



등록특허 10-2423442



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월20일

(11) 등록번호 10-2423442

(24) 등록일자 2022년07월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7019747
(22) 출원일자(국제) 2016년12월09일
심사청구일자 2021년12월06일
(85) 번역문제출일자 2018년07월10일
(65) 공개번호 10-2018-0097629
(43) 공개일자 2018년08월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/065969
(87) 국제공개번호 WO 2017/100671
국제공개일자 2017년06월15일
(30) 우선권주장
62/266,184 2015년12월11일 미국(US)
62/421,891 2016년11월14일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160130996 A
Journal of Virology (2000) Vol.74, No. 18,
pp1-11
US20150079038 A1

(73) 특허권자
캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 캘리포니아 파사데나 엠씨 6-32 이스트 캘리포니아 블러바드 1200 (우: 91125)
(72) 발명자
더버만, 벤자민, 이.
미국 캘리포니아 91125, 파사데나 엠씨 6-32, 이스트 캘리포니아 블러바드 1200, 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
그라디나루, 비비아나
미국 캘리포니아 91125, 파사데나 엠씨 6-32, 이스트 캘리포니아 블러바드 1200, 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
찬, 켄, 와이.
미국 캘리포니아 91125, 파사데나 엠씨 6-32, 이스트 캘리포니아 블러바드 1200, 캘리포니아 인스티튜트 오브 테크놀로지
(74) 대리인
이명진

전체 청구항 수 : 총 6 항

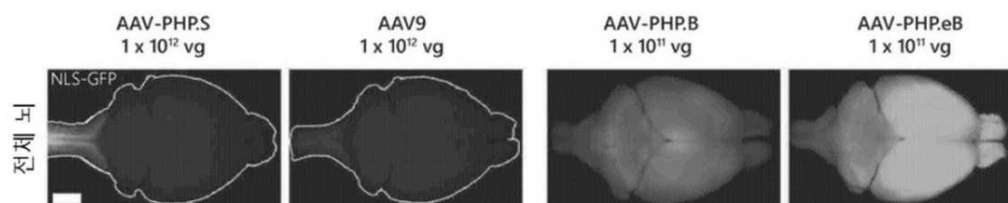
심사관 : 손영희

(54) 발명의 명칭 **아데노-관련 바이러스를 지시하기 위한 타겟팅 펩타이드**

(57) 요약

본 발명은 개체에서 특정 환경, 예를 들어 신경계 및 심장을 표적으로 하기 위해 아데노-관련 바이러스 (adeno-associated viruses, AAV)를 지시(directing)할 수 있는 펩타이드 서열을 제공한다. 또한, 상기 제공된 펩타이드 서열을 포함하는 비-자연적으로 발생하는 캡시드 단백질을 갖는 AAV, 및 질병을 치료하기 위해 상기 AAV를 사용하는 방법을 제공한다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

C07K 7/06 (2013.01)

C12N 2750/14141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

11 개의 연속적인 아미노산 서열을 포함하는 AAV 펩타이드로서,
상기 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호: 4-15 중 하나인 것을 특징으로 하는, AAV 펩타이드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호: 4인 것을 특징으로 하는, AAV 펩타이드.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호: 5인 것을 특징으로 하는, AAV 펩타이드.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호: 6인 것을 특징으로 하는, AAV 펩타이드.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호: 9인 것을 특징으로 하는, AAV 펩타이드.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 AAV 펩타이드를 포함하는 AAV 캡시드 단백질.

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

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

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 출원은 35 U.S.C. § 119 (e)에서 2015년 12월 11일에 출원된 미국 가출원 제62/266184호 및 2016년 11월 14일에 출원된 미국 가출원 제62/421891호에 기초하여 우선권을 주장한다. 본 출원은 또한 2014년 9월 12일에 출원된 미국 특허 출원 제14/485024호와 관련이 있다. 이들 관련 출원의 내용은 본 명세서에 전체적으로 참조로 포함된다.

[0003] 정부 지원 연구개발 보고서

[0004] 본 발명은 5R01AG047664, IDP2NS087949, 5U01NS090577 및 1R21MH103824-01 승인 하에 정부 지원으로 완성되었으며, 국립 보건원(National Institutes of Health)이 수여하였다. 정부는 본 발명에 대해 특정 권리를 가지고

있다.

[0005] 서열 목록 참조

[0006] 본 출원은 전자 형식으로 서열 목록과 함께 제출된다. 서열 목록은 40Kb 크기인 2016년 12월 9일에 생성된 SEQLISTING.TXT라는 제목의 파일로 제공된다. 서열 목록의 전자 형식에서 정보는 그 전체가 본 명세서에 참조로 포함된다.

[0007] 기술분야

[0008] 본 출원은 일반적으로 유전자 전달 분야에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 출원은 표적 조직 또는 기관에 아데노-관련 바이러스(AAV)를 지시(directing)할 수 있는 펩타이드 서열, 새로운 재조합 AAV, 및 다양한 질병을 치료하기 위해 AAV를 사용하는 방법과 관련이 있다.

배경 기술

[0009] 관련 기술의 설명

[0010] 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV)는 유전자 치료를 수행하고 매우 다양한 기본 과학 연구에 중요한 유전자 전달을 촉진하기 위해 생체 내에서 유전자 전달에 사용되는 벡터이다. 여러 가지 특성은 rAAV를 유전자 전달 매개체로서 매력적으로 만든다: (i) 그들은 장기적인 이식유전자 발현을 제공한다, (ii) 그들은 알려진 인간 질병과 관련이 없다, (iii) 그들은 상대적으로 약한 면역 반응을 이끌어 낸다, (iv) 그들은 분열 및 분열하지 않는 다양한 세포 유형을 형질도입 할 수 있으며 (v) rAAV 게놈은 다른 형질도입 특성 및 조직 친화성을 갖는 다양한 캡시드, 또는 바이러스의 단백질 껍질 안에 패키징(packaging)될 수 있다. rAAV 벡터를 사용하는 유전자 치료는 Leber의 선천적인 흑내장, IX 인자 결핍과 관련된 혈우병 및 지단백 리파아제 결핍에 대한 치료를 포함하는 임상 시험에서 성공적이었다. 또한, rAAV-유전자 기반 치료는 Rett 증후군, 선천성 ALS, 파킨슨병, 헌팅턴병 및 척추성 근위축증을 포함한 다양한 질병에서의 사전 임상 모델에서 성공적이었다. rAAV 기반 치료는 HIV와 인플루엔자와 같은 전염병을 치료하기 위해 중화항체를 전달하는데 성공으로 보여졌다. rAAVs는 또한 광유전학(optogenetic)과 같은 비치료 과학 연구를 위한 이식 유전자의 생체 내 전달을 위한 일반적인 벡터이다. 그러나, 많은 적용을 위한 과학 연구에 질병의 치료 및 유전자의 전달을 위한 rAAV의 성공적인 사용은 특정 어려운 세포 유형을 효율적으로 형질도입할 수 있는 캡시드 혈청형의 부족 및 전신 전달 후 효율적 및 선택적으로 원하는 세포 유형/기관을 표적으로 할 수 있는 혈청형의 부족으로 인해 제한되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 서열 QAVRTSL(서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 AAV 벡터를 제공한다. 아미노산 서열은 예를 들어 AAV 벡터의 캡시드 단백질의 일부일 수 있다. 일부 실시양태에서, 서열 QAVRTSL(서열번호: 37)은 벡터(서열번호: 45)의 AAV 서열의 AA588-589 사이에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 서열 QAVRTSL(서열번호: 37)은 벡터(서열번호: 45)의 AAV 서열의 AA586-592 사이에 삽입된다. 일부 실시양태에서, 상기 아미노산 서열은 서열번호 45의 아미노산 587, 588, 589 또는 590 중 적어도 2개를 더 포함한다.

[0012] 또한, 본 발명은 11 개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열을 포함하는 AAV 벡터를 제공하며, 여기서

[0013] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;

[0014] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;

[0015] X_3 는 T, S 또는 N;

[0016] X_4 는 L 또는 V;

- [0017] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0018] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0019] X_7 은 P;
- [0020] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0021] X_9 은 K, R 또는 S;
- [0022] X_{10} 은 A 또는 N; 및
- [0023] X_{11} 은 Q 또는 P이고, 여기서 AAV 벡터는 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)를 포함하지 않는다. 일부 실시 양태에서, 11 개의 연속적인 아미노산 서열은 타겟팅(targeting) 펩타이드의 일부이거나 또는 이를 포함한다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D, X_2 는 G, X_3 은 T, X_4 는 L, X_6 은 V 또는 T, X_8 은 F, 이들의 임의의 조합이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D, X_2 는 G, X_3 은 T, X_4 는 L, X_6 은 V 또는 T, 또는 X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D, X_2 는 G, X_3 은 T, X_4 는 L, X_6 은 V 또는 T, 및 X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, X_4 는 L, X_5 는 A, X_6 는 V, X_7 은 P, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3$ 은 DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 X_1X_2 는 AQ, X_6 은 V, X_7 은 P, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, X_3 은 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_5 는 A이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 는 AQTAV 및 $X_{10}X_{11}$ 은 AQ이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_7X_8X_9$ 은 PFK이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 은 AQTAVPF이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAP, 또는 SNP이다. 일부 실시 양태에서, 11개의 연속적인 아미노산 서열은 AAV 벡터의 캡시드 단백질의 일부이다. 일부 실시 양태에서, 11개의 연속적인 아미노산 서열은 벡터의 AAV 캡시드 단백질 서열, 예를 들어 서열번호 45의 AA586-589 사이에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 11개의 연속적인 아미노산 서열은 서열번호 1-36 중 하나이다.
- [0024] 본 발명은 본 발명에 개시된 하나 이상의 AAV 벡터 및 하나 이상의 약학적으로 허용가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 펩타이드를 제공하고, 상기 펩타이드는 서열번호 1-44, 48-53, 65-68, 및 80-93 중 하나에 기재된 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 펩타이드는 나노 입자, 제 2 분자, 바이러스의 캡시드 단백질, 또는 이들의 조합에 결합된다. 일부 실시 양태에서, 펩타이드는 AAV의 일부이다. 예를 들어, 펩타이드는 AAV의 캡시드 단백질 일 수 있다.
- [0026] 본 발명에 개시된 일부 실시 양태는 타겟팅 펩타이드 및 그의 단편을 포함하는 모든 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 하나 이상의 타겟팅 펩타이드를 포함하는 캡시드 단백질을 제공한다. 예를 들어, 캡시드 단백질은 서열 QAVRTSL(서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 캡시드 단백질은 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열을 포함하며, 여기서
- [0028] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;
- [0029] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;
- [0030] X_3 는 T, S 또는 N;
- [0031] X_4 는 L 또는 V;

- [0032] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0033] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0034] X_7 은 P;
- [0035] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0036] X_9 은 K, R 또는 S;
- [0037] X_{10} 은 A 또는 N; 및
- [0038] X_{11} 은 Q 또는 P이고, 여기서 캡시드 단백질은 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)를 포함하지 않는다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D, X_2 는 G, X_3 은 T, X_4 는 L, X_6 은 V 또는 T, 또는 X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, X_4 는 L, X_5 는 A, X_6 는 V, X_7 은 P, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3$ 은 DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 X_1X_2 는 AQ, X_6 은 V, X_7 은 P, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, X_3 은 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_5 는 A이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 는 AQTAV 및 $X_{10}X_{11}$ 은 AQ이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_7X_8X_9$ 은 PFK이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 은 AQTAVPF이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다. 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 캡시드 단백질 및 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열을 제공한다.
- [0039] 본 발명은 또한 필요로 하는 개체의 표적 환경에 핵산을 전달하는 방법을 제공한다. 일부 실시 양태에서, 상기 방법은 하기의 단계를 포함한다: AAV를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 여기서 상기 AAV는 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하며, 여기서 상기 AAV는 상기 개체의 표적 환경에 전달되는 핵산을 포함하고, 여기서
- [0040] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;
- [0041] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;
- [0042] X_3 는 T, S 또는 N;
- [0043] X_4 는 L 또는 V;
- [0044] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0045] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0046] X_7 은 P;
- [0047] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0048] X_9 은 K, R 또는 S;
- [0049] X_{10} 은 A 또는 N; 및
- [0050] X_{11} 은 Q 또는 P이고, 여기서 캡시드 단백질은 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)를 포함하지 않는다; 및 상기 조성물을 상기 개체에 투여하는 단계. 일부 실시 양태에서, 상기 방법은 하기 단계를 포함한다: AAV를 포함하는 조성물을 제공하는 단계, 여기서 상기 AAV는 서열 QAVRTSL(서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질을 포함하며, 여기서 상기 AAV는 상기 개체의 표적 환

경에 전달되는 핵산을 포함한다; 및 상기 조성물을 상기 개체에 투여하는 단계. 상기 표적 환경은 예를 들어, 심장, 신경계, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 표적 환경은 중추 신경계, 말초 신경계, 심장, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시 양태에서, 상기 표적 환경은 뉴런, 별아교세포, 심근세포, 또는 이들의 조합이다. 일부 실시 양태에서, 상기 조성물은 약학적 조성물이다. 일부 실시 양태에서, 신경계에 전달되는 핵산은 다음 중 하나 이상을 포함한다: a) 영양 인자, 성장 인자, 또는 가용성 단백질을 암호화하는 핵산 서열; b) 유전자에 유전적 돌연변이를 가지고 있는 사람 또는 동물에게 단백질 기능을 회복시키는 cDNA; c) 세포의 활성 또는 상태를 조절하거나 변화시키는데 사용될 수 있는 단백질을 암호화하는 cDNA; d) 세포의 상태를 평가하는데 사용되는 단백질 또는 핵산을 암호화하는 cDNA; e) 게놈 공학을 수행하기 위한 cDNA 및/또는 관련 가이드 RNA; f) 상동 재조합을 통한 게놈 편집을 위한 서열; g) 치료용 RNA를 암호화하는 DNA 서열; h) shRNA 또는 인공 miRNA 전달 시스템; 및 i) 내인성 유전자의 스플라이싱(splicing)에 영향을 미치는 DNA 서열. 상기 필요로 하는 개체는 예를 들어, 만성 통증, 심부전, 심부정맥, 프리드라이히 운동실조, 헌팅턴병(HD), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 척수근위축증 I형 및 II형(SMA I 및 II), 프리드라이히 운동실조(FA), 척수소뇌실조증, 중추 신경계 내 세포를 수반하는 리소좀 축적질환 중 하나 이상을 앓고 있거나 발병 위험이 있는 개체일 수 있다. 리소좀 축적질환은 예를 들어, 크라베병, 샌드호프병, 테이삭스병, 고세병(I형, II형 또는 III형), 니만피크병(NPC1 또는 NPC2 결핍), 후롤러증후군, 폼페병, 또는 배튼병일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV는 정맥 내 투여 또는 전신 투여를 통해 개체에게 투여된다. 상기 신경계는 예를 들어, 중추 신경계일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산은 상기 개체의 후근신경절, 내장 기관, 또는 이들의 조합에 전달된다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산은 상기 개체의 별아교세포, 뉴런, 또는 이들의 조합에 전달된다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체는 성체 동물이다.

도면의 간단한 설명

[0051]

도 1은 AAV-PHP.B-XXX 라이브러리를 생성하기 위해 사용된 다양화 전략의 개략도이다. AAV-PHP.B 7-mer를 포함하는 AAV 캡시드는 7mer 삽입으로부터 2개의 아미노산(이하 "AA"로 언급됨)에서 시작하여 +9 AA로 계속되는 XXX로 표시된 3개의 연속적인 아미노산 위치에서 다양화되었다. 각 XXX 라이브러리는 2AA만큼 이동되었다. 11개의 AA에 걸쳐 5개의 XXX 라이브러리가 생성되었다. 그 다음 AAV-PHP.B-XXX PCR 단편을 미국공개특허 2015/0079038호에 기재된 바와 같이 rAAV-Cap-in-cis-수용체 플라스미드로 조립하였다. 또한, 이 rAAV 게놈은 별아교세포, GAGA활성화(GAGAergic) 뉴런, 및 글루탐산성 뉴런 각각을 형질도입하는 변이체의 선별을 위해, 성인 GFAP-Cre, Vgat-IRES-Cre 및 Vglut-IRES-Cre 마우스에 일회분 1×10^{11} vg/마우스의 용량으로 주입된 AAV 바이러스 라이브러리를 생성하는데 사용되었다. 2회 선별 후, 다수의 변이체가 Cre 라인 중 하나 이상으로부터 회복된 서열에서 농축된 것으로 밝혀졌다. 이들 서열 중 하나인 AAV-PHP.N (DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4))이 개별적인 변이체로서 특성화를 위해 선택되었다. AAV-PHP.B로부터 변화된 상기 AAV-PHP.N의 세 아미노산은 DGT이며 AAV-PHP.B와 다른 서열은 DG이다.

