETV6, F2R, FASTK, FBN1, FBN2, FES, FGFR1, FGR, FKBP8, FN1, FOS, FOSL1, FOSL2, FOXG1A, FOXO1A, FRAP1, FRZB, FTL, FZD2, FZD5, FZD9, G22P1, GAS6, GCN5L2, GDF15, GNA13, GNAS, GNB2, GNB2L1, GPR39, GRB2, GSK3A, GSPT1, GTF2I, HDAC1, HDGF, HMMR, HPRT1, HRB, HSPA4, HSPA5, HSPA8, HSPB1, HSPH1, HYAL1, HYOU1, ICAM1, ID1, ID2, IDUA, IER3, IFITM1, IGF1R, IGF2R, IGFBP3, IGFBP4, IGFBP5, IL1B, ILK, ING1, IRF3, ITGA3, ITGA6, ITGB4, JAK1, JARID1A, JUN, JUNB, JUND, K-ALPHA-1, KIT, KITLG, KLK10, KPNA2, KRAS2, KRT18, KRT2A, KRT9, LAMB1, LAMP2, LCK, LCN2, LEP, LITAF, LRPAP1, LTF, LYN, LZTR1, MADH1, MAP2K2, MAP3K8, MAPK12, MAPK13, MAPKAPK3, MAPRE1, MARS, MASI, MCC, MCM2, MCM4, MDM2, MDM4, MET, MGST1, MICB, MLLT3, MME, MMP1, MMP14, MMP17, MMP2, MNDA, MSH2, MSH6, MT3, MYB, MYBL1, MYBL2, MYC, MYCL1, MYCN, MYD88, MYL9, MYLK, NEO1, NF1, NF2, NFKB1, NFKB2, NFSF7, NID, NINE, NMBR, NME1, NME2, NME3, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH4, NPM1, NQO1, NR1D1, NR2F1, NR2F6, NRAS, NRG1, NSEP1, OSM, PA2G4, PABPC1, PCNA, PCTK1, PCTK2, PCTK3, PDGFA, PDGFB, PDGFRA, PDPK1, PEA15, PFDN4, PFDN5, PGAM1, PHB, PIK3CA, PIK3CB, PIK3CG, PIM1, PKM2, PKMYT1, PLK2, PPARD, PPARG, PPIH, PPP1CA, PPP2R5A, PRDX2, PRDX4, PRKAR1A, PRKCBP1, PRNP, PRSS15, PSMA1, PTCH, PTEN, PTGS1, PTMA, PTN, PTPRN, RAB5A, RAC1, RAD50, RAF1, RALBP1, RAP1A, RARA, RARB, RASGRF1, RB1, RBBP4, RBL2, REA, REL, RELA, RELB, RET, RFC2, RGS19, RHOA, RHOB, RHOC, RHOD, RIPK1, RPN2, RPS6 KB1, RRM1,

SARS, SELENBP1, SEMA3C, SEMA4D, SEPP1, SERPINH1, SFN, SFPQ, SFRS7, HB, SHH, SIAH2, SIVA, SIVA TP53, SKI, SKIL, SLC16A1, SLC1A4, SLC20A1, SMO, 스펅고미엘린 포스포다이에스터라제 1(SMPD1), SNAI2, SND1, SNRPB2, SOCS1, SOCS3, SOD1, SORT1, SPINT2, SPRY2, SRC, SRPX, STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, STC1, TAF1, TBL3, TBRG4, TCF1, TCF7L2, TFAP2C, TFDP1, TFDP2, TGFA, TGFBI, TGFBI, TGFBR2, TGFBR3, THBS1, TIE, TIMP1, TIMP3, TJP1, TK1, TLE1, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF6, TNFSF7, TNK1, TOB1, TP53, TP53BP2, TP53I3, TP73, TPBG, TPT1, TRADD, TRAM1, TRRAP, TSG101, TUFM, TXNRD1, TYRO3, UBC, UBE2L6, UCHL1, USP7, VDAC1, VEGF, VHL, VIL2, WEE1, WNT1, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT5A, WT1, XRCC1, YES1, YWHAB, YWHAZ, ZAP70, 및 ZNF9.

[0104] rAAV 벡터는 트랜스젠으로서 아포토시스를 조절하는 단백질 또는 기능성 RNA를 암호화하는 핵산을 포함할 수 있다. 하기는 아포토시스와 연관된 유전자 및 이들 유전자 및 이의 동족체의 산물을 암호화하고, 이들 유전자 및 이의 동족체의 발현을 저해하는 작은 간섭 핵산(예를 들어, shRNA, miRNA)을 암호화하는 핵산의 비제한적인 목록이며, 이것은 본 발명의 특정 실시형태에서 트랜스젠으로서 유용하다: RPS27A, ABL1, AKT1, APAF1, BAD, BAG1, BAG3, BAG4, BAK1, BAX, BCL10, BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10, BCL2L11, BCL2L12, BCL2L13, BCL2L2, BCLAF1, BFAR, BID, BIK, NAIP, BIRC2, BIRC3, XIAP, BIRC5, BIRC6, BIRC7, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BNIP3L, BOK, BRAF, CARD10, CARD11, NLRC4, CARD14, NOD2, NOD1, CARD6, CARDS, CARDS, CASP1, CASP10, CASP14, CASP2, CASP3, CASP4, CASP5, CASP6, CASP7, CASP8, CASP9, CFLAR, CIDEA, CIDEB, CRADD, DAPK1, DAPK2, DFFA, DFFB, FADD, GADD45A, GDNF, HRK, IGF1R, LTA, LTBR, MCL1, NOL3, PYCARD, RIPK1, RIPK2, TNF, TNFRSF10A, TNFRSF10B, TNFRSF10C, TNFRSF10D, TNFRSF11B, TNFRSF12A, TNFRSF14, TNFRSF19, TNFRSF1A, TNFRSF1B, TNFRSF21, TNFRSF25, CD40, FAS, TNFRSF6B, CD27, TNFRSF9, TNFSF10, TNFSF14, TNFSF18, CD40LG, FASLG, CD70, TNFSF8, TNFSF9, TP53, TP53BP2, TP73, TP63, TRADD, TRAF1, TRAF2, TRAF3, TRAF4, 및 TRAF5.

[0105] 유용한 유전자 산물은 또한 miRNA를 포함한다. miRNA 및 다른 작은 간섭 핵산은 표적 RNA 전사체 절단/분해 또는 표적 메신저 RNA(mRNA)의 번역 억압을 통해서 유전자 발현을 조절한다. miRNA는 전형적으로 최종 19-25 미번역 RNA 산물로서 자연적으로 발현된다. miRNA는 표적 mRNA의 3' 미번역 영역(UTR)과의 서열 특이적 상호작용을 통해서 활성도를 나타낸다. 이러한 내인성으로 발현되는 miRNA는 이후에 miRNA 듀플렉스로 가공되고, "성숙" 단일 가닥 miRNA 분자로 추가로 가공되는 헤어핀 전구체를 형성한다. 이러한 성숙 miRNA는 예를 들어, 성숙 miRNA에 대한 이의 상보성을 기반으로, 예를 들어, 표적 mRNA의 3' UTR 영역에서, 표적 부위를 식별하는 멀티단백질 복합체인 miRISC를 안내한다.

[0106] miRNA 유전자 및 이의 동족체의 하기 비제한적인 예가 방법의 특정 실시형태에서 유전자에 의해서 암호화되는 작은 간섭 핵산(예를 들어, miRNA 스폰지, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, TuD RNA)에 대한 유전자 또는 표적으로서 유용하다: hsa-let-7a, hsa-let-7a\*, hsa-let-7b, hsa-let-7b\*, hsa-let-7c, hsa-let-7c\*, hsa-let-7d, hsa-let-7d\*, hsa-let-7e, hsa-let-7e\*, hsa-let-7f, hsa-let-7f-1\*, hsa-let-7f-2\*, hsa-let-7g, hsa-let-7g\*, hsa-let-7i, hsa-let-7i\*, hsa-miR-1, hsa-miR-100, hsa-miR-100\*, hsa-miR-101, hsa-miR-101\*, hsa-miR-103, hsa-miR-105, hsa-miR-105\*, hsa-miR-106a, hsa-miR-106a\*, hsa-miR-106b, hsa-miR-106b\*, hsa-miR-107, hsa-miR-10a, hsa-miR-10a\*, hsa-miR-10b, hsa-miR-10b\*, hsa-miR-1178, hsa-miR-1179, hsa-miR-1180, hsa-miR-1181, hsa-miR-1182, hsa-miR-1183, hsa-miR-1184, hsa-miR-1185, hsa-miR-1197, hsa-miR-1200, hsa-miR-1201, hsa-miR-1202, hsa-miR-1203, hsa-miR-1204, hsa-miR-1205, hsa-miR-1206, hsa-miR-1207-3p, hsa-miR-1207-5p, hsa-miR-1208, hsa-miR-122, hsa-miR-122\*, hsa-miR-1224-3p, hsa-miR-1224-5p, hsa-miR-1225-3p, hsa-miR-1225-5p, hsa-miR-1226, hsa-miR-1226\*, hsa-miR-1227, hsa-miR-1228, hsa-miR-1228\*, hsa-miR-1229, hsa-miR-1231, hsa-miR-1233, hsa-miR-1234, hsa-miR-1236, hsa-miR-1237, hsa-miR-1238, hsa-miR-124, hsa-miR-124\*, hsa-miR-1243, hsa-miR-1244, hsa-miR-1245, hsa-miR-1246, hsa-miR-1247, hsa-miR-1248, hsa-miR-1249, hsa-miR-1250, hsa-miR-1251, hsa-miR-1252, hsa-miR-1253, hsa-miR-1254, hsa-miR-1255a, hsa-miR-1255b, hsa-miR-1256, hsa-miR-1257, hsa-miR-1258, hsa-miR-1259, hsa-miR-125 a-3p, hsa-miR-125a-5p, hsa-miR-125b, hsa-miR-125b-1\*, hsa-miR-125b-2\*, hsa-miR-126, hsa-miR-126\*, hsa-miR-1260, hsa-miR-1261, hsa-miR-1262, hsa-miR-1263, hsa-miR-1264, hsa-miR-1265, hsa-miR-1266, hsa-miR-1267, hsa-miR-1268, hsa-miR-1269, hsa-miR-1270, hsa-miR-1271, hsa-miR-1272, hsa-miR-1273, hsa-miR-127-3p, hsa-miR-1274a, hsa-miR-1274b, hsa-miR-1275, hsa-miR-127-5p, hsa-miR-1276, hsa-miR-1277, hsa-miR-1278, hsa-miR-1279, hsa-miR-128, hsa-miR-1280, hsa-miR-1281, hsa-miR-1282, hsa-miR-1283, hsa-miR-1284, hsa-miR-1285, hsa-miR-1286, hsa-miR-1287, hsa-miR-1288, hsa-miR-1289, hsa-miR-129\*, hsa-miR-12.90, hsa-miR-1291, hsa-miR-1292, hsa-miR-1293, hsa-miR-129-3p, hsa-miR-1294, hsa-miR-1295, hsa-miR-129-5p, hsa-miR-1296, hsa-miR-1297, hsa-miR-1298, hsa-miR-1299, hsa-miR-1300, hsa-miR-1301, hsa-miR-1302, hsa-

miR-1303, hsa-miR-1304, hsa-miR-1305, hsa-miR-1306, hsa-miR-1307, hsa-miR-1308, hsa-miR-130a, hsa-miR-130a\*, hsa-miR-130b, hsa-miR-130b\*, hsa-miR-132, hsa-miR-132\*, hsa-miR-1321, hsa-miR-1322, hsa-miR-1323, hsa-miR-1324, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b, hsa-miR-134, hsa-miR-135a, hsa-miR-135a\*, hsa-miR-135b, hsa-miR-135b\*, hsa-miR-136, hsa-miR-136\*, hsa-miR-137, hsa-miR-138, hsa-miR-138-1\*, hsa-miR-138-2\*, hsa-miR-139-3p, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-140-3p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-141\*, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-143, hsa-miR-143\*, hsa-miR-144, hsa-miR-144\*, hsa-miR-145, hsa-miR-145\*, hsa-miR-146a, hsa-miR-146a\*, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-147, hsa-miR-147b, hsa-miR-148a, hsa-miR-148a\*, hsa-miR-148b, hsa-miR-148b\*, hsa-miR-149, hsa-miR-149\*, hsa-miR-150, hsa-miR-150\*, hsa-miR-151-3p, hsa-miR-151-5p, hsa-miR-152, hsa-miR-153, hsa-miR-154, hsa-miR-154\*, hsa-miR-155, hsa-miR-155\*, hsa-miR-15a, hsa-miR-15a\*, hsa-miR-15b, hsa-miR-15b\*, hsa-miR-16, hsa-miR-16-1\*, hsa-miR-16-2\*, hsa-miR-17, hsa-miR-17\*, hsa-miR-181a, hsa-miR-181a\*, hsa-miR-181a-2\*, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-181c\*, hsa-miR-181d, hsa-miR-182, hsa-miR-182\*, hsa-miR-1825, hsa-miR-1826, hsa-miR-1827, hsa-miR-183, hsa-miR-183\*, hsa-miR-184, hsa-miR-185, hsa-miR-185\*, hsa-miR-186, hsa-miR-186\*, hsa-miR-187, hsa-miR-187\*, hsa-miR-188-3p, hsa-miR-188-5p, hsa-miR-18a, hsa-miR-18a\*, hsa-miR-18b, hsa-miR-18b\*, hsa-miR-190, hsa-miR-190b, hsa-miR-191, hsa-miR-191\*, hsa-miR-192, hsa-miR-192\*, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-193b, hsa-miR-193b\*, hsa-miR-194, hsa-miR-194\*, hsa-miR-195, hsa-miR-195\*, hsa-miR-196a, hsa-miR-196a\*, hsa-miR-196b, hsa-miR-197, hsa-miR-198, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-199a-5p, hsa-miR-199b-5p, hsa-miR-19a, hsa-miR-19a\*, hsa-miR-19b, hsa-miR-19b-1\*, hsa-miR-19b-2\*, hsa-miR-200a, hsa-miR-200a\*, hsa-miR-200b, hsa-miR-200b\*, hsa-miR-200c, hsa-miR-200c\*, hsa-miR-202, hsa-miR-202\*, hsa-miR-203, hsa-miR-204, hsa-miR-205, hsa-miR-206, hsa-miR-208a, hsa-miR-208b, hsa-miR-20a, hsa-miR-20a\*, hsa-miR-20b, hsa-miR-20b\*, hsa-miR-21, hsa-miR-21\*, hsa-miR-210, hsa-miR-211, hsa-miR-212, hsa-miR-214, hsa-miR-214\*, hsa-miR-215, hsa-miR-216a, hsa-miR-216b, hsa-miR-217, hsa-miR-218, hsa-miR-218-1\*, hsa-miR-218-2\*, hsa-miR-219-1-3p, hsa-miR-219-2-3p, hsa-miR-219-5p, hsa-miR-22, hsa-miR-22\*, hsa-miR-220a, hsa-miR-220b, hsa-miR-220c, hsa-miR-221, hsa-miR-221\*, hsa-miR-222, hsa-miR-222\*, hsa-miR-223, hsa-miR-223\*, hsa-miR-224, hsa-miR-23a, hsa-miR-23a\*, hsa-miR-23b, hsa-miR-23b\*, hsa-miR-24, hsa-miR-24-1\*, hsa-miR-24-2\*, hsa-miR-25, hsa-miR-25\*, hsa-miR-26a, hsa-miR-26a-1\*, hsa-miR-26a-2\*, hsa-miR-26b, hsa-miR-26b\*, hsa-miR-27a, hsa-miR-27a\*, hsa-miR-27b, hsa-miR-27b\*, hsa-miR-28-3p, hsa-miR-28-5p, hsa-miR-296-3p, hsa-miR-296-5p, hsa-miR-297, hsa-miR-298, hsa-miR-299-3p, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-29a, hsa-miR-29a\*, hsa-miR-29b, hsa-miR-296-1\*, hsa-miR-296-2\*, hsa-miR-29c, hsa-miR-29c\*, hsa-miR-300, hsa-miR-301a, hsa-miR-301b, hsa-miR-302a, hsa-miR-302a\*, hsa-miR-302b, hsa-miR-302b\*, hsa-miR-302c, hsa-miR-302c\*, hsa-miR-302d, hsa-miR-302d\*, hsa-miR-302e, hsa-miR-302f, hsa-miR-30a, hsa-miR-30a\*, hsa-miR-30b, hsa-miR-30b\*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30c-1\*, hsa-miR-30c-2\*, hsa-miR-30d, hsa-miR-30d\*, hsa-miR-30e, hsa-miR-30e\*, hsa-miR-31, hsa-miR-31\*, hsa-miR-32, hsa-miR-32\*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-320d, hsa-miR-323-3p, hsa-miR-323-5p, hsa-miR-324-3p, hsa-miR-324-5p, hsa-miR-325, hsa-miR-326, hsa-miR-328, hsa-miR-329, hsa-miR-330-3p, hsa-miR-330-5p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-331-5p, hsa-miR-335, hsa-miR-335\*, hsa-miR-337-3p, hsa-miR-337-5p, hsa-miR-338-3p, hsa-miR-338-5p, hsa-miR-339-3p, hsa-miR-339-5p, hsa-miR-33a, hsa-miR-33a\*, hsa-miR-33b, hsa-miR-33b\*, hsa-miR-340, hsa-miR-340\*, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-342-5p, hsa-miR-345, hsa-miR-346, hsa-miR-34a, hsa-miR-34a\*, hsa-miR-34b, hsa-miR-34b\*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-361-3p, hsa-miR-361-5p, hsa-miR-362-3p, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-363, hsa-miR-363\*, hsa-miR-365, hsa-miR-367, hsa-miR-367\*, hsa-miR-369-3p, hsa-miR-369-5p, hsa-miR-370, hsa-miR-371-3p, hsa-miR-371-5p, hsa-miR-372, hsa-miR-373, hsa-miR-373\*, hsa-miR-374a, hsa-miR-374a\*, hsa-miR-374b, hsa-miR-374b\*, hsa-miR-375, hsa-miR-376a, hsa-miR-376a\*, hsa-miR-376b, hsa-miR-376c, hsa-miR-377, hsa-miR-377\*, hsa-miR-378, hsa-miR-378\*, hsa-miR-379, hsa-miR-379\*, hsa-miR-380, hsa-miR-380\*, hsa-miR-381, hsa-miR-382, hsa-miR-383, hsa-miR-384, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-409-5p, hsa-miR-410, hsa-miR-411, hsa-miR-411\*, hsa-miR-412, hsa-miR-421, hsa-miR-422a, hsa-miR-423-3p, hsa-miR-423-5p, hsa-miR-424, hsa-miR-424\*, hsa-miR-425, hsa-miR-425\*, hsa-miR-429, hsa-miR-431, hsa-miR-431\*, hsa-miR-432, hsa-miR-432\*, hsa-miR-433, hsa-miR-448, hsa-miR-449a, hsa-miR-449b, hsa-miR-450a, hsa-miR-450b-3p, hsa-miR-450b-5p, hsa-miR-451, hsa-miR-452, hsa-miR-452\*, hsa-miR-453, hsa-miR-454, hsa-miR-454\*, hsa-miR-455-3p, hsa-miR-455-5p, hsa-miR-483-3p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-484, hsa-miR-485-3p, hsa-miR-485-5p, hsa-miR-486-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-487a, hsa-miR-487b, hsa-miR-488, hsa-miR-488\*, hsa-miR-489, hsa-miR-490-3p, hsa-miR-490-5p, hsa-miR-

491-3p, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-492, hsa-miR-493, hsa-miR-493\*, hsa-miR-494, hsa-miR-495, hsa-miR-496, hsa-miR-497, hsa-miR-497\*, hsa-miR-498, hsa-miR-499-3p, hsa-miR-499-5p, hsa-miR-500, hsa-miR-500\*, hsa-miR-501-3p, hsa-miR-501-5p, hsa-miR-502-3p, hsa-miR-502-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-504, hsa-miR-505, hsa-miR-505\*, hsa-miR-506, hsa-miR-507, hsa-miR-508-3p, hsa-miR-508-5p, hsa-miR-509-3-5p, hsa-miR-509-3p, hsa-miR-509-5p, hsa-miR-510, hsa-miR-511, hsa-miR-512-3p, hsa-miR-512-5p, hsa-miR-513a-3p, hsa-miR-513a-5p, hsa-miR-513b, hsa-miR-513c, hsa-miR-514, hsa-miR-515- 3p, hsa-miR-515-5p, hsa-miR-516a-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b, hsa-miR-517\*, hsa-miR-517a, hsa-miR-517b, hsa-miR-517c, hsa-miR-518a-3p, hsa-miR-518a-5p, hsa-miR-518b, hsa-miR-518c, hsa-miR-518c\*, hsa-miR-518d-3p, hsa-miR-518d-5p, hsa-miR-518e, hsa-miR-518e\*, hsa-miR-518f, hsa-miR-518f\*, hsa-miR-519a, hsa-miR-519b-3p, hsa-miR-519c-3p, hsa-miR-519d, hsa-miR-519e, hsa-miR-519e\*, hsa-miR-520a-3p, hsa-miR-520a-5p, hsa-miR-520b, hsa-miR-520c-3p, hsa-miR-520d-3p, hsa-miR-520d-5p, hsa-miR-520e, hsa-miR-520f, hsa-miR-520g, hsa-miR-520h, hsa-miR-521, hsa-miR-522, hsa-miR-523, hsa-miR-524-3p, hsa-miR-524-5p, hsa-miR-525-3p, hsa-miR-525-5p, hsa-miR-526b, hsa-miR-526b\*, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-539, hsa-miR-541, hsa-miR-541\*, hsa-miR-542-3p, hsa-miR-542-5p, hsa-miR-543, hsa-miR-544, hsa-miR-545, hsa-miR-545\*, hsa-miR-548a-3p, hsa-miR-548a-5p, hsa-miR-548b-3p, hsa-miR-548b-5p, hsa-miR-548c-3p, hsa-miR-548c-5p, hsa-miR-548d-3p, hsa-miR-548d-5p, hsa-miR-548e, hsa-miR-548f, hsa-miR-548g, hsa-miR-548h, hsa-miR-548i, hsa-miR-548j, hsa-miR-548k, hsa-miR-548l, hsa-miR-548m, hsa-miR-548n, hsa-miR-548o, hsa-miR-548p, hsa-miR-549, hsa-miR-550, hsa-miR-550\*, hsa-miR-551a, hsa-miR-551b, hsa-miR-551b\*, hsa-miR-552, hsa-miR-553, hsa-miR-554, hsa-miR-555, hsa-miR-556-3p, hsa-miR-556-5p, hsa-miR-557, hsa-miR-558, hsa-miR-559, hsa-miR-561, hsa-miR-562, hsa-miR-563, hsa-miR-564, hsa-miR-566, hsa-miR-567, hsa-miR-568, hsa-miR-569, hsa-miR-570, hsa-miR-571, hsa-miR-572, hsa-miR-573, hsa-miR-574-3p, hsa-miR-574-5p, hsa-miR-575, hsa-miR-576-3p, hsa-miR-576-5p, hsa-miR-577, hsa-miR-578, hsa-miR-579, hsa-miR-580, hsa-miR-581, hsa-miR-582-3p, hsa-miR-582-5p, hsa-miR-583, hsa-miR-584, hsa-miR-585, hsa-miR-586, hsa-miR-587, hsa-miR-588, hsa-miR-589, hsa-miR-589\*, hsa-miR-590-3p, hsa-miR-590-5p, hsa-miR-591, hsa-miR-592, hsa-miR-593, hsa-miR-593\*, hsa-miR-595, hsa-miR-596, hsa-miR-597, hsa-miR-598, hsa-miR-599, hsa-miR-600, hsa-miR-601, hsa-miR-602, hsa-miR-603, hsa-miR-604, hsa-miR-605, hsa-miR-606, hsa-miR-607, hsa-miR-608, hsa-miR-609, hsa-miR-610, hsa-miR-611, hsa-miR-612, hsa-miR-613, hsa-miR-614, hsa-miR-615-3p, hsa-miR-615-5p, hsa-miR-616, hsa-miR-616\*, hsa-miR-617, hsa-miR-618, hsa-miR-619, hsa-miR-620, hsa-miR-621, hsa-miR-622, hsa-miR-623, hsa-miR-624, hsa-miR-624\*, hsa-miR-625, hsa-miR-625\*, hsa-miR-626, hsa-miR-627, hsa-miR-628-3p, hsa-miR-628-5p, hsa-miR-629, hsa-miR-629\*, hsa-miR-630, hsa-miR-631, hsa-miR-632, hsa-miR-633, hsa-miR-634, hsa-miR-635, hsa-miR-636, hsa-miR-637, hsa-miR-638, hsa-miR-639, hsa-miR-640, hsa-miR-641, hsa-miR-642, hsa-miR-643, hsa-miR-644, hsa-miR-645, hsa-miR-646, hsa-miR-647, hsa-miR-648, hsa-miR-649, hsa-miR-650, hsa-miR-651, hsa-miR-652, hsa-miR-653, hsa-miR-654-3p, hsa-miR-654-5p, hsa-miR-655, hsa-miR-656, hsa-miR-657, hsa-miR-658, hsa-miR-659, hsa-miR-660, hsa-miR-661, hsa-miR-662, hsa-miR-663, hsa-miR-663b, hsa-miR-664, hsa-miR-664\*, hsa-miR-665, hsa-miR-668, hsa-miR-671-3p, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-675, hsa-miR-7, hsa-miR-708, hsa-miR-708\*, hsa-miR-7-1\*, hsa-miR-7-2\*, hsa-miR-72.0, hsa-miR-744, hsa-miR-744\*, hsa-miR-758, hsa-miR-760, hsa-miR-765, hsa-miR-766, hsa-miR-767-3p, hsa-miR-767-5p, hsa-miR-768-3p, hsa-miR-768-5p, hsa-miR-769-3p, hsa-miR-769-5p, hsa-miR-770-5p, hsa-miR-802, hsa-miR-873, hsa-miR-874, hsa-miR-875-3p, hsa-miR-875-5p, hsa-miR-876-3p, hsa-miR-876-5p, hsa-miR-877, hsa-miR-877\*, hsa-miR-885-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-886-3p, hsa-miR-886-5p, hsa-miR-887, hsa-miR-888, hsa-miR-888\*, hsa-miR-889, hsa-miR-890, hsa-miR-891a, hsa-miR-891b, hsa-miR-892a, hsa-miR-892b, hsa-miR-9, hsa-miR-9\*, hsa-miR-920, hsa-miR-921, hsa-miR-922, hsa-miR-923, hsa-miR-924, hsa-miR-92a, hsa-miR-92a-1\*, hsa-miR-92a-2\*, hsa-miR-92b, hsa-miR-92b\*, hsa-miR-93, hsa-miR-93\*, hsa-miR-933, hsa-miR-934, hsa-miR-935, hsa-miR-936, hsa-miR-937, hsa-miR-938, hsa-miR-939, hsa-miR-940, hsa-miR-941, hsa-miR-942, hsa-miR-943, hsa-miR-944, hsa-miR-95, hsa-miR-96, hsa-miR-96\*, hsa-miR-98, hsa-miR-99a, hsa-miR-99a\*, hsa-miR-99b, 및 hsa-miR-99b\*. 예를 들어, 근위축성측색경화증(ALS)과 연관된 슈퍼옥사이드 다이무타제(SOD1)를 발현하는 염색체 8 오픈 리딩 프레임 72(C9orf72)를 표적으로 하는 miRNA가 흥미로울 수 있다.