도 2는 AAV-PHP.N이 AAV-PHP.B 보다 더 효율적으로 CNS 뉴런을 형질도입하는 것을 나타낸 도면이다. 이미지는 AAV-PHP.B (상단) 또는 AAV-PHP.N (하단) 안에 싸여진 AAV-CAG-mNeonGreen의 저 투여량 (3.3×10^{10} vg/마우스)의 정맥 내 주사 2주 후에 촬영되었다. 밝은 반점은 mNeonGreen 단백질의 발현을 나타낸다 (그러므로 AAV의 형질도입). 이미지는 AAV-PHP.B 발현과 비교하여 피질, 소뇌 및 텐테이트 자이러스(Gentate gyrus)에서 더 높은 AAV-PHP.N 발현을 보여준다. 따라서, AAV-PHP.B와 비교하여 AAV-PHP.N은 여러 뇌 영역에서 뉴런의 형태와 함께 세포의 더 큰 형질도입을 제공한다. 스케일 바는 200 μ m이다.

도 3A-3D는 AAV9와 비교하여 마우스 심장 및 말초 신경에서 AAV-PHP.S의 향상된 형질도입을 나타낸다. **도 3A**는 성체 마우스에 ssAAV9:CAG-NLS-GFP 또는 ssAAV-PHP.S:CAG-NLS-GFP (NLS, 핵 국소화 신호)의 2×10^{12} vg/마우스의 정맥 내 주사 3주 후 마우스의 배면 척수에 들어가는 감각 섬유를 나타낸다. AAV-PHP.S는 AAV9 처리 샘플에 비해 AAV-PHP.S 처리 샘플의 더 밝은 염색으로 나타난 바와 같이 AAV9보다 감각 섬유에서 더 강한 GFP 발현을 제공한다. **도 3B**는 재조합 단일 가닥 (ss)AAV9:CAG-GFP-2A-Luc 또는 ssAAV-PHP.S:CAG-GFP-2A-Luc의 1×10^{12} 벡터 게놈 (vg)/마우스의 정맥 내 투여 3주 후 심장에서 밝은 신호로 나타난 GFP 단백질 발현으로부터 자연 형광 이미지를 나타낸다. **도 3C**는 ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen의 1×10^{12} vg 및 ssAAV-PHP.S:CAG-mTurquoise의 1×10^{12} vg 혼합물의 주사 4주 후 마우스의 후근 신경절에서 자연 형광을 나타내는 3D 투영 이미지를 나타낸다. 두 채널은 회색조 이미지에 함께 나타난다. **도 3D**는 정맥 내 주사 후 장의 신경계 내에서 세포를 형질도입하는 AAV-PHP.S를 나타낸다. 밝은 반점은 AAV-PHP.S에 의해 형질도입된 세포를 표시한다. 이미지는 1×10^{12} vg/마우스

ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen의 정맥 내 투여 3 주 후에 평가된 성체 마우스 장으로부터 최대 강도 투영을 나타낸다. 밝은 반점은 AAV-PHP.S 벡터로부터 mNeon-Green 발현을 나타낸다(왼쪽 패널과 오른쪽 위 패널 참조). 근 중간신경총 뉴런은 pgp9.5에 대한 항체로 식별되고 DAPI에 의해 식별된 핵은 오른쪽 하단 패널에 표시된다.

도 4A-4G는 형질도입된 표적 세포들로부터 AAV 캡시드 서열의 Cre-의존성 회복을 나타낸다. **도 4A**는 CREATE 선별 과정의 개요를 나타낸다. PCR은 캡시드 유전자 단편에 다양성(전체 시각의 스펙트럼 수직 밴드)을 도입하기 위해 사용된다. 상기 단편은 남아있는 캡시드 유전자를 가지고 있는 rAAV 게놈 안에 클로닝되고 바이러스 변이체의 라이브러리를 생성하기 위해 사용된다. 상기 라이브러리는 Cre 유전자이식 동물에 주입되고 PCR은 Cre⁺ 세포로부터 캡시드 서열을 선택적으로 회복하기 위해 사용된다. **도 4B**는 rAAV-Cap-in-cis-lox rAAV 게놈을 나타낸다. Cre는 lox71 및 lox66 부위에 의해 측면에 위치한 폴리아데닐화(pA) 서열을 역전시킨다. PCR 프라이머(반화살표)는 Cre-재조합 서열을 선택적으로 증폭시키는데 사용된다. **도 4C**는 2 개의 Cre⁺ 또는 Cre⁻ 마우스로부터 회복된 캡시드 라이브러리 서열의 Cre 재조합-의존성(상단) 및 -비의존성(하단) 증폭으로부터의 PCR 산물을 나타낸다. 개략도(하단)는 PCR 증폭 전략을 나타낸다(상세한 것은 도 8A-8B 참조). **도 4D**는 Rep-AAP AAV 헬퍼 플라스미드 내의 AAV 유전자 및 cap 유전자에 의해 암호화되는 단백질의 개략도이다. cap 유전자에 삽입된 정지 코돈은 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질 발현을 제거한다. **도 4E**는 표준 AAV2/9 rep-cap 헬퍼 및 rAAV-UBC-mCherry 게놈(중간)으로 생산되거나 또는 AAV2/9 rep-AAP 및 rAAV-UBCmCherry 게놈(하단)으로 생산된 vg와 비교하여 분열 AAV2/9 rep-AAP 및 rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈(상단)으로 생산된 DNase 내성 AAV 벡터 게놈(vg)을 나타낸다. 그룹당 N=3의 독립적인 실험; 평균 \pm s.d.; ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$; 일반적인 ANOVA 및 Tukey 다중 비교 테스트. **도 4F**는 7-mer 캡시드 라이브러리를 rAAV-ΔCap-in-cis 벡터에 클로닝 하는 것을 나타낸다. **도 4G**는 AAV9 표면 모델을 나타낸다. **도 4F-4G**는 AA588-589 사이에 삽입된 7-mer의 위치를 나타낸다.

도 5A-5G는 성체 마우스에서 정맥 내 주사 후 CNS를 통해 AAV-PHP.B 매개된 유전자 전달을 나타낸다. **도 5A-5F**에서, 1×10^{12} vg/마우스 또는 1×10^{11} vg/마우스의 용량으로 ssAAV9:CAG-GFP 또는 ssAAV-PHP.B:CAG-GFP를 성체 마우스에게 정맥 내 주사하였다. **도 5A**는 주사 3주 후에 각각 AAV9(좌측) 및 AAV-PHP.B(중간 및 우측)를 투여한 마우스에서 GFP 발현 이미지(지시된 캡시드에 의해 전달된 ssAAV 게놈으로부터의 발현을 나타내는)를 나타낸다. GFP 발현은 밝은 신호로 나타난다. **도 5B**는 50 μ m의 최대 강도 투영(MIP) 공 초점 이미지에서 피질(cortex) 또는 선조체(striatum)에서 GFP (밝은 신호로 표시됨)의 발현을 나타낸다. **도 5C**는 PARS-제거된 허리 척수에서 GFP 단백질(밝은 신호로 표시됨)의 발현을 나타낸다. **도 5D**는 망막에서 GFP 단백질(밝은 신호로 표시)의 발현을 나타낸다(좌측: 20 μ m MIP, 횡단면; 우측: 전체 탑재 MIP). **도 5E-5F**는 피질 및 선조체를 형질도입시킨 AAV-PHP.B로부터 PARS-제거된 조직의 3D MIP 이미지에서 GFP 단백질 (밝은 신호로 표시)의 발현을 나타내며, AAV9(상단) 및 AAV-PHP.B(하단)으로 형질도입된 마우스 유래 장기를 나타낸다. **도 5F**에서, 화살표는 캡시드 단백질을 발현하는 신경을 강조한다. 체장의 이미지에 있는 별표는 GFP를 발현하는 섬세포를 나타낸다. 3D 투영법의 주요 눈금은 100 μ m이다. **도 5G**는 성체 마우스에 정맥 내 주사 1×10^{11} vg 투여 25일 후에, 표시된 CNS 영역 및 기관에서의 AAV 생체 내 분포를 나타낸다. AAV-PHP.B의 경우 N=3이고 AAV9의 경우 n=4; 평균 \pm s.d.; ** $p < .01$, *** $p < .001$, Holm-Sidak 방법으로 다중 비교를 위해 언페어드(unpaired) t 검정을 검사하였다. 스케일 바: 1mm(도 5A 및 도 5C (좌측)); 50 μ m (도 5B, 5C (우측), 5D, 및 5E). 도 5C, 5E 및 5F에서 3D 투영에서의 주요 눈금 표시는 100 μ m이다.

도 6A-6I는 AAV9보다 더 효율적으로 다중 CNS 세포 유형을 형질도입하는 AAV-PHP.B를 나타낸다. **도 6A-6E**는 AAV-PHP.B가 별아교세포, 희소돌기아교세포 및 뉴런을 형질 도입하는 것을 보여주는 이미지이다: 성체 마우스에 ssAAV-PHP.B:CAG-GFP의 1×10^{11} (도 6A) 또는 1×10^{12} (도 6B-6E)의 정맥 내 주사 3주 후 GFP 단백질의 발현. **도 6A**는 해마에서 염색 MIP 이미지를 나타낸다. 밝은 신호는 AAV-PHP.B 구조의 발현을 나타내며 어두운 신호는 GFAP 발현을 나타낸다. **도 6B**는 피질에서 AAV-PHP.B 및 CC1 마커의 발현을 검출하기 위해 면역 조직 화학을 나타낸다. 번호가 매겨진 상자는 이중 양성 세포의 예를 표시한 것이다. 해당 단일 채널 이미지가 표시된다(우측). 별표는 검출 가능한 GFP 발현 없이 세포를 강조시킨다. **도 6C**는 표시된 뇌 영역에서 AAV-PHP.B 및 NeuN 마커의 형질도입을 검출하기 위해 면역 조직 화학을 나타낸다. **도 6D**는 중뇌에서 AAV-PHP.B 및 TH IHC의 형질도입을 보여주는 GFP 형광의 MIP 이미지를 나타낸다. **도 6D**는 소뇌에서 AAV-PHP.B 형질도입 및 칼빈딘(Calb) IHC를 나타낸다. **도 6F-6H**는 주사 3주 후 표시된 뇌 영역에서 AAV-PHP.B 형질전환에 대해 양성인 세포의 백분율을 정량화한 것을 나타낸다. **도 6I**는 ChAT 척수 운동 뉴런을 형질도입시키는 AAV-PHP.B를 나타낸다. 밝은 반점은 AAV-PHP.B 발현을 나타낸다. 어두운 신호는 ChAT에 대한 IHC를 나타낸다. 이미지는 전체 척수 횡단면 (좌측) 또는 복측 각 MIP 이미지 (우측)를 나타낸다. 전체 척수 횡단면 (좌측) 또는 복측 각 MIP 이미지 (우측)에서 ChAT

의 비율. 각 척수 영역에서 AAV-PHP.B를 발현한 ChAT 뉴런의 비율은 $\pm 95\%$ 신뢰 구간으로 주어진다. 정량화를 위해, 그룹당 $n=5$; 평균 \pm s.d.; AAV9 대 AAV-PHP.B 평균의 모든 쌍은 Holm-Sidak 방법으로 다중 비교를 위한 언페어드(unpaired) t 검정과 다른 것으로 판명되었다 ($***p<0.001$). 스케일 바: 20 μm (도 6A-6B 및 도 6D), 50 μm (도 6C 및 6I (우측)), 200 μm (도 6E) 및 1 mm (도 6I (좌측)).

도 7A-7F는 CNS 별아교세포의 AAV-PHP.A 형질도입 및 말초 기관에 대한 굴절률 감소를 나타낸다. **도 7A-7C** 및 **7E**는 3×10^{11} 의 ssAAV9:CAG-GFP 또는 ssAAV-PHP.A:CAG-GFP를 성체 마우스에 정맥 내 주사 한 후 3주 후에 AAV-PHP.A의 발현을 나타낸다. **도 7A-7B**는 ssAAV9:CAG-GFP 및 AAV-PHP.A:CAG-GFP에 대한 IHC의 대표적인 이미지를 나타낸 것이다. **도 7C**는 해마에서 GFP 단백질에 대한 IHC를 나타낸다. 어두운 신호는 해마에서 GFAP에 대한 IHC를 나타낸다. 번호가 매겨진 상자는 GFP 단백질 및 GFAP를 둘 다 발현하는 세포의 예를 표시한 것이다. 해당 단일 채널 이미지가 오른쪽에 표시된다. **도 7D**에서, ssAAV-PHP.A:CAG-NLS-GFP의 2.5×10^{11} vg를 성인 마우스에 정맥 내 주사 하였다. 그래프는 NLS-GFP에 대해 양성인 Aldh111 및 NeuN 세포의 백분율(%) 측정값을 나타낸다. **도 7E**는 간에서의 AAV-PHP.A 발현 (밝은 신호)을 나타낸다(조직 자기 형광은 어두운 신호로 나타낸다). **도 7F**는 성인 마우스에 1×10^{11} vg의 정맥 내 주사 후 25 일째에 CNS 영역 및 말초 기관에서의 AAV 생체 내 분포를 나타낸다. 도 7E-7F에서, 그룹당 $N=4$; 평균 \pm s.d.: $*p<0.05$, $**p<0.01$, $***p<0.001$, Holm-Sidak 방법으로 다중 비교를 위해 언페어드(unpaired) t 검정을 검사하였다. 스케일 바: 1mm (도 7A); 100 μm (도 7B); 50 μm (도 7C).

도 8A-8B는 PCR 산물 및 rAAV-Cap-in-cis 게놈의 개략도를 나타낸다. **도 8A**는 아미노산 588 이후에 삽입된 무작위 서열(전체 스펙트럼 수직 막대로 표시)의 7개 아미노산(본 발명에서 "7AA"로 나타냄)을 갖는 PCR 산물의 개략도이다. 라이브러리를 생성하는데 사용된 프라이머는 이름 및 절반 화살표에 의해 표시된다. PCR 주형은 캡시드 유전자 단편(xE) 내에서 자연적으로 발생하는 Ear1 제한 부위를 제거하기 위해 변형되었다(자세한 내용은 실시예 참조). **도 8B**는 벡터 게놈을 정량화하고 Cre 발현 세포를 형질도입시킨 서열을 회복하는데 사용된 프라이머 및 rAAV-Cap-in-cis 게놈을 나타내는 개략도이다. PCR 기반 회복은 두 단계로 수행된다. 단계 1은 하류 폴리 아데닐화(pA) 서열의 Cre-의존성 역전을 거친 게놈으로부터의 Cap 서열을 선택적으로 증폭시킴으로써 표적 세포 특이적 서열 회복을 제공한다. 1 단계의 경우, 9CapF는 정방향 프라이머로서 작용하고, CDF 프라이머는 Cre에 의해 재조합된 주형에서 역방향 프라이머로서 작용한다. 2 단계는 rAAV- Δ Cap-in-cis 플라스미드 (라이브러리 재생)에 클로닝되는 PCR 산물을 생성하기 위해 또는 AAV2/9 rep-cap 트랜스 플라스미드 (변이체 특성화)프라이머로 클로닝하기 위해 프라이머 XF 및 AR을 사용한다. 표 1은 도 8A-8B에 예시된 PCR에서 사용될 수 있는 프라이머 서열의 비 제한적인 예를 제공한다.

도 9A-9B는 각각의 선별로부터의 3 종의 가장 강화된 변이체 (즉, AAV-PHP.B, AAV-PHP.B2 및 AAV-PHP.B3)의 캡시드 특성 및 생산 효율을 나타낸다. **도 9A**는 AAV-PHP.B 또는 제2 또는 제3의 가장 강화된 변이체, AAV-PHP.B2 및 AAV-PHP.B3에 싸여진 ssAAV-CAG-mNeonGreen-farnesylated(mNeGreen-f)의 3.3×10^{10} vg/마우스 주사 2주 후에 평가된 마우스로부터의 대표적인 시상 두뇌 절편의 이미지이다. 밝은 신호는 GFP 단백질의 발현을 나타낸다. 데이터는 그룹당 2마리(AAV-PHP.B) 및 3마리(AAV-PHP.B2 및 AAV-PHP.B3)의 마우스의 대표이다. **도 9B**는 GFAP-Cre 선별로부터 회복된 개개의 변이체의 제조로부터 수득된 DNase-내성 vg의 양을 나타낸다. 수득량은 생산 세포의 150mm 디쉬 당 정제된 벡터 게놈 복제의 수로 주어진다; 평균 \pm s.d. $*p<0.05$, 일방적인 ANOVA 및 Tukey 다중 비교 테스트. 각 캡시드에 대한 독립적인 제조의 수는 막대 내에 표시된다.

도 10A-10G는 AAV-PHP.B가 몇몇 중간뉴런 세포 유형 및 내피세포를 형질 도입하지만 미세아교세포를 형질도입하지 않는 것을 보여주는 이미지이다. **도 10A-10D**에서, 성체 마우스에게 AAV-PHP.B:CAG-GFP의 1×10^{12} vg를 주사하고 3 주 후에 GFP 단백질의 발현을 평가 하였다. 대표 이미지는 표시된 항원 및 뇌 영역에 대한 IHC와 함께 AAV-PHP.B 발현(도 10A-10C) 또는 GFP 단백질 발현(도 10D)으로부터의 자연 형광에 대한 IHC를 나타낸다. **도 10E**에서, ssAAV-PHP.B:CAG-mNeGrn-f의 3.3×10^{10} vg가 주사된 성체 마우스는 주사 2주 후에 평가되었다. mNeGrn-f 유래 자연 형광은 일부 내피 세포 발현 CD31과 공존한다. **도 10F-10G**에서, 성인 마우스에게 2×10^{12} vg ssAAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP를 주사하고 주사 3주 후에 평가 하였다. 밝은 신호는 AAV-PHP.B의 발현을 나타내며 어두운 신호는 Iba1의 발현을 나타낸다. 별표는 표시된 항원을 발현하지만 AAV-PHP.B의 발현은 검출되지 않는 세포를 나타낸다. 파브알부민(PV), 칼빈딘(Calb) 및 칼레티닌(CR). 스케일 바: 20 μm (도 10A-10D); 50 μm (도 10E-10F) 및 500 μm (도 10G).

도 11은 AAV-PHP.B를 이용한 유전자 이식 후의 뇌에서의 장기간 AAV-PHP.B 발현을 나타낸다. 성체 마우스에게

AAV9 또는 AAV-PHP.B에 싸여진 ssAAV-CAG-GFP의 표시된 양을 정맥 내 주사하고, 377일 후에 자연 eGFP 형광에 대해 평가 하였다. 밝은 신호는 eGFP 발현을 나타낸다. 벡터/양 당 N=1.

도 12A-12D는 AAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP에 의한 형질도입 후의 여러 뉴런 및 신경아교세포 유형에 대한 GFP 단백질 발현 및 IHC로부터의 자연 형광 대표 이미지이다. **도 12A-12D**에서, 성체 마우스에 2×10^{12} vg ssAAV-PHP.B:CAG-NLS-GFP를 주사하고 3주 후에 평가 하였다. 이미지는 표시된 뇌 영역에서 표시된 항원에 대한 IHC와 함께 GFP 단백질 발현으로부터 자연 형광을 나타낸다. 모든 패널에서, 화살표는 표시된 항원에 대한 IHC와 GFP 발현의 공존을 나타낸다. 도 12B-12C는 단일 평면 공 초점 이미지이다; 도 12A 및 12D는 MIP이다. 뇌량(cc), 후질 치밀부(SNC), 복측 피개부(VTA). 스케일 바: 50 μ m.

도 13A-C는 관련 배양물 및 온전한 3D 피질 배양물에서 인간 iPSC-유래 피질 뉴런 및 별아교세포의 AAV-PHP.A 및 AAV-PHP.B 형질도입을 나타낸다. **도 13A**는 AAV-PHP.B가 관련 단층 배양물에서 인간 뉴런 및 별아교세포의 보다 높은 형질도입을 제공한다는 것을 나타낸다. 대표 이미지는 생체 외에서 분화된 분리된 iPSC-유래 인간 피질 회전타원체의 바이러스성 형질도입(AAV9, AAV-PHP.A, 또는 AAV-PHP.B에 싸여진 ssAAV-CAG-NLS-GFP; 1×10^9 vg/well) 5일 후에 AAV9, AAV-PHP.A, 및 AAV-PHP.B 캡시드를 사용하여 전달된 GFP cDNA로부터의 발현을 나타낸다. GFP 단백질을 발현하는 세포는 흰색 화살표로 표시된 대로 MAP2에 대해 면역 염색된 GFAP 또는 뉴런에 대해 면역 염색된 별아교세포와 함께 공존한다. **도 13B**는 AAV9, AAV-PHP.A 또는 AAV-PHP.B에 의해 감염된 GFAP+ 또는 MAP2+ 세포의 핵분율을 나타낸다 (2명의 개체로부터 유래된 2개의 인간 iPSC 계통의 피질 회전타원체로 n=3 분화; 양방향 ANOVA, Tukey 다중 비교 테스트; 평균 \pm s.d.). **도 13C**는 AAV9, AAV-PHP.A 및 AAV-PHP.B가 온전한 인간 3D 피질 배양물 (인간 iPSC로부터 분화된 피질 회전타원체)을 형질도입한다는 것을 나타낸다. AAV9, AAV-PHP.A 또는 AAV-PHP.B에 싸여진 ssAAV-CAG-NLS-GFP로 형질도입된 인간 iPSC-유래 피질 회전타원체 동결 절편(cryosections) (생체 외 분화 205일)의 이미지는 GFAP 및 MAP2의 면역 염색과 함께 GFP 단백질 발현으로부터의 자연 형광을 나타낸다. 이미지는 GFP 단백질과 GFAP+ 별아교세포(cyan) 또는 MAP2+ 뉴런과의 공동 표시를 나타낸다. 스케일 바: 40 μ m (도 13A); 및 100 μ m (도 13C).

도 14A-14D는 정맥 주사 후 뇌 혈관계통에 국소화시키고 투여 후 24시간까지 혈관계통을 따라 세포를 형질도입시키는 AAV-PHP.B 및 AAV-PHP.A 캡시드를 나타낸다. 성체 마우스에게 표시된 대로 AAV9, AAV-PHP.A 또는 AAV-PHP.B에 싸여진 1×10^{11} vg의 ssAAV-CAG-NLS-GFP를 주사하였다. **도 14A-14B**는 심장 관류에 의한 고정에 앞서 한 시간 정맥 내 주사된 마우스의 뇌에서 소뇌(도 14A) 또는 선조체(도 14B)에서의 공유 내부 항원 결정기를 인식하는 B1 항-AVV VP3 항체를 사용하는 캡시드 면역 염색(밝은 염색)의 대표 이미지이다. 캡시드 면역 염색은 AAV-PHP.A 및 AAV-PHP.B를 주사한 마우스의 뇌에서 두루 검출 가능했지만, AAV9를 동일한 용량으로 투여 한 마우스의 뇌에서는 거의 보이지 않았다. 세포핵은 DAPI로 표지되었다(어두운 염색). 리포푸신 자기 형광은 녹색 및 적색 채널 모두에서의 존재로 인해 캡시드 염색으로부터 구별될 수 있다. **도 14A**는 AAV-PHP.B 이미지에서 강조 표시된 영역의 3D MIP 이미지를 나타낸다. 화살표는 캡시드 IHC 신호를 강조 표시한다; 별표는 혈관의 내강을 나타낸다. 데이터는 그룹 당 2마리 (무 바이러스 및 AAV-PHP.A) 또는 3마리 (AAV9 및 AAV-PHP.B) 마우스의 대표이다. **도 14C**는 AAV-PHP.B 투여 24 시간 후 DAPI (백색 염색) 및 CD31 (어두운 염색)와 GFP 발현 (밝은 염색)의 대표적인 이미지이다. 화살표는 GFP-발현 세포를 표시한 것이다. **도 14D**는 표시된 뇌 영역에서 혈관계통을 따라 존재하는 GFP 발현 세포의 수를 정량화한 것이다. 그룹당 N=3; 평균 \pm s.d.: AAV-PHP.B vs AAV9 및 AAV-PHP.A, 모든 영역에 대해 ***p<0.001; AAV9 vs AAV-PHP.A, 유의하지 않음; 양방향 ANOVA, 스케일 바: 200 μ m (도 14A); 50 μ m (도 14B-14C); 주 눈금은 고배율 삽입이미지에서 50 μ m이다(도 14A).

도 15A-15B는 GFAP-Cre 마우스로부터 회복된 상위 3가지 변이체로부터의 리포터 발현을 나타낸다. **도 15A**는 AAV-PHP.B 또는 제2 또는 제3의 가장 강화된 변이체, AAV-PHP.B2 및 AAV-PHP.B3에 싸여진 ssAAV-CAG-mNeon-Green-farnesylated (mNeGrn-f)의 3.3×10^{10} vg/마우스의 주사 2주 후에 평가된 마우스로부터의 대표적인 시상 두뇌 절편의 이미지를 나타낸다. 밝은 신호는 세 가지 강화된 변이체, AAV-PHP.B (좌측), AAV-PHP.B2 (중간), 및 AAV-PHP.B3 (우측)에 의해 전달된 cDNA로부터 mNeGrn-f 발현을 나타낸다. **도 15B**는 AAV-PHP.B, AAV-PHP.B2 또는 AAV-B3에 싸여진 ssAAV-CAG-NLS-GFP의 2×10^{12} vg/마우스 주사 3주 후 평가된 뇌 절편 내 NLS-GFP 발현의 고배율 (40x) 회색조 이미지를 나타낸다.

도 16은 AAV-PHP.B 변이체로부터 리포터 발현을 보여주는 이미지이다. 밝은 반점은 AAV-PHP.B 변이체로부터의 리포터 발현을 나타낸다. 마우스로부터의 뇌 절편의 단일 평면 공 초점 이미지는 AAV-PHP.B 또는 표시된 AAV-PHP.B 변이체 1×10^{11} vg (총)/마우스의 IV 주사 후 2주 후에 평가되었다. 각 변이체는 리포터들의 혼합을 패키징

하는데 사용되었다: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen, 및 mKate 2.5. 참고로, mKate2.5는 일부 세포 유형, 특히 뉴런과 내피 세포에서 대부분 모인 것으로 나타난다.

도 17은 AAV-PHP.B 변이체로부터의 리포터 발현을 나타낸다. 밝은 반점은 AAV-PHP.B 변이체로부터의 리포터 발현을 나타낸다. 마우스로부터의 뇌 절편의 단일 평면 공 초점 이미지는 표시된 AAV-PHP.B 변이체의 3×10^{11} vg(총)/마우스 주사 3주 후 평가되었다. 각 변이체는 리포터들의 혼합을 패키징하는데 사용되었다: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen, 및 mRuby2.

도 18은 AAV-PHP.B 변이체로부터의 리포터 발현을 나타내는 이미지이다. 밝은 반점은 AAV-PHP.B 변이체로부터의 리포터 발현을 나타낸다. 마우스로부터의 뇌 절편의 단일 평면 공 초점 이미지는 표시된 AAV-PHP.B 변이체 1×10^{11} vg(총)/마우스의 IV 주사 후 11일 후에 평가되었다. 각 변이체는 리포터들의 혼합을 패키징하는데 사용되었다: ssAAV-CAG-mTurquoise2, mNeonGreen, 및 mRuby2.

도 19A-19C는 성인 IV 투여 후 AAV-PHP.B-DGT에 의한 CNS 형질도입이 AAV-PHP.B에 의한 것보다 더 효율적임을 나타낸다. **도 19A**는 표시된 캡시드 내에 싸여진 ssAAV-CAG-NLS-GFP 1×10^{11} vg/마우스의 IV 투여 후 3주 후에 ssAAV-CAG-NLS-GFP 발현의 전체 뇌 이미지(등쪽)를 나타낸다. ssAAV-CAG-NLS-GFP의 발현은 밝은 회색조 신호로 표시된다. **도 19B**는 GFP를 발현하는 운동 피질 (좌측) 또는 선조체 (우측)에서 전체 핵 (DAPI⁺)의 백분율을 나타내는 그래프를 도시한다. **도 19C**는 GFP⁺ 핵 당 ssAAV-CAG-NLS-GFP의 평균 발현을 나타내는 그래프를 도시한다. 그룹당 N=4 마리 동물.

도 20A-20D는 AAV9와 비교하여 AAV-PHP.S에 의한 말초 신경 형질도입을 나타낸 것이다. **도 20A**는 표시된 캡시드에 싸여진 1×10^{12} vg/마우스의 ssAAV-CAG-NLS-GFP를 IV 투여한 3주 후 AAV-PHP.S 발현의 전체-뇌 이미지 (등쪽, 좌측 및 배쪽, 우측)이다. GFP의 표현은 회색조로 표시된다. 참고로, 핵-위치된 GFP를 사용함에도 불구하고, GFP의 발현은 전체 뇌 이미지에서 보일 정도로 척수 및 뇌 줄기로 들어가는 말초 뉴런의 축삭에서 충분히 강하다. **도 20B**는 3×10^{12} vg(total)의 ssAAV-PHP.S:CAG-XFPmix로 형질도입된 후의 척수의 횡단면을 나타내는 이미지이다. **도 20C**는 1×10^{12} vg의 ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen 및 1×10^{12} 의 ssAAV-PHP.S:CAGmTurquoise의 혼합물을 주사한 후 4주 후에 마우스의 후근신경절에서 자연 형광을 나타내는 3D 투영 이미지이다. **도 20D**는 정맥 내 주사 후 장 신경계 내에서 세포를 형질도입하는 AAV-PHP.S를 나타내는 이미지이다. 자연 mNeonGreen 형광 (밝은 신호)은 AAV-PHP.S에 의해 형질도입된 세포를 표시한다. 이미지는 1×10^{12} vg/마우스 ssAAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen의 정맥 내 투여 3주 후에 평가된 성체 마우스 장으로부터의 최대 강도 투영을 나타낸다. 뉴런은 pgp9.5(회색 염색)에 대한 항체로 표시되고 DAPI에 의해 표시된 핵은 어두운 염색으로 나타난다. 각각의 채널이 오른쪽에 표시된다. 오른쪽 상단 이미지는 AAV-PHP.S:CAG-mNeonGreen에 의한 형질 도입을 나타내는 장 신경계에서의 mNeonGreen 발현을 나타낸다.

도 21은 AAV-PHP.B 7-mer 펩타이드 및 측면 서열의 전개를 나타낸다. PHP.B 7-mer는 AAV9 캡시드의 AA588-589 사이에 삽입되었다. 5개의 사이트 포화 라이브러리(XXX1-XXX5)는 PCR에 의해 생성되었으며, 동일한 양으로 혼합되어 DNA 생성에 사용되었다. 그런 다음 DNA는 AAV 캡시드 라이브러리를 생성하는데 사용되었다.

도 22A-22B는 AAV-PHP.N VP1 캡시드 (**도 22A**) 및 AAV-PHP.S VP1 캡시드 (**도 22B**)의 아미노산 서열을 나타낸다. **도 22A**: AAV-PHP.S 7-mer 삽입은 밑줄이 그어져 있고 AAV-PHP.B 7-mer와 다른 두 아미노산이 강조 표시되어 있다. **도 22B**: AAV-PHP.S 7-mer에는 밑줄이 그어져 있다.

도 23A-23E는 2개의 AAV 캡시드인 AAV-PHP.S 및 AAV-PHP.N이 말초 및 중추 신경계로 각각 유전자를 효율적으로 이식하는 것을 나타낸다. 성체 마우스에는 표시된 양의 바이러스가 정맥 내 주사되었다. **도 23A**는 전체 뇌에서 GFP 발현의 이미지를 나타낸다. **도 23B-23C**는 시상 뇌 절편에서의 GFP 발현의 이미지이다. **도 23D-23E**는 횡단 척수 절편에서 GFP 발현의 이미지이다. 이미지에서 밝은 신호는 GFP 발현을 나타낸다.

도 24A-24G는 AAV-PHP.N이 AAV-PHP.B 보다 더 효율적으로 여러 뉴런 개체군을 형질도입한다는 것을 나타낸다. **도 24A-24C**는 피질 (**도 24A**), 선조체 (**도 24B**), 및 소뇌 (**도 24C**)에서 AAV-PHP.B (상단) 또는 AAV-PHP.N (하단)이 주사된 성체 마우스 유래 뇌 절편에서 GFP 단백질 발현으로부터의 자연 GFP 형광을 나타내는 이미지이다. GFP 표현은 밝은 신호로 표시된다. **도 24D**는 AAV-PHP.B 또는 AAV-PHP.N의 주사 후 GFP를 발현하는 핵 (DAPI⁺) 세포의 백분율을 나타낸다. **도 24E**는 GFP를 발현하는 소뇌에서 NeuN⁺ 뉴런(피질 또는 선조체) 또는 칼빈

딘⁺(Calb) 푸르키니 뉴런의 백분율을 나타낸다. 도 24F는 GFP를 발현하는 S100b⁺ 세포의 백분율을 나타낸다. 도 24G는 표시된 뇌 영역에서 각각의 GFP⁺ 핵의 평균 형광 강도를 나타낸다. 데이터는 각 핵에 대한 평균 형광 값을 취함으로써 생성되었다. *p<0.05, **p<0.01, 스튜던트 언페어드 (student unpaired) T 테스트.