[0107] miRNA는 그것이 표적으로 하는 mRNA는의 기능을 저해하고, 그 결과, mRNA에 의해서 암호화되는 폴리펩타이드의 발현을 저해한다. 따라서, miRNA의 활성도를 (부분적으로 또는 완전히) 차단하는 것(예를 들어, miRNA를 침묵시

킴)은 발현이 저해되는 폴리펩타이드의 발현을 효과적으로 유도 또는 회복시킬 수 있다(폴리펩타이드를 탈억제(derepression)시킴). 일 실시형태에서, miRNA의 mRNA 표적에 의해서 암호화되는 폴리펩타이드의 탈억제는 다양한 방법 중 임의의 하나를 통해서 세포에서 miRNA 활성을 저해함으로써 달성된다. 예를 들어, miRNA의 활성 차단, miRNA와 상보성이거나 실질적으로 상보성인 작은 간섭 핵산(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오타이드, miRNA 스폰지, TuD RNA)과의 혼성화에 의해서 달성되어, miRNA와 이의 표적 mRNA의 상호작용을 차단할 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, miRNA와 실질적으로 상보성인 작은 간섭 핵산은 miRNA와 혼성화되어, miRNA의 활성을 차단할 수 있는 것이다. 일부 실시형태에서, miRNA와 실질적으로 상보성인 작은 간섭 핵산은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 또는 18개의 염기를 제외하고 모두에서 miRNA와 상보성인 작은 간섭 핵산이다. "miRNA 저해제"는 miRNA 기능, 발현 및/또는 가공을 차단하는 작용제이다. 예를 들어, 이러한 분자는 miRNA와 드로샤 복합체의 상호작용을 저해하는 마이크로RNA 특이적 안티센스, 마이크로RNA 스폰지, 강인한 디코이(decoy) RNA(TuD RNA) 및 마이크로RNA 올리고뉴클레오타이드(이중 가닥, 헤어핀, 짧은 올리고뉴클레오타이드)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

- [0108] 추가의 다른 유용한 유전자는 병원체에 수동 면역을 부여하는 면역글로불린을 암호화하는 것을 포함할 수 있다. "면역글로불린 분자"는 함께 공유 결합되고, 항원과 특이적으로 조합될 수 있는 면역글로불린 중쇄 및 면역글로불린 경쇄의 면역학적 활성 부분을 함유하는 단백질이다. 면역글로불린 분자는 임의의 유형(예를 들어, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA 및 IgY), 부류(예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 및 IgA2) 또는 하위부류를 갖는다. 용어 "항체" 및 "면역글로불린"은 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다.
- [0109] "면역글로불린 중쇄"는 면역글로불린의 항원 결합 도메인의 적어도 일부 및 면역글로불린 중쇄의 가변 영역의 적어도 일부 또는 면역글로불린 중쇄의 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩타이드이다. 따라서, 면역글로불린 유래된 중쇄는 다수의 면역글로불린 유전자 상과와 아미노산 서열 상동성이 상당한 영역을 갖는다. 예를 들어, Fab 단편 내의 중쇄는 면역글로불린-유래된 중쇄이다.
- [0110] "면역글로불린 경쇄"는 면역글로불린의 항원 결합 도메인의 적어도 일부 및 면역글로불린 경쇄의 가변 영역의 적어도 일부 또는 불변 영역의 적어도 일부를 함유하는 폴리펩타이드이다. 따라서, 면역글로불린 유래된 경쇄는 다수의 면역글로불린 유전자 상과의 구성원과 아미노산 상동성의 상당한 영역을 갖는다.
- [0111] "면역접착제"는 결합 단백질, 통상적으로 수용체, 리간드 또는 세포-접착 분자의 기능성 도메인과, 통상적으로 힌지 영역 및 FC 영역을 비롯한 면역글로불린 불변 도메인을 조합하는 키메라 항체-유사 분자이다.
- [0112] "단편 항원-결합(Fab) 단편"은 항원에 결합하는 항체 상의 영역이다. 그것은 중쇄 및 경쇄 각각의 하나의 불변 도메인 및 하나의 가변 도메인으로 구성된다.
- [0113] 항-병원체 작제물은 예방이 추구되는 질환에 대한 원인 작용제(causative agent)(병원체)를 기초로 선택된다. 이들 병원체는 바이러스, 박테리아 또는 진균 기원일 수 있고, 인간에서 인간 질환에 대해서 감염을 예방하거나 또는 비인간 포유동물 또는 다른 동물에서 수의과 질환을 예방하기 위해서 사용될 수 있다.
- [0114] rAAV는 바이러스 병원체에 대한 항체, 및 특히 중화 항체를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 항-바이러스 항체는 인플루엔자 A, 인플루엔자 B 및 인플루엔자 C 중 하나 이상에 대해서 지향되는 항-인플루엔자 항체를 포함할 수 있다. 타입 A 바이러스는 가장 치명적인 인간 병원체이다. 전세계적 유행병과 연관된 인플루엔자 A의 항원형은 1918년에 스페인 독감 및 2009년에 돼지 독감을 초래한 H1N1; 1957년에 아시아 독감을 초래한 H2N2; 1968년에 홍콩 독감을 초래한 H3N2; 2004년에 조류 독감을 초래한 H5N1; H7N7; H1N2; H9N2; H7N2; H7N3; 및 H10N7을 포함한다. 다른 표적 병원체 바이러스는 아레나바이러스(푸닌(funin), 마추포(machupo), 및 라사(Lassa) 포함), 필로바이러스(마르부르크(Marburg) 및 에볼라 포함), 한타바이러스, 피코모비리데(picomoviridae)(리노바이러스, 에코바이러스 포함), 코로나바이러스, 파라믹소바이러스, 모르빌바이러스, 호흡기 세포융합 바이러스, 토파바이러스, 콕사키바이러스, JC 바이러스, 파코바이러스 B19, 파라인플루엔자, 아데노바이러스, 레오바이러스, 두창(대두창(천연두)) 및 폭스바이러스 파로부터의 중두증(우두), 및 대상포진(가성광견병)을 포함한다. 바이러스성 출혈열은 아레나바이러스 과(라사열)(이 과는 또한 림프구성 맥락 수막염(LCM)과 연관됨), 필로바이러스(에볼라 바이러스), 및 한타바이러스(푸레말라(puremala))의 구성원에 의해서 유발된다. 피코마바이러스(리노바이러스의 아과)의 구성원이 인간에서 감기와 연관된다. 코로나바이러스 과는 비-인간 바이러스, 에컨데, 전염성 기관지염 바이러스(가금류), 돼지 전염성 기관지염 위장 바이러스(돼지), 돼지 적혈구 응집성 뇌염 바이러스(돼지), 고양이 전염성 복막염 바이러스(고양이), 고양이 장 코로나바이러스(고양이), 개 코로나바이러스(개)를 포함한다. 인간 기관지 코로나바이러스는 감기, 비-A형, B형 또는 C형 간염 및 중증 급성 호흡기 증후군(SARS)과 연관된다고 추정된다. 파라믹소바이러스 과는 파라인플루엔자 바이러스 타입



1, 파라인플루엔자 바이러스 타입 3, 소 파라인플루엔자 바이러스 타입 3, 루볼라바이러스(유행성 이하선염 바이러스, 파라인플루엔자 바이러스 타입 2, 파라인플루엔자 바이러스 타입 4, 뉴캐슬병 바이러스(닭), 우역, 홍역 및 개 홍역을 포함하는 모르빌리바이러스, 및 호흡기 세포융합 바이러스(RSV)를 포함하는 뉴모바이러스를 포함한다. 파보바이러스 과는 고양이 파보바이러스(고양이 장염), 고양이 관류코페니아바이러스, 개 파보바이러스 및 돼지 파보바이러스를 포함한다. 아데노바이러스 과는 호흡 질환을 야기하는 바이러스(EX, AD7, ARD, O.B.)를 포함한다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 rAAV 벡터는 항-에볼라 항체, 예를 들어, 2G4, 4G7, 13C6, 항-인플루엔자 항체, 예를 들어, FI6, CR8033 및 항-RSV 항체, 예를 들어, 팔리비주맵, 모타비주맵을 발현하도록 조작될 수 있다.

[0115] 박테리아 병원체에 대한 중화 항체 작제물이 또한 본 발명에서 사용을 위해서 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 중화 항체 작제물은 박테리아 자체에 대해서 지향된다. 또 다른 실시형태에서, 중화 항체 작제물은 박테리아에 의해서 생산되는 독소에 대해서 지향된다. 공기 매개 박테리아 병원체는 예를 들어, 나이세리아 메닝기티디스(*Neisseria meningitidis*)(뇌수막염), 클레브시엘라 뉴모니아(*Klebsiella pneumonia*)(폐렴), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas aeruginosa*)(폐렴), 슈도모나스 아에루기노사(*Pseudomonas pseudomallei*)(폐렴), 슈도모나스 말레이(*Pseudomonas mallei*)(폐렴), 아시네토박터(*Acinetobacter*)(폐렴), 모락셀라 카타르할리스(*Moraxella catarrhalis*), 모락셀라 라쿠나타(*Moraxella lacunata*), 알칼리게네스(*Alkaligenes*), 카디오박테리움(*Cardiobacterium*), 헤모필루스 인플루엔자(*Haemophilus influenzae*)(감기), 헤모필루스 파라인플루엔자(*Haemophilus parainfluenzae*), 보르데텔라 페르투스시(Bordetella pertussis)(백일해), 프란시셀라 톨라렌시스(폐렴/열), 레지오넬라 뉴모니아에(*Legionella pneumonia*)(제항균인병), 클라마이디아 프시타시(*Chlamydia psittaci*)(폐렴), 클라마이디아 뉴모니아에(*Chlamydia pneumoniae*)(폐렴), 마이코박테리움 투베쿨로시스(*Mycobacterium tuberculosis*)(결핵(TB)), 마이코박테리움 칸사시(*Mycobacterium kansasii*)(TB), 마이코박테리움 아비움(*Mycobacterium avium*)(폐렴), 노카디아아스테로이데스(*Nocardia asteroides*)(폐렴), 바실루스 안트라시스(*Bacillus anthracis*)(탄저병), 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)(폐렴), 스트렙토코쿠스 피요게네스(*Streptococcus pyogenes*)(성홍열), 스트렙토코쿠스 뉴모니아에(*Streptococcus pneumoniae*)(폐렴), 코리네박테리아 디프테리아(*Corynebacteria diphtheria*)(디프테리아), 마이코플라스마 뉴모니아에(*Mycoplasma pneumoniae*)(폐렴)를 포함한다.

[0116] rAAV는 박테리아 병원체, 예컨대, 바실루스 안트라시스에 의해서 생산되는 독소인 탄저병의 원인 작용제에 대한 항체, 및 특히 중화 항체를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 독소이드를 형성하는 3개의 펩타이드 중 하나인 보호제(edema factor: PA)에 대한 중화 항체가 기술되어 있다. 나머지 2개의 폴리펩타이드는 치명적 인자(LF) 및 부종 인자(EF)로 이루어진다. 항-PA 중화 항체는 탄저병에 대한 수동 면역에 효과적인 것으로 기술되어 있다(예를 들어, 미국 특허 제7,442,373호; 문헌[R. Sawada-Hirai et al, J Immune Based Ther Vaccines. 2004; 2: 5. (on-line 2004 May 12)] 참고). 추가의 다른 항-탄저균 독소 중화 항체는 기술되어 있고/있거나 생성될 수 있다. 유사하게, 다른 박테리아 및/또는 박테리아 독소에 대한 중화 항체를 사용하여 본 명세서에 기술된 바와 같은 AAV-전달된 항-병원체 작제물을 생성시킬 수 있다.

[0117] 감염성 질환에 대한 항체는 예를 들어, 아스페길루스(*Aspergillus*) 종, 압시디아 코림비페라(*Absidia corymbifera*), 릭스푸스 스톨로니퍼(*Rhizopus stolonifer*), 무코 플루베우스(*Mucor plumbeus*), 크립토코쿠스 네오포르만스(*Cryptococcus neoformans*), 히스토플라즈م 캡슐라툼(*Histoplasma capsulatum*), 블라스토마이세스 더마티티디스(*Blastomyces dermatitidis*), 코코디오이데스 이미티스(*Coccidioides immitis*), 페니실리움(*Penicillium*) 종, 마이크로폴리스포라 파에니(*Micropolyspora faeni*), 썬모악티노마이세스 불가리스(*Thermoactinomyces vulgaris*), 알터나리아 알터네이트(*Alternaria alternate*), 클라도스포리움(*Cladosporium*) 종, 헬민토스포리움(*Helminthosporium*), 및 스타키보트리스(*Stachybotrys*) 종을 비롯한, 기생충 또는 진균에 의해서 유발될 수 있다.

[0118] rAAV는 질환 예컨대, 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), GBA-파킨슨병, 류마티스 관절염(RA), 과민성 대장 증후군(IBS), 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD), 암, 종양, 전신 경화증, 천식 및 다른 질환의 병원체 인자의 항체, 및 특히 중화 항체를 암호화하는 유전자를 포함할 수 있다. 이러한 항체는 비제한적으로 예를 들어, 알파-시누클레인, 항-혈관 내피 성장 인자(VEGF)(항-VEGF), 항-VEGFA, 항-PD-1, 항-PDL1, 항-CTLA-4, 항-TNF-알파, 항-IL-17, 항-IL-23, 항-IL-21, 항-IL-6, 항-IL-6 수용체, 항-IL-5, 항-IL-7, 항-인자 XII, 항-IL-2, 항-HIV, 항-IgE, 항-종양 괴사 인자 수용체-1(TNFR1), 항-노치 2/3, 항-노치 1, 항- OX40, 항-erb-b2 수용체 타이로신 카이나제 3(ErbB3), 항-ErbB2, 항-베타 세포 성숙 항원, 항-B 림프구 자극인자, 항-CD20, 항-HER2, 항-과립구 대식세포 집락-자극 인자, 항-온코스타틴 M(OSM), 항-림프구 활성화 유전자 3(LAG3) 단백질, 항-CCL20, 항-혈청 아밀로이

드 P 성분(SAP), 항-프롤린 하이드록실라제 저해제, 항-CD38, 항-당단백질 IIb/IIIa, 항-CD52, 항-CD30, 항-IL-1베타, 항-표피 성장 인자 수용체, 항-CD25, 항-RANK 리간드, 항보체계 단백질 C5, 항-CD11a, 항-CD3 수용체, 항-알파-4( $\alpha 4$ ) 인테그린, 항-RSV F 단백질, 및 항-인테그린  $\alpha_4\beta_7$ 일 수 있다. 또 다른 병원체 및 질환은 당업자에게 자명할 것이다. 다른 적합한 항체는 알츠하이머병을 치료하는 데 유용한 것, 특히 예를 들어, 항-베타-아밀로이드(예를 들어, 크레네주맵, 솔라네주맵, 아두카누맵), 항-베타-아밀로이드 피브릴, 항-베타-아밀로이드 플라크, 항-tau, 바피네우주맵 등을 포함할 수 있다. 다양한 적응증을 치료하기에 적합한 다른 항체는 예를 들어, 2016년 10월 27일자 출원되고, WO 2017/075119A1로서 공개된 특허 제PCT/US2016/058968호에 기술된 것을 포함한다.

## [0119] II. rAAV 벡터 생산

AAV 바이러스 벡터(예를 들어, 재조합(r) AAV)를 생산하는 데 사용하기 위해서, 발현 카세트는 패키징 숙주 세포에 전달되는, 임의의 적합한 벡터, 예를 들어, 플라스미드 상에 보유될 수 있다. 본 발명에 유용한 플라스미드는, 그것이 시험관내에서 특히 원핵 세포, 곤충 세포, 포유동물 세포에서 복제 및 패키징되기에 적합하도록 조작될 수 있다. 적합한 형질주입 기술 및 숙주 세포의 패키징 기술은 공지되어 있고/있거나 당업자에 의해서 쉽게 설계될 수 있다.

벡터로서 사용하기에 적합한 AAV를 생성 및 단리시키는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(일반적으로, 예를 들어, 문헌[Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *et al.*, 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733] 및 하기에 인용된 문헌 참고(이들 각각은 이들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)). 유전자를 비리온 내에 패키징하기 위해서, ITR은 발현 카세트(들)를 함유하는 핵산 분자와 동일한 작제물 내에서 시스템 필요가 있는 유일한 AAV 성분이다. cap 및 rep 유전자는 트랜스로 공급될 수 있다.

일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 발현 카세트는, 상부에 보유된 면역글로불린 작제물 서열을 바이러스 벡터의 생산을 위한 패키징 숙주 세포 내로 전달하는 유전 요소(예를 들어, 서플 플라스미드) 내에서 조작된다. 일 실시형태에서, 선택된 유전 요소는 형질주입, 전기침공법, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질 융합을 비롯한, 임의의 적합한 방법에 의해서 AAV 패키징 세포에 전달될 수 있다. 안정적인 AAV 패키징 세포가 또한 제조될 수 있다. 대안적으로, 발현 카세트는 AAV가 아닌 바이러스 벡터를 생성하기 위해서 또는 시험관내에서 항체의 혼합물의 생산을 위해서 사용될 수 있다. 그러한 작제물을 제조하기 위해 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 당업자에게 공지되어 있고, 이것은 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기술을 포함한다(예를 들어, 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)] 참고).

용어 "AAV 중간체" 또는 "AAV 벡터 중간체"는 내부에 패키징된 목적하는 게놈 서열이 걸여된 조립된 rAAV 캡시드를 지칭한다. 이들은 또한 "중공" 캡시드라 지칭될 수 있다. 이러한 캡시드는 발현 카세트의 어떠한 검출 가능한 게놈 서열도 함유할 수 없거나, 또는 유전자 산물의 발현을 달성하기에 불충분한 단지 부분적으로 패키징된 게놈 서열을 함유할 수 있다. 이들 중공 캡시드는 관심 유전자를 숙주 세포에 전달하기에 비기능성이다.

본 명세서에 기술된 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)는 공지된 기술을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 국제 특허 제WO 2003/042397호; 제WO 2005/033321호, 제WO 2006/110689호; 미국 특허 제US 7588772 B2호 참고). 이러한 방법은 AAV 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소한, AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 이식유전자로 구성된 발현 카세트; 및 발현 카세트의 AAV 캡시드 단백질을 내로의 패키징을 허용하기에 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다. 캡시드, 이를 위한 암호 서열을 생성하는 방법 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법이 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Gao, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100 (10), 6081-6086 (2003)] 및 미국 특허 제US 2013/0045186A1호 참고).

일 실시형태에서, 재조합 AAVhu68을 생산하는 데 유용한 생산 세포 배양물이 제공된다. 이러한 세포 배양물은 숙주 세포에서 AAVhu68 캡시드 단백질을 발현하는 핵산; AAVhu68 캡시드, 예를 들어, AAV ITR 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 함유하는 벡터 게놈 내에 패키징하기에 적합한 핵산 분자; 및 재조합 AAVhu68 캡시드 내에 핵산 분자를 패키징하는 것을 허용하기 위한 충분한 AAV rep 기능 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 함유한다. 일 실시형태에서, 세포 배양물은 포유동물 세포(예를 들어, 특히 인간 배아 신장 293 세포) 또는 곤충 세포(예를 들어, 바콜로바이러스)로 구성

된다.

- [0126] 선택적으로, rep 기능은 hu68가 아닌 AAV에 의해서 제공된다. 특정 실시형태에서, rep 기능의 적어도 부분은 AAVhu68로부터 유래된다. 예를 들어, rep 서열은 서열번호 4의 rep 단백질, 및 이의 기능성 단편을 암호화한다는 것을 참고하기 바란다. AAV rep는 서열번호 3의 핵산 서열에 의해서 암호화될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, rep 단백질은 AAVhu68rep가 아닌 이중 rep 단백질, 예를 들어 비제한적으로, AAV1 rep 단백질, AAV2 rep 단백질, AAV3 rep 단백질, AAV4 rep 단백질, AAV5 rep 단백질, AAV6 rep 단백질, AAV7 rep 단백질, AAV8 rep 단백질; 또는 rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 및 rep40/52; 또는 이의 단편; 또는 또 다른 공급원이다. 선택적으로, rep 및 cap 서열은 세포 배양물에서 동일한 유전 요소 상에 존재한다. rep 서열과 cap 유전자 사이에 스페이서가 존재할 수 있다. 선택적으로, 스페이서는 atgacttaaacagggt 서열번호 9이다. 이러한 AAVhu68 또는 돌연변이체 AAV 캡시드 서열 중 임의의 것은 숙주 세포에서 발현을 지시하는 외인성 조절 제어 서열의 제어 하에 존재할 수 있다.
- [0127] 일 실시형태에서, 세포는 적합한 세포 배양물(예를 들어, HEK 293) 세포에서 제조된다. 본 명세서에 기재된 유전자 요법을 제조하는 방법은 유전자 요법 벡터의 생성을 위해 사용되는 플라스미드 DNA의 생성, 벡터의 생성 및 벡터의 정제와 같이 당업계에 잘 공지된 방법을 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고, 생성된 플라스미드는 AAV 게놈 및 관심 유전자를 암호화하는 AAV 시스-플라스미드, AAV rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 트랜스-플라스미드, 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드이다. 벡터 생성 공정은 방법 단계, 예컨대, 세포 배양의 개시, 세포의 계대, 세포의 시딩, 세포에의 플라스미드 DNA의 형질주입, 혈청 무함유 배지로의 형질주입 후 배지 교환, 및 벡터-함유 세포 및 배양 배지의 수거를 포함할 수 있다. 수거된 벡터-함유 세포 및 배양 배지를 본 명세서에서 조 세포 수거물이라 지칭한다. 또 다른 시스템에서, 유전자 요법 벡터는 곤충 세포 내부로 바콜로바이러스-기반 벡터로의 감염에 의해 도입된다. 이러한 생산 시스템에 대한 리뷰에 대해서는, 일반적으로 예를 들어, 문헌[Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929](그 내용은 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)를 참고하기 바란다. 이러한 및 다른 AAV 생산 시스템의 제조 및 사용 방법은 하기 미국 특허에 기술되어 있으며, 이들 각각의 내용은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다: 5,139,941; 5,741,683; 6,057,152; 6,204,059; 6,268,213; 6,491,907; 6,660,514; 6,951,753; 7,094,604; 7,172,893; 7,201,898; 7,229,823; 및 7,439,065.
- [0128] 이후에 조절의 세포 수거물은 이후에 벡터 수거물의 농축, 벡터 수거물의 투석여과, 벡터 수거물의 미세유동화, 뉴클레아제 벡터 수거물의 분해, 미세유동화된 중간체의 여과, 크로마토그래피에 의한 조절의 정제, 초원심분리에 의한 조절의 정제, 접선유동여과에 의한 완충제 교환 및/또는 벌크 벡터를 제조하기 위한 제형 및 여과와 같은 방법 단계들이 실시될 수 있다.
- [0129] 고 염 농도에서, 그 다음 음이온 교환 수지 크로마토그래피에 의한 2-단계 친화도 크로마토그래피 정제를 사용하여 벡터 약물 제품을 정제하고, 중공 캡시드를 제거한다. 이러한 방법은 본 명세서에 참고로 포함된 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065970호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌, 미국 특허 출원 제62/322,071호(출원일 2016년 4월 13일), 및 제62/226,357호(출원일 2015년 12월 11일, 발명의 명칭 "Scalable Purification Method for AAV9")에 보다 상세하게 기술되어 있다. AAV8에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065976호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌 미국 특허 출원 제62/322,098호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/266,341호(출원일 2015년 12월 11일) 및 rh10에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US16/66013호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌, 미국 특허 출원 제62/322,055호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/266,347호(발명의 명칭 "Scalable Purification Method for AAVrh10", 또한 출원일 2015년 12월 11일), 및 AAV1에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065974호(출원일 2016년 12월 9일), 및 이의 우선권 문헌 미국 특허 출원 제62/322,083호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/26,351호("Scalable Purification Method for AAV1", 출원일 2015년 12월 11일)은 모두 본 명세서에 참고로 포함된다.
- [0130] 중공 입자 및 전입자 함량을 계산하기 위해서, 선택된 샘플에 대한 VP3 밴드 체적(예를 들어, 본 명세서 실시예에서, 아이오딘산을 구배-정제된 제제이고, 여기서 GC의 # = 입자의 #)을 적재된 GC 입자에 대해서 플로팅한다. 생성된 일차 방정식( $y = mx + c$ )을 사용하여 시험품 피크의 밴드 체적 내의 입자의 수를 계산한다. 이어서, 적재된  $20\mu\text{l}$ 당 입자의 수(pt)에 50을 곱하여 입자(pt)/ $\text{ml}$ 를 제공한다. Pt/ $\text{ml}$ 를 GC/ $\text{ml}$ 로 나누어서 게놈 복제물에 대한 입자의 비(pt/GC)를 제공한다. Pt/ $\text{ml}$ -GC/ $\text{ml}$ 는 중공 pt/ $\text{ml}$ 를 제공한다. 중공 pt/ $\text{ml}$ 를 pt/ $\text{ml}$ 로 나누고 100을 곱하여 중공 입자의 백분율을 제공한다.