도 25A-25D는 AAV-PHP.S가 말초 감각 뉴런을 AAV9보다 효율적으로 형질 도입한다는 것을 나타낸다. 도 25A는 AAV9 또는 AAV-PHP.S에 패키징된 1x10¹² vg의 ssAAV-CAG-NLS-GFP의 형질도입 후 자연 GFP 형광을 나타내는 이미지이다. GFP 발현은 밝은 신호로 표시된다. 도 25B는 핵 GFP를 발현하는 PGP9.5⁺ DRG 뉴런의 백분율을 나타낸다. 도 25C는 표시된 벡터로 형질도입된 GFP⁺ 세포의 평균 형광 강도의 중간 값을 나타낸다. 도 25D는 심장신경절 및 심근을 형질도입시키는 AAV-PHP.S를 나타낸다. AAV-PHP.S 발현은 밝은 신호로 표시된다. **p<0.01, ***p<0.0001, 스튜던트 언페어드 (student unpaired) T 테스트.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0052] 이하 상세한 설명에서, 본 발명의 일부를 형성하는 첨부 도면을 참조한다. 상기 도면에서, 유사한 기호는 일반적으로 문맥이 달리 지시하지 않는 한 유사한 구성 요소를 식별한다. 상세한 설명, 도면 및 청구 범위에 설명된 예시적인 실시예는 제한하는 것을 의미하지 않는다. 본 발명에 제시된 요지의 의도 또는 범위를 벗어나지 않고 다른 실시예가 이용될 수 있고 다른 변경이 이루어질 수 있다. 본 발명에 일반적으로 기술되고 도면들에 도시된 바와 같은 본 개시의 양상들은 다양한 다른 구성들로 배열, 대체, 결합, 분리 및 설계될 수 있음을 쉽게 이해할 수 있으며, 이들 모두는 명백하게 본 발명에 고려되고 본 개시의 일부가 된다.
- [0053] 본 발명은 AAV로 형질도입된 개체에서 표적 환경, 예를 들어 세포, 세포 집단, 조직, 기관, 또는 이들의 조합에 핵산을 전달할 수 있는 AAV를 제공한다. 예를 들어, 상기 AAV는 신경계, 예를 들어, 중추 신경계(CNS) 및/또는 개체의 말초 신경계(PNS)에 핵산을 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV는 개체의 심장에 핵산을 전달하는데 사용될 수 있으며, 또한 개체에서 AAV를 표적 환경 (예를 들어, 신경계, 심장 또는 이들의 조합)으로 유도할 수 있는 펩타이드, 상기 펩타이드를 포함하는 AAV 캡시드 단백질, 상기 펩타이드를 포함하는 캡시드 단백질을 가지는 AAV 벡터를 포함하는 조성물(예를 들어, 약학적 조성물), 및 상기 펩타이드 및 AAV 캡시드 단백질을 암호화 하는 핵산 서열이 개시된다. 또한, 상기 AAV 벡터의 제조 및 사용 방법이 개시된다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터는 하나 이상의 질병 및 장애, 예를 들어 신경계 및/또는 심장과 관련된 질병 및 장애를 예방 및/또는 치료하는데 사용된다.
- [0054] 정의
- [0055] 다르게 정의되지 않는 한, 본 발명에서 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖는다. 예를 들어, Singleton et al., Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed., J. Wiley & Sons (New York, NY 1994); Sambrook 등, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989) 참조. 본 발명의 목적을 위해, 다음의 용어가 하기에 정의된다.
- [0056] 본 발명에서 사용된 용어 "벡터"는 핵산을 운반 또는 전달하기 위한 이동수단을 의미할 수 있다. 벡터의 비제한적인 예는 플라스미드 및 바이러스 (예를 들어, AAV 바이러스)를 포함한다.
- [0057] 본 발명에서 사용된 용어 "구성(construct)"은 특정 뉴클레오타이드 서열(들)의 발현의 목적으로 생성되었거나 다른 재조합 뉴클레오타이드 서열의 구성에 사용되는 재조합 핵산을 의미한다.
- [0058] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "플라스미드"는 숙주 생물 내에서 재조합 DNA 서열을 복제하는데 사용될 수 있는 핵산을 의미한다. 상기 서열은 이중 가닥 DNA 일 수 있다.
- [0059] 본 발명에서 사용된 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 상호 교환 가능하며, 포스포디에스테르 결합 또는 변형된 결합, 예컨대 포스포트리에스테르, 포스포라미데이트, 실록산, 카보네이트, 카복시메틸에스테르, 아세트아미데이트, 카바메이트, 티오에테르, 브릿지된(bridged) 포스포라미데이트, 브릿지된(bridged) 메틸렌 포스포네이트, 브릿지된(bridged) 포스포가미데이트, 브릿지된(bridged) 포스포라미데이트, 브릿지된(bridged) 메틸렌 포스포네이트, 포스포로티오에이트, 메틸포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 브릿지된(bridged) 포스포로티오에이트 또는 선폴 결합, 및 이러한 결합들의 조합으로 이루어진 임의의 핵산을 의미한다. 용어 "핵산" 및 "폴리뉴클레오타이드"는 또한 특이적으로 5 개의 생물학적 발생 염기 (아데닌, 구아닌, 티민, 시토신 및 우라실) 이외

의 염기들로 이루어진 핵산을 포함한다.

[0060] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 2개 이상의 연속적인 아미노산의 펩타이드 서열의 아미노산 " X_n " 또는 " B_n "은 펩타이드 서열의 n 번째 (n 은 양의 정수) 위치에서의 아미노산을 가리킨다. 예를 들어, 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 펩타이드 서열에서, X_1 은 상기 펩타이드 서열의 1 번 위치 (즉, 1번째 위치)의 아미노산이고, X_2 는 상기 펩타이드 서열의 2번 위치 (즉, 2번째 위치)의 아미노산이고, X_3 은 상기 펩타이드 서열의 3번 위치 (즉, 3번째 위치)의 아미노산이고, X_4 는 상기 펩타이드 서열의 4번 위치 (즉, 4번째 위치)의 아미노산이고, X_5 는 상기 펩타이드 서열의 5번 위치(즉, 5번째 위치)의 아미노산이고, X_6 은 상기 펩타이드 서열의 6번 위치 (즉, 6번째 위치)의 아미노산이고, X_7 은 상기 펩타이드 서열의 7번 위치 (즉, 7번째 위치)의 아미노산이고, X_8 은 상기 펩타이드 서열의 8번 위치 (즉, 8번째 위치)의 아미노산이고, X_9 는 상기 펩타이드 서열의 9 번 위치 (즉, 9번째 위치)의 아미노산이고, X_{10} 은 상기 펩타이드 서열의 10번 위치 (즉, 10번째 위치)의 아미노산이고, X_{11} 은 상기 펩타이드 서열의 11번 위치 (즉, 11번째 위치)의 아미노산이다. 예를 들어, 펩타이드 서열에서 위치 9에 A, 위치 10에 G 및 위치 11에 Q가 존재하는 경우, 아미노산 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 AGQ인 것으로 기술된다. 다른 예로서, QAB_3B_4TSL 의 펩타이드 서열에서, 이는 B_3 이 펩타이드 서열의 3 번 위치의 아미노산이고 B_4 가 펩타이드 서열의 4 번 위치의 아미노산임을 의미한다.

[0061] 용어 "재조합 효소 인식 서열" 또는 "재조합 효소 인식 부위"는 재조합 효소에 의해 인식될 수 있고 상기 재조합 효소에 의해 촉매된 재조합 이벤트에 대한 기질로서 작용할 수 있는 핵산 서열을 의미한다. 상기 서열은 예를 들어, 이중 가닥 DNA일 수 있다.

[0062] 용어 "바이러스 게놈"은 바이러스성 캡시드 내로 핵산의 패키징을 매개하는 시스 작용 핵산 서열이 측면에 위치하는 핵산 서열을 의미한다. AAV 및 파르보바이러스의 경우, 예를 들어, 바이러스 게놈의 5 ' 및 3 '말단에 위치한 "역전된 말단 반복"(ITR)이 이 기능을 갖고, ITR이 이중, 예를 들어 비야생형 바이러스 게놈의 바이러스성 캡시드로의 패키징을 매개할 수 있다는 것이 알려져 있다.

[0063] 용어 "요소(element)"는 어떤 것의 별개의 또는 독특한 부분, 예를 들어 더 긴 핵산 서열 내의 별개의 기능을 가진 핵산 서열을 의미한다. 용어 "조절 요소(regulatory element)" 및 "발현 조절 요소(expression control element)"는 본 발명에서 상호 교환적으로 사용되고 특정 숙주 생물에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 영향을 미칠 수 있는 핵산 분자를 의미한다. 이 용어들은 프로모터, RNA 중합 효소 및 전사 인자의 기본 상호 작용에 필요한 핵심 요소, 상향 요소, 인핸서, 및 반응 요소를 포함하여 전사를 촉진 또는 조절하는 모든 요소에 광범위하게 사용된다(Lewin, "Genes V "(Oxford University Press, Oxford) 847-873 쪽 참조). 원핵 생물에서의 예시적인 조절 요소는 프로모터, 작동 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포에서 사용되는 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 스플라이싱(splicing) 신호, 폴리아데닐화 신호, 터미네이터, 단백질 분해 신호, 내부 리보솜-엔트리 요소 (IRES), 2A 서열 등과 같은 숙주 세포에서 코딩 서열의 발현 및/또는 암호화된 폴리펩타이드의 생산을 제공 및/또는 조절하는 전사 및 번역 조절 서열을 제한 없이 포함할 수 있다.

[0064] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "변이체(variant)"는 참조 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드와 실질적으로 유사한 서열을 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩타이드를 의미한다. 폴리뉴클레오티드의 경우, 변이체는 참조 폴리뉴클레오티드와 비교하여 5 '말단, 3'말단, 및/또는 하나 이상의 내부 자리에서 하나 이상의 뉴클레오티드의 결실, 치환, 첨가를 가질 수 있다. 변이체와 참조 폴리뉴클레오티드 사이의 서열의 유사성 및/또는 차이점은 당업계에 공지된 통상적인 기술, 예를 들어 중합 효소 연쇄 반응 (PCR) 및 하이브리드화 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 변이체 폴리뉴클레오티드는 또한 예를 들어 부위 특이적 돌연변이 유도(site-directed mutagenesis)를 이용함으로써 생성된 것과 같은 합성적으로 유도된 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일반적으로, DNA를 포함하나 이에 한정되지 않는 폴리 뉴클레오티드의 변이체는 당업자에 의해 공지된 서열 정렬 프로그램에 의해 결정된 참조 폴리뉴클레오티드에 적어도 약 50 %, 약 55 %, 약 60 %, 약 65 %, 약 70 %, 약 75 %, 약 80 % 약 85 %, 약 90 %, 약 91 %, 약 92 %, 약 93 %, 약 94 %, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 그 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 폴리 펩타이드의 경우, 변이체는 참조 폴리펩타이드에 비교하여 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환, 첨가를 가질 수 있다. 변이체와 참조 폴리펩타이드 사이의 서열의 유사성 및/또는 차이점은 당업계에 공지된 통상적인 기술, 예를 들어 웨스턴 블롯을 사용하여 검출할 수 있다. 일반적으로, 폴리펩타이드의 변이체는 당업자에 의해 공지된 서열 정렬 프로그램에 의해 결정된 참조 폴리펩타이드에 적어도 약 60 %, 약 65 %, 약 70 %, 약 75 %, 약 80 %, 약 85 %, 약 90 %, 약 91 %, 약 92 %, 약 93 %, 약 94

%, 약 95 %, 약 96 %, 약 97 %, 약 98 %, 약 99 % 또는 그 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다.

- [0065] 용어 "AAV" 또는 "아테노-관련 바이러스"는 바이러스의 파르보비리다에 속(*Parvoviridae*) 내에 데펜도파르보바이러스(Dependoparvovirus)를 의미한다. 예를 들어, 상기 AAV는 자연적으로 발생하는 "야생형" 바이러스로부터 유래된 AAV, 자연적으로 발생하는 cap 유전자에 의해 암호화된 캡시드 단백질 유래 캡시드 안에 패키징된 rAAV 게놈으로부터 유래된 AAV 및/또는 비자연적 캡시드 cap 유전자에 의해 암호화된 캡시드 단백질 유래 캡시드 안에 패키징된 rAAV 게놈, 예를 들어 AAV-PHP.N 및 AAV-PHP.S일 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 용어 "AAV-PHP.eB", "AAV-PHP.N", 및 "AAV-PHP.B-DGT"는 11-mer 아미노산 서열 DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4, 본 발명에서 각각 "PHP.eB", "PHP.N" "PHP.B-DGT"서열로 언급함)를 포함하는 비자연적 캡시드 단백질을 가지는 AAV 변이체와 통용된다.
- [0066] 용어 "rAAV"는 "재조합(recombinant) AAV"를 의미한다. 일부 실시 양태에서, 재조합 AAV는 rep 및 cap 유전자의 일부 또는 전부가 이중 서열로 대체된 AAV 게놈을 갖는다.
- [0067] 용어 "rep-cap 헬퍼 플라스미드"는 바이러스성 rep 및 cap 유전자 기능을 제공하는 플라스미드를 의미한다. 이 플라스미드는 기능적 rep 및/또는 캡시드 유전자 서열이 결합된 rAAV 게놈으로부터의 AAV의 생산에 유용할 수 있다.
- [0068] 용어 "벡터"는 핵산을 운반하거나 전달하는 이동 수단으로 정의된다. 벡터의 비 제한적인 예는 플라스미드 및 바이러스를 포함한다.
- [0069] 용어 "cap 유전자"는 바이러스의 캡시드 또는 단백질 껍질을 형성하거나 그 형성에 기여하는 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 의미한다. AAV의 경우, 캡시드 단백질은 VP1, VP2 또는 VP3 일 수 있다. 다른 파르보바이러스의 경우 캡시드 단백질의 이름 및 개수가 다를 수 있다.
- [0070] 용어 "rep 유전자"는 바이러스의 복제 및 생산에 필요한 비구조적 단백질 (rep78, rep68, rep52 및 rep40)을 암호화하는 핵산 서열을 의미한다.
- [0071] "라이브러리(library)"는 선형 핵산, 플라스미드, 바이러스 입자 또는 바이러스 벡터의 다양한 형태일 수 있다. 라이브러리는 적어도 2 개의 선형 핵산을 포함할 것이다.
- [0072] 삽입된 핵산 서열이 임의로 생성될 때, N=A, C, G 또는 T; K=G 또는 T; M=A 또는 C이다.
- [0073] 달리 명시하지 않는 한, 본 발명에서 언급된 임의의 단일 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이다; 이중 가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 언급된다.
- [0074] 본 발명에서 사용된 용어 "자연적으로 발생하는"은 자연에서 발견되는 물질 또는 자연에서 발견되는 물질의 형태를 의미한다.
- [0075] 표준 기술들은 재조합 DNA, 올리고 뉴클레오티드 합성, 및 조직 배양물 및 형질전환 (예를 들어, 전기 천공법(electroporation), 리포펙션(lipofection))에 사용될 수 있다. 효소 반응 및 정제 기술은 제조사의 설명서에 따라 또는 당해 기술 분야에서 통상적으로 완성되거나 본 발명에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다. 상기에 기재한 기술 및 절차는 일반적으로 당해 분야에 공지된 통상적인 방법에 따라 그리고 본 발명 전반에 걸쳐 인용되고 논의된 다양한 일반적인 더 구체적인 참고 문헌에 기재된 바와 같이 수행될 수 있다. 예를 들어, 임의의 목적으로 본원에 참조로 인용된 Sambrook 등, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)) 참조. 특정 정의가 제공되지 않는 한, 본 발명에 기술된 분석 화학, 합성 유기 화학, 및 의학 및 약학의 화학과 관련하여 이용되는 명명법 및 실험실 절차 및 기술은 당업계에 널리 공지되어 있고 통상적으로 사용되는 것이다. 표준 기술들은 화학 합성, 화학 분석, 약학적 조제, 제제, 및 전달, 및 환자 치료에 사용될 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 사용된 바와 같이, "개체(subject)"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 동물을 의미한다. "동물"은 냉혈 및 온혈 척추동물 및 어류, 갑각류, 파충류와 같은 무척추동물, 및 특히 포유동물을 포함한다. 본 발명에서 사용되는 "포유동물(mammal)"은 포유동물문(class Mammalia)에 속하는 개체를 말하며, 사람, 가축 및 농장 동물, 동물원 동물, 스포츠 및 애완 동물을 포함하나, 이에 한정되지는 않는다. 포유동물의 비제한적 예는 마우스; 랫트; 토끼; 기니피그; 개; 고양이; 양; 염소; 암소; 말; 원숭이, 침팬지 및 유인원, 특히 인간과 같은 영장류동물을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 포유동물은 인간이다. 그러나, 일부 실시 양태에서, 상기 포유동물은 인간이 아니다.

- [0077] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료(treatment)"는 환자, 특히 하나 이상의 세로토닌 관련 질병을 앓고 있는 환자에 의해 나타나는 질병, 장애 또는 생리학적 상태에 반응하여 이루어지는 개입을 의미한다. 치료 목적은 증상의 완화 또는 예방, 질병, 장애, 또는 상태의 진행 또는 악화를 지연시키거나 중지시키는 것 및 질병, 장애 또는 상태의 완화 중 하나 이상을 포함하나 이에 한정되지는 않는다. 용어 "치료하다(treat)" 및 "치료(treatment)"는 예를 들어, 치료를 위한 치료, 예방을 위한 치료 및 개체가 장애 또는 다른 위험 인자를 발전시킬 위험을 감소시키는 적용을 포함한다. 치료는 장애를 완전히 낮게 할 것을 요구하지 않으며 증상 또는 근본적인 위험 인자를 감소시키는 실시 양태들을 포함한다. 일부 실시 양태에서, "치료(treatment)"는 치료를 위한 치료 및 예방을 위한 또는 예방 방법 모두를 의미한다. 치료가 필요한 사람들은 질병이나 장애 또는 원하지 않는 생리학적 조건에 의해 이미 영향을 받은 사람들뿐만 아니라 질병이나 장애 또는 원하지 않는 생리학적 조건이 예방되어야 하는 사람들을 포함한다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 치료는 개체에서 세로토닌 수준을 증가시키거나 감소시킴으로써 질병의 증상을 감소, 완화 또는 근절시킬 수 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "예방"은 세로토닌 관련 질병 증상을 나중에 발현하는 개인의 부담을 감소시키는 임의의 활성을 의미한다. 이는 1차, 2차 및/또는 3차 예방 수준에서 발생할 수 있는데, 여기서: a) 1차 예방은 증상/장애/상태의 발달을 방지한다; b) 2차 예방 활성은 상태/장애/증상 치료의 초기 단계를 목표로 함으로써 상태/장애/증상의 진행 및 증상의 출현을 예방하기 위한 개입 기회를 증가시킨다; 및 c) 3차 예방은 예를 들어, 기능 회복 및/또는 임의의 상태/장애/증상 또는 관련된 합병증의 감소에 의해 이미 확립된 상태/장애/증상의 부정적인 영향을 감소시킨다. 용어 "예방하다(prevent)"는 사건의 가능성을 100% 제거할 것을 요구하지 않는다. 오히려, 그것은 사건의 발생 가능성이 화합물 또는 방법의 존재 하에 감소되었음을 나타낸다.
- [0078] 본 발명에서 사용된 바와 같이, 용어 "유효량(effective amount)"은 유익하거나 바람직한 생물학적 및/또는 임상 결과를 초래하기에 충분한 양을 의미한다.
- [0079] "약학적으로 허용 가능한" 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 그에 노출된 세포 또는 포유동물에 무독성인 것들이다. "약학적으로 허용 가능한" 담체는 경구 투여 또는 주사와 같은 선택된 투여 방식에 적합한 유기 또는 무기, 고체 또는 액체 부형제일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 통상적인 약학적 조제, 예를 들어 알약, 파립, 분말, 캡슐과 같은 고체 및 용액, 에멀전, 현탁액 등과 같은 액체의 형태로 투여된다. 종종 생리학적으로 허용되는 담체는 인산 완충액 또는 시트르산 완충액과 같은 수성 pH 완충 용액이다. 생리학적으로 허용되는 담체는 또한 하기의 하나 이상을 포함할 수 있다: 아스코르브산을 포함하는 산화 방지제, 저분자량 (약 10 잔기 미만) 폴리펩타이드, 단백질, 예를 들어 혈청 알부민, 젤라틴, 면역 글로불린; 폴리비닐피롤리돈, 아미노산, 글루코오스, 만노오스 또는 덱스트린을 포함하는 탄수화물과 같은 친수성 폴리머, EDTA와 같은 킬레이트제, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당 알코올, 나트륨과 같은 염 형성 반대 이온, 및 TweenTM과 같은 비이온성 계면활성제, 폴리에틸렌 글리콜(PEG), 및 PluronicTM. 보조제, 안정제, 유화제, 윤활제, 결합제, pH 조절제, 등장화제 및 기타 통상적인 첨가제가 또한 담체에 첨가될 수 있다.
- [0080] 타겟팅 서열
- [0081] 본 발명은 개체의 표적 환경(target environments)에 AAV를 지시(directing)할 수 있는(예를 들어, 하나 이상의 핵산을 전달하는 목적을 위해 AAV를 지시하는) 타겟팅 펩타이드를 제공한다. 상기 표적 환경은 예를 들어 개체에서 세포, 세포 집단, 하나 이상의 조직, 하나 이상의 기관, 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 표적 환경은 중추 신경계(CNS)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 표적 환경은 말초 신경계(PNS)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 표적 환경은 심장이다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 개체의 CNS에 AAV를 지시할 수 있다(본 발명에서 "CNS 타겟팅 펩타이드"로 언급됨). 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 개체의 PNS에 AAV를 지시할 수 있다(본 발명에서 "PNS 타겟팅 펩타이드"로 언급됨). 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 개체의 심장에 AAV를 지시할 수 있다(본 발명에서 "심장 타겟팅 펩타이드"로 언급됨). 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 CNS 타겟팅 펩타이드다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 PNS 타겟팅 펩타이드다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 심장 타겟팅 펩타이드다. 예를 들어, 상기 CNS 타겟팅 펩타이드는 일부 실시 양태에서 CNS의 뉴런, 아교세포, 내피 세포, 별아교세포, 소뇌의 푸르킨예 세포, 또는 이들의 조합에 핵산을 전달하기 위해 AAV를 지시할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 개체에서 CNS, 심장 (예를 들어, 심장의 심근 세포), 말초 신경, 또는 이들의 조합에 핵산을 전달하기 위해 AAV를 지시할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체는 성인, 예를 들어, 3세 이상의 개체이다.
- [0082] 상기 타겟팅 펩타이드 (예를 들어, CNS 타겟팅 펩타이드, PNS 타겟팅 펩타이드, 및 심장 타겟팅 펩타이드)는 길

이가 다를 수 있다. 예를 들어, 타겟팅 펩타이드는 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 20, 25, 30, 또는 이 중 임의의 두 값 사이 범위의 아미노산 길이이거나, 길이일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 7개 또는 약 7개의 아미노산 길이이다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 11개 또는 약 11개의 아미노산 길이이다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 7 내지 11개 또는 약 7 내지 11개의 아미노산 길이이다.

- [0083] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열을 포함하거나 이로 이루어지고, 여기서
- [0084] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;
- [0085] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;
- [0086] X_3 는 T, S 또는 N;
- [0087] X_4 는 L 또는 V;
- [0088] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0089] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0090] X_7 은 P;
- [0091] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0092] X_9 은 K, R 또는 S; 및
- [0093] X_{10} 및 X_{11} 의 각각은 독립적으로 임의의 아미노산이다.
- [0094] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)가 아니거나, 또는 이를 포함하지 않는다. 상기 타겟팅 펩타이드의 일부 실시 양태에서, X_{10} 및 X_{11} 은 독립적으로 임의의 아미노산, 예를 들어 표준 아미노산 중 임의의 것일 수 있다. 본 발명에서 사용된 표준 아미노산은 알라닌("Ala" 또는 "A"로 약칭함), 아르기닌("Arg" 또는 "R"로 약칭함), 아스파라긴("Asn" 또는 "N"으로 약칭함), 아스파르트 산("Asp" 또는 "D"로 약칭함), 시스테인("Cys" 또는 "C"로 약칭함), 글루타민산("Glu" 또는 "E"로 약칭함), 글루타민("Gln" 또는 "Q"로 약칭함), 글리신("Gly" 또는 "G"로 약칭함), 히스티딘("His" 또는 "H"로 약칭함), 이소류신("Ile" 또는 "I"로 약칭함), 류신("Leu" 또는 "L"로 약칭함), 라이신("Lys" 또는 "K"로 약칭함), 메티오닌("Met" 또는 "M"으로 약칭함), 페닐알라닌("Phe" 또는 "F"로 약칭함), 프롤린("Pro" 또는 "P"로 약칭함), 세린("Ser" 또는 "S"로 약칭함), 트레오닌("Thr" 또는 "T"로 약칭함), 트립토판("Trp" 또는 "W"로 약칭함), 티로신("Tyr" 또는 "Y"로 약칭함), 발린("Val" 또는 "V"로 약칭함)을 포함한다. 일부 실시 양태에서, X_{10} 은 A 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_{11} 은 Q 또는 P이다. X_{10} 및 X_{11} 은 동일하거나 상이한 아미노산 일 수 있다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D이다. 일부 실시 양태에서, X_2 는 G이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_6 는 V 또는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 LAVPFKAQ (서열번호: 80)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 X_1X_2 는 AQ이고, 아미노산 $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 VPFKAQ (서열번호: 81)이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_5 는 A이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 X_1X_2 는 AQ, 상기 아미노산 서열 X_3X_4 는 TL, 및 상기 아미노산 서열 $X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 FKAQ (서열번호: 82)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 는 AQTAV (서열번호: 83)이고 상기 아미노산 서열 $X_{10}X_{11}$ 은 AQ이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_7X_8X_9$ 은 PFK이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 은 AQTAVPF (서열번호: 84)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAK, KAP, 또는 SNP이다. 일

부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 DGTLPFKXX (X는 임의의 아미노산일 수 있다, 서열번호: 68)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 GGTLPFKAQ (서열번호: 10)일 수 있다. 본 발명에 설명된 실시 양태들의 다양한 조합이 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, X_{10} 이 A일 때, X_{11} 은 Q 또는 P; 및 X_1 이 D일 때, X_2 는 G, N, S, T, 및 V 중 어느 하나 일 수 있다. 다른 예로서, X_3 이 T이고 X_4 가 L일 때, X_5 는 A일 수 있다.

[0095] 일부 실시 양태에서, X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , 및 X_{11} 은 각각 L, A, V, P, F, K, A, 및 Q; 및 X_3 는 T, S, 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_3 가 T인 것이 유리하다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다.

[0096] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A 및 X_2 는 Q; X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} 및 X_{11} 은 각각 V, P, F, K, A, Q; 및 X_3 은 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_3X_4X_5$ 는 TLA이다.

[0097] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_5 은 F, X_6 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q, 및 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다.

[0098] 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 AQTLPFKAQ(서열번호: 1)이다.

[0099] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_5 는 A, X_6 은 V, X_7 은 P, 및 X_8 은 F, 및 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다.

[0100] 타겟팅 펩타이드는 또한 본 발명에 개시된 타겟팅 펩타이드, 예를 들어 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68의 타겟팅 펩타이드 중 어느 하나의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 타겟팅 펩타이드는 서열번호: 37-44 및 65-68 중 하나의 4, 5 또는 6개의 연속적인 아미노산을 포함하거나, 이로 이루어진다. 일부 실시 양태에서, 타겟팅 펩타이드는 서열번호: 1-36 중 하나의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 연속적인 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진다.

[0101] 상기 타겟팅 펩타이드는 또한 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 4, 5, 또는 6개의 연속적인 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진다. 예를 들어, 상기 타겟팅 펩타이드는 QAVR (서열번호: 85), AVRT (서열번호: 86), VRTS (서열번호: 87), RTSL (서열번호: 88), QAVRT (서열번호: 89), AVRTS (서열번호: 90), VRTSL (서열번호: 91), QAVRTS (서열번호: 92), 및 AVRTSL (서열번호: 93)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 또한 서열번호: 37과 1 또는 2개가 불일치하는 아미노산 서열을 포함하거나 이로 이루어질 수 있다. 예를 들어, 상기 타겟팅 펩타이드는 QAB₃B₄TSL의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있고, 여기서 B₃ 및 B₄는 독립적으로 임의의 표준 아미노산 일 수 있다. 일부 실시 양태에서, B₃은 V가 아니거나, B₄는 R이 아니거나, 또는 둘 다이다. 또 다른 예로서, 상기 타겟팅 펩타이드는 QAVRB₅SL의 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있고, 여기서 B₅는 임의의 표준 아미노산일 수 있다. 일부 실시 양태에서, B₅는 T가 아니다.

[0102] 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드는 독립형 펩타이드일 수 있거나, 또는 나노 입자, 제 2 분자, 바이러스 캡시드 단백질, 또는 이들의 조합에 접합되거나 그 일부일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 AAV9 캡시드 서열 (서열번호: 45)의 아미노산 588 및 589 사이에 삽입된다.

[0103] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68 중 하나의 4개 이상의 연속적인 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시 양태에서, 상기 CNS 타겟팅 펩타이드는 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68 중 임의의 4, 5 또는 6개의 아미노산을 포함하거나 이로 이루어진다. 일부 실시 양태에서, 2개 이하의 아미노산은 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68 중 임의의 것으로 변경될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 변경은 보존적인 변경이다(본 발명에서 제공된 임의의 타겟팅 서열 내에서). 일부 실시 양태에서, 상기 변경은 하나 또는 두 개의 아미노산(본 발명에서 제공된 임의의 타겟팅 서열 내에서)의 결실 또는 삽입이다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 본 발명에서 제공된 상기 타겟팅 서열 중 하나에 적어도 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99%, 또는 그 이상의 서열 동일성을 가질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 본 발명에서 1, 2, 3, 4, 5, 6개, 또는 그 이상의 아미노산으로 개시된 상기 타겟팅 서열 중 하나로부터

다를 수 있다.

[0104] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 서열 중 임의의 하나 이상을 포함하거나, 구성하거나, 이로 부터 필수적으로 이루어진다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 본 발명에 기재된 바와 같이, 보다 긴 펩타이드에 삽입된다. 표 1은 타겟팅 펩타이드의 비제한적인 예를 제공한다.

[0105] 표 1. 본 발명에 개시된 타겟팅 펩타이드의 모범적인 예 (X는 임의의 표준 아미노산 일 수 있다)

표 1

[0106]

타겟팅 펩타이드	서열번호
AQTLAVPFKAQ	서열번호: 1
AQSVSKPFLAQ	서열번호: 2
AQFTLTTPKAQ	서열번호: 3
DGTLAVPFKAQ	서열번호: 4
ESTLAVPFKAQ	서열번호: 5
GGTLAVPFKAQ	서열번호: 6
AQTLATPFKAQ	서열번호: 7
ATTLATPFKAQ	서열번호: 8
DGTLATPFKAQ	서열번호: 9
GGTLATPFKAQ	서열번호: 10
SGSLAVPFKAQ	서열번호: 11
AQTLAQPFKAQ	서열번호: 12
AQTLQQPFKAQ	서열번호: 13
AQTLSPFKAQ	서열번호: 14
AQTLAVPFSNP	서열번호: 15
QGTSLAVPFKAQ	서열번호: 16
NQTLAVPFKAQ	서열번호: 17
EGSLAVPFKAQ	서열번호: 18
SGNLAVPFKAQ	서열번호: 19
EGTLAVPFKAQ	서열번호: 20
DSTLAVPFKAQ	서열번호: 21
AVTLAVPFKAQ	서열번호: 22
AQTLSTPFKAQ	서열번호: 23
AQTLQPFKAQ	서열번호: 24
AQTLSPFKAQ	서열번호: 25
AQTLQLPFKAQ	서열번호: 26
AQTLTMPFKAQ	서열번호: 27
AQTLTPFKAQ	서열번호: 28
AQYTLSPGWAQ	서열번호: 29
AQMNATKNVAQ	서열번호: 30
AQVSGGHSAQ	서열번호: 31
AQTLQPFKAQ	서열번호: 32
AQTLATPFKAQ	서열번호: 33
AQTLTMPFKAQ	서열번호: 34
AQTLTAPFKAQ	서열번호: 35
AQTLSPFKAQ	서열번호: 36
QAVRTSL	서열번호: 37
YTLSPGW	서열번호: 38
LAKERLS	서열번호: 39
TLAVPFK	서열번호: 40
SVSKPFL	서열번호: 41
FTLTTPK	서열번호: 42
MNSTKNV	서열번호: 43
VSGGHHS	서열번호: 44
SAQTLAVPFKAQAQ	서열번호: 48
SXXXLAVPFKAQAQ	서열번호: 49
SAQXXXVPFKAQAQ	서열번호: 50
SAQTLXXXFKAQAQ	서열번호: 51

SAQTLAVXXXAAQ	서열번호: 52
SAQTLAVPFXXXAQ	서열번호: 53

- [0107] 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드의 하나 이상을 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.
- [0108] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 AAV의 일부, 예를 들어 AAV 캡시드 단백질 (서열번호: 45)의 일부이다. 본 발명은 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드의 하나 이상을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다. 예를 들어, 상기 AAV 캡시드 단백질은 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 연속적인 아미노산의 4, 5, 또는 6개를 포함하거나 이로 이루어지는 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함한다.
- [0109] 또한, 본 발명은 11 개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공하고, 여기서
- [0110] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;
- [0111] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;
- [0112] X_3 는 T, S 또는 N;
- [0113] X_4 는 L 또는 V;
- [0114] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0115] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0116] X_7 은 P;
- [0117] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0118] X_9 은 K, R 또는 S; 및
- [0119] X_{10} 및 X_{11} 의 각각은 독립적으로 임의의 아미노산이다.
- [0120] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 아미노산 서열 AQTLAVPFKAQ (서열번호: 1)가 아니거나, 또는 이를 포함하지 않는다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 아미노산 서열 AQTLAVPFKAQ (서열번호: 1)를 포함하지 않는다. 본 발명에 기재된 바와 같이, X_{10} 및 X_{11} 은 독립적으로 임의의 아미노산, 예를 들어 표준 아미노산 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시 양태에서, X_{10} 은 A 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_{11} 은 Q 또는 P이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D이다. 일부 실시 양태에서, X_2 는 G이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_6 는 V 또는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 LAVPFKAQ (서열번호: 80)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, 및 상기 아미노산 서열 $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 VPFKAQ (서열번호: 81)이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_5 는 A이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 는 T, X_4 는 L, 및 상기 아미노산 서열 $X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 FKAQ (서열번호: 82)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 는 AQTLAV (서열번호: 83), X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_7X_8X_9$ 은 PFK이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 은 AQTLAVPF (서열번호: 84)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연

속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 DGTLPFPKXX (X는 임의의 아미노산일 수 있다, 서열번호: 68)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 GGTLPFPKQAQ (서열번호: 10)이다. 본 발명에 설명된 실시 양태들의 다양한 조합이 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, X_{10} 이 A일 때, X_{11} 은 Q 또는 P; 및 X_1 이 D일 때, X_2 는 G, N, S, T, 및 V 중 어느 하나 일 수 있다. 다른 예로서, X_3 이 T이고 X_4 가 L일 때, X_5 는 A일 수 있다.

[0121] 일부 실시 양태에서, X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , 및 X_{11} 은 각각 L, A, V, P, F, K, A, 및 Q; 및 X_3 는 T, S, 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_3 가 T인 것이 유리하다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다.

[0122] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A 및 X_2 는 Q; X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} 및 X_{11} 은 각각 V, P, F, K, A, Q; 및 X_3 은 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_3X_4X_5$ 는 TLA이다.

[0123] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q, 및 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다.

[0124] 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 AQTLPFPKQAQ(서열번호: 1)이다.