- [0131] 일반적으로, 패키징된 게놈을 갖는 AAV 벡터 입자 및 중공 캡시드에 대한 검정 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 문헌[Grimm et al., *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128] 참고). 변성 캡시드에 대해서 시험하기 위해서, 방법은 처리된 AAV 스톱을, 3종의 캡시드 단백질, 예를 들어, 완충제 중에 3 내지 8%의 트리스-아세트아이드를 함유하는 구매 젤을 분리할 수 있는 임의의 젤로 이루어진, SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동법에 적용하는 단계, 이어서, 젤을 샘플 물질이 분리될 때까지 전개시키는 단계, 및 젤을 나일론 또는 나이트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론 상에 블롯팅하는 단계를 포함한다. 이어서, 항-AAV 캡시드 항체는 변성 캡시드 단백질, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론성 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론성 항체에 결합하는 1차 항체로서 사용된다(Wobus et al., *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). 이어서, 2차 항체, 즉, 1차 항체에 결합하고, 1차 항체와의 결합을 검출하기 위한 수단, 보다 바람직하게는 그것에 공유 결합된 검출 분자를 함유하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 호스래디쉬 퍼옥시다제에 공유 연결된 양 항-마우스 IgG 항체인 것이 사용된다. 결합을 검출하기 위한 방법을 사용하여 1차 항체와 2차 항체 간의 결합을 반-정량적으로 결정하는데, 바람직하게는 검출 방법은 방사성 동위원소 방출, 전자기 방사선, 또는 표색제 변화, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트를 검출할 수 있다. 예를 들어, SDS-PAGE의 경우, 칼럼 분획으로부터의 샘플을 취하고, 환원제(예를 들어, DTT)를 함유하는 SDS-PAGE 적재 완충액 중에서 가열할 수 있고, 캡시드 단백질을 프리-캐스트(pre-cast) 구매 폴리아크릴아마이드 젤(예를 들어, 노벨스(Novex)) 상에서 분할시켰다. 제조사의 설명서에 따라서 실버엑스프레스(SilverXpress)(인비트로젠사(Invitrogen), 미국 캘리포니아주 소재)를 사용하여 또는 다른 적합한 염색 방법, 즉 SYPRO 루비 또는 쿠마시 염색제를 사용하여 염색을 수행할 수 있다. 일 실시형태에서, 칼럼 분획 중의 AAV 벡터 게놈(vg)의 농도를 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해서 측정할 수 있다. 외인성 DNA를 제거하기 위해 샘플은 DNase I(또는 다른 적합한 뉴클레아제)를 이용하여 희석되고 분해된다. 뉴클레아제의 비활성화 후에, 상기 샘플은 추가로 희석되며, 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 태크만(TaqMan)<sup>(상표명)</sup> 형광원 프로브 및 프라이머를 이용하여 증폭시킨다. 정의된 형광 수준에 도달하는 데 필요한 사이클의 수(역치 사이클, Ct)를 어플라이드 바이오시스템즈 프리즘(Applied Biosystems Prism) 7700 서열 검출 시스템 상에서 각각의 샘플에 대해서 측정한다. AAV 벡터에 함유된 것과 동일한 서열을 함유하는 플라스미드 DNA를 사용하여 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성시킨다. 샘플로부터 얻은 사이클 역치(Ct) 값을 사용하여 그것을 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값에 정규화시킴으로써 벡터 게놈 역가를 결정한다. 디지털 PCR을 기반으로 한 중점 검정을 또한 사용할 수 있다.
- [0132] 일 양상에서, 광역 스펙트럼 세린 프로테아제, 예를 들어, 프로테이나제 K(예컨대, 퀴아젠사(Qiagen)으로부터 상업적으로 입수 가능함)를 사용하는 최적화된 q-PCR 방법을 사용한다. 보다 특별하게는, 최적화된 qPCR 게놈 역가 검정은, DNase I 소화 후에, 샘플을 프로테이나제 K 완충액으로 희석하고, 프로테이나제 K로 처리한 후 열 불활성화시키는 것을 제외하고는, 표준 검정과 유사하다. 적합하게는 샘플을 샘플 크기와 동일한 양의 프로테이나제 K 완충액으로 희석한다. 프로테이나제 K 완충액을 2배수 이상으로 농축시킬 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2mg/ml이지만, 0.1mg/ml 내지 약 1mg/ml 달라질 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55℃에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 낮은 온도(예를 들어, 약 37℃ 내지 약 50℃)에서 더 긴 시간 기간(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분) 동안, 또는 더 높은 온도(예를 들어, 최대 약 60℃)에서 더 짧은 시간 기간(예를 들어, 약 5 내지 10분) 동안 수행될 수 있다. 유사하게, 열 불활성화는 일반적으로 약 95℃에서 약 15분 동안이지만, 그 온도는 더 낮을 수 있고(예를 들어, 약 70 내지 약 90℃), 그 시간은 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 이어서, 샘플을 희석(예를 들어, 1000배)하고, 표준 검정에 기술된 바와 같이 태크만 분석법에 적용한다.
- [0133] 추가로, 또는 대안적으로, 드로플렛 디지털(Droplet digital) PCR(ddPCR)을 사용할 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의해서 단일-가닥 및 자가-상보성 AAV 벡터 게놈 역가를 결정하는 방법은 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[M. Lock et al., *Hu Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14] 참고).
- [0134] 간략하면, 게놈-결합 AAVhu68 중간체로부터 패키징된 게놈 서열을 갖는 rAAVhu68 입자를 분리하는 방법은 재조합 AAVhu68 바이러스 입자 및 AAVhu68 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액을 약 260 및 약 280에서의 자외 흡광도에 대해서 모니터링하면서 고속 성능 액체 크로마토그래피에 적용하는 것을 포함하는데, 여기서 AAVhu68 바이러스 입자 및 AAVhu68 중간체는 pH 10.2에서 평형화된 강한 음이온 교환 수지에 결합되고, 염 구매에 적용된다. RAAV9hu68에 대해서 덜 적합하긴 하지만, pH는 약 10.0 내지 10.4 범위일 수 있다. 이러한 방법에서, A260/A280의 비가 변곡점에 도달한 경우 용리된 분획으로부터 AAVhu68 전 캡시드를 분리한다. 일 예에서, 친화도 크로마토그래피 단계에 대해, 투석여과 산물은 AAV2/hu68 혈청형을 효율적으로 포획하는 캡처 셀렉트

(Capture Select)<sub>(상표명)</sub> 포로스-AAV2/9 친화도 수지(라이프 테크놀로지스사(Life Technologies))에 적용된다. 이러한 이온 조건 하에서, 상당한 백분율의 잔류하는 세포 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해서 유동하면서, AAV 입자가 효율적으로 포획된다.

[0135] **III. 조성물 및 용도**

[0136] 본 명세서에서는 적어도 1종의 rAAV 스톡(예를 들어, rAAVhu68 스톡 또는 돌연변이체 rAAV 스톡) 및 선택적인 담체, 부형제 및/또는 보존제를 함유하는 조성물이 제공된다. rAAV 스톡은 예를 들어, 농도 및 투여 단위의 논의에서 하기에 기술된 양에서와 동일한 복수의 rAAV 벡터를 지칭한다.

[0137] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술 분야에 널리 공지되어 있다. 보조 활성 성분이 또한 조성물 중에 혼입될 수 있다. 구 "약제학적으로 허용 가능한"은 숙주에 투여되는 경우 알레르기 또는 유사한 뜻밖의 반응을 생성시키지 않는 분자 엔티티 및 조성물을 지칭한다. 전달 비히클, 예컨대, 리포솜, 나노캡슐, 마이크로입자, 마이크로구체, 지질 입자, 소포체 등이 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포에 도입하기 위해서 사용될 수 있다. 특히, rAAV 벡터 전달 벡터 계통이 전달을 위해서 지질 입자, 리포솜, 소포체, 나노구체 또는 나노입자 등에 캡슐화되어 제형화될 수 있다.

[0138] 일 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 전달하기에 적합한 최종 제형을 포함하고, 이것은 예를 들어, 생리학적 으로 상용성인 pH 및 염 농도로 완충된 수성 액체 현탁액이다. 선택적으로, 1종 이상의 계면활성제가 제형 중에 존재한다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 투여하기 위해서 희석되는 농축물로서 수송될 수 있다. 다른 실시형태에서, 조성물은 동결건조되고, 투여 시기에 재구성될 수 있다.

[0139] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합물은 비독성인 비이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 일 실시 형태에서, 1차 하이드록실기에서 중결되는 2작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 폴록사머(Poloxamer) 188로서도 알려져 있고 중성 pH를 갖는 폴루로닉(Poloxamer)(등록상표) F68[바스프사(BASF)]은 평균 분자량이 8400이다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇄가 측점된 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇄로 구성된 비이온성 트라이블록 공중합체, SUTOL HS 15(마크로골(Macrogol)-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴 글리세리드), 폴리옥시 10 올레일 에터, TWEEN(폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 통상적으로 글자 "P"(폴록사머에 대해) 다음에 3개의 숫자로 명명되며: 처음 2개의 숫자×100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략의 분자량을 제공하고, 마지막 숫자×10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다.

[0140] 벡터는 과도한 부작용 없이 또는 의학 분야의 당업자에 의해서 결정될 수 있는 의학적으로 허용 가능한 생리학적 효과와 함께 치료적 이익을 제공하기에 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하기 위해서 세포에 형질주입시키기에 충분한 양으로 투여된다. 종래의 약제학적으로 허용 가능한 투여 경로는, 목적하는 기관(예를 들어, 간(선택적으로 간 동맥을 통해서), 폐, 심장, 눈, 신장)으로의 직접 전달, 경구, 흡입, 비강내, 척추강내, 기관내, 동맥내, 안내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내 또는 다른 비경구 투여 경로를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 대안적으로 또는 추가로, 투여 경로는 바람직한 경우 조합될 수 있다.

[0141] 바이러스 벡터의 투여량은 치료될 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 인자에 주로 좌우될 것이며, 따라서 환자에 따라서 다양할 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료적으로 유효한 인간 투여량은 일반적으로 약  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{16}$  게놈 바이러스 벡터의 농도를 함유하는 용액 100ml에 대해서 약 25 내지 약 1000마이크로리터의 범위이다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추도록 조절될 것이고, 이러한 투여량은 재조합 벡터에 대해 사용되는 치료적 용도에 따라 다를 수 있다. 트랜스젠 산물의 발현 수준을 모니터링하여 바이러스 벡터, 바람직하게는 꼬마유전자를 함유하는 AAV 벡터를 생성시키는 투여 빈도를 결정할 수 있다. 선택적으로, 치료 목적을 위해서 기술된 것과 유사한 투여 요법이 본 발명의 조성물을 사용한 면역화를 위해서 사용될 수 있다.

[0142] 복제-결합 바이러스 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 약  $1.0 \times 10^9$  GC 내지 약  $1.0 \times 10^{16}$  GC(약 70kg 체중의 평균 대상체를 치료하는 경우), 바람직하게는 인간 환자의 경우  $1.0 \times 10^{12}$  GC 내지  $1.0 \times$

$10^{14}$  GC의 범위 내인 복제-결합 바이러스의 양을 함유하도록 투여 단위로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^9$ ,  $2 \times 10^9$ ,  $3 \times 10^9$ ,  $4 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $6 \times 10^9$ ,  $7 \times 10^9$ ,  $8 \times 10^9$ , 또는  $9 \times 10^9$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ , 또는  $9 \times 10^{10}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ , 또는  $9 \times 10^{11}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ , 또는  $9 \times 10^{12}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ , 또는  $9 \times 10^{13}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ , 또는  $9 \times 10^{14}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ , 또는  $9 \times 10^{15}$  GC를 함유하도록 제형화된다. 일 실시형태에서, 인간 적용을 위해서, 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당  $1 \times 10^{10}$  내지 약  $1 \times 10^{12}$  GC의 범위일 수 있다.

[0143] 이러한 상기 용량은 치료될 면적의 크기, 사용되는 바이러스 역가, 투여 경로 및 목적하는 방법의 효과에 따라서, 범위 내의 모든 수를 포함하여, 약 25 내지 약 1000밀리리터 또는 더 높은 부피의 범위의 다양한 부피의 담체, 부형제 또는 완충 제형으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 담체, 부형제 또는 완충제의 부피는 적어도 약  $25\mu\text{l}$ 이다. 일 실시형태에서, 부피는 약  $50\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $75\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $100\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $125\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $150\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $175\mu\text{l}$ 이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $200\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $225\mu\text{l}$ 이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $250\mu\text{l}$ 이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $275\mu\text{l}$ 이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $300\mu\text{l}$ 이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $325\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $350\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $375\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $400\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $450\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $500\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $550\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $600\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $650\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약  $700\mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 700 내지 1000 $\mu\text{l}$ 이다.

[0144] 특정 실시형태에서, 용량은 약  $1 \times 10^9$  GC/g 뇌 질량 내지 약  $1 \times 10^{12}$  GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 용량은 약  $3 \times 10^{10}$  GC/g 뇌 질량 내지 약  $3 \times 10^{11}$  GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 용량은 약  $5 \times 10^{10}$  GC/g 뇌 질량 내지 약  $1.85 \times 10^{11}$  GC/g 뇌 질량의 범위일 수 있다.

[0145] 일 실시형태에서, 바이러스 작제물은 적어도 약 적어도  $1 \times 10^9$  GC 내지 약  $1 \times 10^{15}$ , 또는 약  $1 \times 10^{11}$  내지  $5 \times 10^{13}$  GC의 용량으로 전달될 수 있다. 이들 용량 및 농도의 전달을 위한 적합한 부피는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약  $1\mu\text{l}$  내지 150ml의 부피가 선택될 수 있고, 더 높은 부피가 성인에 대해서 선택된다. 전형적으로, 신생아 유아의 경우, 적합한 부피는 약 0.5ml 내지 약 10ml이고, 더 나이가 든 유아의 경우, 약 0.5ml 내지 약 15ml가 선택될 수 있다. 걸음마기 유아(toddler)의 경우, 약 0.5ml 내지 약 20ml의 부피가 선택될 수 있다. 소아의 경우, 최대 약 30ml의 부피가 선택될 수 있다. 침대 초반 및 침대의 경우, 최대 약 50ml의 부피가 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 약 5ml 내지 약 15ml의 부피 또는 약 7.5ml 내지 약 10ml의 부피가 선택된 척추강내 투여로 제공될 수 있다. 다른 적합한 체적 및 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 부작용에 대해서 치료 이익의 균형을 이루도록 조절될 것이고, 이러한 투여량은 재조합 벡터가 이용되는 치료 응용에 따라서 달라질 수 있다.

- [0146] 상기에 기술된 재조합 벡터는 공개된 방법에 따라서 숙주 세포에 전달될 수 있다. 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 담체 중에 현탁된 rAAV가 인간 또는 비인간 포유동물 환자에게 투여될 수 있다. 특정 실시형태에서, 인간 환자에 대한 투여를 위해서, rAAV는 적합하게는 염수, 계면활성제, 및 생리학적으로 상용성인 염 또는 염의 혼합물을 함유하는 수성 용액 중에 현탁된다. 적합하게는, 이 제형은 생리학적으로 허용 가능한 pH, 예를 들어, pH 6 내지 9, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8로 조정된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32이기 때문에, 척추강내 전달을 위해서, 이러한 범위 내의 pH가 바람직할 수 있는 반면; 정맥내 전달을 위해서는, 약 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이들 하위 범위 내의 다른 pH가 다른 전달 경로를 위해서 선택될 수 있다.
- [0147] 또 다른 실시형태에서, 조성물은 담체, 희석제, 부형제 및/또는 아주반트를 포함한다. 적합한 담체는 전달 바이러스가 관련될 적응증의 관점에서 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 염수를 포함하는데, 이것은 다양한 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 염수)으로 제형화될 수 있다. 다른 예시적인 담체는 멸균 염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 아가, 펙틴, 땅콩 오일, 참기름, 및 물을 포함한다. 완충액/담체는 rAAV가 용합 배관에 접촉되는 것을 방지하지만 생체내에서 rAAV 결합 활성도를 방해하지 않는 성분을 포함해야 한다. 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합물은, 비독성인 비이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 1차 하이드록실기로 말단화된 2작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 예컨대, 폴록사머 188라고도 공지된 플루로닉(등록상표) F68[바스프사]가 선택되는데, 이것은 중성 pH를 갖고, 8400의 중량 평균 분자량을 갖는다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇄에 의해서 플랭킹된 폴리옥시프로필렌(폴리프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇄로 구성된 비이온성 트라이블록 공중합체, SOLUTOL HS 15(마크로콜-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴 글리세리드), 폴리옥시올레일 에터, TWEEN(폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 통상적으로 글자 "P"(폴록사머에 대해) 다음에 3개의 숫자로 명명되며: 처음 2개의 숫자×100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략의 분자량을 제공하고, 마지막 숫자×10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005% 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다. 일례에서, 제형은 예를 들어, 물 중에, 염화나트륨, 중탄산나트륨, 텍스트로스, 황산마그네슘(예를 들어, 황산마그네슘·7H<sub>2</sub>O), 염화칼륨, 염화칼슘(예를 들어, 염화칼슘·2H<sub>2</sub>O), 이염기성 인산나트륨, 및 이들의 혼합물 중 1종 이상을 포함하는 완충 염수 용액을 함유할 수 있다. 적합하게는, 척추강내 전달을 위해서, 오스몰 농도는 뇌척수액과 상용성인 범위 이내(예를 들어, 약 275 내지 약 290)이다(예를 들어, [emedicine.medscape.com/article/2093316-overview](http://emedicine.medscape.com/article/2093316-overview) 참고). 임의로, 척추강내 전달을 위해서, 상업적으로 입수 가능한 희석제를 현탁화제로서, 또는 또 다른 현탁화제 및 다른 임의적인 부형제와 조합하여 사용할 수 있다(예를 들어, 엘리엇츠(Elliotts) B(등록상표) 용액[Lukare Medical] 참고). 다른 실시형태에서, 제형은 1종 이상의 투과 인헨서를 함유할 수 있다. 적합한 투과 인헨서의 예는 예를 들어, 만니톨, 소듐 글리코콜레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 카프릴레이트, 소듐 카프레이트, 소듐 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우렐 에터, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.
- [0148] 선택적으로, 본 발명의 조성물은 rAAV 및 담체(들)에 더하여, 다른 종래의 약제학적 성분, 예를 들어, 보존제, 또는 화학적 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.
- [0149] 본 발명에 따른 조성물은 상기에서 정의된 것과 같은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 적합하게는, 본 명세서에 기술된 조성물은 약제학적으로 적합한 담체에 현탁된 및/또는 주사, 삼투압 펌프, 척추강내 카테터를 통한 대상체에 대한 전달을 위해, 또는 다른 장치 또는 경로에 의한 전달을 위해 설계된 적합한 부형제와 혼합된 하나 이상의 AAV의 유효량을 포함한다. 일례에서, 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화된다.
- [0150] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "척추강내 전달" 또는 "척추강내 투여"는, 약물이 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 척추관, 보다 구체적으로는 지주막하 공간 내로의 주사를 통한 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다. 척추강내 전달은 요추 천자(lumbar puncture), 뇌실내(intraventricular)(뇌혈관내(ICV) 포함), 후두골하(suboccipital)/수조내(intracisternal), 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자에 의해서 지주막하 공간을 통한 확산을 위해서 도입될 수 있다. 또 다른 예에서, 주사는 대수조(cisterna magna) 내로 행해질 수 있다.



- [0151] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여"는 대수조 소뇌연수의 뇌척수액 내로 직접, 보다 구체적으로는 후두골하 천자를 통해서 또는 대수조 내로의 직접 주사에 의해서 또는 영구적으로 배치된 관을 통해서인 것인 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다.
- [0152] **IV. 약제학적 조성물을 뇌척수액에 전달하기 위한 장치 및 방법**
- [0153] 일 양상에서, 본 명세서에 제공된 백터는 이 부분에 제공되고, 도 7에 추가로 기술된 방법 및/또는 장치를 통해서 척추강내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 다른 장치 및 방법이 선택될 수 있다. 방법은 척추 바늘을 환자의 대수조로 전진시키는 단계, 가요성 튜빙의 길이를 척추 바늘의 근위 허브에 연결시키고, 밸브의 산출 포트를 가요성 튜빙의 근위 단부에 연결시키는 단계, 및 상기 전진 단계 및 연결 단계 후에 그리고 튜빙이 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후에, 임의의 양의 등장성 용액을 함유하는 제1 용기를 밸브의 플러쉬 입구 포트에 연결하는 단계, 및 그 후 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 제2 용기를 밸브의 백터 입구 포트에 연결하는 단계를 포함한다. 제1 용기 및 제2 용기를 밸브에 연결한 후에, 유체 유동을 위한 경로가 백터 입구 포트와 밸브의 출구 포트 사이에서 개방되고, 약제학적 조성물이 척추 바늘을 통해서 환자에게 주사되고, 약제학적 조성물의 주사 후, 유체 유동을 위한 경로가 플러쉬 입구 포트 및 밸브의 출구 포트를 통해서 개방되고, 등장성 용액이 척추 바늘로 주사되어 약제학적 조성물이 환자에게 플러싱된다.
- [0154] 또 다른 양상에서, 약제학적 조성물의 수조내 전달을 위한 장치가 제공된다. 장치는 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 제1 용기, 등장성 용액을 함유하는 제2 용기, 및 약제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대수조내의 뇌척수액으로 직접 배출될 수 있는 척추 바늘을 포함한다. 장치는 제1 용기에 서로 연결된 제1 입구 포트, 제2 용기에 서로 연결된 제2 입구 포트, 척추 바늘에 서로 연결된 출구 포트, 및 약제학적 조성물 및 등장성 용액의 척추 바늘을 통한 유동을 제어하기 위한 루어 락을 갖는 밸브를 추가로 포함한다.
- [0155] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 컴퓨터 단층촬영(CT)은 신체 구조의 3차원 영상이 축을 따라서 제조된 일련의 평면 단면 영상으로부터 컴퓨터에 의해서 구축되는 방사선촬영을 지칭한다.
- [0156] 도 7에 나타내는 장치 또는 의학적 장치(10)는 밸브(16)를 통해 상호 연결되는 하나 이상의 용기(12 및 14)를 포함한다. 용기(12 및 14)는 각각 약제학적 조성물, 약물, 백터, 또는 유사한 물질의 새로운 공급원 및 등장성 용액, 예컨대, 염수의 새로운 공급원을 제공한다. 용기(12 및 14)는 환자에게 유체의 주사를 가능하게 하는 의학 장치의 임의의 형태일 수 있다.
- [0157] 예의 방식에 의해서, 각각의 용기(12 및 14)는 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 예시된 실시형태에서, 용기(12)는 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 개별 주사기로서 제공되고, 본 명세서에서 "백터 주사기"라 지칭된다. 단지 예의 목적을 위해서, 용기(12)는 약 10cc의 약제학적 조성물 등을 함유할 수 있다.
- [0158] 마찬가지로, 용기(14)는 식염수 용액의 양을 함유하는 별개의 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있고 "플러쉬 주사기"로서 지칭될 수 있다. 단지 예의 목적을 위해, 용기(14)는 약 10cc의 식염수 용액을 함유할 수 있다.
- [0159] 대안으로서, 용기(12 및 14)는 주사기 이외의 형태로 제공될 수 있고, 단일 장치 내로 통합될 수 있으며, 예컨대 통합된 의학적 주사 장치는 한쌍의 별개의 챔버(약제학적 조성물에 대한 하나 및 식염수 용액에 대한 하나)를 가진다. 또한, 챔버 또는 용기의 크기는 목적하는 양의 유체를 함유하도록 필요에 따라서 제공될 수 있다.
- [0160] 예시된 실시형태에서, 밸브(16)는 스위블(swivel) 수 루어 락(18)을 갖는 4-웨이 스태프콕으로서 제공된다. 밸브(16)는 용기(12 및 14)(즉, 예시된 실시형태에서 백터 주사기 및 플러쉬 주사기)에 서로 연결되고, 스위블 수 루어 락은 밸브(16)를 통과하는 경로가 용기(12 및 14) 각각에 대해서 폐쇄되거나 개방되는 것을 가능하게 한다. 이러한 방식에서, 밸브(16)를 통과하는 경로는 백터 주사기 및 플러쉬 주사기 둘 모두에 대해서 폐쇄될 수 있거나 또는 백터 주사기 및 플러쉬 주사기 중 선택된 하나에 대해서 개방될 수 있다. 4-웨이 스태프콕에 대한 대안으로서, 밸브는 3-웨이 스태프콕 또는 유체 제어 장치일 수 있다.
- [0161] 예시된 실시형태에서, 밸브(16)는 연장 튜빙(20)의 길이의 하나의 단부 또는 유체를 위한 유사한 도관에 연결된다. 튜빙(20)은 목적하는 길이 또는 내부 체적을 기초로 선택될 수 있다. 단지 예의 방식으로, 튜빙은 약 6 내지 7인치 길이일 수 있다.
- [0162] 예시된 실시형태에서, 튜빙(12)의 반대 단부(22)는 T-연결기 연장 세트(24)에 연결되고, 결국, 이것은 척추 바늘(26)에 연결된다. 예의 방식으로, 바늘(26)은 5인치, 22 또는 25게이지의 척추 바늘일 수 있다. 또한, 선택으



로서, 척추 바늘(26)은 도입기 바늘(28), 예컨대, 3 및 1/2인치, 18게이지 도입기 바늘에 연결될 수 있다.

- [0163] 사용 시에, 척추 바늘(26) 및/또는 임의적인 도입기 바늘(28)은 대수조를 향해서 환자에게 전진될 수 있다. 바늘 전진 후, 바늘(26 및/또는 28) 및 상응하는 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 골, 뇌줄기 및 척수)의 가시화를 허용하는 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상을 얻을 수 있다. 올바른 바늘 배치는 바늘 허브 내의 뇌척수액(CSF)의 관찰 및 대수조 내의 바늘 팁의 가시화에 의해서 확인된다. 그 후, 상대적으로 짧은 연장 튜빙(20)이 삽입된 척추 바늘(26)에 부착될 수 있고, 이어서 4-웨이 스탭콕(16)이 튜빙(20)의 반대 단부에 부착될 수 있다.
- [0164] 상기 조립체는 환자의 CSF로 "자가-프라이밍"되도록 허용된다. 그 후, 사전 충전된 정상 염수 플러쉬 주사기(14)가 4-웨이 스탭콕(16)의 플러쉬 입구 포트에 부착되고, 약제학적 조성물을 함유하는 벡터 주사기(12)가 4-웨이 스탭콕(16)의 벡터 입구 포트에 부착된다. 그 후, 스탭콕(16)의 산출 포트가 벡터 주사기(12)에 대해서 개방되고, 벡터 주사기의 내용물이 일정 시간 기간에 걸쳐서 밸브(16) 및 조립된 장치를 통해서 환자에게 서서히 주사될 수 있다. 단지 예의 목적을 위해서, 이러한 시간 기간은 대략 1 내지 2분 및/또는 목적하는 임의의 다른 시간일 수 있다.
- [0165] 벡터 주사기(12)의 내용물이 주사된 후, 스탭콕(16) 상의 스위블 락(18)은 스탭콕(16) 및 바늘 조립체가 부착된 사전 충전된 플러쉬 주사기(14)를 사용하여 목적하는 양의 생리 식염수로 플러싱될 수 있도록 제2 위치로 돌려진다. 단지 예의 방식으로, 1 내지 2cc의 생리 식염수가 사용될 수 있지만; 더 많거나 더 적은 양이 필요에 따라서 사용될 수 있다. 생리 식염수는 모든 또는 대부분의 약제학적 조성물이 조립된 장치를 통해서 환자에게 주사되어, 약제학적 조성물이 조립된 장치 내에 거의 또는 전혀 남아있지 않도록 보장한다.
- [0166] 조립된 장치가 염수로 플러싱된 후, 바늘(들), 연장 튜빙, 스탭콕, 및 주사기를 비롯한 이의 전체적으로 조립된 장치는 대상체로부터 제거되고, 폐기를 위해서 수술 트레이 상의 생물재해 폐기물 리셉터를 또는 두꺼운 용기(바늘(들)을 위해서)에 놓인다.
- [0167] 스크리닝 공정은 연구 책임자에 의해서 수행될 수 있고, 이것은 궁극적으로 수조내(IC) 절차로 이어질 수 있다. 연구 책임자는 대상체(또는 지정된 간병인)에게 안전한 정보를 제공하기 위해서 공정, 절차, 투여 절차 자체 및 모든 가능한 안정성 위험을 기술할 수 있다. 병력, 수반된 의약, 신체 검사, 활력 징후, 심전도(ECG) 및 실험실 시험 결과가 수득되거나 수행되어, IC 절차에 대한 대상체 적격성의 스크리닝 평가에서 사용하기 위해서 신경방사선전문의, 신경외과의사, 및 마취과의사에게 제공된다.
- [0168] 적격성을 검토하기 위한 적절한 시간을 허용하기 위해, 다음의 절차는 제1 스크리닝 방문과 연구 방문 전 1주까지 사이의 임의의 시간에 수행될 수 있다. 예를 들어, "0일"에, 가돌리늄(즉,  $eGFR > 30ml/분/1.73m^2$ )과 함께 또는 그것 없이 머리/목 자기 공명 영상(MRI)이 수득될 수 있다. 머리/목 MRI에 더하여, 연구자는 골/신 연구를 통해서 목의 임의의 추가 평가에 대한 필요성을 결정할 수 있다. MRI 프로토콜은 T1, T2, DTI, FLAIR 및 CINE 프로토콜 영상을 포함할 수 있다.
- [0169] 또한, 머리/목 MRA/MRV는 CSF 유동의 적절한 평가 및 CSF 공간 사이에서 의사소통의 가능한 차단 또는 결여의 식별을 허용하는 제도적 프로토콜에 따라서 수득될 수 있다(즉, 경막내/경막경유 수술의 이력이 있는 대상체는 배제될 수 있거나 또는 추가 시험(예를 들어, 방사성뉴클레오타이드 뇌수조조형술(cisternography)이 필요할 수 있음).
- [0170] 신경방사선전문의, 신경외과의사, 및 마취과의사는 궁극적으로 모든 입수 가능한 정보(스캔, 병력, 신체 검사, 랩 등)를 기초로 IC 절차에 대해서 각각의 대상체의 적격성을 논의하고, 결정한다. MPS 대상체의 특별한 생리학적 요구를 명심하면서, 기도, 목(짧아짐/두꺼워짐) 및 머리 운동 범위(목 굽힘 정도)의 상세한 평가를 제공하는 마취 수술전 평가가 또한 "-28일" 내지 "1일"로부터 수득될 수 있다.
- [0171] IC 절차 이전에, CT 스위트(Suite)는 하기 장비 및 의약이 존재하는지를 확인해 줄 것이다.: 성인 요추 천자(LP) 키트(기관에 따라서 공급됨); BD(백톤 디킨슨사) 22 또는 25게이지x3 - 7" 척추 바늘(퀸케 베벨사(Quincke bevel)); 동축 도입기 바늘, 중재자(interventionalist)의 재량으로 사용됨(척추 바늘의 도입을 위해서); 스위블(스핀) 수 루어 락을 갖는 4 웨이 스몰 보어 스탭콕; 암 루어 락 어댑터를 갖는 T-연결기 연장 세트(튜빙), 대략적인 길이 6.7인치; 옴니파큐(Omnipaque) 180(이오핵술), 척추강내 투여용; 정맥내(IV) 투여용 아이오딘화 조영제; 주사용 1% 리도카인 용액(성인 LP 키트에 제공되지 않은 경우); 사전 충전된 10cc 생리 식염수(멸균) 플러쉬 주사기; 방사선불투과성 마커(들); 수술 준비 장비/면도기; 삽관된 대상체의 적절한 배치를 허용하기 위한 필로/지지체; 기관내 삽관 장비, 일반적인 마취 기계 및 기계적 환기; 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비(및 필요한 인원); 및 벡터를 함유하는 10cc 주사기; 별도의 약제학 매뉴얼에 따라서 CT/수술실(OR) 스위트

에서 준비하고 운반됨.

- [0172] 절차에 대해서 정보를 제공한 동의서를 의료 기록 및/또는 연구 파일 내에서 확인하고 문서화한다. 영상의학과 및 마취통증의학과 스태프로부터의 절차를 위한 별개의 동의서를 제도적 요건에 따라서 획득한다. 대상체는 제도적 가이드라인에 따라서 적절한 병원 진료 유닛 내에 놓인 정맥내 접근(예를 들어, 2개의 IV 접근 부위)을 허용한다. 정맥내 유체를 마취과의사의 재량으로 투여한다. 마취과의사의 재량으로 그리고 제도적 가이드라인에 따라서, 대상체에게 적절한 환자 진료 유닛, 대기 구역 또는 수술/CT 절차 공간에서 일반적인 마취제의 투여와 함께 기관내 삽관을 유도하거나 행할 수 있다.
- [0173] 요추 천자를 먼저 수행하여 5cc의 뇌척수액(CSF)을 제거하고, 그 다음 조영제(옵니파큐 180)를 척추강내로 주사하여 대수조의 가시화를 돕는다. 적절한 대상체 배치 조작을 수행하여 대수조 내에서 조영제의 확산을 가능하게 할 수 있다.
- [0174] 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비를 대상체에게 부착한다. 대상체를 엎드리거나 측와위 위치로 CT 스캐너 테이블 상에 놓는다. 이송 및 배치 동안 대상체 안정성을 보장하기 위해서 적절한 스태프가 존재해야 한다. 적절하다고 생각되는 경우, 대상체를 수술전 평가 동안 안전한 것으로 결정된 정도까지 그리고 배치 후에 문서화된 정상 신경생리학적 모니터 신호를 사용하여 목 굽힘을 제공하는 방식으로 배치할 수 있다.
- [0175] 하기 스태프가 현장에 존재하는지 확인할 수 있고, 식별할 수 있다: 절차를 수행하는 중재자/신경외과의사; 마취과의사 및 호흡 테크니션(들); 간호사 및 보조 의사; CT(또는 OR) 테크니션; 신경생리학 테크니션; 및 현장 코디네이터(Site Coordinator). “타임-아웃”을 공동위원회(Joint Commission)/병원 프로토콜에 따라서 완결하여 올바른 대상체, 절차, 부위, 배치, 및 공간 내의 모든 필수적인 장비의 존재를 올바르게 수정할 수 있다. 이어서, 책임 사이트 연구자는, 그/그녀가 대상체 준비를 진행할 수 있는지를 스태프와 함께 확인할 수 있다.
- [0176] 두개저(skull base) 하의 대상체의 피부를 적절한 경우 면도한다. CT 스카우트 영상을 수행하고, 그 다음 표적 위치를 국한시키고, 혈관을 영상화하기 위해서 중재자가 필요하다고 판단하는 경우, IV 조영제를 사용하여 사전 절차 계획 CT를 수행한다. 표적 부위(대수조)를 식별하고, 바늘 궤도를 계획한 후, 피부를 수술준비시키고, 제도적 가이드라인에 따라서 멸균 기술을 사용하여 가린다. 방사선불투과성 마커를 중재자에 의해서 제시된 바와 같은 표적 피부 위치에 놓는다. 마커 하의 피부를 1% 리도카인으로의 침투를 통해서 마취시킨다. 이어서, 동축 도입기 바늘을 사용하는 선택으로, 22G 또는 25G 척추 바늘을 대수조를 향해서 전진시킨다.
- [0177] 바늘 전진 후, 제도적 장비를 사용하여 실현 가능한 가장 얇은 CT 슬라이스 두께(이상적으로는 2.5mm 이하)를 사용하여 CT 영상을 취득한다. 바늘 및 상응하는 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 골, 뇌줄기 및 척수)의 적절한 가시화를 허용하는 가능한 가장 낮은 방사선 용량을 사용하여 순차적인 CT 영상을 취득한다. 바늘 허브 내의 CSF의 관찰 및 대수조 내의 바늘 팁의 가시화에 의해서 올바른 바늘 배치를 확인한다.
- [0178] 중재자는 벡터 주사기가 멸균 필드에 가깝게, 그러나 그 외부에 배치되는지를 확인한다. 벡터 주사기 내의 약제학적 조성물을 취급 또는 투여하기 전에, 멸균 필드 내에서 절차를 돕는 스태프는 장갑, 마스크 및 눈 보호기를 착용한다.
- [0179] 연장 튜빙을 삽입된 척추 바늘에 부착하고, 이어서 이것을 4-웨이 스태프에 부착한다. 이러한 장치가 대상체의 CSF로 “자가-프라이밍”된 후, 10cc의 사전 충전된 생리 식염수 플러쉬 주사기를 4-웨이 스태프의 플러쉬 입구 포트에 부착한다. 이어서 벡터 주사기를 중재자에게 제공하고, 4-웨이 스태프 상의 벡터 입구 포트에 부착한다.
- [0180] 스태프의 스위블 락을 제1 위치에 놓음으로써 스태프의 출구 포트를 벡터 주사기에 대해서 개방한 후, 주사 동안 주사기의 플러저 상에 과도한 힘이 적용되지 않도록 주의하면서, 벡터 주사기의 내용물을 서서히 주사한다(대략 1 내지 2분에 걸쳐서). 벡터 주사기의 내용물을 주사한 후, 스태프의 스위블 락을 스태프 및 바늘 조립체가 부착된 사전 충전된 플러쉬 주사기를 사용하여 1 내지 2cc의 생리 식염수로 플러싱될 수 있도록 제2 위치로 돌린다.
- [0181] 준비되면, 이어서 중재자는 그/그녀가 대상체로부터 장치를 제거할 것을 스태프에게 알린다. 단일 행동으로, 바늘, 연장 튜빙, 스태프, 및 주사기를 대상체로부터 서서히 제거하고, 폐기를 위해서 수술 트레이 상의 생물재해 폐기물 리셉터를 또는 두꺼운 용기(바늘을 위해서)에 넣는다.
- [0182] 바늘 삽입 부위를 출혈 또는 CSF 누출의 징후에 대해서 조사하고, 연구자에 의해서 제시된 바와 같이 처리한다. 부위를 제시된 바와 같이 거즈, 수술 테이프 및/또는 테가덤 드레싱(Tegaderm dressing)을 사용하여

드레싱한다. 이어서 대상체를 CT 스캐너로부터 제거하고, 들것 상에 반듯이 눕힌다. 이송 및 배치 동안 대상체 안정성을 보장하기 위해서 적절한 스태프가 존재한다.

[0183] 마취를 중단하고, 마취 후 케어를 위한 제도적 가이드라인에 따라서 대상체를 케어한다. 신경생리학적 모니터를 대상체로부터 제거한다. 대상체가 누워있는 들것의 머리를 회복 동안 약간 상승시켜야 한다(약 30도). 제도적 가이드라인에 따라서 대상체를 적절한 마취 후 케어 유닛으로 옮긴다. 대상체가 의식을 적절하게 회복하고, 안정적인 상태가 된 후, 그/그녀를 프로토콜 위임 평가를 위해서 적절한 장소/유닛으로 이동시킬 것이다. 신경학적 평가가 프로토콜에 따라서 이어질 것이며, 1차 연구자는 병원 및 연구 스태프와 공동으로 대상 치료를 감독한다.

[0184] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물의 전달 방법은 척추 바늘을 환자의 대수조로 전진시키는 단계; 가용성 튜빙의 길이를 척추 바늘의 근위 허브에 연결시키고, 밸브의 출구 포트를 가요성 튜빙의 근위 단부에 연결시키는 단계; 상기 전진 단계 및 연결 단계 후에 그리고 튜빙이 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후에, 임의의 양의 등장성 용액을 함유하는 제1 용기를 밸브의 플러쉬 입구 포트에 연결하는 단계, 및 그 후 임의의 양의 억제학적 조성물을 함유하는 제2 용기를 밸브의 벡터 입구 포트에 연결하는 단계; 상기 제1 용기 및 제2 용기를 밸브에 연결시키는 단계 후에, 유체 유동을 위한 경로를 벡터 입구 포트와 밸브의 출구 포트 사이에서 개방시키는 단계 및 억제학적 조성물을 척추 바늘을 통해서 환자에게 주사하는 단계; 및 억제학적 조성물을 주사하는 단계 후에, 유체 유동을 위한 경로를 플러쉬 입구 포트 및 밸브의 출구 포트를 통해서 개방시키는 단계 및 등장성 용액을 척추 바늘로 주사하여 억제학적 조성물을 환자에게 플러싱하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 방법은 튜빙 및 밸브를 척추 바늘의 허브에 연결시키는 단계 이전에 대수조 내에서 척추 바늘의 원위 팁의 적절한 배치를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 확인하는 단계는 대수조 내의 척추 바늘의 원위 팁을 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상을 사용하여 가시화하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 확인하는 단계는 척추 바늘의 허브에서 환자의 뇌척수액의 존재를 관찰하는 단계를 포함한다.

[0185] 상기에 기술된 방법에서, 밸브는 플러쉬 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 벡터 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제1 위치 및 벡터 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 플러쉬 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제2 위치로 스위블에 대해서 개작된 스위블 루어 락을 갖는 스태프일 수 있고, 여기서 스위블 루어 락은 상기 억제학적 조성물이 환자에게 주사되는 경우에는 상기 제1 위치에 배치되고, 상기 억제학적 조성물이 등장성 용액에 의해서 상기 환자에게 플러싱되는 경우에는 상기 제2 위치에 배치된다. 특정 실시형태에서, 등장성 용액을 척추 바늘에 주사하여 억제학적 조성물을 환자 내에서 플러싱한 후, 튜빙, 밸브, 및 제1 및 제2 용기가 조립체로서 이에 연결된 척추 바늘을 환자로부터 배출한다. 특정 실시형태에서, 밸브는 스위블 수 루어 락을 갖는 4-웨이 스태프이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, T-연결기는 척추 바늘의 허브에 위치되고, 튜빙을 척추 바늘에 서로 연결한다. 선택적으로, 척추 바늘은 척추 바늘의 원위 단부에서 도입기 바늘을 포함한다. 척추 바늘은 5인치, 22 또는 24게이지 척추 바늘일 수 있다. 특정 실시형태에서, 도입기 바늘은 3.5인치, 18게이지 도입기 바늘이다.

[0186] 특정 양상에서, 방법은, 최소한, 임의의 양의 억제학적 조성물을 함유하기 위한 제1 용기; 등장성 용액을 함유하기 위한 제2 용기; 억제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대수조 내의 뇌척수액으로 직접 배출될 수 있는 척추 바늘; 및 제1 용기에 서로 연결된 제1 입구 포트, 제2 용기에 서로 연결된 제2 입구 포트, 척추 바늘에 서로 연결된 출구 포트, 및 억제학적 조성물 및 등장성 용액의 척추 바늘을 통한 유동을 제어하기 위한 루어 락을 갖는 밸브로 구성된 장치를 사용한다. 특정 실시형태에서, 밸브는 제2 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 제1 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제1 위치 및 제1 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 제2 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제2 위치로 스위블에 대해서 개작된 스위블 루어 락을 갖는 스태프이다. 선택적으로, 밸브는 스위블 수 루어 락을 갖는 4-웨이 스태프이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, 척추 바늘은 가요성 튜빙의 길이를 통해서 밸브에 서로 연결되어 있다. T-연결기는 튜빙을 척추 바늘에 서로 연결할 수 있다. 특정 실시형태에서, 척추 바늘은 5인치, 22 또는 24게이지 척추 바늘이다. 특정 실시형태에서, 장치는 추가로 척추 바늘의 원위 단부에 연결된 도입기 바늘을 추가로 포함한다. 선택적으로, 도입기 바늘은 3.5인치, 18게이지 도입기 바늘이다.

[0187] 이러한 방법 및 이러한 장치는 본 명세서에 제공된 조성물의 척추강내 전달을 위해서 각각 선택적으로 사용될 수 있다. 대안적으로, 다른 방법 및 장치가 이러한 척추강내 전달을 위해서 사용될 수 있다.

[0188] 특정 실시형태에서, rAAVhu68-항-HER2 항체를 포함하는 조성물이 제공되며, AAV 벡터는 선택된 세포 내에서 면역글로불린의 발현을 지시하는 조절 서열 및 면역글로불린 작제물을 암호화하는 핵산 발현 카세트를 보유한다.



백터를 CNS에 투여한 후에, 백터는 CNS로 발현 카세트를 전달하고, 생체내에서 단백질성 면역글로불린 작제물을 발현한다. 1종 이상의 다른 항-신생물 또는 다른 활성제의 전달을 선택적으로 포함할 수 있는 항-신생물 요법에 서의 이들 조성물의 용도에서와 같이 항-신생물 방법에서의 본 명세서에 기술된 조성물의 사용이 기술된다.

[0189] 조성물은 생체내에서 항-신생물을 전달하기 위한 발현 카세트를 함유하는 본 명세서에 기술된 바와 같은 단일 유형의 AAVhu68 백터를 함유할 수 있다. 대안적으로, 조성물은 2종 이상의 상이한 AAV 백터를 함유할 수 있는데, 이들 각각은 그 내에 상이한 발현 카세트를 패키징 할 수 있다. 예를 들어, 2종 이상의 상이한 AAV는 생체내에서 조립되어 단일 기능성의 면역글로불린 작제물을 형성하는 면역글로불린 폴리펩타이드를 발현하는 상이한 발현 카세트를 가질 수 있다. 또 다른 예에서, 2종 이상의 AAV는 상이한 표적에 대해서 면역글로불린 폴리펩타이드를 발현하는 상이한 발현 카세트를 가질 수 있고, 예를 들어, 2개가 2개의 기능성 면역글로불린 작제물 (예를 들어, 항-Her2 면역글로불린 작제물 및 제2 항-신생물 면역글로불린 작제물)을 제공한다. 추가의 또 다른 대안으로서, 2종 이상의 상이한 AAV는 동일한 표적에 지향되는 면역글로불린 작제물을 발현할 수 있고, 여기서 면역글로불린 작제물 중 하나는 FcRn 결합을 제거하도록 변형된 것이고, 제2 면역글로불린 작제물은 FcRn에 결합하는 능력을 보유하거나 이에 결합하는 향상된 능력을 갖는다. 이러한 조성물은 뇌 면적에서 증가된 보유를 갖는 항체 및 면역글로불린 작제물의 전신 전달을 위한 항체를 동시에 제공하는데 유용할 수 있다.

[0190] 선택적으로, 본 명세서에 기술된 이러한 면역글로불린 작제물 중 하나 또는 둘 모두는 향상된 ADCC 활성도를 갖는다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 요법은 본 명세서에 기술된 조합물 중 하나 이상에 더하여, 항-신생물 생물학적 약물, 항-신생물 소분자 약물, 화학치료제, 면역 향상제, 방사선, 수술 등 중 하나와의 추가 조합물을 포함할 수 있다. 본 명세서에 기술된 바와 같은 생물학적 약물은 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질, 효소, 핵산 분자, 백터(바이러스 백터 포함) 등을 기반으로 한다.

[0191] 적합하게는, 본 명세서에 기술된 조성물은 주사, 삼투압 펌프, 척수강내 카테터를 통한 대상체에 대한 전달을 위해서 또는 또 다른 장치 또는 경로에 의한 전달을 위해서 설계된 약제학적으로 적합한 담체에 현탁된 1종 이상의 AAVhu68의 항-신생물 유효량을 포함한다. 일례에서, 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 척추강내 전달 척추관, 보다 구체적으로는, 지주막하 공간으로의 주사를 포함한다. 그러나, 다른 전달 경로가 선택될 수 있고, AAV 조성물을 위한 약제학적으로 허용 가능한 담체는 다른 적합한 직접 또는 전신 경로 중에서, 예를 들어, 두개내, 비강내, 수조내, 뇌척수내 유체 전달, 즉, 옴마야 저장소 (Ommaya reservoir)을 포함한다.

[0192] 조성물은 약  $1 \times 10^9$  개/cm<sup>3</sup> 카피(GC) 내지 약  $5 \times 10^{13}$  GC(70kg 체중의 평균 대상체를 치료하는 경우)의 범위인 AAV의 양을 함유하기 위한 투여 단위로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 척추 천자(spinal tap)가 수행되는데 여기서 약 15ml(또는 그 미만) 내지 약 40ml의 CSF가 제거되고, 백터가 CSF와 혼합되고/되거나 상용성 담체 중에 현탁되어 대상체에게 전달된다. 일례에서, 백터 농도는 약  $3 \times 10^{13}$  GC, 다른 양, 예컨대, 약  $1 \times 10^9$  GC, 약  $5 \times 10^9$  GC, 약  $1 \times 10^{10}$  GC, 약  $5 \times 10^{10}$  GC, 약  $1 \times 10^{11}$  GC, 약  $5 \times 10^{11}$  GC, 약  $1 \times 10^{12}$  GC, 약  $5 \times 10^{12}$  GC, 또는 약  $1.0 \times 10^{13}$  GC이다.

[0193] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 종양의 성장을 지연시키기 위한 방법에서 사용된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 대상체에서 종양 크기를 감소시키는 데 유용하다. 추가 실시 형태에서, 본 명세서에 기술된 조성물은 비고형 종양 암에서 암 세포의 수를 감소시키는 데 유용하다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 환자에서 전체 생존 및/또는 무진행 생존을 증가시키는 방법에서 사용된다. 항-신생물 면역글로불린 작제물은 치료될 신생물의 관점에서 선택된다. 예를 들어, 뇌에서의 전이성 유방암의 치료를 위해서, 항-HER 항체를 위한 발현 카세트를 본 명세서에 기술된 재조합 AAV로 조작할 수 있다. 선택적으로, 본 명세서에 기술된 AAV 조성물은 추가적인 외인성 약리학적 작용제 또는 화학적 작용제 또는 혈액 뇌 장벽의 다른 물리적인 파괴의 부재 하에서 투여된다. 병용 요법에서, 본 명세서에 기술된 AAV-전달 면역글로불린 작제물은 또 다른 작용제뿐만 아니라 이의 임의의 조합물로의 치료 시작 이전에, 시작 동안 또는 시작 이후에, 즉, 항-신생물 요법의 시작 이전과 시작 동안, 시작 이전과 이후, 시작 동안과 시작 이후, 또는 시작 이전, 시작 동안 및 시작 이후에 투여된다. 예를 들어, AAV는 방사선 요법을 시작하기 1 내지 30일, 바람직하게는 3 내지 20일, 보다 바람직하게는 5 내지 12일 이전에 투여될 수 있다. 본 발명의 또 다른 실시형태에서, 화학요법은 AAV-매개된 면역글로불린(항체) 요법과 동시에, 보다 바람직하게는 이것 이후에 투여된다. 추가의 다른 실시 형태에서, 본 발명의 조성물은 다른 생물학적, 예를 들어, 재조합 단클론성 항체 약물, 항체-약물 접합체 등과 조합될 수 있다. 추가로, 상기에 논의된 바와 같은 상이한 AAV-전달 면역글로불린 작제물의 조합물이 이러한

요법에서 사용될 수 있다. 임의의 적합한 방법 또는 경로를 사용하여 본 명세서에 기술된 바와 같은 AAVhu68. 항-Her2-함유 조성물을 투여할 수 있고, 선택적으로, 항-신생물제 및/또는 다른 수용체의 길항제를 공동 투여할 수 있다. 본 발명에 따라서 사용되는 항-신생물제 요법은 환자의 신생물 병태의 치료에 최적으로 적합하다고 여겨지는 임의의 요법을 포함한다. 상이한 악성 종양은 특이적 항종양 항체 및 특이적 항-신생물제의 사용을 요구할 수 있는데, 이것은 환자마다 결정될 것이다. 투여 경로는, 예를 들어, 전신, 경구, 정맥내, 복강내, 피하, 또는 근육내 투여를 포함한다. 투여되는 길항제의 양은 예를 들어, 길항제의 유형, 치료될 종양의 유형 및 중증도 및 길항제의 투여 경로를 비롯한, 다수의 인자에 좌우된다.

[0194] 단수 표현은 하나 이상을 지칭하는 것을 주목해야 한다. 이와 같이, 단수 표현, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0195] 단어 "포함하다", "포함한다", 및 "포함하는"은 배타적인 것이 아니라 포괄적인 것으로 이해되어야 한다. 단어 "이루어지다", "이루어진", 및 이의 변형은, 포괄적인 것이 아니라 배타적인 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 다양한 실시형태가 다른 상황 하에서, 표현 "포함하는"을 사용하여 제시되는 경우, 관련된 실시형태는 표현 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진"을 사용하여 설명 및 기술되도록 의도된다.

[0196] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한, 주어진 참조값으로부터의 10%의 변동 ( $\pm 10\%$ )을 의미한다.

[0197] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "질환", "장애" 및 "병태"는 대상체의 비정상적인 상태를 나타내기 위해 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0198] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 기술 용어 및 과학 용어는 당업자에 의해서 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고, 당업자에게 본 출원에서 사용되는 용어 중 다수에 대한 일반적인 지침을 제공하는 공개된 문헌을 참고로 한다.

[0199] 용어 "발현"은 본 명세서에서 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, RNA 또는 RNA 및 단백질의 생산을 포함한다. RNA와 관련하여, 용어 "발현" 또는 "번역"은 특히 펩타이드 또는 단백질의 생산에 관한 것이다. 발현은 일시적일 수 있거나 안정적일 수 있다.

[0200] 본 명세서에 사용되는 용어 "Nab 역가"는 표적화된 에피토프(예를 들어, AAV)의 생리학적 효과를 중화시키는 중화 항체(예를 들어, 항-AAV Nab)가 얼마나 생성되는지의 측정치이다. 항-AAV Nab 역가는 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390]에 기술된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0201] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "발현 카세트"는 암호 서열, 프로모터를 포함하는 핵산 분자를 지칭하고, 이를 위한 다른 조절 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 벡터 계통은 2종 이상의 발현 카세트를 함유할 수 있다. 다른 실시형태에서, 용어 "트랜스젠"은 "발현 카세트"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성시키기 위한 이러한 발현 카세트는 바이러스 계통의 패키징 신호에 의해서 축적된 본 명세서에 기술된 유전자 산물을 위한 암호 서열 및 다른 발현 제어 서열, 예컨대 본 명세서에 기술된 것을 함유한다.

[0202] 약어 "sc"는 자가-상보성을 지칭한다. "자가-상보성 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해서 보유된 암호 영역이 분자내 이중 가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 감염 시, 제2 가닥의 세포 매개된 합성을 기다리지 않고, scAAV의 2개의 상보성 절반부는 회합하여 즉각적인 복제 및 전사 준비가 된 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 형성할 것이다(예를 들어, 문헌[DM McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254] 참고). 자가-상보성 AAV는 예를 들어, 각각 전문이 참고로 본 명세서에 포함된 미국 특허 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기술되어 있다.

[0203] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 트랜스로 또는 관심 유전자를 제어하도록 하는 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 지칭한다.

[0204] 용어 "이중성(이중)"은 단백질 또는 핵산과 관련하여 사용되는 경우 단백질 또는 핵산이 본래 서로와 동일한 관계로 발견되지 않는 2개 이상의 서열 또는 하위서열을 포함하는 것을 나타낸다. 예를 들어, 새로운 기능성 핵산을 제조하도록 배열된 관련되지 않은 유전자로부터의 2개 이상의 서열을 갖는 핵산은 전형적으로 재조합 방식의



로 생산된다. 예를 들어, 일 실시형태에서, 핵산은 상이한 유전자로부터 암호 서열의 발현을 유도하도록 배열된 하나의 유전자로부터의 프로모터를 갖는다. 따라서, 암호 서열과 관련하여, 프로모터는 이중성이다.