[0125] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_5 는 A, X_6 은 V, X_7 은 P, 및 X_8 은 F, 및 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다.

[0126] 상기 캡시드 단백질의 타겟팅 펩타이드 부분(portion)은 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드 중 어느 하나의 서열, 또는 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드 중 어느 하나의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하거나, 이로 이루어질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68 중 어느 하나의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하거나, 이로 이루어진 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 서열번호: 37-44 및 65-68의 연속적인 아미노산의 4, 5, 또는 6개를 포함하거나 이로 이루어진 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 서열번호: 1-36의 연속적인 아미노산의 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개를 포함하거나 이로 이루어진 타겟팅 펩타이드 부분(portion)을 포함한다.

[0127] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 서열번호: 45의 AAV9 캡시드 서열의 일부이다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 원하는대로 표적화 되어야 하는 임의의 분자에 연결될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 재조합 단백질, 항체, 세포, 진단약, 치료제, 나노 분자, 또는 이들의 조합에 제한 없이 연결되거나 접합될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 캡시드 단백질은 서열번호: 46 또는 서열번호: 47의 서열을 포함하거나, 이로 이루어진다.

[0128] 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 단백질의 임의의 목표하는 부분에 삽입 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 캡시드 단백질에 삽입 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 목표 단백질의 표면 상에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 단백질의 일차 서열에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 단백질에 연결된다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 단백질에 공유 결합된다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 목표 단백질의 비구조적 루프에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 비구조적 루프는 상기 단백질의 구조적 모델을 통해 확인된 것일 수 있다.

[0129] 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 상기 AAV 캡시드 단백질의 하나 이상을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0130] 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터 및 재조합 AAV

[0131] 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus, AAV)는 복제-결핍 파르보바이러스(parvovirus), 145개의 뉴클레오타이드 역전 말단 반복(ITRs)을 포함하는 약 4.7kb 길이의 단일 가닥 DNA 게놈이다. 상기 ITR은 AAV DNA를 숙주 세포 게놈에 통합하는 역할을 한다. AAV가 숙주 세포를 감염 시킬 때, 상기 바이러스 게놈은 세포의 잠복 감염을 초래하는 숙주의 염색체로 통합된다. 자연계에서 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스 또는 헤르페스 바이러스)는 감염된 세포에서 AAV 바이러스의 생성에 대해 허용하는 유전자를 제공한다. 아데노바이러스의 경우

유전자 E1A, E1B, E2A, E4 및 VA는 헬퍼 기능을 제공한다. 헬퍼 바이러스에 감염되면, 상기 AAV 프로바이러스는 구제되고 증폭되며, AAV 및 아데노바이러스 둘 다 생성된다. Rep 및/또는 Cap 유전자를 갖지 않는 재조합 AAV 벡터의 경우, 상기 AAV는 비-통합될 수 있다.

[0132] 하나 이상의 목적 단백질의 코딩 영역을 포함하는 AAV 벡터가 제공된다. 상기 AAV 벡터는 하나 이상의 목적 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 삽입을 허용하기 위해 AAV의 5' 역전 말단 반복(ITR), 3' AAV ITR, 프로모터, 및 상기 프로모터의 제한 부위 하류를 포함할 수 있고, 여기서 상기 프로모터 및 상기 제한 부위는 5' AAV ITR의 하류 및 3' AAV ITR의 상류에 위치된다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터는 상기 제한 부위의 전사 후 조절 요소 하류 및 3' AAV ITR의 상류를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 상기 AAV 벡터는 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 재조합 AAV 바이러스를 생산하기 위한 목적 단백질을 암호화하는 이식유전자를 운반하는 AAV 전달 벡터로서 사용될 수 있다.

[0133] 본 발명은 rAAV 게놈을 제공한다. 상기 게놈은 예를 들어, 벡터 및 cap 유전자로의 패키징을 허용하기 위해 구성된 적어도 하나의 역전 말단 반복을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, cap 유전자의 발현 및 스플라이싱(splicing)에 필요한 rep 유전자 내에 서열을 더 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 게놈은 VP3을 발현할 수 있는 서열을 더 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 발현되는 유일한 단백질은 VP3 (조립된 캡시드의 대부분을 구성하는 캡시드 구조 단백질 중 가장 작다 - 조립된 캡시드는 VP 단백질의 60 유닛, VP3의 ~50개로 구성된다)이다. 일부 실시 양태에서, VP3 발현만으로도 스크리닝 방법을 가능하게 하는데 충분할 수 있다.

[0134] 상기 바이러스 벡터의 생성은 제한 엔도뉴클레아제 소화, 절찰, 형질전환, 플라스미드 정제, 및 DNA 시퀀싱의 표준 기술을 포함하지만 이에 제한되지 않는 당업계에 널리 공지된 임의의 적합한 유전 공학 기술, 예를 들어, Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. (1989))에 기재된 바와 같이 사용하여 완성될 수 있다.

[0135] 상기 바이러스 벡터는 임의의 공지된 생물체의 게놈으로부터의 서열을 포함할 수 있다. 상기 서열은 이들의 자연 형태로 포함될 수 있거나 또는 원하는 활성을 얻기 위해 임의의 방식으로 변형될 수 있다. 예를 들어, 상기 서열은 삽입, 절실 또는 치환을 포함할 수 있다.

[0136] 일부 실시 양태에서, 상기 바이러스 벡터는 진핵 생물에서 복제 및 통합에 적합한 벡터를 만드는 추가적인 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 상기 바이러스 벡터는 원핵 생물 및 진핵 생물 모두에서 복제 및 통합에 적합한 벡터를 만드는 서열 요소를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 바이러스 벡터는 프로모터 및 인핸서와 같은 추가적인 전사 및 번역 개시 서열; 및 폴리아데닐화 신호와 같은 추가적인 전사 및 번역 종결자를 포함할 수 있다. AAV 벡터에 포함될 수 있는 다양한 조절 요소는 본 발명에서 참고로 인용된 미국 특허 공개 제2012/0232133호에 상세히 기재되어있다.

[0137] 본 발명은 개체에서 AAV를 표적 환경 (예를 들어, CNS, PNS, 및 심장)으로 지시할 수 있는 타겟팅 펩타이드를 포함하는 AAV 벡터를 제공한다. 일부 실시 양태에서, 상기 타겟팅 펩타이드는 상기 AAV 벡터의 캡시드 단백질의 일부이다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터는 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 단백질을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV의 캡시드는 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열은 상기 AAV 벡터의 캡시드 단백질의 일부이다. 일부 실시 양태에서, 상기 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)은 상기 벡터 (서열번호: 45)의 AAV 서열의 AA588-589 사이에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)은 상기 벡터 (서열번호: 45)의 AAV 서열의 AA586-592 사이에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 서열 QAVRTSL (서열번호: 37)은 서열번호: 45의 아미노산 587, 588, 589, 및 590 중 적어도 2개를 더 포함한다.

[0138] 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터, 예를 들어 상기 AAV 벡터의 캡시드 단백질은 11 개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열을 포함하고, 여기서

[0139] X_1 은 D, A, E, Q, N, G, 또는 S;

[0140] X_2 는 G, N, S, T, Q, 또는 V;

[0141] X_3 는 T, S 또는 N;

[0142] X_4 는 L 또는 V;

- [0143] X_5 는 A, S, Q, P, 또는 T;
- [0144] X_6 는 V, T, Q, N, L, 또는 M;
- [0145] X_7 은 P;
- [0146] X_8 은 F, Y, V, L, C, 또는 S;
- [0147] X_9 은 K, R 또는 S; 및
- [0148] X_{10} 및 X_{11} 의 각각은 독립적으로 임의의 아미노산이다.
- [0149] 일부 실시 양태에서, 상기 11 개의 연속적인 아미노산의 서열은 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)가 아니거나, 또는 이를 포함하지 않는다. 일부 실시 양태에서, 상기 캡시드 단백질은 아미노산 서열 AQTAVPFKAQ (서열번호: 1)를 포함하지 않는다. 본 발명에 기재된 바와 같이, X_{10} 및 X_{11} 은 독립적으로 임의의 아미노산, 예를 들어 표준 아미노산 중 임의의 것일 수 있다. 일부 실시 양태에서, X_{10} 은 A 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_{11} 은 Q 또는 P이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 D이다. 일부 실시 양태에서, X_2 는 G이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_6 는 V 또는 T이다. 일부 실시 양태에서, X_8 은 F이다. 일부 실시 양태에서, 아미노산 $X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 LAVPFKAQ (서열번호: 80)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, 및 상기 아미노산 서열 $X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 VPFKAQ (서열번호: 81)이다. 일부 실시 양태에서, X_3 는 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, X_5 는 A이다. 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 는 T, X_4 는 L, 및 상기 아미노산 서열 $X_8X_9X_{10}X_{11}$ 은 FKAQ이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6$ 는 AQTAV (서열번호: 83), X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 $X_7X_8X_9$ 은 PFK이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8$ 은 AQTAVPF (서열번호: 84)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 DGTATPFKXX (X는 임의의 아미노산일 수 있다, 서열번호: 68)이다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산 $X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7X_8X_9X_{10}X_{11}$ 의 서열은 GGTATPFKAQ (서열번호: 10)이다. 본 발명에 설명된 실시 양태들의 다양한 조합이 본 발명의 범위에 포함된다. 예를 들어, X_{10} 이 A일 때, X_{11} 은 Q 또는 P; 및 X_1 이 D일 때, X_2 는 G, N, S, T, 및 V 중 어느 하나 일 수 있다. 다른 예로서, X_3 이 T이고 X_4 가 L일 때, X_5 는 A일 수 있다.
- [0150] 일부 실시 양태에서, X_4 , X_5 , X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} , 및 X_{11} 은 각각 L, A, V, P, F, K, A, 및 Q; 및 X_3 는 T, S, 또는 N이다. 일부 실시 양태에서, X_3 가 T인 것이 유리하다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_1X_2X_3$ 은 AQT, DGT, GGT, EGT, DST, EST, QGT, NQT, SGS, SGN, ATT, AVT, 또는 ART이다.
- [0151] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A 및 X_2 는 Q; X_6 , X_7 , X_8 , X_9 , X_{10} 및 X_{11} 은 각각 V, P, F, K, A, Q; 및 X_3 은 T 및 X_4 는 L이다. 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열 $X_3X_4X_5$ 는 TLA이다.
- [0152] 일부 실시 양태에서, X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_8 은 F, X_9 는 K, X_{10} 은 A, 및 X_{11} 은 Q, 및 상기 아미노산 서열 $X_5X_6X_7$ 은 AVP, ATP, AQP, QQP, PQP, SNP, STP, SQP, QLP, TMP, 또는 TTP이다.
- [0153] 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 AQTAVPFKAQ(서열번호: 1)이다.
- [0154] X_1 은 A, X_2 는 Q, X_3 은 T, X_4 는 L, X_5 는 A, X_6 은 V, X_7 은 P, 및 X_8 은 F, 및 상기 아미노산 서열 $X_9X_{10}X_{11}$ 은 KAQ, KAP, 또는 SNP이다.
- [0155] 일부 실시 양태에서, 상기 아미노산 서열은 상기 AAV 벡터의 캡시드 단백질의 일부이다. 일부 실시 양태에서,

상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 상기 벡터의 AAV 캡시드 단백질 서열 서열번호: 45의 AA586 및 589 사이에 삽입된다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 서열번호: 45의 아미노산 587, 588, 589, 또는 590 중 적어도 2개를 더 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 11개의 연속적인 아미노산의 서열은 서열번호: 1-36 중 하나이다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53 및 65-68 중 하나의 적어도 4개의 연속적인 아미노산을 포함한다.

[0156] 본 발명에 기재된 바와 같이, 상기 rAAV는 AAV 캡시드 단백질의 AA588 및 AA589 사이에 임의추출된 서열의 7개의 아미노산(AA)을 삽입함으로써 만들어진 변이체를 포함하는 캡시드의 라이브러리로부터 동정될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 K449R 치환, A587D 치환, Q588G 치환, A587G 치환, Q588G 치환, V592T 치환, K595S 치환, A595N 치환, Q597P 치환, 및 이들의 조합을 포함하나, 이에 제한되지 않는 야생형 AAV 캡시드 단백질과 비교하여 다양한 치환을 가질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 캡시드 단백질은 상기 야생형 AAV9 캡시드와 동일한 서열을 가지나 K449R 치환과 함께 가진다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV9 캡시드 단백질은 상기 아미노산 치환 A587D 및 Q588G를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV9 캡시드 단백질은 상기 아미노산 치환 A587G 및 Q588G를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV9 캡시드 단백질은 상기 아미노산 치환 V592T를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV9 캡시드 단백질은 상기 아미노산 치환 K595S, A595N, 및 Q597P를 포함한다.

[0157] 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 타겟팅 펩타이드는 단일 시스템 (예를 들어, 단일 AAV 벡터, 단일 AAV 캡시드 단백질, 또는 단일 rAAV)에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 타겟팅 서열을 사용할 수 있고, 또한 인간과 같은 개체에 존재하는 기존 항체에 의한 AAV의 인식을 감소시키기 위해 다른 부위를 변형시킬 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 AAV 벡터는 친화성/표적화, 발현 속도 및 가능한 면역 반응에 영향을 미치는 캡시드를 포함할 수 있다. 상기 벡터는 또한 rAAV를 포함할 수 있는데, 이 계놈은 조절 서열과 함께 이식유전자/치료 양상(예를 들어, 서열)을 운반한다. 일부 실시 양태에서, 상기 벡터는 목표 분자 (치료 분자, 진단 분자 등)이거나 이를 이동시키는 기질 내에/상에 타겟팅 서열을 포함할 수 있다.

[0158] 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드는 일부 실시 양태에서, 개체에서 표적 환경 (예를 들어, CNS, PNS, 심장 또는 이들의 조합)에 대한 rAAV의 형질도입 효율을 상기 타겟팅 펩타이드를 포함하지 않는 AAV와 비교하여 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 본 발명에 개시된 상기 타겟팅 펩타이드의 하나 이상을 rAAV에 포함시키는 것은 상기 타겟팅 펩타이드를 포함하지 않는 AAV와 비교하여 형질도입 효율을 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 1.5 배, 2 배, 2.5 배, 3 배, 3.5 배, 4 배, 4.5 배, 5 배, 5.5 배, 6 배, 6.5 배, 7 배, 7.5 배, 8 배, 10 배, 20 배, 30 배, 40 배, 50 배, 60 배, 70 배, 80 배, 90 배, 100 배, 또는 이들 값의 임의의 2개 사이의 범위까지, 또는 적어도 상기 값들까지 증가시킬 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 증가는 적어도 2 배이다. 일부 실시 양태에서, 상기 증가는 40-90 배 증가이다. 일부 실시 양태에서, 상기 형질도입 효율은 rAAV를 CNS로 형질도입 하는 것에 대한 증가이다. 일부 실시 양태에서, 상기 형질도입 효율은 rAAV를 PNS로 형질도입 하는 것에 대한 증가이다. 일부 실시 양태에서, 상기 형질도입 효율은 rAAV를 심장으로 형질도입 하는 것에 대한 증가이다. 일부 실시 양태에서, 상기 형질도입 효율은 rAAV를 심근 세포, 감각 뉴런, 후근신경절, 내장 기관, 또는 이들의 임의의 조합으로 형질도입 하는 것에 대한 증가이다.

[0159] 일부 실시 양태에서, 정상적으로 복제 할 수 있는 조건하에 바이러스의 복제를 예방하지 못하도록 변형된 전체 rep 및 cap 서열을 둘 다 포함하는 AAV 계놈을 포함하는 캡시드 라이브러리가 제공된다 (아데노 바이러스와 같은 헬퍼 바이러스와 함께 포유동물 세포의 동시감염). 유사 야생형 ("wt") 계놈은 "wt" AAV 계놈 내에 가공된 cap 유전자를 갖는 것일 수 있다.

[0160] 일부 실시 양태에서, 상기 캡시드 라이브러리는 역전 말단 반복(ITR) 옆에 위치한 상기 바이러스 복제 유전자(rep) 및 캡시드 유전자(cap)를 포함하는 "유사-야생형" AAV 계놈 내에서 제조된다. 일부 실시 양태에서, 상기 캡시드 라이브러리는 역전 말단 반복(ITR) 옆에 위치한 상기 바이러스 복제 유전자(rep) 및 캡시드 유전자(cap)를 포함하는 "유사-야생형" AAV 계놈 내에서 제조되지 않는다.

[0161] 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV 계놈은 cap 유전자 및 cap 유전자 산물의 발현 및 스플라이싱(splicing)에 필요한 rep 유전자 내의 서열만을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 캡시드 유전자 재조합 효소 인식 서열이 이들 서열의 옆에 위치한 역전 말단 반복과 함께 제공된다.

[0162] 일부 실시 양태에서, 상기 시스템은 특이적 세포/기관의 향상된 표적화를 나타내는 캡시드를 발달시키는데, 면역 회피하는 캡시드를 선택하는데, 상동재조합에서 보다 많은 계놈을 선택하는데, 세포 내의 이중 가닥 DNA 계놈으로의 단일 가닥 DNA 계놈의 전환 효율성을 증가시키는 계놈 요소를 선택하는데 및/또는 세포 내에서 지속

적인, 환형으로의 AAV 게놈의 전환을 증가시키는 게놈 요소를 선택하는데 사용될 수 있다.