[0205] "복제-결합 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"는 관심 유전자를 함유하는 발현 카세트가 바이러스 캡시드 또는 엔벨로프(envelope) 내에 패키징된 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하고, 여기서 바이러스 캡시드 또는 엔벨로프 내에 또한 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제-결합이고; 즉, 이들은 자손 비리온을 생성할 수 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제에 필요한 효소를 암호화하는 유전자를 포함하지 않지만(게놈은 "거트리스(gutless)"- 인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호에 의해서 축적된 관심 유전자 만을 함유하도록 조작될 수 있음), 이들 유전자는 생산 동안 공급될 수 있다. 따라서, 그것은 유전자 요법에서 사용하기에 안전한 것으로 여겨지는데, 그 이유는 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재 하에서 제외하고는 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 일어날 수 없기 때문이다.

[0206] 다수의 예에서, rAAV 입자는 "DNase 내성"이라고 지칭된다. 그러나, 이러한 엔도뉴클레아제(DNase)에 더하여, 다른 엔도- 및 엑소- 뉴클레아제가 또한 본 명세서에 기술된 정제 단계에 사용되어, 오염된 핵산을 제거할 수 있다. 이러한 뉴클레아제는 단일 가닥 DNA 및/또는 이중 가닥 DNA, 및 RNA를 분해하도록 선택될 수 있다. 이러한 단계는 단일 뉴클레아제, 또는 상이한 표적에 지향된 뉴클레아제의 혼합물을 함유할 수 있고, 엔도뉴클레아제 또는 엑소뉴클레아제일 수 있다.

[0207] 용어 "뉴클레아제-내성"은, AAV 캡시드가 유전자를 숙주 세포에 전달하도록 설계된 발현 카세트 주변에서 완전히 조립되고, 생산 공정으로부터 존재할 수 있는 오염된 핵산을 제거하도록 설계된 뉴클레아제 인큐베이션 단계 동안 분해(소화)로부터 이들 게놈 서열을 보호하는 것을 나타낸다.

[0208] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "유효량"은 벡터 게놈으로부터 유전자 산물의 양을 전달하여, 표적 세포에서 발현되는 rAAV 조성물의 양을 지칭한다. 유효량은 인간 환자가 아닌, 동물 모델을 기반으로 결정될 수 있다. 적합한 무린(무린) 모델의 예가 본 명세서에 기술되어 있다.

[0209] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 rAAV 또는 조성물은 항-인플루엔자 항체 또는 면역글로불린 작제물을 배제한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 rAAV 또는 조성물은 척수성 근위축(SMA) 유전자 또는 SMN 암호 서열을 배제한다.

[0210] 본 발명과 관련하여 용어 "번역"은 리보솜에서의 과정에 관한 것이며, 여기서 mRNA 가닥은 아미노산 서열의 조립을 제어하여 단백질 또는 펩타이드를 생성한다.

[0211] 본 명세서 및 청구범위 전체에서 사용되는 바와 같이, 용어 "포함하는", "함유하는", "비롯한", 및 이의 변형은 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 포함한다. 이에 반해서, 용어 이루어진 및 이의 변형은 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 배제한다.

[0212] 단수 표현은 하나 이상을 지칭하는 것을 주목해야 하며, 예를 들어, "인헨서"는 하나 이상의 인헨서(들)를 표현하는 것으로 이해된다. 이와 같이, 단수 표현, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0213] 상기에 기술된 바와 같이, 용어 "약"은 수치값을 수식하도록 사용되는 경우 달리 명시되지 않는 한  $\pm 10\%$ 의 변동을 의미한다.

[0214] 하기 실시예는 단지 예시이며, 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다.

## [0215] 실시예

[0216] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 또한 클레이드 F에 속하는 AAV9를 양호하게 산출하는 것을 발견하였다. 67번 위치에서의 글루탐산(Glu) 및 157번 위치에서의 발린(Val) 중 하나 또는 둘 모두의 아미노산의 변화가 이러한 증가된 수율을 부여할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드를 갖는 벡터는 AAV9를 기반으로 하는 벡터와 비교할 때 패키징된 벡터의 수율의 적어도 15% 증가를 제공한다. AAVhu68과 AAVrh10 간의 비교에서, AAVhu68은 뇌혈관내(intracerebroventricular) 투여 이후에 낮은 용량(예를 들어 약  $1 \times 10^9$ )에서 AAVrh10보다 더 양호한 형질도입 효율을 제공하는 것을 발견하였다.

## [0217] 실시예 1

### [0218] A. AAVhu68의 식별

[0219] 조직 DNA를 하기 변형과 함께 제조사의 지시에 따라서 QIAamp 칼럼(퀴아젠사사(Qiagen))을 사용하여 PCR 주형으로서 인간 조직 샘플로부터 추출하였다. Q5 DNA 증합효소(Q5(등록상표) Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix, NEB)를 이의 상당히 높은 충실도 및 강력한 효율을 위해서 선택하여 문헌[Gao, et al [Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Sep 3, 99(18): 11854-11859 (Epub 2002 Aug 21)]]에 기술된 바와 같이 샘플에서 잠재적인 AAV의 전장 VP1 유전자를 회수하였고, 변형된 프라이머 세트는 하기와 같다: AV1NS 대신에, GCTGCGYCAACTGGACCAATGAGAAC 프라이머, prm504[서열번호 7]를 사용하였고, 역 프라이머 AV2CAS 대신에, prm505:CGCAGAGACCAAGTTCAACTGAAACGA[서열번호 8]를 사용하였다. PCR 조건을 하기와 같이 변형시켰다:

	μL
물	9
prm504	1.25
prm505	1.25
주형	1
2X Q5	12.5

[0220]

[0221] PCR 프로그램

	시간 (초)	사이클
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

[0222]

[0223] PCR로부터의 약 3kb의 밴드를 겔로부터 절단하고; DNA를 QIAquick Gel Extraction Kit(퀴아젠사사)로 추출하고, Zero Blunt(등록상표) TOPO(등록상표) PCR Cloning Kit(써모 피셔 사이언티픽사) 내에 클로닝하였다. 플라스미드를 서열결정하여 AAV VP1 유전자의 전장을 얻었다. 샘플 대부분의 경우, 적어도 3개의 플라스미드는 완전히 서열결정되었고, 공통 서열은 그 샘플에 대해서 최종 AAV 서열로서 도출되었다.

[0224] AAVhu68의 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 획득된 핵산 서열이 서열번호 1에 제공된다(또한 도 2a 내지 도 2c 참고). AAVhu68의 vp1 아미노산 서열이 도 1 및 서열번호 2에 제공된다. AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32와 비교할 때, 2개의 돌연변이(A67E 및 A157V)가 AAVhu68에서 중요한 것으로 식별되었다(도 1에서 원으로 나타냄).

[0225] 이러한 증폭 방법은 또한 vp1 암호 서열과 rep 암호 서열 사이에 스페이서 서열을 제공하였다. 이러한 암호 서열은 atgacttaaacaggt, 서열번호 9이다. rep52 of AAVhu68에 대한 암호 서열은 서열번호 3에 제시된다. rep52 단백질 서열은 또한 서열번호 4에 제시된다.

[0226] 이어서, 패키징 효율, 수율 및 형질도입 특성을 평가하기 위해서 AAV9 VP1 유전자 대신에 hu68의 VP1 유전자를 pAAV2/9 골격에 적재함으로써 pAAV2/hu68 트랜스 플라스미드를 제조하였다. pAAV2/9 플라스미드는 캡시드 유전자에 축적한 AAV2 5' 및 3' ITR을 함유하고, 펜 벡터 코어(Penn Vector Core)[펜실베이니아 대학교(University of Pennsylvania), 미국 펜실베이니아 필라델피아 소재, pennvectorcore.med.upenn.edu]로부터 입수 가능하다.

## [0227] B. AAVhu68의 특징규명

[0228] 이러한 현상은 아데노-연관 바이러스 캡시드에서 이미 관찰되거나 기술되지 않았지만, 다른 단백질 및 펩타이드는 생체내뿐만 아니라 시험관내 둘 모두에서, 다양한 화학적 변형에 민감하다고 밝혀져 있다. 가장 빈번한 변형 중 하나는 자발적 비-효소 반응인 아스파라긴의 탈아미드화이다. 일반적으로, 생리 조건(pH 7.4, 37°C) 하에서 아스파라기닐 탈아미드화의 반감기는 약 1 내지 1000일이다. 유사한 시리즈의 반응은 글루타민 대 글루타메이트 잔기에서 일어나지만, 이러한 반응은 이의 아스파라긴 반대 부분의 반응보다 훨씬 더 느리다.

[0229] 짧은 펩타이드에서, 환식 중간체의 형성은 1차 서열에 의해서 제어되지만, 단백질에서 2차, 3차 및 4차 구조가

추가적인 효과를 갖는다. 따라서, 각각의 단백질 아마이드의 탈아마이드화 속도는 고유하게 결정된다. 탈아마이드화된 펩타이드의 질량 분석법적 식별은 비교적 간단한데, 그 이유는 탈아마이드화가 무손상 분자 +0.984Da의 질량(-OH와 -NH<sub>2</sub>기 간의 질량 차이)에 추가되기 때문이다. 탈아마이드화는 기체상에서 안정적인 변형이기 때문에, MS/MS 스펙트럼은 심지어는 몇몇 잠재적인 탈아마이드화 부위의 존재 하에서도 탈아마이드화의 위치를 나타낼 수 있다.

[0230] 4종의 AAVhu68 벡터를, 본 연구와 무관한 4종의 벡터 계통 중 하나를 사용하여 제조하였는데, 이들 각각은 293 개의 세포에서 종래의 삼중 형질주입 방법을 사용하여 제조되었다. 이러한 기술의 일반적인 설명에 대해서는 예를 들어, 문헌[Bell CL, *et al.*, "The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice.", J Clin Invest. 2011; 121:2427-2435]을 참고하기 바란다. 간략하면, HEK293 세포에 AAV2 rep 유전자 및 AAVhu68 cap 유전자를 암호화하는 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드(pAdΔF6)를 삼중 형질주입시킴으로써, AAV2 반전 말단 반복부에 의해서 축적된 패키징될 서열(담 β-액틴 프로모터, 인트론 및 성장 호르몬 폴리A로부터 발현된 유전자 산물)을 암호화하는 플라스미드를 패키징하였다. 생성된 AAV 바이러스 입자를 CsCl 구배 원심분리를 사용하여 정제시키고, 농축시키고, 추후 사용을 위해서 동결시킬 수 있다.

[0231] 변성 및 알킬화: 100μg의 해동된 바이러스 제제(단백질 용액)에 2μl의 1M 다이티오프레이톨(DTT) 및 2μl의 8M 구아니딘 염산염(GndHCl)을 첨가하고, 90℃에서 10분 동안 인큐베이션시킨다. 용액을 실온까지 냉각시키고, 이어서 5μl의 새로 제조된 1M 아이오도아세트아마이드(IAM)를 첨가하고, 30분 동안 실온에서 암실에서 인큐베이션시킨다. 30분 후에, 1μl의 1M DTT를 첨가하여 알킬화 반응을 반응정지시킨다.

[0232] 소화: 변성 단백질 용액에 20mM 중탄산암모늄, pH 7.5 내지 8을, 최종 GndHCl 농도를 800mM로 희석시키는 부피로 첨가한다. 프로테아제 용액(트립신 또는 키모트립신)을 1:20의 프로테아제 대 단백질비로 첨가하고, 37℃에서 밤새 인큐베이션시킨다. 소화 후, TFA를 0.5%의 최종 농도로 첨가하여 소화 반응을 반응정지시킨다.

[0233] 질량 분광분석법: 대략 1마이크로그램의 조합된 소화 혼합물을 UHPLC-MS/MS에 의해서 분석한다. UltiMate 3000 RSLCnano System(써모 사이언티픽사) 상에서 LC를 수행한다. 이동상 A는 0.1% 폼산을 함유하는 MilliQ 물이다. 이동상 B는 0.1% 폼산을 함유하는 아세트나이트릴이다. LC 구배를 15분 동안 4% B에서 6% B로, 이어서 25분 동안 10% B로(총 40분), 이어서 46분 동안 30% B로(총 86분) 수행한다. 샘플을 칼럼에 직접 적재한다. 칼럼 크기는 75cm×15um I.D.이고, 2마이크론 C18 매질(Acclaim PepMap)로 충전되어 있다. LC는 공급원을 사용한 나노플렉스 전기분무 이온화를 통해서 사중극-오비트랩 질량 분석기(Q-Exactive HF, 써모 사이언티픽사)에 접속된다. 칼럼을 35℃까지 가열하고, 2.2kV의 전기분무 전압을 인가한다. 질량 분석기를 탭 20개 이온으로부터의 탠덤 질량 스펙트럼을 획득하도록 프로그래밍한다. 완전 MS 분해능은 120,000이고, MS/MS 분해능은 30,000이다. 정규화된 충돌 에너지를 30으로 설정하고, 자동 이득 제어를 1e5로 설정하고, 최대 충전 MS를 100ms로 설정하고, 최대 충전 MS/MS를 50ms로 설정한다.

[0234] 데이터 처리: 질량 분석기 원시 데이터 파일을 BioPharma Finder 1.0(써모 사이언티픽사)에 의해서 분석하였다. 간략하면, 모든 탐색은 10ppm의 전구체 질량 공차, 5ppm의 단편 질량 공차, 트립신 절단, 최대 1의 손실된 절단, 시스테인 알킬화의 고정된 변형, 메티오닌/트립토판 산화, 아스파라긴/글루타민 탈아마이드화, 포스포릴화, 메틸화 및 아마이드화의 가변적 변형을 요구하였다.

[0235] 하기 표에서, T는 트립신을 지칭하고, C는 키모트립신을 지칭한다.

변형												
효소	T	T	T	T	C	C	C	C	T	T	T	
커버리지%	93.6	92	93.1	92.5	90.2	89.7	91.1	88.9	98.9	97	94.6	92.4
+탈아마이드화(Dcamid)												

[0236]

~N35												
N57+ Deamid	87.6	95.5	89.3	88.2	90.5	96.3	86.4	84.8	100.0	100.0	99.0	92.7
N66+ Deamid	4.7											
N94+ Deamid	11.3	10.9	11.0	5.3	11.6	10.4	10.8	5.6	5.0	11.1	5.4	16.0
N113+ Deamid			1.8									
~N253+ Deamid	17.7	22.0	21.1	15.0	17.0	22.6	20.5	15.6	4.2	5.5		
Q259+ Deamid	35.2	25.6	21.0		35.4	26.3	20.9	9.2				
~N270+ Deamid	16.4	25.1	23.2	16.6	15.9	24.9	23.5	16.1	0.2			
~N304+ Deamid	2.6	2.9	2.8	1.3	2.5	2.8	2.9	1.3	16.6	10.3		
~N314+Deamid									6.5			
N319+ Deamid	0.3	2.8	2.8	0.2		2.9	2.8	0.2				
N329+ Deamid	72.7	85.6	89.1	86.8	71.0	87.2	88.7	84.7	85.5	79.4	78.9	91.8
N336+ Deamid		30.8	9.3	100.0		31.0	9.2	95.7				
~N409+ Deamid	21.3	22.9	23.9	24.0	22.0	23.4	24.7	24.2				
N452+ Deamid	98.8	99.7	99.2	100.0	98.9	97.3	98.1	95.2	98.2	68.7	67.4	49.4
N477+ Deamid	4.4	4.3	4.3	2.6	4.5	4.4	4.3	2.6			0.8	
N512+ Deamid	97.5	97.9	95.3	95.7	92.2	91.8	99.2	96.1	99.7	98.2	87.9	75.7
~N515+ Deamid	8.2	21.0	16.0		8.3	21.0	16.5	0.0	2.5	3.0		15.1
~Q599+ Deamid	4.0	15.4	10.1	13.6	4.0	15.5	10.0	13.8	15.8			
N628+ Deamid	5.3		5.6		5.4	0.0	5.4	0.0				
N651+ Deamid	0.9	1.6	1.6						0.5			
N663+ Deamid	3.4		3.5	3.7	3.4	0.0	3.4	3.6				
N709+ Deamid	0.6	0.8	20.2	0.6	0.6	0.8	19.8	0.6	0.3	1.3	0.1	0.2
N735									25.0	42.7		21.7
+ 아세틸화(Ac):												
K332 + Ac				100.0								

[0237]

~K693+Ac	13.0		13.5									
~K666+Ac				93.8								
~K68+ Ac		59.2										
+ 이성질체화 (Iso):												
D97 + Iso	0.5	0.4	0.4	0.2	0.5		0.4	0.2				
D107 + Iso		0.3		0.3		0.3						
D384 + Iso	0.8				0.9							
+ 포스포릴화 (Phos)												
S149+Phos	5.8	5.7	5.2	9.8	5.7	5.9	5.2	9.9				
~S499+ Phos				30.6								
~T569+ Phos	0.9											
~S586+ Phos		3.6										
+ 산화												
~W23+Oxi		4.7	5.5			4.8	5.5					
W247+Oxi	1.5	0.4	0.7		1.4							
W247+카이 뉴레인으로의 Oxi		0.1				0.1						
W306+Oxi	0.7	0.9	1.6	1.8	0.7	1.0	1.6	1.8				
W306+카이 뉴레인으로의 산화			0.3				0.3					
M404+Oxi	0.1		0.2		0.1		0.2					
M436+Oxi	4.9		10.2	23.0	4.8		10.2	22.6				
~M518+ Oxi	29.9		1.5	10.6	29.9		1.5	10.5				
~M524+ Oxi	18.8	31.6	52.7		18.4	31.1	52.5	14.2				
M559+Oxi	19.0	21.6	19.6	20.9	19.6	21.3	20.1	20.9				
~M605+ Oxi	12.2	15.2			12.8	14.8						
W619+Oxi	1.0		0.6	1.5	1.0		0.6	1.5				
W619+ 산화			20.3									
~M640+ Oxi	23.5	64.2	24.6		22.4	21.1	25.6					
W695+Oxi	0.3		0.4	0.4	0.3		0.4	0.4				
+아마이드화												
~D297+아마이드화	72.9		73.3									

[0238]

[0239]

AAVhu68 캡시드 단백질의 경우에, 4개의 잔기(N57, N329, N452, N512)는 일상적으로 높은 수준의 탈아마이드화를 나타내고, 그것은 대부분의 경우에 다양한 로트에 걸쳐서 90% 초과이다. 추가 아스파라긴 잔기(N94, N253, N270, N304, N409, N477) 및 Q599)는 또한 다양한 로트에 걸쳐서 최대 약 20%의 탈아마이드화 수준을 나타낸다. 탈아마이드화 수준을 먼저 트립신 소화에 의해서 식별하고, 키모트립신 소화로 검증하였다.

[0240]

#### 실시예 2- AAVhu68백터의 수율

[0241]

다양한 태그, 예컨대, GFP 및 LacZ를 보유하는 AAVhu68 및 AAV9 백터를 생성시키고, 평가하였다. 백터 각각을 문헌[Gao et al[Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859]에 기술된 바와 같이, 293개 세포에서 삼중 형질주입 기술을 사용하여 생성시켰다.

[0242]

#### A. pAAVhu68 트랜스 플라스미드의 생산

[0243]

vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 서열번호 1에 제공된다.

[0244]

패키징 효율, 수율 및 형질도입 특성을 평가하기 위해서 AAV9 VP1 유전자 대신에 hu68의 VP1 유전자를 pAAV2/9 골격에 적재함으로써 pAAV2/hu68 트랜스 플라스미드를 제조하였다. pAAV2/9 플라스미드는 캡시드 유전자에 측접한 AAV2 5' 및 3' ITR을 함유하고, 펜 백터 코어[펜실베이니아 대학교, 미국 펜실베이니아 필라델피아 소재,



pennvectorcore.med.upenn.edu]로부터 입수 가능하다.

[0245]

## B. AAVhu68 벡터의 수율

[0246]

293개 세포를 배양시키고, 10%의 우태아 혈청이 보충된 4.5g/L 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨을 함유하는 DMEM, 1×(이글스 최소 필수 배지의 둘베코 변형) 중에서 5% CO<sub>2</sub>를 갖는 분위기 하에서 37℃에서 유지시켰다. 벡터 플라스미드를 pAAV2/hu68 또는 pAAV2/9로 대체하여, 문헌[Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859]]에 기술된 바와 같이 형질주입 기술을 수행하였다. 사용된 트랜스젠(발현 카세트)은 CB7.CI.ff루시퍼라제.RBG였다. 형질주입된 세포를 6웰 플레이트에서 추가로 배양하였다. 세포의 총 용해물뿐만 아니라 상청액을 문헌[Gao et al [Gao, Guangping, et al. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo." Human gene therapy 11.15 (2000): 2079-2091]]에 기술된 바와 같이 트랜스젠(발현 카세트)의 토기 베타-글로빈 폴리A 영역을 표적으로 하는 프라이머 및 프로브를 사용함으로써 태크만(어플라이드 바이오시스템즈사(Applied Biosystems)) 분석을 통한 바이러스 정량을 위해서 수집하였다. 6개의 pAAV2/9 플라스미드 및 6개의 pAAV2/hu.68 플라스미드의 수율을, 상청액 역가 및 총 용해물 역가 둘 모두와 관련하여, 6웰 플레이트에서 헤드-투-헤드로 비교하였다. 각각의 플라스미드는 개별 박테리아 집락으로부터 유래되었다.

[0247]

AAVhu68의 수율은 총 용해물과 관련하여 AAV9의 것과 유사한 것을 발견하였다(도 3A, n=6, p = 0.42). 그러나, 상청액에서, AAVhu68의 수율은 AAV9의 것보다 상당히 더 높았다(도 3B, n=6, p = 0.0003). 따라서, AAVhu68은 생산과 관련하여 AAV9에 비해서 더 양호한 벡터로서 입증되었는데, 그 이유는 상청액이 세포-적층 및 바이러스 생산 동안 동안 수거되기 때문이다.

[0248]

## 실시예 3 - AAVhu68.LacZ의 생체내 형질도입

[0249]

핵-국지화 박테리아 β-갈락토시다제를 암호화하는 서열(nLacZ)을 삽입하고, 이어서 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산함으로써 AAVhu68.CB7.nLacZ(AAVhu68.LacZ라고도 지칭됨)를 생성하였다. 생체내에서 AAVhu68의 패키징 효율, 수율, 형질도입 특성, 형질도입 효율 및 향성을 평가하기 위해서, 마우스에게 5×10<sup>11</sup>개/ml의 AAVhu68.LacZ 벡터를 다양한 투여 방법, 예컨대, 정맥내, 근육내 및 비강내 투여를 통해서 주사하였다. 벡터 투여 2주 후에 마우스를 희생시킨 후 근육, 폐, 간 및 심장을 수집하였다. 각각의 기관의 동결된 박편을 제조하고, 가공하고, LacZ 유전자 발현을 검출하는 종래의 프로토콜로서 분석하였다[Bell, Peter, et al. "An optimized protocol for detection of E. coli β-galactosidase in lung tissue following gene transfer." Histochemistry and cell biology 124.1 (2005): 77-85]. 청색으로 나타나는 LacZ에 대한 양성 염색(도 4a 내지 도 4c)은 AAVhu68의 성공적인 형질도입을 나타낸다.

[0250]

도 4a에 나타난 바와 같이, 벡터가 정맥내 주사(IV)를 통해서 마우스에 도입된 후, 모든 시험된 기관(심장, 간, 폐 및 근육)은 AAVhu68 형질도입을 나타내었지만, 폐 및 근육보다 심장 및 간이 선호되는 향성이 관찰되었다. 벡터가 근육내 주사(IM)를 통해서 마우스에 도입된 후, 심장, 간 및 근육은 AAVhu68의 높은 형질도입률을 나타내었지만, 폐에서는 형질도입이 관찰되지 않았다. 비강내 투여가 수행된 경우, 산재된 형질도입이 심장, 간, 근육 및 폐에서 관찰되었다.

[0251]

이러한 결과는, AAVhu68이 높은 형질도입 효율 및 광범위한 조직/기관 향성을 나타내었다는 것을 보여주었다.

[0252]

## 실시예 4 - AAV9.GFP와 비교한 AAVhu68.GFP의 생체내 형질도입

[0253]

유전자로서 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 유전자를 삽입하고, 이어서 실시예 2에 기술된 바와 같이 생산함으로써 AAVhu68.GFP 및 AAV9.GFP를 생성하였다. 생체내에서 AAVhu68 및 AAV9의 패키징 효율, 수율, 형질도입 특성, 형질도입 효율 및 향성을 평가하기 위해서, 마우스에 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP를 1×10<sup>10</sup> GC 또는 1×10<sup>11</sup> GC의 용량으로 투여하였다. 벡터 투여 2주 후에 마우스를 희생시킨 후 뇌, 근육, 폐, 간 및 심장을 수집하였다. 문헌[Wang et al [Wang L, et al., Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11): 1389-401; Wang L, et al., Mol Ther. 2010 Jan; 18(1): 126-34]]에 기술된 바와 같이 각각의 기관의 동결된 박편을 준비하고, 가공하여 GFP 발현을 가시화하였다. 녹색으로 나타나는 GFP에 대한 양성 염색(도 5a 내지 도 5c 및 도 6a 내지 도 6d)은 시험 벡터의 성공적인 형질도입을 나타낸다.

[0254]

벡터의 뇌혈관내 투여를 갖는 마우스의 다양한 뇌 영역(해마, 운동 피질 및 소뇌)으로부터의 박편을

조사하였다.  $1 \times 10^{10}$  GC의 AAV9.GFP가 주사된 마우스로부터의 것을 제외한 모든 시험된 해마 샘플에서 AAV 벡터의 형질도입을 관찰하였다. AAV9의 것과 비교한 AAVhu68.GFP의 더 양호한 형질도입을 운동 피질에서 관찰하였다. 추가로,  $1 \times 10^{10}$  GC의 벡터가 주사된 마우스의 경우에만 AAVhu68.GFP의 소뇌에서의 형질도입이 관찰되었다. 따라서, AAVhu68은 AAV9에 비해서 뇌에서 더 광범위한 향성뿐만 아니라 더 높은 형질도입 효율을 나타내었다.

[0255] 추가 실험에서, AAVhu68.GFP가 정맥내로 투여된 마우스로부터의 다양한 기관, 예컨대, 간, 신장, 심장 및 췌장을 준비하고, 문헌[Wang et al [Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11):1389-401; Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenberghe LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1):126-34]]에 기술된 바와 같이 가공하였다. 녹색으로 나타나는 GFP로부터의 양성 신호는 상기 AAV 벡터의 성공적인 형질도입을 나타낸다. 기관 형태학을 위해서 흑색과 백색으로 나타나는 명시 야상이 제공되었지만, 상응하는 적색 형광 채널이 음성 대조군으로서 제공되었다.

[0256] 녹색으로 나타나는 강한 양성 신호가 간에서 관찰되었고, 신장, 심장 및 췌장이 마찬가지로 상기 벡터의 형질도입을 나타내었는데, 이는 AAVhu68 벡터의 넓은 조직/기관 향성을 나타낸다.

[0257] 실시예 5 - A67E 및 A157V 돌연변이를 갖는 AAV 벡터의 수율 및 생체내 형질도입

[0258] 제조합 아데노-연관(rAAV) 벡터의 수율 및/또는 패키징 효율을 증가시키기 위해서, 67번 아미노산 위치에 Glu를 갖고/갖거나 157번 아미노산 위치에 Val을 갖는 vp1 단백질을 발현하는 AAV 캡시드 유전자를 AAV 벡터, 예컨대, AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32로 조작하는데, 여기서 아미노산 잔기의 넘버링은 AAVhu68[서열번호 5]의 넘버링을 기준으로 한다. 상기 AAV 벡터를 실시예 2에 따라서 제조하고, 각각의 벡터의 수율에 대해서 평가한다. 생체내 형질도입 효율 및 조직/기관/영역 향성을 종래의 방법, 예컨대 실시예 3에 예시된 바와 같이 추가로 평가한다.

[0259] 실시예 6 - 인간 HER2+ 유방암 뇌전이의 예방을 위한 척추강내 AAVhu68.CMV.PI.h트라스투주맙.SV40

AAV9	아데노-연관 바이러스 9
AAV9. 트라스투주맙	AAV9.CMV.PI.h 트라스투주맙.SV40 (AAV9 트라스투주맙 발현 카세트 보유)
BCA	바이신코닌산 검정
BCBM	유방암 뇌 전이
CI	키메라 인트론
CMV (프로모터)	사이토메갈로바이러스 극 초기 인핸서/닭 베타-액틴 프로모터
CSF	뇌척수액
ddPCR	드롭렛 디지털 종합효소 연쇄 반응
DNA	데옥시리보핵산
GC	계놈 카피
GLP	의약품 관리 기준(Good laboratory practices)
GTP	유전자 요법 프로그램

[0260]

HER2	인간 표피 성장 인자 수용체 2
AAVhu68	아데노-연관 바이러스 혈청형 hu68
AAVhu68. 트라스투주맙	hu68.CMV.PI.h 트라스투주맙.SV40(AAVhu68 트라스투주맙 발현 카세트 보유)
ICV	뇌혈관내
ID	식별 번호
IT	척추강내
mAb	단클론성 항체
MED	최소 필수 용량
n	동물의 수
PBS	인산염 완충 염수
qPCR	정량적 중합효소 연쇄 반응
RAG1 <sup>+/+</sup>	재조합 활성화 유전자1 넉-아웃
RAG1	재조합 활성화 유전자1
rBG	토끼β-글로빈 폴리 A 서열
RPM	분당 회전수
SD	표준 편차
SOP	표준 작업 절차
SV40 (폴리 A 신호)	시미안 바이러스 40 폴리아데닐화 신호

[0261]

[0262]

[0263]

#### A. 요약

본 연구의 목적은, 이종이식 마우스 모델에서 인간 HER2+ 유방암 뇌전이의 예방에 대한 트라스투주맙 발현 카세트를 함유하는 항원형 AAVhu68의 재조합 아데노-연관 바이러스인 AAVhu68.CMV.PI.h 트라스투주맙.SV40(AAVhu68. 트라스투주맙)의 치료 효능을 시험하는 것이었다. 트라스투주맙(Herceptin(등록상표), 로슈사(Roche))은, 전신 HER2+ 질환을 치료하기 위한 화학요법으로 정맥내로 사용되는 경우 환자의 생존을 연장시키는 HER2에 대해서 지향되는 인간화된 단클론성 항체(mAb)이다. 그러나, 혈액-뇌 장벽은 정맥내로 투여된 Herceptin(등록상표)이 중추 신경계로 유입되는 것을 거부하여, HER2+ 유방암 뇌전이를 효과적으로 치료할 수 없게 한다. 몇몇 사례 보고는, 척추강내-투여된 Herceptin(등록상표)이 HER2+ 연수막 질환을 갖는 환자의 생존을 증가시키거나 또는 HER2+ 병소 전이의 진행을 중단시킬 수 있다는 것을 나타낸다[J. Bendell, et al, Central nervous system metastases in women who receive trastuzumab based therapy for metastatic breast carcinoma. Cancer. 97, 2972-2977 (2003); D. J. Slamon, et al., Use of Chemotherapy plus a Monoclonal Antibody against HER2 for Metastatic Breast Cancer That Overexpresses HER2. N. Engl. J. Med. 344, 783-792 (2001), M. A. Cobleigh, et al, Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. J. Clin. Oncol. 17, 2639-2648 (1999), Zagouri F, et al, (2013). Intrathecal administration of trastuzumab for the treatment of meningeal carcinomatosis in HER2-positive metastatic breast cancer: a systematic review and pooled analysis. Breast Cancer Res Treat, 139(1): 13-22., Bousquet G, et al. (2016). Intrathecal Trastuzumab Halts Progression of CNS Metastases in Breast Cancer. J Clin Oncol. 34(16):e151-155]. 그러나, CSF는 신속하게 턴 오버하여, 상당히 변동이 있는 CSF 약동학 프로파일로 인해서, IT Herceptin(등록상표)의 치료 효과를 훼손시킬 가능성이 있다. AAVhu68. 트라스투주맙 치료의 목적은, 뇌실질 자체에서 AA Vhu6 8. 트라스투주맙의 국지화된 장기간 발현을 제공함으로써, 발생을 예방하거나, 성장을 둔화시키거나, 생존을 개선시키거나 또는 HER2+ BCM과 연관된 임상적인 삶의 질 척도를 증가시키는 것이다.

[0264]

AAVhu68. 트라스투주맙을 4종의 상이한 용량( $1.00 \times 10^{10}$ ,  $3.00 \times 10^{10}$ ,  $1.00 \times 10^{11}$ , 및  $3.00 \times 10^{11}$  GC/동물)으로 6 내지 9주령의 RAG1<sup>-/-</sup> 마우스에서 두개내실내(intracranioventricular) 주사(ICV)에 의해서 투여하였다. HER2+ 인간 관 암종 세포주로부터 유래된 BT474.M1.fluc 세포를 적어도 21일 후에 이식하였다. 마우스를 매일 관찰하였고, 연구 종점에 안락사시켰다. 종양 체적을 측정하기 위한 부검 시에 뇌 조직을 수집하였다. HER2+ 유방암

뇌전이의 RAG1<sup>-/-</sup> 이종이식 모델에서 AAVhu68.CMV.PI.h트라스투주맙.SV40의 예방적 ICV 투여는, 본 실험에서 모 든 용량 시험에서 종양 체적을 상당히 감소시켰다는 결론을 얻었다. 함께, 이러한 결과는, HER2+ BCBM을 갖는 환자의 생존을 개선시키는, AAVhu68. 트라스투주맙의 치료 효능을 입증하였다.

[0265] B. 본 연구의 목적은, 종양 체적의 연구에 의해서 HER2+ BCBM의 RAG1<sup>-/-</sup> 이종이식 모델에서 종양 예방을 위한 AAVhu68.트라스투주맙의 최소 필수 용량(minimal essential dose: MED)을 조사하는 것이었다. 벡터는 AAVhu68.CMV.PI.h트라스투주맙.SV40 또는 AAVhu68.트라스투주맙이다.

[0266] ddPCR 역가:  $7.38 \times 10^{13}$  GC/ml

[0267] 엔도톡신: 2.0EU/ml 미만

[0268] 순도 :100%

[0269] 인산염 완충 염수(PBS)(처리 대조군 없음)

[0270] 종양 예방을 제공하는 AAVhu68.트라스투주맙의 능력을 HER2+ BCBM의 RAG1<sup>-/-</sup> 무린 이종이식 모델을 사용하여 평가하였다. 면역결핍 마우스 모델은 마우스 면역계에 의한 거부 없이 마우스에서 인간 기원의 동소이식 (orthotopic) 종양의 성장을 허용한다. 추가로, RAG1<sup>-/-</sup> 마우스는 내인성 IgG를 보유하지 않아서, 트라스투주맙 이 단백질 A ELISA에 의해서 정량되는 것을 가능하게 한다.

표: 연구 설계

군 번호	치료제	용량 (GC/마우스)	유전자형 (n)	용량 부피 ( $\mu$ l)	ROA	종양 세포 이식
1	AAVhu68.tras 투주맙	$1.0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	치료 후 21일
2	AAVhu68.tras 투주맙	$3.0 \times 10^{10}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
3	AAVhu68.tras 투주맙	$1.0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
4	AAVhu68.tras 투주맙	$3.0 \times 10^{11}$	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	
5	PBS	미치료	RAG1 <sup>-/-</sup> (10)	5	ICV	

[0271]

[0272] 시험품 및 음성 대조군을 멸균 인산염 완충 염수(PBS)로 적절한 농도로 희석하였다. 벡터를 좌측 측뇌실에 ICV 로 투여하였다.

[0273] CSF 접근을 위한 다양한 경로를 사용하여 척추강내 AAV 전달을 수행할 수 있다. ICV 경로를 선택하였는데, 그 이유는 (목의 피부 및 근육을 통한 절개가 필요한 대수조 경로에 비해서) 그것이 최소한으로 비침습적이고, 마우스에서 어떠한 수술 절차도 필요하지 않기 때문이다. 본 발명자들의 실험 및 다른 연구자들에 의해서, 마우스 및 대동물 둘 모두에서 뇌척수액(ICV 또는 대수조) 내로의 AAV9 벡터의 단회 주사는 전체 뇌 전체의 뉴론을 표적으로 한다는 것이 이미 입증되어 있다[Dirren et al. (2014). Intracerebroventricular Injection Of Adeno-Associated Vims 6 And 9 Vectors For Cell Type-Specific Transgene Expression In The Spinal Cord. Hum. Gene. Therapy 25, 109-120, Snyder et al. (2011). Comparison Of Adeno-Associated Viral Vector Serotypes For Spinal Cord And Motor Neuron Gene Delivery. Hum. Gene Ther 22, 1129-1135, Bucher et al. (2014). Intracisternal Delivery Of AAV9 Results In Oligodendrocyte And Motor Neuron Transduction In The Whole Central Nervous System Of Cats. Gene Therapy 21, 522-528, Hinderer et al. (2014). Intrathecal Gene Therapy Corrects CNS Pathology In A Feline Model Of Mucopolysaccharidosis I. Mol Ther: 22,2018-2027].

[0274] C. RAG1<sup>-/-</sup> 마우스에서의 종양 세포 이식

[0275] HER2+ BCBM에 대한 마우스 이종이식 모델을 생성시키기 위해서, 파이어플라이 루시페라제, BT474-M1.fluc가 형

질도입된 인간 HER2+ 관 세포 암종 세포주를 사용하였다. 주사 절차를 위해서, 마우스를 케타민/자일라진으로 마취시켰다. 두피와 목의 털을 깎았다. 시간 지연-방출 17-β 에스타라다이에올 펠릿(1.7mg, 90-일 방출, 이노베 이티브 리서치 오프 어메리카사(Innovative Research of America))을 목의 후면에 피하로 이식하고, 연구 동안 90일 마다 재투여하였다. 마우스를 정위 장치에 고정시켰다. 노출된 피부를 포비돈-아이오딘 및 70% 에탄올로 닦았다. 두개골의 상단에 1cm 전후방 절개를 행하였다. 브레그마가 식별되었다. 공압 드릴을 브레그마에 배치하 고, 이어서 브레그마의 0.8mm 후방 및 2.2mm 좌측으로 움직였고, 이때 버홀(burr hole)이 두개골에 천공되었다. 25μl의 해밀톤 주사기에 5μl의 종양 세포 현탁액(50:50 MatriGel(등록상표):PBS 중의 총 100,000개 세포)을 적 재하였다. 바늘을 브레그마로 가져오고, 상기에 제시된 좌표로 이동시킨 후에, 뇌실질에 4.0mm로 관통시켰다. 이어서, 바늘을 바늘 트랙 위로 다시 1.0mm 들어올려 종양 세포가 주사될 포켓을 생성하였다. 바늘을 5분 동안 그 위치에 유지시켰다. 다음으로, 5μl의 세포 현탁액을 자동 주사 장치를 사용하여 10분에 걸쳐서 주사하였다. 주사가 완결된 후 바늘을 5분 동안 그 위치에 유지시키고, 이어서 서서히 제거하였다. 두개골 상의 절개부를 4.0 바이크릴로 봉합하고, 마우스에게 멸균 PBS 중의 0.3mg/kg 부프레노르핀과 함께 멸균 PBS 중의 15mg/kg 엔 로플록사신(바이엘사)을 피하로 제공하였다.

[0276] 마우스를 매일 모니터링하였다. 빈사 상태일 때, 마우스를 CO2에 과다 노출시킨 후 경추 과열법에 의해서 안락 사시켰다. 부검 시에, 뇌를 단리시키고, 종양 주사 바늘 트랙을 통해서 관상으로(coronally) 절단하였다.

[0277] 종양 체적: 35일 종양 직경의 측정을 디지털 버니어 캘리퍼(써모피셔사)를 사용하여 수행하였다. 부검 시에 뇌 를 수거하였다. 종양 주사 바늘 트랙에서의 무딘 박리(blunt dissection)를 사용하여 주변 뇌 조직으로부터 종 양을 단리시켰다. 이어서, 종양 직경을 3개의 치수(x, y 및 z)로 측정하고, 종양 체적을 타원체의 체적,  $4/3 * \pi * x/2 * y/2 * z/2$ 로서 계산하였다. 벡터 주사 및 종양 이식 부위에 대한 반대 반구인 우측 대뇌 반구를 폼 알린에서 보존하였다. 절제된 종양을 용량 코호트에 의해서 풀링시키고, 폼알린에서 보존하였다. 종양 체적 비 교를 만-휘트니(Mann-Whitney) 시험을 사용하여 GraphPad Prism 7에서 수행하였다.

#### [0278] D. 결과

[0279] 종양 체적: IT AAVhu68.트라스투주맵 종양 예방이 종양 성장을 둔화시키는지를 결정하기 위해서, 본 발명자들은 이식 35일 후에 종양 직경을 측정하였다. 최고 용량의 AAVhu68.트라스투주맵 종양 예방제가 제공된 군으로부터 의 종양의 중위 체적(0.4mm<sup>3</sup>, n=10)은 어떤 치료도 제공되지 않은 마우스(26.1mm<sup>3</sup>, n=9)보다 상당히 작았다. 더 낮은 용량의 AAVhu68.트라스투주맵의 제공된 마우스 모두는 어떤 치료도 제공되지 않은 것과 비교할 때 상당히 더 작은 종양을 가졌다.  $1.00 \times 10^{10}$  GC/마우스가 제공된 마우스의 중위 종양 체적은  $3.00 \times 10^{10}$  GC/마우스가 제공 된 마우스의 중위 종양 체적과 통계학적으로 동일한 것으로 계산되었다(p=0.6029). 중요하게는, 군 1의 2마리의 마우스, 군 2의 1마리의 마우스, 군 3의 3마리의 마우스 및 군 4의 3마리의 마우스는 해부 시에 크게 눈에 띄는 종양이 없었다.

군	용량 (GC/마우스)	마우스의 수	중위 종양 체적 (mm <sup>3</sup> )	미처리와 비교한 p 값
1	$1.00 \times 10^{10}$	9*	6.4	0.0375
2	$3.00 \times 10^{10}$	10	8.1	0.0053
3	$1.00 \times 10^{11}$	9*	1.3	0.0026
4	$3.00 \times 10^{11}$	10	0.4	<0.0001

\*이들 군 각각에서 예정된 부검일 이전에 1마리의 동물을 안락사시켰고, 따라서 분석에 포함되지 않았다.

[0280] 모든 용량에서, AAVhu68.트라스투주맵의 IT 투여는, HER2+ BT474.M1 인간 관 암종 세포주를 사용하는 HER2+ BCBM의 RAG1<sup>-/-</sup> 무린 이중이식 모델에서 예방적으로 투여되는 경우 종양 이식 후 D35일에 상당히 더 작은 중위 체적으로 이어졌다. 본 연구에서 측정된 AAVhu68.트라스투주맵 MED는  $1.00 \times 10^{10}$  GC/마우스였다.

#### [0282] 실시예 7 - AAVhu68 벡터에 대한 생산 수율 및 순도



- [0283] 상이한 캡시드를 갖는 제조합 아데노-연관(rAAV) 벡터, 즉, 상이한 캡시드를 갖는 2개의 상이한 세트의 벡터, 예컨대, AAVhu68, AAV8트리플, AAV8 및 AAV9를 생성시키고, 준비하였다.
- [0284] 간략하면, 제시된 캡시드 및 사이트메갈로마이어스 프로모터(CMV), 파이어플라이 루시퍼라제 암호 서열, 및 SV40 폴리 A를 포함하는 벡터 게놈(CMV.ff루시퍼라제.SV40)을 갖는 한 세트의 벡터를 작은 규모로 생산하고, 각각의 벡터의 수율에 대해서 평가하였다. 결과는, AAV9 벡터가 최고 수율을 제공한 반면, AAVhu68 벡터는 그 다음 두 번째였다는 것을 보여준다(도 8A). AAV8 및 AAV8 트리플 벡터는 또한  $4 \times 10^{13}$  GC 초과 수율을 제공하였다(도 8A).
- [0285] 제시된 캡시드 및 CMV 프로모터, 인트론, 면역접착제 암호 서열(201Ig IA) 및 SV40 폴리 A를 포함하는 벡터 게놈(CMV.PI.201Ig IA.SV40)을 갖는 나머지 세트의 벡터를 종래의 방법에 따라서 메가 규모로 생산하고, 각각의 벡터의 수율 및 순도에 대해서 평가하였다. 결과를 도 8B 및 도 9에 나타낸다.
- [0286] 작은 규모에서의 제조 수율과 유사하게, AAV9 벡터는, 약  $5.7 \times 10^{14}$  GC로 최고 수율을 제공한 반면, AAVhu68 벡터는 약  $3.8 \times 10^{14}$  GC로 그 다음 두 번째였다(도 8B). AAV8 벡터는 약  $3.6 \times 10^{14}$  GC의 수율 및 AAV8트리플은 약  $1.8 \times 10^{14}$  GC의 수율을 제공하였다(도 8B). 시험된 제제의 순도는 약 97.4% 내지 약 98.6%의 범위로 대등하다.
- [0287] **실시예 8 - 수컷 RAG KO 마우스에서의 rAAV 벡터.**
- [0288] 유전자 발현을, AAVhu68, AAV8트리플, AAV8 및 AAV9를 비롯한, 상이한 캡시드를 갖고, 분비되는 트랜스젠 산물 201Ig IA를 발현하는 rAAV 벡터를 사용하여 생체내에서 시험하였다.
- [0289] 6 내지 8주령의 수컷 RAG KO 마우스(n=5/군)에게 해밀턴 주사기를 사용하여 시험 벡터  $3 \times 10^{11}$  GC/마우스 또는  $3 \times 10^{10}$  GC/마우스를 비복근 근육 내에 근육내로 투여하였다. 혈청 수집 튜브 내로의 하악하 출혈에 의해서 분비되는 단백질을 발현하는 벡터가 투여된 마우스로부터 매주 혈청을 수집하였다. 트랜스젠 발현 수준을 혈청에서 문헌[Greig *et al.*, Intramuscular Injection of AAV8 in Mice and Macaques Is Associated with Substantial Hepatic Targeting and Transgene Expression, PLoS One. 2014 Nov 13;9(11):e 112268. doi: 10.1371/journal.pone.0112268. eCollection 2014]에 기술된 바와 같이 ELISA에 의해서 측정하였다.
- [0290] 도 10A 및 도 10B에 나타난 바와 같이, AAVhu68, AAV8 및 AAV9 벡터는 유사한 수준으로 트랜스젠을 발현한 반면, AAV8트리플 벡터는 마우스에서 IM 주사 이후에 더 양호하게 발현하였다. 시험된 더 낮은 용량(즉,  $3 \times 10^{10}$  GC/마우스)에서, AAV8트리플과의 발현의 차이는 상당하다.
- [0291] **실시예 9 - 수컷 C57BL/6J 마우스에서의 rAAV 벡터의 트랜스젠 발현.**
- [0292] 간 및 근육에서의 발현을, AAVhu68, AAV8트리플, AAV8 및 AAV9를 비롯한, 상이한 캡시드를 갖고, 트랜스젠으로서 파이어플라이 루시퍼라제(ffLuc)를 발현하는 rAAV 벡터를 사용하여 생체내에서 시험하였다.
- [0293] 6 내지 8주령의 수컷 C57BL/6J 마우스(n=5/군)에게 해밀턴 주사기를 사용하여  $3 \times 10^{11}$  GC/마우스의 벡터를 비복근 근육내로 근육내로 투여하였다. 이미 기술된 바와 같이(상기에 인용된 문헌[Greig *et al.*, PLoS One 2014]) 전신 생물발광 영상화에 의해서 ffLuc 발현을 가시화하였다.
- [0294] 도 11A 및 도 11B에 나타난 바와 같이, AAVhu68, AAV8 및 AAV9 벡터는 근육 및 간 둘 모두에서 유사한 수준으로 발현된 반면, AAV8트리플 벡터는 간에서 발현이 감소되었고, 근육에서 발현이 향상되었다.
- [0295] **실시예 10 - 수컷 및 암컷 시노몰거스 마카크에서의 rAAV 벡터.**
- [0296] 트랜스젠 발현을, AAVhu68, AAV8트리플, AAV8 및 AAV9를 비롯한, 상이한 캡시드를 갖고, 분비되는 트랜스젠 201Ig IA를 발현하는 rAAV 벡터를 사용하여 시노몰거스 마카크에서 시험하였다.
- [0297] 연구의 시작 시에 1:5 미만의 주사되는 벡터에 대한 Nab 역가를 갖는 수컷 및 암컷 시노몰거스 마카크에게 벡터 생체분포 연구를 위해서 1ml 주사/체중 kg( $10^{13}$  GC/ml의 벡터 농도)으로서 4종의 벡터 캡시드(AAV8트리플, AAVhu68, AAV9, 또는 AAV8) 중 하나로부터 201Ig IA를 발현하는 벡터를  $10^{13}$  GC/체중 kg의 용량으로, 오른쪽 다리 및 왼쪽 다리 둘 모두의 외측 광근 내에 근육내로 투여하였다. 혈액 샘플을 연구 이전에 채취하고, 대퇴 정맥의 정맥 천자를 통해서 연구 동안 매주 채취하였다. 트랜스젠 발현 수준을 이미 기술된 바와 같이(상기에 인

용된 문헌[Greig *et al.*, PLoS One 2014]) ELISA에 의해서 혈청에서 측정하였다.

[0298] 도 12에 나타난 바와 같이, AAVhu68 및 AAV8트리플은 IM 주사 이후에 AAV9 및 AAV8 벡터에 비해서 더 양호하게 발현한다.

[0299] 본 명세서에 인용된 모든 문헌은 미국 가특허 출원 제62/614,002호(출원일 2018년 1월 5일), 미국 가특허 출원 제62/591,001호(출원일 2017년 11월 27일) 및 미국 가특허 출원 제62/464,748호(출원일 2017년 2월 28일)에서 같이 본 명세서에 참고로 포함된다. "17-7986 Seq Listing\_ST25.txt"라는 파일명으로 본 명세서와 함께 제출된 서열 목록 및 그 내의 서열 및 텍스트는 참고로 포함된다. 본 발명이 특정 실시형태를 참고로 기술되어 있지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 변형이 행해질 수 있음이 인식될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함되도록 의도된다.

[0300] (서열 목록 프리 텍스트)

[0301] 하기 정보는 번호 식별인자 <223> 하의 서열 함유 프리 텍스트를 제공한다.

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
2	<223> Synthetic Construct
3	<223> AAVhu68 rep gene of homo sapiens origin
4	<223> Synthetic Construct
5	<223> AAV9 VP1 capsid of homo sapiens origin <220> <221> CDS <222> (1)..(2208) <223> AAV9 VP1 Capsid
6	<223> Synthetic Construct
7	<223> primer prm504
8	<223> primer prm505

[0302]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
9	<223> AAVhu68 spacer sequence
10	<223> AAVhu31 vp1 capsid protein
11	<223> AAVhu32 vp1 capsid protein
12	<223> AAVhu31 vp1 coding sequence
13	<223> AAVhu32 vp1 coding sequence
14	<223> modified hu68vp1  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (23)..(23) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W.  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (35)..(35) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (57)..(57) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (66)..(66) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

[0303]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (94)..(94)          &lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (97)..(97)          &lt;223&gt; Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (107)..(107)          &lt;223&gt; Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; misc_feature          &lt;222&gt; (113)..(113)          &lt;223&gt; Xaa can be any naturally occurring amino acid</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (149)..(149)          &lt;223&gt; Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorilated S</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (149)..(149)</p>

[0304]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;223&gt; Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (247)..(247)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (253)..(253)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (259)..(259)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid (alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of alpha- and gamma-glutamic acid</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (270)..(270)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (297)..(297)</p>

[0305]



서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;223&gt; Xaa represents D (Asp, aspartic acid) or amidated D to N (Asn, asparagine)</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (304)..(304)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (306)..(306)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (314)..(314)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (319)..(319)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (329)..(329)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p>

[0306]

<p>서열번호 (프리 텍스트 함유)</p>	<p>Free text under &lt;223&gt;</p>
	<p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (332)..(332)                      &lt;223&gt; Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (336)..(336)                      &lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (384)..(384)                      &lt;223&gt; Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (404)..(404)                      &lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (409)..(409)                      &lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;                      &lt;221&gt; MISC_FEATURE                      &lt;222&gt; (436)..(436)</p>

[0307]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (452)..(452)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (477)..(477)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (499)..(499)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (512)..(512)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (515)..(515)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p>

[0308]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;222&gt; (518)..(518)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (524)..(524)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (559)..(559)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (569)..(569)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be T (Thr, threonine), or Phosphorylated T</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (586)..(586)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p>&lt;220&gt;</p> <p>&lt;221&gt; MISC_FEATURE</p> <p>&lt;222&gt; (599)..(599)</p> <p>&lt;223&gt; Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid (alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of alpha- and gamma-glutamic acid</p>

[0309]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (605)..(605)          &lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (619)..(619)          &lt;223&gt; Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g.,          kynurenine).</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (628)..(628)          &lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (640)..(640)          &lt;223&gt; Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE          &lt;222&gt; (651)..(651)          &lt;223&gt; Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p>&lt;220&gt;          &lt;221&gt; MISC_FEATURE</p>

[0310]



서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<222> (663)..(663) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (666)..(666) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (689)..(689) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (693)..(693) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (695)..(695) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W  <220> <221> MISC_FEATURE <222> (709)..(709) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp  <220>

[0311]

서열번호 (프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<221> MISC_FEATURE <222> (735)..(735) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

[0312]