[0163] AAV 벡터 및 rAAV의 사용

[0164] 본 발명에 개시된 상기 AAV 벡터는 예를 들어, 핵산을 전달하기 위한 개체의 표적 환경 (예를 들어, CNS, PNS, 심장, 이들의 임의의 조합, 및 다른 목표 시스템)으로 효과적으로 형질도입 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 핵산 서열을 신경계로 전달하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 본 발명에서 제공된 타겟팅 서열 중 어느 하나 이상을 포함하는 단백질을 제공하는 단계를 포함 할 수 있다. 상기 단백질은 AAV의 캡시드의 일부일 수 있다. 상기 AAV는 신경계로 전달되는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 그런 다음 개체에 상기 AAV를 투여할 수 있다.

[0165] 일부 실시 양태에서, 표적 환경 (예를 들어, 신경계)에 전달되는 상기 핵산 서열은 신경계 및/또는 전달 지역 또는 주변 조직 또는 환경에 일부 사용 또는 이점인 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 영양 인자, 성장 인자, 또는 형질도입된 세포로부터 방출되고 그 세포 및/또는 주변 세포들의 생존 또는 기능에 영향을 줄 수 있는 다른 가용성 인자를 포함 하나 이에 제한되지 않는, 목표 단백질을 암호화하는 핵산일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 유전자에 유전적 돌연변이(들)을 갖는 인간 또는 동물에게 단백질 기능을 회복시키는 cDNA일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 세포의 활성 또는 상태를 조절하거나 변화시키는 데 사용될 수 있는 단백질을 암호화하는 cDNA일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 세포의 상태를 평가하기 위해 사용되는 단백질을 암호화하는 cDNA일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 게놈 공학을 수행하기 위한 cDNA 및/또는 관련된 RNA일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 상동재조합을 통한 게놈 편집을 위한 서열일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 치료용 RNA를 암호화하는 DNA 서열일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 shRNA 또는 인공 miRNA 전달 시스템일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 핵산 서열은 내인성 유전자의 스플라이싱(splicing)에 영향을 주는 DNA 서열일 수 있다.

[0166] 본 발명에서 사용된 "목표 단백질"은 자연적으로 발생 및 비자연적으로 발생하는 단백질을 포함하는 임의의 단백질일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 목표 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드는 본 발명에 개시된 AAV 벡터 중 하나에 존재할 수 있고, 여기서 상기 폴리뉴클레오티드는 프로모터와 작동 가능하게 연결된다. 일부 경우, 상기 프로모터는 숙주 세포 (예를 들어, 인간 뉴런)에서 목표 단백질(들)의 발현을 유도할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 항-타우(tau) 항체, 항-AB 항체, ApoE 이소폼(isoform)이다.

[0167] 목표 단백질의 예로는 루시퍼라제; 형광 단백질 (예: GFP); 성장 호르몬 (GH) 및 이의 변이체; 인슐린-유사 성장 인자 (IGF) 및 이의 변이체; 과립구 콜로니-자극 인자 (G-CSF) 및 이의 변이체; 에리스로포이에틴 (EPO) 및 이의 변이체; 인슐린, 예컨대 프로인슐린(proinsulin), 프리프로인슐린(preproinsulin), 인슐린, 인슐린 유사체 (insulin analogs) 등; 항체 및 이의 변이체, 예컨대 하이브리드(hybrid) 항체, 키메라항체(chimeric antibodies), 인간화(humanized) 항체, 모노클로날(monoclonal) 항체; 항체의 항원 결합 단편 (Fab 단편), 항체의 단쇄 가변성 단편 (scFV 단편); 디스트로핀(dystrophin) 및 이의 변이체; 응고 인자 및 이의 변이체; 낭포성 섬유증 막투성 전도 조절제 (CFTR) 및 이의 변형; 및 인터페론 및 이의 변이체가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.

[0168] 일부 실시 양태에서, 목표 단백질은 치료 단백질 또는 그의 변이체이다. 치료 단백질의 비제한적인 예로는 혈액 인자, 예컨대 β -글로빈, 헤모글로빈, 조직 플라스미노겐(plasminogen) 활성화제 및 응고 인자; 콜로니 자극 인자 (CSF); 인터루킨, 예컨대 IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9 등; 성장 인자, 예컨대 케라티노사이트(keratinocyte) 성장 인자 (KGF), 줄기 세포 인자 (SCF), 섬유아세포 성장 인자 (FGF, 예컨대 염기성 FGF 및 산성 FGF), 간세포 성장 인자 (HGF), 인슐린 유사 성장 인자 (IGF), 뼈 형성 단백질 (BMP), 상피 성장 인자 (EGF), 성장 분화 인자-9 (GDF-9), 간암 유래 성장 인자 (HDGF), 미오스타틴(myostatin) (GDF-8), 신경 성장 인자 (NGF), 뉴로트로핀(neurotrophin), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 트롬보포이에틴 (thrombopoietin) (TPO), 형질전환 성장 인자 알파 (TGF- α), 형질전환 성장 인자 베타 (TGF- β) 등; 가용성 수용체, 예컨대 가용성 TNF- α 수용체, 가용성 VEGF 수용체, 가용성 인터루킨 수용체 (예컨대, 가용성 IL-1 수용체 및 가용성 II형 IL-1 수용체), 가용성 γ/δ T 세포 수용체, 가용성 수용체의 리간드-결합 단편 등; 효소, 예컨대 α -글루코시다아제(α -glucosidase), 이미글루카라아제(imiglucarase), β -글루코세레브리사이드(β -glucocerebrosidase), 및 알글루세라아제(alglucerase); 효소 활성화제, 예컨대 조직 플라스미노겐(plasminogen) 활성화제; 케모카인, 예컨대 IP-10, 인터페론-감마에 의해 유도된 모노카인 (Mig), Gro α /IL-8, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , MCP-1, PF-4 등; 혈관형성제, 예컨대 혈관 내피 성장 인자 (VEGF, 예컨대, VEGF121,

VEGF165, VEGF-C, VEGF-2), 형질전환 성장 인자- β , 염기성 섬유 아세포 성장 인자, 신경아교종 유래 성장 인자, 안지오제닌(angiotensin), 안지오제닌-2(angiotensin-2) 등; 항-혈관형성제, 예컨대 가용성 VEGF 수용체; 단백질 백신; 신경활성 펩타이드, 예컨대 신경 성장 인자(NGF), 브래디키닌(bradykinin), 콜레키스토키닌(cholecystokinin), 가스틴(gastrin), 세크레틴(secretin), 옥시토신(oxytocin), 생식샘자극호르몬-방출 호르몬, 베타-엔도르핀(endorphin), 엔케팔린(encephalin), 물질(substance) P, 소마토스타틴(somatostatin), 프로락틴(prolactin), 갈라닌(galanin), 성장 호르몬-방출 호르몬, 봄베신(bombesin), 다이노르핀(dynorphin), 와파린(warfarin), 뉴로텐신(neurotensin), 모틸린(motilin), 갑상선 자극 호르몬, 뉴로펩타이드(neuropeptide) Y, 황체 형성 호르몬, 칼시토닌(calcitonin), 인슐린, 클루카곤, 바소프레신, 안지오텐신 II, 갑상선 자극 호르몬-방출 호르몬, 혈관작용 장 펩타이드, 수면 펩타이드(sleep peptide) 등; 혈전 용해제; 심방성 나트륨 이뇨 펩타이드; 릴렉신(relaxin); 신경교섬유질 산성 단백질; 여포 자극 호르몬(FSH); 인간 알파-1 항트립신; 백혈병 억제 인자(LIF); 형질전환 성장 인자(TGF); 조직 인자, 황체 형성 호르몬; 대식세포 활성화 인자; 종양 괴사 인자(TNF); 호중구 주화성 인자(NCF); 신경 성장 인자; 금속 단백질 분해 효소의 조직 억제제; 혈관작용 장 펩타이드; 안지오제닌(angiotensin); 안지오토프린(angiotropin); 피브린(fibrin); 히루딘(hirudin); IL-1 수용체 길항제; 등이 포함된다. 목표 단백질의 몇몇 다른 비제한적인 예는 섬모 신경 영양 인자(CNTF); 뇌-유래 신경 영양 인자(BDNF); 뉴로트로핀(neurotrophin) 3 및 4/5 (NT-3 및 4/5); 신경교세포 유래 신경 영양 인자(GDNF); 방향족 아미노산 데카르복실라제(decarboxylase) (AADC); 혈우병 관련 응고 단백질, 예컨대 인자 VIII, 인자 IX, 인자 X; 디스트로핀(dystrophin) 또는 니니(nini)-디스트로핀; 리소좀 산 리파아제; 페닐알라닌 히드록실라제(phenylalanine hydroxylase) (PAH); 당원저장병-관련 효소, 예컨대 글루코스-6-포스포타아제, 산 말타아제, 글리코겐 탈분기 효소, 근육 글리코겐 포스포릴라제(phosphorylase), 간 글리코겐 포스포릴라제, 근육 포스포프락토키나제(phosphofructokinase), 포스포릴 라제 키나아제 (예컨대, PHKA2), 글루코스 운반체(transporter) (예컨대, GLUT2), 알돌라제(aldolase) A, β -엔올라아제(β -enolase), 및 글리코겐 합성효소; 리소좀 효소 (예컨대, 베타-N-아세틸헥소사미니다아제(acetylhexosaminidase) A); 및 그의 임의의 변이체를 포함한다.

- [0169] 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 상기 전술한 단백질 중 임의의 것과 같은 단백질의 활성 단편이다. 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 2개 이상의 단백질의 전부 또는 일부를 포함하는 융합 단백질이다. 일부 실시 양태에서, 융합 단백질은 상기 전술한 단백질 중 임의의 것의 전부 또는 일부를 포함 할 수 있다.
- [0170] 일부 실시 양태에서, 상기 바이러스 벡터는 2개 이상의 목표 단백질에 대한 코딩 영역을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 상기 2개 이상의 목표 단백질은 서로 같거나 다를 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 2개 이상의 목표 단백질은 폴리펩타이드, 예를 들어 동일한 항체의 경쇄(들) 및 중쇄(들)와 관련된다.
- [0171] 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 다중-서브유닛(multi-subunit) 단백질이다. 예를 들어, 상기 목표 단백질은 2개 이상의 서브유닛, 또는 2개 이상의 독립적인 폴리펩타이드 사슬을 포함 할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 항체일 수 있다. 항체의 예는 다양한 아이소타입(isotype) (예를 들어, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgD, IgE, 및 IgM)의 항체; 단클론 항체의 항원-결합 단편을 포함하는, 당업자에게 공지된 임의의 수단에 의해 생성된 단클론 항체; 인간화 항체; 키메라항체; 단일 사슬 항체; Fv, F(ab')₂, Fab', Fab, Facb, scFv 등과 같은 항체 단편;을 포함하나, 이에 제한되지 않고, 상기 항체는 항원에 결합할 수 있는 것이 제공된다. 일부 실시 양태에서, 상기 항체는 전체-길이 항체이다. 일부 실시 양태에서, 상기 목표 단백질은 면역접합체(immunoadhesin)가 아니다.
- [0172] 일부 실시 양태에서, 상기 결과로 초래된 표적 분자는 수명이 긴 세포 집단으로의 생체 내 유전자 전달 적용과 관련이 있는 방법 및/또는 치료에서 사용될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이들은 예를 들어: 척수근위축증(SMA), 근위축성 측삭 경화증(ALS), 파킨슨병, 프리드라이히 운동실조, 폼페병, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 배튼병, 리소좀 축적질환, 다형성 교아종, 레트 증후군, 레버 선천성 흑내장, 만성 통증, 뇌졸중, 척수 손상, 외상성 뇌 손상 및 리소좀 축적질환을 포함하는, 임의의 rAAV-기반 유전자 치료에 적용될 수 있다. 또한, rAAV는 광유전학 기술, 유전자 과발현, shRNA 또는 miRNA로 유전자 녹다운(knock-down), miRNA 스폰지 또는 디코이(decoy)를 사용하는 내생 miRNA의 조절, 조건부 유전자 결실을 위한 재조합효소 전달, 조건부(재조합효소-의존적인) 발현, 또는 CRISPRs, TALENs, 및 아연 핑거 뉴클레아아제(nuclease)로 유전자 편집하는 것과 같은 비-치료 과학 연구를 위한 이식유전자의 생체 내 전달에 사용될 수 있다.
- [0173] 본 발명은 본 발명에 기재된 방법 및 조성물을 사용하는 헌팅턴병을 치료 및/또는 예방하는 방법을 제공한다. 상기 헌팅턴병을 치료 및/또는 예방하는 방법은 개체(들)를 확인하는 단계, 본 발명에서 제공되는 바와 같이 개체의 신경계로 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위한 벡터를 제공하는 단계, 유효량의 벡터를 개체에게 투여함으로써

써 개체에서 헌팅틴병을 치료 및/또는 예방하는 단계를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 헌팅틴병을 가진 개체를 치료하는 방법은 상기 벡터가 헌팅틴 (HTT) 유전자의 전사를 억제하기 위해 조작된 아연 핑거 단백질 (ZFP)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 조성물을 전달하는 조성물을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 ZFP는 CAG 반복 길이-의존 방식으로 HTT 유전자의 CAG 반복 영역에 결합함으로써 개체에서 헌팅틴병을 일으키는 원인이 되는 HTT 유전자 대립 형질의 전사를 선택적으로 억제한다. 일부 실시 양태에서, ZNFTR은 상기 HTT 유전자의 두 대립 형질의 전사를 선택적으로 억제한다.

[0174] 일부 실시 양태에서, 개체에게 투여되는 치료제는 CAG 반복에 결합함으로써 HTT 대립 형질을 유발하는 질병으로부터 전사된 RNA 분자의 선택적 분해를 유도하거나 또는 RNA 분자의 번역을 억제함으로써 헌팅틴(Huntingtin) 발현을 낮추는(knock down)시키는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA)를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 헌팅틴병 환자를 치료하는 방법은 rAVV 게놈 내에 헌팅틴-특이적 마이크로 RNA 발현 카세트 (cassette)를 혼입시키는 것을 포함한다. 그런 다음, 이는 혈관계를 통한 전달을 위해 개시된 서열 변이체 중 하나에 패키징될 수 있다.

[0175] 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 HTT 대립 형질의 하나 또는 둘 다로부터 전사된 RNA 분자의 분해를 유도하거나 또는 RNA 분자의 번역을 억제함으로써 헌팅틴(Huntingtin) 발현을 낮추는(knock down)시키는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA)를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 대립 형질을 유발하는 질병 내에 존재하는 뉴클레오티드 다형성 중 하나 이상의 선택적 인식을 통한 HTT 대립 형질을 유발하는 질병으로부터 전사된 RNA 분자의 선택적 분해를 유도하거나 또는 RNA 분자의 번역을 억제함으로써 헌팅틴(Huntingtin) 발현을 낮추는(knock down)시키는 짧은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA)를 포함한다. 상기 뉴클레오티드 다형성은 정상 및 대립 형질을 유발하는 질병 사이를 구별하기 위해 당업자에 의해 사용될 수 있다

[0176] 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 HTT RNA의 스플라이싱(splicing) 또는 생산을 변경시키는 RNA 또는 단백질을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (Transcription activator-like effector nuclease, TALEN), 아연 핑거 뉴클레아제(zinc finger nuclease) 또는 HTT 유전자 서열의 변경을 위해 HTT 유전자 내 또는 인접하게 DNA Nick(nick) 또는 이중 가닥 DNA 절단을 유도하기 위해서 당업자에 의해 조작된 일정한 간격으로 분포하는 짧은 재발성 반복(clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-cas9 유전자(CRISPR/Cas9) 시스템을 사용하여 게놈 편집을 위한 하나 이상의 폴리펩타이드 및/또는 RNA를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 HTT 유전자 유래 폴리펩타이드에 결합하는 폴리펩타이드, HTT 유전자 유래 폴리펩타이드의 형태를 변경하거나 또는 HTT 유전자 유래 폴리펩타이드의 어셈블리(assembly)를 함으로 변화시키거나 또는 HTT 유전자 유래 폴리펩타이드의 반감기를 변경하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 HTT 유전자 유래 폴리펩타이드의 전사 후 변형을 일으키거나 예방하는 RNA 또는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 HTT 유전자 유래 폴리펩타이드의 형태 및/또는 안정성에 영향을 주기 위해 당업자에게 공지된 샤프론(chaperone) 단백질로부터의 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0177] 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 개체의 목표 세포 내에서 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 RNA 및/또는 단백질 산물의 발현에 영향을 주기 위해 당업자에게 공지된 조절 요소를 포함한다.

[0178] 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여되는 치료제는 선택의 임의의 질병 또는 장애에 적합한 치료제를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이는 본 발명에 기재된 방법 및 조성물을 사용하는 알츠하이머병을 치료 및/또는 예방하기 위한 조성물, 예를 들어, 알츠하이머병에 대한 ApoE2 또는 ApoE3; SMA의 치료를 위한 SMN; 프리드리히 운동실조의 치료를 위한 프라탁신(frataxin) 전달; 및/또는 ALS의 치료를 위한 shRNA 또는 miRNA를 포함할 수 있다.