도면

도면1

		1		100
AAV9	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGRBWWMLKPGPPQPKANQDHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVMAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF		
hu.68.VP1	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGRBWWMLKPGPPQPKANQDHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVMAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF		
hu.31	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGRBWWMLKPGPPQPKANQDHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVMAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF		
hu.32	(1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGRBWWMLKPGPPQPKANQDHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEPVMAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF		
		101		200
AAV9	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS		
hu.68.VP1	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS		
hu.31	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS		
hu.32	(101)	QERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKKRLLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGGKSGAQPAKKRLNFGQTDGTEVPDPQPIGEPPAAPSGVGS		
		201		300
AAV9	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQMLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDIWQR		
hu.68.VP1	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQMLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDIWQR		
hu.31	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQMLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDIWQR		
hu.32	(201)	LTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQMLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRDIWQR		
		301		400
AAV9	(301)	LINNWWGFRPKRLNFKLFNIQKVEVDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDNGQAVGRSSFYCLEYF		
hu.68.VP1	(301)	LINNWWGFRPKRLNFKLFNIQKVEVDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDNGQAVGRSSFYCLEYF		
hu.31	(301)	LINNWWGFRPKRLNFKLFNIQKVEVDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDNGQAVGRSSFYCLEYF		
hu.32	(301)	LINNWWGFRPKRLNFKLFNIQKVEVDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLDNGQAVGRSSFYCLEYF		
		401		500
AAV9	(401)	PSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSOLDRLMPLIDQYLYYLSKTINGSGNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE		
hu.68.VP1	(401)	PSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSOLDRLMPLIDQYLYYLSKTINGSGNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE		
hu.31	(401)	PSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSOLDRLMPLIDQYLYYLSKTINGSGNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE		
hu.32	(401)	PSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSOLDRLMPLIDQYLYYLSKTINGSGNQQLKFSVAGPSNMAVQGRNYPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSE		
		501		600
AAV9	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEIKTTPVATESYGVQVATNHGSAQAQAQTGWQNGQ		
hu.68.VP1	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEIKTTPVATESYGVQVATNHGSAQAQAQTGWQNGQ		
hu.31	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEIKTTPVATESYGVQVATNHGSAQAQAQTGWQNGQ		
hu.32	(501)	FAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEIKTTPVATESYGVQVATNHGSAQAQAQTGWQNGQ		
		601		700
AAV9	(601)	ILPGMVWQDRDYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLSNFTQYSTGVQSVIEIEWELQKENSKRWNPEIQ		
hu.68.VP1	(601)	ILPGMVWQDRDYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLSNFTQYSTGVQSVIEIEWELQKENSKRWNPEIQ		
hu.31	(601)	ILPGMVWQDRDYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLSNFTQYSTGVQSVIEIEWELQKENSKRWNPEIQ		
hu.32	(601)	ILPGMVWQDRDYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLSNFTQYSTGVQSVIEIEWELQKENSKRWNPEIQ		
		701		736
AAV9	(701)	YTSNYYKSNNEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL		
hu.68.VP1	(701)	YTSNYYKSNNEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL		
hu.31	(701)	YTSNYYKSNNEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL		
hu.32	(701)	YTSNYYKSNNEFAVNTTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL		

도면2a

		1	100
AAV9	(1)	ATGGCTGCCGATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTTGGTGAAGGAATTCCGAGTGGTGGCTTTGAAACCTGGAGGCCCTCAACCAAGG	
hu.68.VP1	(1)	ATGGCTGCCGATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTTGGTGAAGGAATTCCGAGTGGTGGCTTTGAAACCTGGAGGCCCTCAACCAAGG	
hu.31	(1)	ATGGCTGCCGATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTCTCTGTGAAGGAATTAGAGAGTGGTGGAGCTTAAACCTGGCCGCCCAACCAAGG	
hu.32	(1)	ATGGCTGCCGATGGTTATCTCCAGATTGGCTCGAGGACAACTCTCTGTGAAGGAATTAGAGAGTGGTGGAGCTTAAACCTGGCCGCCCAACCAAGG	
		101	200
AAV9	(101)	CAATTAACCAATCATCAGACACGCTTCGGTCTTGCTTCGGTTACAAATACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.68.VP1	(101)	CAATTAACCAATCATCAGACACGCTTCGGTCTTGCTTCGGTTACAAATACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.31	(101)	CCGAGAGCGGCTTAGGACGACAGCGGGGTCTTGCTTCGGTTACAAATACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGC	
hu.32	(101)	CCGAGAGCGGCTTAGGACGACAGCGGGGTCTTGCTTCGGTTACAAATACCTTGGACCCGGCAACGGACTCGACAAGGGGAGCCGGTCAACGC	
		201	300
AAV9	(201)	AGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCAGCACAAGGCTACGACGAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGAGCGGAGTTTC	
hu.68.VP1	(201)	AGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCAGCACAAGGCTACGACGAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGAGCGGAGTTTC	
hu.31	(201)	AGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCAGCACAAGGCTACGACGAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGAGCGGAGTTTC	
hu.32	(201)	AGCAGACGCGGCGGCCCTCGAGCAGCACAAGGCTACGACGAGCTCAAGGCCGGAGACAACCCGTACCTCAAGTACAACACGCGGAGCGGAGTTTC	
		301	400
AAV9	(301)	CAGGAGCGGCTCAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.68.VP1	(301)	CAGGAGCGGCTCAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.31	(301)	CAGGAGCGGCTCAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
hu.32	(301)	CAGGAGCGGCTCAAGAAGATACGCTTTTGGGGCAACCTCGGGGAGCAGTCTTCCAGGCCAAAAAGAGGCTCTTGAACCTCTTGGTCTGGTTGAGG	
		401	500
AAV9	(401)	AAGCGGCTAAGCGGCTCCTGGAAAGAAAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGTATTGGCAATCGGGTTCACAGCCCGC	
hu.68.VP1	(401)	AAGCGGCTAAGCGGCTCCTGGAAAGAAAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGTATTGGCAATCGGGTTCACAGCCCGC	
hu.31	(401)	AAGCGGCTAAGCGGCTCCTGGAAAGAAAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGTATTGGCAATCGGGTTCACAGCCCGC	
hu.32	(401)	AAGCGGCTAAGCGGCTCCTGGAAAGAAAGGCTGTAGAGCAGTCTCCTCAGGAACCGGACTCCTCCGCGGTATTGGCAATCGGGTTCACAGCCCGC	
		501	600
AAV9	(501)	TAAAAAGAGACTCAATTTCCGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCTCAACCAATCGGAGAACCTCCGCGAGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.68.VP1	(501)	TAAAAAGAGACTCAATTTCCGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCTCAACCAATCGGAGAACCTCCGCGAGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.31	(501)	TAAAAAGAGACTCAATTTCCGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCTCAACCAATCGGAGAACCTCCGCGAGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
hu.32	(501)	TAAAAAGAGACTCAATTTCCGTCAGACTGGCGACACAGAGTCACTCCAGACCTCAACCAATCGGAGAACCTCCGCGAGCCCTCAGGTGTGGGATCT	
		601	700
AAV9	(601)	CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCTCGGAAATGGCATTGCGATTCCCAAT	
hu.68.VP1	(601)	CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCTCGGAAATGGCATTGCGATTCCCAAT	
hu.31	(601)	CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCTCGGAAATGGCATTGCGATTCCCAAT	
hu.32	(601)	CTTACAATGGCTTCAGGTGGTGGCGCACCAGTGGCAGACAATAACGAAGGTGCCGATGGAGTGGGTAGTTCTCGGAAATGGCATTGCGATTCCCAAT	
		701	800
AAV9	(701)	GGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAAGACCCGAACTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAACTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
hu.68.VP1	(701)	GGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAAGACCCGAACTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAACTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
hu.31	(701)	GGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAAGACCCGAACTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAACTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
hu.32	(701)	GGCTGGGGGACAGAGTCATCACCACCAAGACCCGAACTGGGCCCTGCCACCTACAACAATCACCTCTACAAGCAAACTCCAAACAGCACATCTGGAGG	
		801	900
AAV9	(801)	ATCTTCAATGACAACGCCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGA	
hu.68.VP1	(801)	ATCTTCAATGACAACGCCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGA	
hu.31	(801)	ATCTTCAATGACAACGCCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGA	
hu.32	(801)	ATCTTCAATGACAACGCCCTACTTCGGCTACAGCACCCCTGGGGGTATTTTGACTTCAACAGATTCCACTGCCACTTCTCACCACGTGACTGGCAGCGA	
		901	1000
AAV9	(901)	CTCATCAACAACAAGTGGGATTCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAGGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.68.VP1	(901)	CTCATCAACAACAAGTGGGATTCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAGGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.31	(901)	CTCATCAACAACAAGTGGGATTCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAGGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)	CTCATCAACAACAAGTGGGATTCGGGCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTCAAGTCAAGGAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	



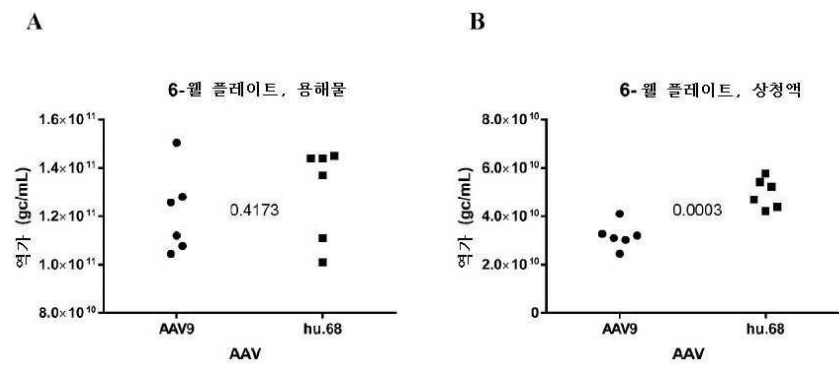
도면2b

		901	1000
AAV9	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTACAGTCAAAAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.68.VP1	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTACAGTCAAAAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.31	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTACAGTCAAAAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
hu.32	(901)	CTCATCAACAACAACCTGGGATTCGGCCTAAGCGACTCAACTTCAAGCTCTTCAACATTACAGTCAAAAGGTTACGGACAACAATGGAGTCAAGACCA	
		1001	1100
AAV9	(1001)	TGCGCAATAACCTTACCAGCAGGTCACAGTCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGTTCGGCTCAGCAGGGCTGCCTCCCGCGCTT	
hu.68.VP1	(1001)	TGCGCAATAACCTTACCAGCAGGTCACAGTCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGTTCGGCTCAGCAGGGCTGCCTCCCGCGCTT	
hu.31	(1001)	TGCGCAATAACCTTACCAGCAGGTCACAGTCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGTTCGGCTCAGCAGGGCTGCCTCCCGCGCTT	
hu.32	(1001)	TGCGCAATAACCTTACCAGCAGGTCACAGTCTTCAAGGACTCAGACTATCAGCTCCCGTACGTGCTCGGTTCGGCTCAGCAGGGCTGCCTCCCGCGCTT	
		1101	1200
AAV9	(1101)	CCACGGGAGCTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCGTGGGTGCTTCGCTCTTTTACTGCCTGGAATATTTTC	
hu.68.VP1	(1101)	CCACGGGAGCTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCGTGGGTGCTTCGCTCTTTTACTGCCTGGAATATTTTC	
hu.31	(1101)	CCACGGGAGCTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCGTGGGTGCTTCGCTCTTTTACTGCCTGGAATATTTTC	
hu.32	(1101)	CCACGGGAGCTTTTCATGATTCCTCAGTACGGGTATCTGACGCTTAATGATGGAAGCCAGGCGTGGGTGCTTCGCTCTTTTACTGCCTGGAATATTTTC	
		1201	1300
AAV9	(1201)	CCGTCGCAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTTCCAGTACGAGTTTGAAGACGTACCTTCCATAGCAGCTACGCTCAGACGCCAAAGCGTGGAC	
hu.68.VP1	(1201)	CCGTCGCAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTTCCAGTACGAGTTTGAAGACGTACCTTCCATAGCAGCTACGCTCAGACGCCAAAGCGTGGAC	
hu.31	(1201)	CCGTCGCAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTTCCAGTACGAGTTTGAAGACGTACCTTCCATAGCAGCTACGCTCAGACGCCAAAGCGTGGAC	
hu.32	(1201)	CCGTCGCAATGCTAAGAACGGGTAAACAACCTTCCAGTACGAGTTTGAAGACGTACCTTCCATAGCAGCTACGCTCAGACGCCAAAGCGTGGAC	
		1301	1400
AAV9	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGACTATCTCTCAAGACTATTAAACGGTTCTGGACAGAAATCAACAACGCTAAATTCAGTGTGGCGG	
hu.68.VP1	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGACTATCTCTCAAGACTATTAAACGGTTCTGGACAGAAATCAACAACGCTAAATTCAGTGTGGCGG	
hu.31	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGACTATCTCTCAAGACTATTAAACGGTTCTGGACAGAAATCAACAACGCTAAATTCAGTGTGGCGG	
hu.32	(1301)	GACTAATGAATCCACTCATCGACCAATACCTTGACTATCTCTCAAGACTATTAAACGGTTCTGGACAGAAATCAACAACGCTAAATTCAGTGTGGCGG	
		1401	1500
AAV9	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACGCGAA	
hu.68.VP1	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACGCGAA	
hu.31	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACGCGAA	
hu.32	(1401)	ACCCAGCAACATGGCTGCCAGGGAAGAACTACATACCTGGACCCAGCTACCGACAACAACGTGTCTCAACCACTGTGACTCAAAACAACAACGCGAA	
		1501	1600
AAV9	(1501)	TTTGCTTGGCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAGGAGAGGACCGTT	
hu.68.VP1	(1501)	TTTGCTTGGCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAGGAGAGGACCGTT	
hu.31	(1501)	TTTGCTTGGCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAGGAGAGGACCGTT	
hu.32	(1501)	TTTGCTTGGCTGGAGCTTCTTCTTGGGCTCTCAATGGACGTAATAGCTTGATGAATCCTGGACCTGCTATGGCCAGCCACAAGAGGAGAGGACCGTT	
		1601	1700
AAV9	(1601)	TCTTCCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAACAAGGAACCTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA	
hu.68.VP1	(1601)	TCTTCCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAACAAGGAACCTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA	
hu.31	(1601)	TCTTCCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAACAAGGAACCTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA	
hu.32	(1601)	TCTTCCCTTTGTCTGGATCTTTAATTTTGGCAACAAGGAACCTGGAAGAGACAACGTGGATGCGGACAAAGTCATGATAACCAACGAAGAAGAAATTA	
		1701	1800
AAV9	(1701)	AACCTACTAACCCGCTAGCAACGAGTCTATGGACAAGTGCCACAACAACCAACAGAGTGCCCAAGCACAAGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA	
hu.68.VP1	(1701)	AACCTACTAACCCGCTAGCAACGAGTCTATGGACAAGTGCCACAACAACCAACAGAGTGCCCAAGCACAAGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA	
hu.31	(1701)	AACCTACTAACCCGCTAGCAACGAGTCTATGGACAAGTGCCACAACAACCAACAGAGTGCCCAAGCACAAGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA	
hu.32	(1701)	AACCTACTAACCCGCTAGCAACGAGTCTATGGACAAGTGCCACAACAACCAACAGAGTGCCCAAGCACAAGCGCAGACCGGCTGGGTTCAAAACCAAGGA	

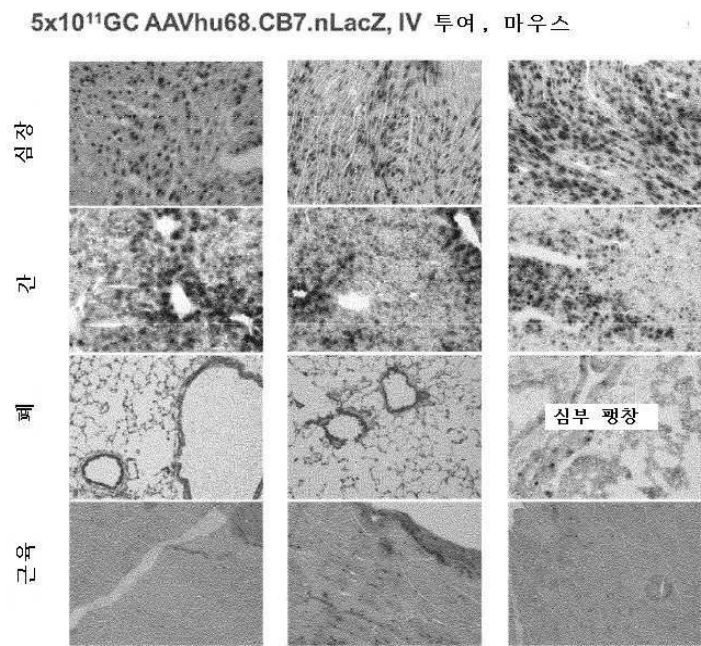
도면2c

		1801	1900
AAV9	(1801)	ATACCTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCACTTTCACCCCTTCTCCGC	
hu.68.VP1	(1801)	ATACCTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCACTTTCACCCCTTCTCCGC	
hu.31	(1801)	ATACCTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCACTTTCACCCCTTCTCCGC	
hu.32	(1801)	ATACCTCCGGGTATGGTTTGGCAGGACAGATGTGTACCTGCAAGGACCCATTGGGCCAAAATTCCTCACACGGACGGCACTTTCACCCCTTCTCCGC	
		1901	2000
AAV9	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT	
hu.68.VP1	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT	
hu.31	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT	
hu.32	(1901)	TGATGGGAGGGTTTGAATGAAGCACCCGCCCTCCTCAGATCCTCATCAAAAACACACCTGTACCTGCGGATCCTCCAAACGGCTTTCAAAGGACAAGCT	
		2001	2100
AAV9	(2001)	GAACCTTTTCATCACCCAGTATTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG	
hu.68.VP1	(2001)	GAACCTTTTCATCACCCAGTATTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG	
hu.31	(2001)	GAACCTTTTCATCACCCAGTATTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG	
hu.32	(2001)	GAACCTTTTCATCACCCAGTATTCTACTGSCCAAGTCAGCGTGGAGATTGAGTGGGAGCTGCAGAGGAAAAACAGCAAGCGCTGGAACCCGGAGATCCAG	
		2101	2200
AAV9	(2101)	TACACTTCCAACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
hu.68.VP1	(2101)	TACACTTCCAACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
hu.31	(2101)	TACACTTCCAACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
hu.32	(2101)	TACACTTCCAACTATTACAAGTCTAATAATGTTGAATTTGCTGTTAATACTGAAGGTGTATATAGTGAACCCCGCCCATTTGGCACCAGATACCTGACTC	
		2201 2211	
AAV9	(2201)	GTAATCTGTAA	
hu.68.VP1	(2201)	GTAATCTGTAA	
hu.31	(2201)	GTAATCTGTAA	
hu.32	(2201)	GTAATCTGTAA	

도면3



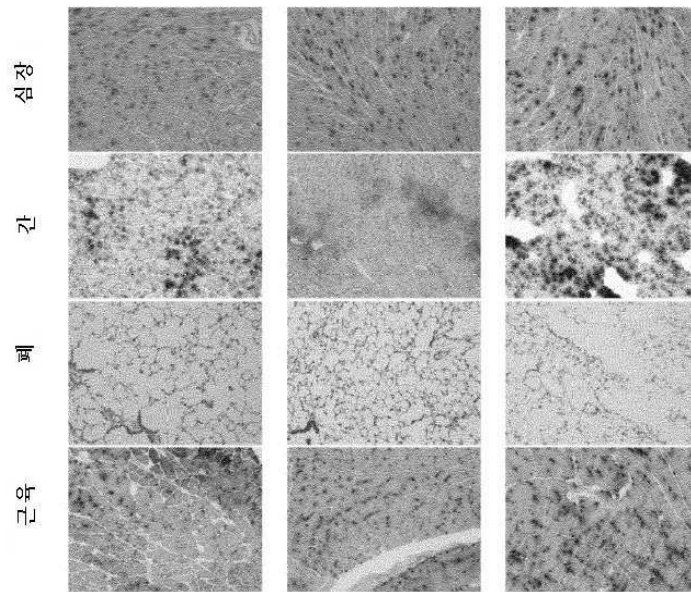
도면4a





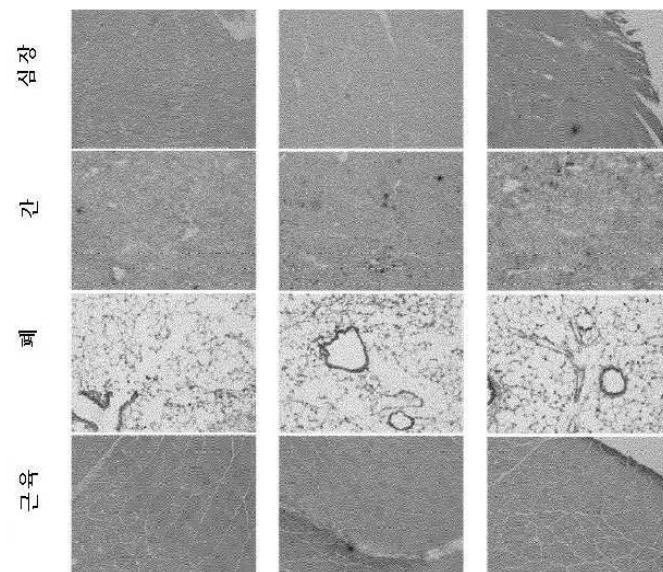
도면4b

5x10<sup>11</sup>GC AAVhu68.CB7.nLacZ, IM 투여, 마우스

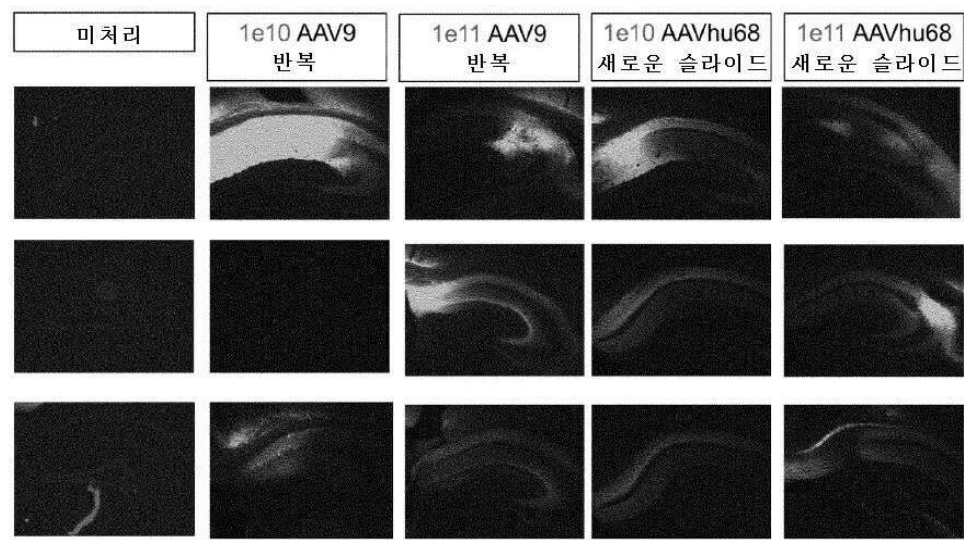


도면4c

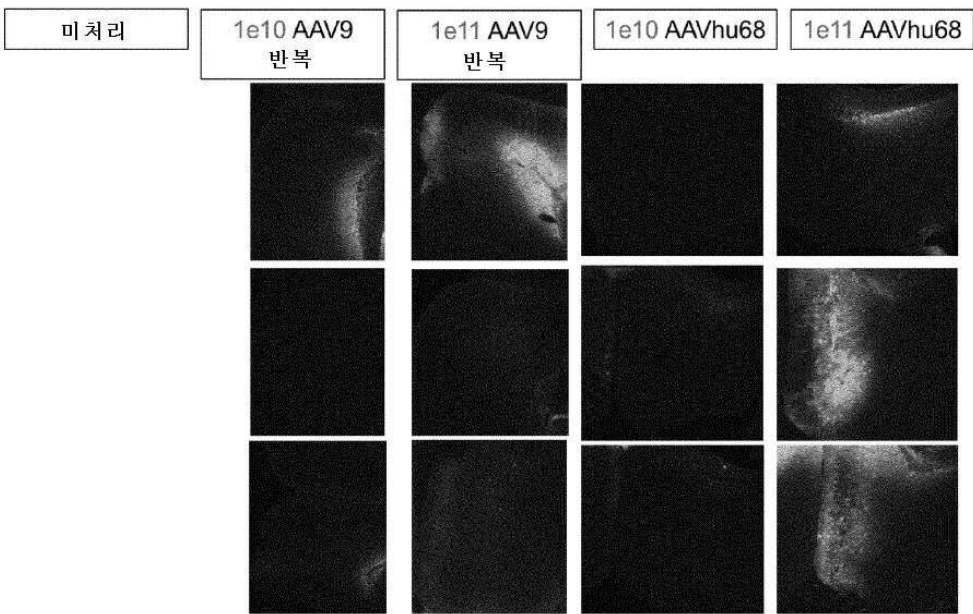
5x10<sup>11</sup>GC AAVhu68.CB7.LacZ, IN 투여, 마우스



도면5a













도면5b

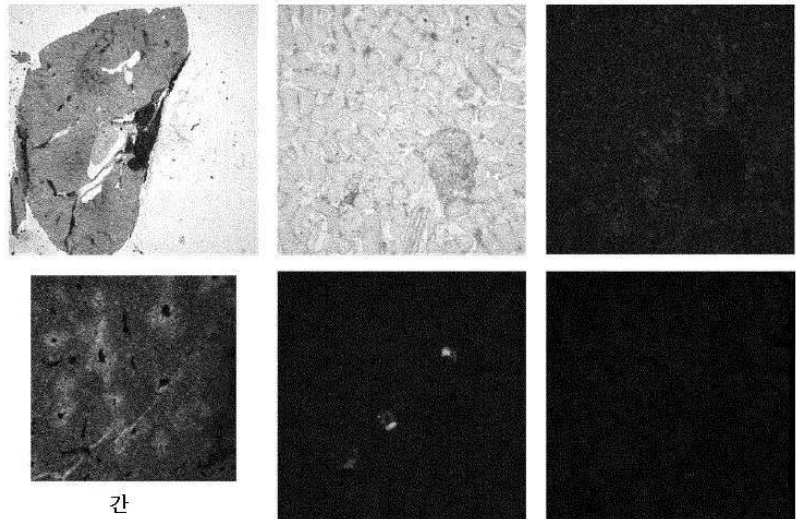




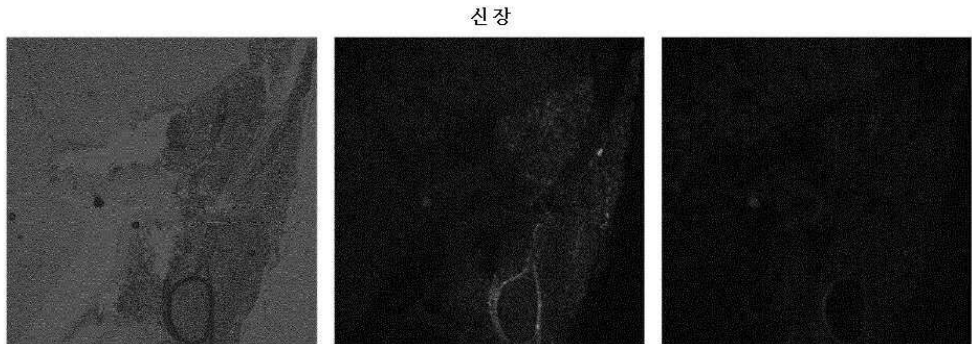
도면5c

미처리	1e10 AAV9 반복	1e11 AAV9 반복	1e10 AAVhu68	1e11 AAVhu68
				
				
				

도면6a

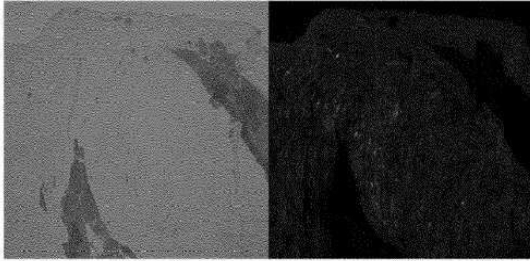


도면6b



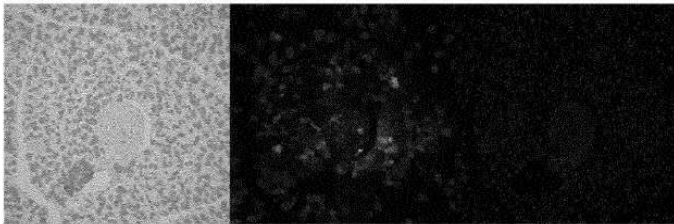
도면6c

심장

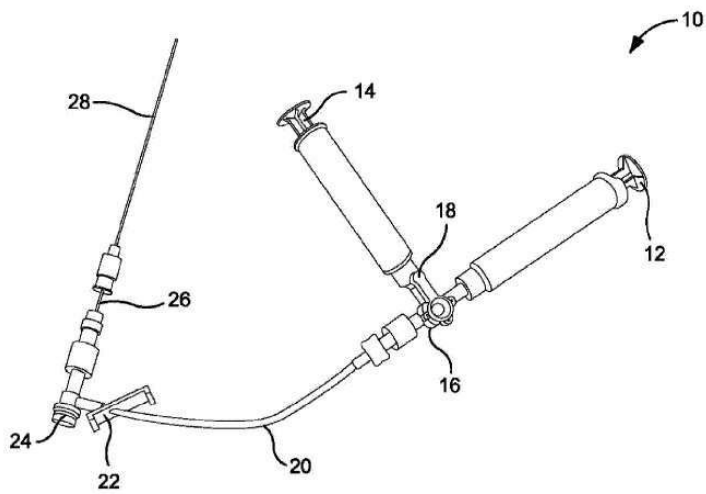


도면6d

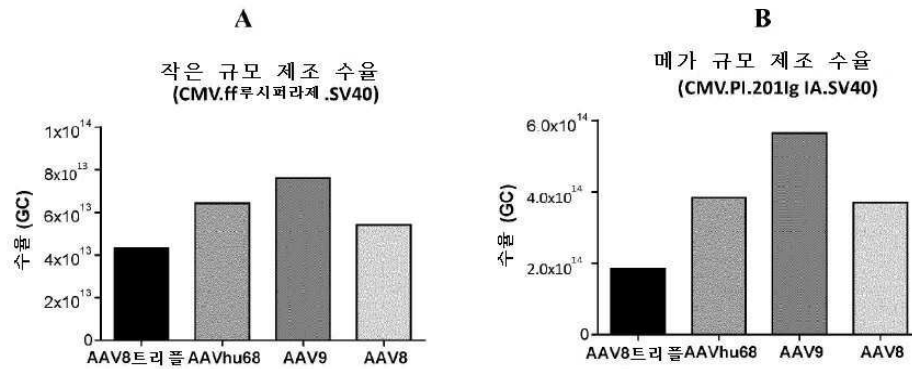
췌장



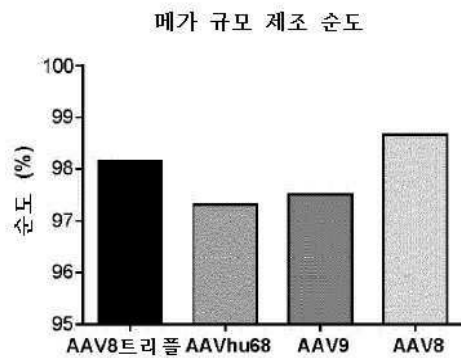
도면7



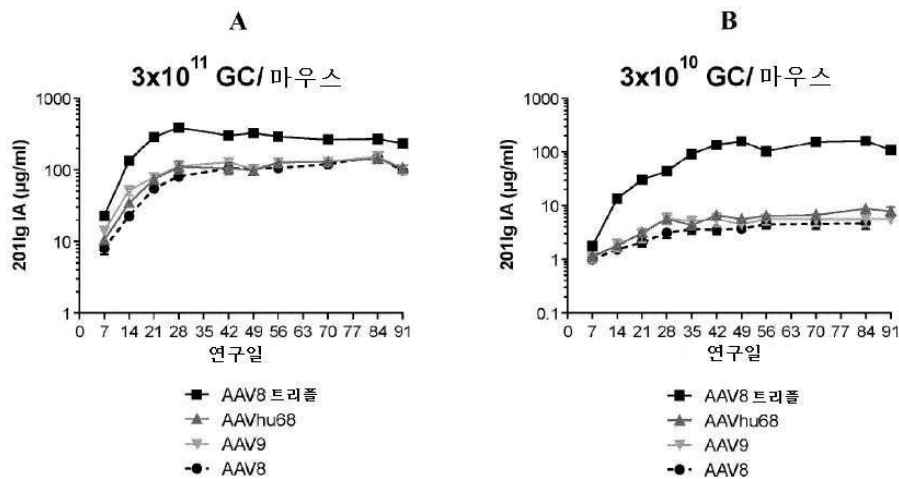
도면8



도면9

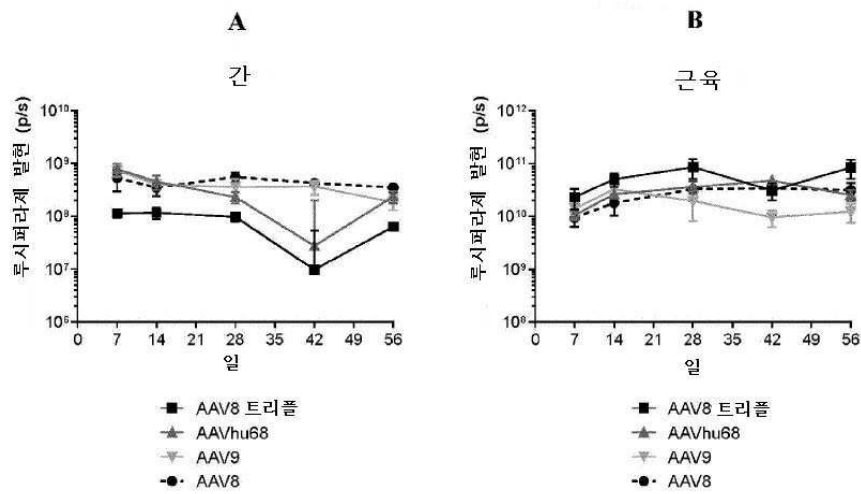


도면10

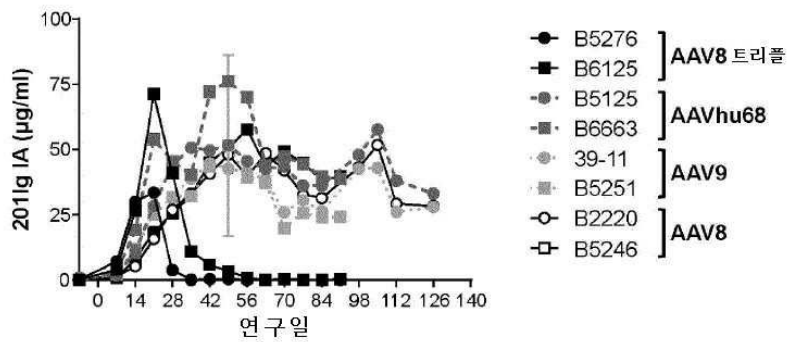




도면11



도면12



## 서열 목록

### SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> Novel AAV Isolate and Uses Therefore

<130> UPN-17-7986P

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVhu68 vp1 capsid of Homo Sapiens origin

<400> 1

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctcagtga aggcattcgc

60

gagtgggtggg ctttgaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120  
aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac 180

aagggggagc cggtaacga agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240  
cagcagctca aggccggaga caacccttac ctcaagtaca accacgccga cggcagttc 300  
caggagcggc tcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag 360  
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420  
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgt gggatattggc 480  
aaatcgggtg cacagccgcg taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540  
tcagtccccg acctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660  
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac 720  
accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaatc 780  
tccaacgca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840  
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcaaaga 900  
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960  
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgctaataa cttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctacagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080  
gagggtgcc tcccgcgtt cccagcggac gttttcatga ttctcagta cgggtatcta 1140  
acgttaatg atggaagcca agccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc 1200  
ccgtcgaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagtca gctacagatt tgagaacgta 1260  
cctttccata gcagctatgc tcacagccaa agcctggacc gactcatgaa tccactcatc 1320  
gaccaatact tgiactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaaaaacg 1380  
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaaca caacagcgaa 1500  
tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560  
ggactgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620  
ttaattttt gcaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atcgcgacaa agtcatgata 1680  
accaacgaag aagaaattaa aactaccaac ccagtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740  
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800  
atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catittgggc 1860

aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920  
aagcacccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980  
gctttcaaca aggacaagct gaactctttc atcaccaggt attctactgg ccaagtcagc 2040  
gtggagattg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100  
tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgtt 2160  
tattctgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn  
 260 265 270  
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275 280 285  
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300  
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320  
  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
 340 345 350  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365  
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp  
 370 375 380  
  
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

405                      410                      415  
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420                      425                      430  
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser  
 435                      440                      445  
  
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser  
 450                      455                      460  
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn  
 485                      490                      495  
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn  
 500                      505                      510  
  
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515                      520                      525  
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly  
 530                      535                      540  
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser  
 565                      570                      575  
  
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln  
 580                      585                      590  
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595                      600                      605  
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
 610                      615                      620  
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met  
 625                      630                      635                      640  
  
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
 645                      650                      655



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

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val  
705 710 715 720  
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 3

<211> 1866

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVhu68 rep gene of homo sapiens origin

<400> 3

atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg accttgacga gcatctgccc 60  
ggcattttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg aatgggagtt gccgccagat 120  
  
tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcaccctga ccgtggccga gaagctgcag 180  
cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc cggaggctct tttctttgtg 240  
caatttgaga agggagagag ctacttcac atgcacgtgc tcgtggaaac caccggggtg 300  
aatccatgg ttttgggacg tttcttgagt cagattcgcg aaaaactgat tcagagaatt 360  
taccgcgga tcgagccgac ttgccaac tggttcgagg tcacaaagac cagaaatggc 420  
gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc ccaattactt gtccecaaa 480  
accagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac agtatttaag cgcctgtttg 540  
  
aatctcacgg agcgtaaag gttggtggcg cagcatctga cgcacgtgtc gcagacgcag 600  
gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc cggatgacag atcaaaaact 660  
tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctctggaca aggggattac ctcggaag 720  
cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca atgcggcctc caactcgcg 780  
tcccaaatca aggtcgctt ggacaatgcg ggaagatta tgagcctgac taaaaccgcc 840  
cccgactacc tgggtggcca gcagccctg gaggacattt ccagcaatcg gatttataaa 900

atatttgaac taaacgggta cgatcccaaa tatgcggctt ccgtctttct gggatgggcc 960

acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggtctgttg ggcctgcaac taccggaag 1020

accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct acgggtgcgt aaactggacc 1080

aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg tgatctggtg ggaggagggg 1140

aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc tcggaggaag caaggtgcgc 1200

gtggaccaga aatgcaagtc ctggcccag atagaccga ctcccgatgat cgtcacctcc 1260

aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga ccttcgaaca ccagcagccg 1320

ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc tggatcatga ctttgggaag 1380

gtcaccaagc aggaagtcaa agactttttc cgggtgggcaa aggatcacgt ggttgaggtg 1440

gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa gacccgcccc cagtgcgcga 1500

gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc agccatcgac gtcagacgcg 1560

gaagcttcca tcaactacgc ggacaggtac caaaacaaat gttctcgtca cgtgggcatg 1620

aatctgatgc tgtttcctg cagacaatgc gagagactga atcagaattc aaatatctgc 1680

ttcactcagc gtgtcaaaga ctgttttagag tgttttcccg tgtcagaatc tcaaccggtt 1740

tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc atcacatcat gggaaaggtg 1800

ccagacgctt gcaactgcttg cgacctggtc aatgtggact tggatgactg tgtttctgaa 1860

caataa 1866

<210> 4

<211> 621

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 4

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp

1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu

20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile

35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu

50 55 60

Thr	Glu	Trp	Arg	Arg	Val	Ser	Lys	Ala	Pro	Glu	Ala	Leu	Phe	Phe	Val
65					70					75					80
Gln	Phe	Glu	Lys	Gly	Glu	Ser	Tyr	Phe	His	Met	His	Val	Leu	Val	Glu
				85					90					95	

Thr	Thr	Gly	Val	Lys	Ser	Met	Val	Leu	Gly	Arg	Phe	Leu	Ser	Gln	Ile
100						105				110					
Arg	Glu	Lys	Leu	Ile	Gln	Arg	Ile	Tyr	Arg	Gly	Ile	Glu	Pro	Thr	Leu
115						120				125					
Pro	Asn	Trp	Phe	Ala	Val	Thr	Lys	Thr	Arg	Asn	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly
130						135				140					
Asn	Lys	Val	Val	Asp	Glu	Cys	Tyr	Ile	Pro	Asn	Tyr	Leu	Leu	Pro	Lys
145						150				155				160	

Thr	Gln	Pro	Glu	Leu	Gln	Trp	Ala	Trp	Thr	Asn	Met	Glu	Gln	Tyr	Leu
165						170					175				
Ser	Ala	Cys	Leu	Asn	Leu	Thr	Glu	Arg	Lys	Arg	Leu	Val	Ala	Gln	His
180						185					190				
Leu	Thr	His	Val	Ser	Gln	Thr	Gln	Glu	Gln	Asn	Lys	Glu	Asn	Gln	Asn
195						200					205				
Pro	Asn	Ser	Asp	Ala	Pro	Val	Ile	Arg	Ser	Lys	Thr	Ser	Ala	Arg	Tyr
210						215					220				

Met	Glu	Leu	Val	Gly	Trp	Leu	Val	Asp	Lys	Gly	Ile	Thr	Ser	Glu	Lys
225				230				235				240			
Gln	Trp	Ile	Gln	Glu	Asp	Gln	Ala	Ser	Tyr	Ile	Ser	Phe	Asn	Ala	Ala
245				250				255							
Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Gln	Ile	Lys	Val	Ala	Leu	Asp	Asn	Ala	Gly	Lys
260				265				270							
Ile	Met	Ser	Leu	Thr	Lys	Thr	Ala	Pro	Asp	Tyr	Leu	Val	Gly	Gln	Gln
275				280				285							

Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu  
290 295 300  
Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala

305                      310                      315                      320  
 Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala  
                          325                      330                      335  
 Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro  
                          340                      345                      350  
  
 Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp  
                          355                      360                      365  
 Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala  
                          370                      375                      380  
 Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg  
 385                      390                      395                      400  
 Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val  
                          405                      410                      415  
  
 Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser  
                          420                      425                      430  
 Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe  
                          435                      440                      445  
 Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln  
                          450                      455                      460  
 Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val  
 465                      470                      475                      480  
  
 Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala  
                          485                      490                      495  
 Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val  
                          500                      505                      510  
 Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp  
                          515                      520                      525  
 Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu  
                          530                      535                      540  
  
 Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Leu Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys  
 545                      550                      555                      560

Phe Thr His Gly Val Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu  
565 570 575  
Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr  
580 585 590  
Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp  
595 600 605

Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu Gln  
610 615 620

<210> 5

<211> 2208

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV9 VP1 capsid of homo sapiens origin

<400> 5

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc	60
gagtgggtggg ctttgaacc tggagcccct caaccaagg caaatcaaca acatcaagac	120
aacgctcgag gtcttgtgt tccgggttac aaataccttg gaccggcaa cggactcgac	180
aagggggagc cggtaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc	300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag	360
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct	420
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggatttggc	480
aaatcgggtg cacagcccgc taaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag	540
tcagtccag acctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct	600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga	660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac	720
accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaac	780
tccaacagca catctggagg atcttcaa atgacaacgcct acttcggcta cagcaccccc	840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga	900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt	960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc	1020



acggtccagg tcttcacgga ctacagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggtgcc tcccgcggtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140

acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc 1200

ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttcagttca gctacagatt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc tcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620

ttaatttttg gcaaacaaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740

gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800

atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catittgggcc 1860

aaaattcttc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920

aagcacccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980

gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcaccaggt attctactgg ccaagtcagc 2040

gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaacct ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaagtgta 2160

tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctg 2208

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 6

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35                      40                      45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50                      55                      60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
  
 65                      70                      75                      80  
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85                      90                      95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100                      105                      110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro  
 115                      120                      125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
  
 130                      135                      140  
 Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165                      170                      175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180                      185                      190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
  
 195                      200                      205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210                      215                      220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225                      230                      235                      240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245                      250                      255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn  
  
 260                      265                      270  
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275                      280                      285

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300  
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
 340 345 350  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365  
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp  
 370 375 380  
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu  
 405 410 415  
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430  
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser  
 435 440 445  
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser  
 450 455 460  
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn  
 485 490 495  
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn  
 500 505 510  
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525  
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

530                      535                      540  
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser  
                          565                      570                      575  
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

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

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

705                      710                      715                      720  
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
                          725                      730                      735

<210> 7

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer prm504

<400> 7

gctgcgycaa ctggaccaat gagaac

<210> 8  
 <211> 27  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer prm505  
 <400> 8  
 cgcagagacc aagttcaact gaaacga 27

<210> 9  
 <211> 16  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> AAVhu68 spacer sequence  
 <400> 9  
 atgacttaaa ccaggt 16

<210> 10  
 <211> 736  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> AAVhu31 vpl capsid protein  
 <400> 10  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30

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



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

340					345					350						
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro	
355					360					365						
Ala	Asp	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr	Leu	Asn	Asp	
370					375					380						
Gly	Gly	Gln	Ala	Val	Gly	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe	
385					390					395					400	
Pro	Ser	Gln	Met	Leu	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr	Glu	
405					410					415						
Phe	Glu	Asn	Val	Pro	Phe	His	Ser	Ser	Tyr	Ala	His	Ser	Gln	Ser	Leu	
420					425					430						
Asp	Arg	Leu	Met	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr	Leu	Ser	
435					440					445						
Lys	Thr	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr	Leu	Lys	Phe	Ser	
450					455					460						
Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn	Met	Ala	Val	Gln	Gly	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro	
465					470					475					480	
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Thr	Thr	Val	Thr	Gln	Asn	
485					490					495						
Asn	Asn	Ser	Glu	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala	Leu	Asn	
500					505					510						
Gly	Arg	Asn	Ser	Leu	Met	Asn	Pro	Gly	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	
515					520					525						
Glu	Gly	Glu	Asp	Arg	Phe	Phe	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Leu	Ile	Phe	Gly	
530					535					540						
Lys	Gln	Gly	Thr	Gly	Arg	Asp	Asn	Val	Asp	Ala	Asp	Lys	Val	Met	Ile	
545					550					555					560	
Thr	Asn	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Thr	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Ser	
565					570					575						
Tyr	Gly	Gln	Val	Ala	Thr	Asn	His	Gln	Ser	Ala	Gln	Ala	Gln	Ala	Gln	
580					585					590						

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln  
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His  
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met  
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala  
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr  
660 665 670

Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln  
675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn  
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Ser Thr Glu Gly Val  
705 710 715 720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
725 730 735

<210> 11

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> AAVhu32 vpl capsid protein

<400> 11

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50	55	60	
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
145	150	155	160
Lys Ser Gly Ser Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
165	170	175	
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
290	295	300	

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305                      310                      315                      320  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn  
                          325                      330                      335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
                          340                      345                      350  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
                          355                      360                      365  
  
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp  
                          370                      375                      380  
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385                      390                      395                      400  
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu  
                          405                      410                      415  
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
                          420                      425                      430  
  
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser  
                          435                      440                      445  
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser  
                          450                      455                      460  
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn  
                          485                      490                      495  
  
 Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn  
                          500                      505                      510  
 Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys  
                          515                      520                      525  
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly  
                          530                      535                      540  
 Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile



545                      550                      555                      560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser

565                      570                      575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

580                      585                      590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595                      600                      605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610                      615                      620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met

625                      630                      635                      640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala

645                      650                      655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr

660                      665                      670

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

675                      680                      685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn

690                      695                      700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705                      710                      715                      720

Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

725                      730                      735

<210> 12

 $\langle 211 \rangle$  2211

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> AAVhu31 vp1 coding sequence

 $\langle 400 \rangle$ 

12

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aagcctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gaccggcaa cggactcgac 180  
aagggggagc cggtaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgaca ggctacgac 240  
cagcagctca agcccgaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cggcagttc 300  
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag 360  
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420  
  
ggaaagaaga ggctgtaga gcagctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480  
aaatcgggtg cacagccgc taaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540  
tcagtcagg accctcaacc aatcggagaa cctccgcag cccctcagg tgtgggatct 600  
cttacaatgg cticaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660  
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac 720  
accaccagca ccgaacctg ggccctgcc acctacaaca atcacctca caagcaaatc 780  
tccaacagca catctggagg atcttcaa atgacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840  
  
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900  
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcagctca acttcaagct cttcaacatt 960  
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc 1020  
acggtccagg tcttcacgga ctacagctat cagctccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080  
gagggtgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttctcagta cgggtatctg 1140  
acgttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct ttactgcct ggaatatctc 1200  
ccgtcgaaa tgctaagaac gggtacaac ttccagttca gctacgatt tgagaacgta 1260  
  
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcgc 1320  
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaaaaacg 1380  
ctaaaattca gtgtggcgg acccagcaac atggctgtcc aggaagaaa ctacatacct 1440  
ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaaaca caacagcgaa 1500  
tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggt ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560  
ggacctgcta tgccagcca caaagaagga gaggaccgtt tcttctctt gtctggatct 1620  
ttaattttt gcaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atcgggaca agtcatgata 1680  
  
accaacgaag aagaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740  
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800  
atacttcgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc ctttgggcc 1860  
aaaattcctc acacggacgg caactttcac ctttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920  
aagcacccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tctccaacg 1980

gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcaccagct attctactgg ccaagtcagc 2040  
gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160  
tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 13  
<211> 2211  
<212> DNA  
<213> Artificial sequence  
<220><223> AAVhu32 vp1 coding sequence  
<400> 13

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctgaggaca ctctctctga aggaataaga 60  
cagtgggtgga agctcaaacc tggcccacca ccaccaaagc ccgcagagcg gcataaggac 120  
gacagcaggg gtcttgtgct tcctgggtac aagtacctcg gaccggcaa cggactcgac 180  
aaggggggagc cggtaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300  
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360  
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420  
ggaaagaaga ggcttctaga gcagctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480  
aaatcgggtt cacagccgc taaaaagaaa ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540  
tcagtccccg acctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600  
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac 720  
accaccagca cccgaacctg ggcctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaac 780  
tccaacagca catctggagg atcttcaa atgacaacgct acttcggcta cagcaccccc 840  
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900  
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960  
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc 1020  
acggtccagg tcttcacgga ctgagactat cagctcccg acgtgctcgg gtcggtcac 1080

gagggtgcc tcccgcgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140  
acgttaatg atgggagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc 1200  
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320  
 gaccaatact tgtactatct ctcaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380  
 ctaaaattca gcgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440  
 ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560  
 ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620  
 ttaatttttg gcaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680  
 accaacaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740  
 gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800  
 atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860  
 aaaattcttc acacggacgg caactttcac ctttctccgc taatgggagg gtttggaatg 1920

aagcacccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980  
 gctttcaata aggacaagct gaactctttc atcaccagct attctactgg ccaagtcagc 2040  
 gtggagattg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100  
 tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160  
 tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 14

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified hu68vp1

<220><221> MISC\_FEATURE

<222>

> (23)..(23)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (66)..(66)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (97)..(97)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> misc\_feature

<222> (113)..(113)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorilated S

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (247)..(247)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (253)..(253)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (259)..(259)

<223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid

(alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of

alpha- and gamma-glutamic acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (270)..(270)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (297)..(297)

<223> Xaa represents D (Asp, aspartic acid) or amidated D to N (Asn, asparagine)

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (304)..(304)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (306)..(306)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (314)..(314)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (319)..(319)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (329)..(329)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (332)..(332)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (336)..(336)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (384)..(384)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (404)..(404)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE



<222> (409)..(409)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (436)..(436)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (452)..(452)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (477)..(477)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (499)..(499)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (512)..(512)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (515)..(515)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (518)..(518)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (524)..(524)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (559)..(559)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (569)..(569)

<223> Xaa may be T (Thr, threonine), or Phosphorylated T

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (586)..(586)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (599)..(599)

<223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid  
(alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of  
alpha- and gamma-glutamic acid

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (605)..(605)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (619)..(619)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (628)..(628)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (640)..(640)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (651)..(651)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (663)..(663)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (666)..(666)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (689)..(689)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (693)..(693)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (695)..(695)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W.

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (709)..(709)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC\_FEATURE

<222> (735)..(735)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<400> 14

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Xaa Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Xaa Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Xaa Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

Val Xaa Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Xaa His Ala

85 90 95

Xaa Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Xaa Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Xaa Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140

Pro Val Glu Gln Xaa Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly

145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser  
 210 215 220  
  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Xaa Ala Leu Pro Thr Tyr Xaa Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Xaa Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Xaa Asp Asn  
 260 265 270  
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg  
 275 280 285  
  
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Xaa Trp Gln Arg Leu Ile Asn Xaa  
 290 295 300  
 Asn Xaa Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Xaa Phe Lys Leu Phe Xaa Ile  
 305 310 315 320  
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Xaa Gly Val Xaa Thr Ile Ala Xaa  
 325 330 335  
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu  
 340 345 350  
  
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365  
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Xaa  
 370 375 380  
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Xaa Leu Arg Thr Gly Xaa Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu

405	410	415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu		
420	425	430
Asp Arg Leu Xaa Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser		
435	440	445
Lys Thr Ile Xaa Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser		
450	455	460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Xaa Tyr Ile Pro		
465	470	475
		480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn		
485	490	495
Asn Asn Xaa Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Xaa		
500	505	510
Gly Arg Xaa Ser Leu Xaa Asn Pro Gly Pro Ala Xaa Ala Ser His Lys		
515	520	525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly		
530	535	540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Xaa Ile		
545	550	555
		560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Xaa Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser		
565	570	575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Xaa Ala Gln Ala Gln Ala Gln		
580	585	590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Xaa Val Trp Gln		
595	600	605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Xaa Ala Lys Ile Pro His		
610	615	620
Thr Asp Gly Xaa Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Xaa		
625	630	635
		640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Xaa Thr Pro Val Pro Ala		
645	650	655

Asp	Pro	Pro	Thr	Ala	Phe	Xaa	Lys	Asp	Xaa	Leu	Asn	Ser	Phe	Ile	Thr
660				665				670							
Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln
675				680				685							
Xaa	Glu	Asn	Ser	Xaa	Arg	Xaa	Asn	Pro	Glu	Ile	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn
690				695				700							
Tyr	Tyr	Lys	Ser	Xaa	Asn	Val	Glu	Phe	Ala	Val	Asn	Thr	Glu	Gly	Val
705				710				715				720			
Tyr	Ser	Glu	Pro	Arg	Pro	Ile	Gly	Thr	Arg	Tyr	Leu	Thr	Arg	Xaa	Leu
725				730				735							