[0179] 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 변이체는 심장 근육으로의 유전자 전달의 효과적인 수단으로서 사용될 수 있다. 그렇게 하면 프리드리히 운동실조, 심부전, 허혈성 심장 질환, 심장 비대, 만성 통증 및 말초 신경 손상을 비롯한 여러 가지 질병 및 손상을 연구하고 치료하는 데 유용할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 변이체는 혈관계를 통해 투여 될 때 말초 신경을 형질도입하는데 사용될 수 있다.

[0180] 일부 실시 양태에서, 상기 전달을 위한 치료제는 파킨슨병 치료를 위한 시누클레인(synuclein) 응집을 감소시키기 위한 단백질 (단백질을 암호화함) 또는 RNA 기반 전략이다. 예를 들어, 응집에 내성인 시누클레인

(synuclein) 변이체를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 전달함으로써 내인성 시누클레인(synuclein)의 응집을 파괴 할 수 있다.

- [0181] 일부 실시 양태에서, AD, PD, ALS, SMA, 또는 HD의 치료를 위한 영양 인자를 암호화하는 이식유전자가 포함된 치료제일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 영양 인자는 예를 들어, BDNF, GDNF, NGF, LIF 및/또는 CNTF가 사용되거나 이들을 포함할 수 있다.
- [0182] 바이러스 벡터의 투여량은 주로 환자의 치료되는 상태, 연령, 체중 및 건강과 같은 인자에 따라 달라질 수 있으며, 따라서 환자마다 다를 수 있다. 예를 들어, 상기 바이러스 벡터의 치료적으로 유효한 인간 투여량은 일반적으로 약 1×10^9 내지 1×10^{16} 게놈 바이러스 벡터의 농도를 포함하는 용액의 약 0.1 ml 내지 약 100 ml의 범위이다. 바람직한 인간 투여량은 약 1×10^{13} 내지 1×10^{16} AAV 게놈일 수 있다. 상기 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료 효과의 균형을 맞추기 위해 조절될 것이며, 그러한 투여량은 재조합 벡터가 사용되는 치료 적용에 따라 달라질 수 있다. 이식유전자의 발현 수준은 상기 벡터로부터 결과를 나타내는 투여량의 빈도를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다.
- [0183] 일부 실시 양태에서, 상기 벡터는 개체의 목표 세포 내에서 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 RNA 및/또는 단백질 산물의 발현에 영향을 주기 위해 당업자에게 공지된 조절 요소를 또한 포함 할 수 있다.
- [0184] 일부 실시 양태에서, 기능적으로, 폴리뉴클레오티드의 발현은 작동 가능하게 연결된 조절 요소에 의해 적어도 부분적으로 조절되고, 이러한 요소(들)가 폴리 뉴클레오티드의 전사, 폴리뉴클레오티드에 의해 암호화되는 RNA의 수송, 가공 및 안정성을 조절한다. 발현 조절 요소의 구체적인 예는 전사된 서열의 5'에 주로 위치하는 프로모터이다. 발현 조절 요소의 다른 예는 전사된 서열의 5' 또는 3' 또는 전사된 서열 내에 위치될 수 있는 인핸서(enhancer)이다. 조절 요소의 또 다른 예는 마이크로 RNA에 대한 인식 서열이다. 조절 요소의 또 다른 예는 인트론(intron) 및 상기 인트론의 스플라이싱(splicing)을 조절하는 스플라이스 도너(splice donor) 및 스플라이스 수용체 서열이다. 조절 요소의 또 다른 예는 전사 종결 신호 및/또는 폴리아데닐화(polyadenylation) 서열이다.
- [0185] 발현 조절 요소 및 프로모터는 본 발명에서 "조직-특이적 발현 조절 요소/프로모터"로 언급되는 특정 조직 또는 세포 유형에서 활성인 것들을 포함한다. 조직-특이적 발현 조절 요소는 전형적으로 특정 세포 또는 조직 (예를 들어, 간, 뇌, 중추 신경계, 척수, 눈, 망막 또는 폐 안에)에서 활성이다. 발현 조절 요소는 전형적으로 이러한 세포, 조직 또는 기관에서 활성인데, 이는 이들이 특정 세포, 조직 또는 기관 유형에 고유한 전사 활성제 단백질, 또는 전사의 다른 조절제에 의해 인식되기 때문이다.
- [0186] 발현 조절 요소는 또한 많은 상이한 세포 유형에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 유도 할 수 있는 편재하거나 불규칙한 프로모터/인핸서를 포함한다. 이러한 요소로는 시토메갈로바이러스 (CMV) 직접적인 초기 프로모터/인핸서 서열, 라우스육종바이러스 (RSV) 프로모터/인핸서 서열 및 다양한 포유 동물 세포 유형에서 활성인 다른 바이러스 프로모터/인핸서; 베타 액틴, 유비퀴틴 또는 EF1 알파를 포함하지만 이에 제한되지 않는, 편재적으로 또는 불규칙적으로 발현된 포유 동물 유전자로부터의 프로모터/인핸서 서열; 또는 자연에 존재하지 않는 합성 요소가 포함되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0187] 발현 조절 요소는 또한 조절 가능한 방식으로 발현을 유도 할 수 있는데, 즉 신호 또는 자극은 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가 또는 감소시킨다. 신호 또는 자극에 반응하여 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키는 조절 가능한 요소는 또한 "유도성 요소(inducible element)"(즉, 신호에 의해 유도됨)로 언급된다. 특정 예에는 호르몬 (예를 들어, 스테로이드) 유도성 프로모터가 포함되나, 이에 제한되는 것은 아니다. 신호 또는 자극에 반응하여 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키는 조절 가능한 요소는 "억제성 요소(repressible element)"로 언급된다 (즉, 상기 신호가 제거되거나 부재할 때 발현이 증가되는 것과 같이 상기 신호는 발현을 감소시킨다). 전형적으로, 그러한 요소에 의해 부여되는 증가 또는 감소의 양은 존재하는 신호 또는 자극의 양에 비례한다; 신호 또는 자극의 양이 높을수록 발현의 증가 또는 감소가 커진다.
- [0188] 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 하나 이상의 타겟팅 펩타이드를 포함하는 캡시드 단백질을 갖는 rAAV는 신경계를 효과적으로 형질도입하는데 사용될 수 있다. 이는 rAAV를 예를 들어, 헌팅턴병(HD), 알츠하이머병(AD), 파킨슨병(PD), 근위축성 측삭 경화증, 척수근위축증 I형 및 II형, 프리드라이히 운동실조, 척수소뇌실조증, 및 크라베병, 샌드호프병, 테이삭스병, 고세병(I형, II형 또는 III형), 니만피크병(NPC1 또는 NPC2 결핍), 후롤러증후군, 폼페병, 및/또는 배튼병증후를 포함하나 이에 제한되지 않는 신경계 내 세포를 수반하는 임의의

리소좀 축적질환을 치료하기 위한 치료제의 전달에 유용하게 만든다.

[0189] 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 하나 이상의 타겟팅 펩타이드를 포함하는 캡시드 단백질을 갖는 상기 rAAV는 심장 근육, 말초 신경, 또는 이들의 임의의 조합을 효과적으로 형질도입하는데 사용될 수 있다. 이는 상기 rAAV를 예를 들어, 프리드라이히 운동실조, 심부전, 허혈성 심장 질환, 심장 비대증, 만성 통증 및/또는 말초 신경 손상을 치료하기 위한 치료제의 전달에 유용하게 만든다.

[0190] 일부 실시 양태에서, 본 발명에 개시된 하나 이상의 타겟팅 펩타이드를 포함하는 캡시드 단백질을 갖는 상기 rAAV는 개체의 표적 환경에서 특정 세포 유형에 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 상기 rAAV는 개체 (예를 들어, 포유 동물)의 신경계 (PNS, CNS, 또는 둘 모두를 포함하는)에서 뉴런 및 교세포에 유전자를 전달하는데 사용될 수 있다. 상기 타겟팅 펩타이드는 예를 들어 AAV-PHP.N (서열번호: 46)일 수 있다. 본 발명에 개시된 상기 조성물 및 방법은 예를 들어, (i) 헌팅턴병 환자에서 돌연변이 헌팅틴의 발현을 감소시키는 것, 예를 들어 rAAV 게놈 내에 헌팅틴 특이적 마이크로RNA 발현 카세트(cassette)를 혼입시키는 것 및 예를 들어 혈관계를 통한 전달을 위해 변이체 rAAV(예를 들어, AAV-PHP.N) 안에 rAAV 게놈을 패키징(packaging)함으로써, (ii) 프리드라이히 운동실조 환자에게 프라탁신(Frataxin) 유전자의 기능적 복제물을 전달하는 것, (iii) 유전자 돌연변이 때문에 정상적인 리소좀 기능에 중요한 효소의 발현이 부족한 환자 (예를 들어, 니만-피크병 (Neimann-Pick disease), III형 점액다당류증, 및/또는 고세병)에서 상기 효소의 발현을 회복시키는 것, (iv) 상기 rAAV (예를 들어, AAV-PHP.N)를 질병의 동물 모델을 생성하는데 사용하는 것, 또는 이들의 조합에 사용될 수 있다.

[0191] 약학적 조성물 및 투여 방법

[0192] 또한, 본 발명은 본 발명에 개시된 하나 이상의 상기 rAAV 바이러스 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 제공한다. 상기 조성물은 또한 희석제, 안정화제, 부형제 및 보조제와 같은 추가 성분을 포함 할 수 있다. 본 발명에서 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한" 담체, 부형제, 희석제, 보조제, 또는 안정화제는 사용된 투여량 및 농도에 노출된(바람직하게 비활성의) 세포 또는 개체에 독성이 없거나 당업자에 의해 확인된 바로 허용가능한 수준의 독성을 가진다.

[0193] 상기 담체, 희석제 및 보조제는 인산염, 시트르산 또는 다른 유기산과 같은 완충제; 아스코르브산과 같은 항산화제; 저분자량 폴리펩타이드 (예를 들어, 약 10개 잔기 미만); 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역 글로불린과 같은 단백질; 폴리비닐피롤리돈과 같은 친수성 중합체; 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 아르기닌, 또는 라이신과 같은 아미노산; 당당류, 이당류, 및 포도당, 만노오스, 또는 덱스트린을 포함하는 다른 탄수화물; EDTA와 같은 킬레이트제; 당알콜, 만니톨 또는 소르비톨과 같은 당알코올; 나트륨과 같은 염-형성 반대 이온; 및/또는 TweenTM, PluronicTM, 또는 폴리에틸렌 글리콜 (PEG)과 같은 비이온성 계면 활성제를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 생리학적으로 허용되는 담체는 수성 pH 완충 용액이다.

[0194] 투여되는 상기 rAAV의 적정 농도는 예를 들어, 특정 rAAV, 투여 방식, 치료 목표, 개체 및 표적화되는 세포 유형(들)에 따라 달라질 것이며, 당업계에서 표준인 방법에 의해 결정될 수 있다.

[0195] 당업자에게 손쉽게 명백해질 바와 같이, 투여될 재조합 바이러스의 유용한 생체 내 투여량 및 특정 투여 방식은 연령, 체중, 고통의 중증도 및 치료 된 동물 종, 사용된 목표 단백질을 발현하는 특정 재조합 바이러스, 및 상기 재조합 바이러스가 사용되는 특정 용도에 따라 달라질 것이다. 유효한 투여량 수준, 즉 목표하는 결과를 얻기 위해 필요한 투여량 수준의 결정은 일상적인 약학적 방법을 사용하는 당업자에 의해 달성될 수 있다. 전형적으로, 제품의 인간 임상 적용은 목표 효과가 달성될 때까지 투여량 수준을 증가시키면서 더 낮은 투여량 수준에서 개시된다. 다르게는, 허용가능한 시험관 내 연구는 확립된 약학적 방법을 사용하는 본 방법에 의해 동정된 조성물의 유용한 투여량 및 투여 경로를 확립하는데 사용될 수 있다.

[0196] 정확한 투여량은 약물별로 결정되지만, 대부분의 경우 투여량에 관한 일반화가 이루어질 수 있다. 일부 실시 양태에서, 개체의 신경계 (예를 들어, CNS)에 핵산을 전달하기 위한 상기 rAAV는 예를 들어 개체의 kg 당 재조합 바이러스의 1×10^{10} 게놈 카피(copies) (GC) 및 kg 당 2×10^{14} GC 사이의 투여량, 예를 들어 5×10^{11} GC/kg 및 5×10^{12} GC/kg 사이의 투여량으로 개체에게 주사를 통해 투여될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여된 상기 rAAV의 투여량은 kg 당 2×10^{14} GC 이하이다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여된 상기 rAAV의 투여량은 kg 당 5×10^{12} GC 이하이다. 일부 실시 양태에서, 상기 개체에게 투여된 상기 rAAV의 투여량은 kg 당

5×10^{11} GC 이하이다.

- [0197] 본 발명에 개시된 상기 재조합 바이러스는 이를 필요로 하는 개체 (예를 들어, 사람)에게 투여될 수 있다. 상기 투여의 경로는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 재조합 바이러스의 치료적으로 유효한 양은 당업계에 서의 표준 경로를 통해 상기 개체에게 투여될 수 있다. 상기 경로의 비-제한적인 예는 근육 내, 질 내, 정맥 내, 복강 내, 피하, 에피큐테니우스(epicutaneous), 피내, 직장, 안구 내, 폐, 두개 내, 골 내, 구강, 볼, 조직, 또는 비강을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 상기 재조합 바이러스는 조직의 형질도입에 의해 개체에게 투여된다. 일부 실시 양태에서, 상기 재조합 바이러스는 근육 내 주사에 의해 개체에게 투여된다. 일부 실시 양태에서, 상기 재조합 바이러스는 질 내 주사에 의해 개체에게 투여된다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV는 비경 구 경로에 의해 (예를 들어, 정맥 내, 근육 내 또는 피하 주사에 의해), 표면 난절에 의해 또는 개체의 체강 내 점중에 의해 개체에게 투여된다. 상기 rAAV 바이러스의 AAV 성분의 투여 경로(들) 및 혈청형(들)은 치료되는 감염 및/또는 질병 상태 및 목표 단백질을 발현하는 표적 세포/조직(들)을 고려하여 당업자에 의해 용이하게 결정 될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 정맥 내 투여를 통해 상기 rAAV를 투여하는 것이 유리할 수 있다.
- [0198] 상기 rAAV의 실제 투여는 상기 rAAV를 개체의 표적 조직으로 운반할 임의의 물리적 방법을 사용함으로써 수행될 수 있다. 예를 들어, 상기 rAAV는 정맥 내 투여 될 수 있다. 본 발명에 개시된 바와 같이, 상기 rAAV의 캡시드 단백질은 rAAV가 중추 신경계와 같은 목표 특정 표적 환경에 표적화되고, 목표 표적 환경 (예를 들어, CNS 친화 성)에 대한 친화성을 증강시키도록 변형될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV는 핵산을 심장, 말초 신경, 또는 이들의 조합으로 전달한다. 약학적 조성물은 예를 들어, 주사 가능한 제형으로 제조될 수 있다.
- [0199] 사용될 상기 재조합 바이러스는 액체 또는 동결 건조 형태 (동결 건조 공정 중에 바이러스를 보호하기 위한 하나 이상의 적합한 방부제 및/또는 보호제와 조합하여)로 사용될 수 있다. 유전자 치료 (예를 들어, 특정 유전자 산물에 의해 개선될 수 있는 신경 장애의)에 대해, 치료 단백질을 발현하는 재조합 바이러스의 치료적으로 유효한 양이 그러한 치료를 필요로 하는 숙주에게 투여된다. 숙주에서 면역을 유도하거나 숙주에 유전자 치료를 제공하기 위한 의학의 제조에서 본 발명에 개시된 상기 재조합 바이러스의 사용은 본 발명의 범위 내에 있다.
- [0200] 상기 rAAV에 대한 인간 투여량이 적어도 일부 조건에 대해 확립된 경우, 이들 동일한 투여량, 또는 설정된 투여량의 약 0.1% 및 500% 사이, 보다 바람직하게는 약 25% 및 250% 사이의 투여량이 사용될 수 있다. 새로 발견된 약학적 조성물의 경우와 같이 인간 투여량이 확립되지 않은 경우, 적절한 인간 투여량은 동물들에서의 독성 연구 및 효율성 연구에 의해 자격이 부여된 대로, ED50 또는 ID50 값 또는 시험 관내 또는 생체 내 연구로부터 유래된 다른 적절한 값으로부터 유추될 수 있다.
- [0201] 상기 rAAV의 치료적으로 유효한 양은 다양한 시점에서 개체에게 투여될 수 있다. 예를 들어, 상기 rAAV는 상기 개체가 질병 또는 장애를 발병하기 전, 도중 또는 후에 투여될 수 있다. 상기 rAAV는 또한 질병 또는 장애 (예를 들어, 헌팅턴병 (HD), 알츠하이머병, 파킨슨병, 근위축성 측삭경화증, 척수근위축증, 유형 I 및 II, 프리드 라이히 운동실조, 척수소뇌실조증, 및 크라베병, 샌드호프병, 테이삭스병, 고세병(I형, II형 또는 III형), 니만 피크병(NPC1 또는 NPC2 결핍), 후를러증후군, 폼페병, 배튼병, 또는 이들의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한 되지 않는, 중추 신경계 내 세포를 수반하는 리소좀 축적질환), 만성 통증, 심부전, 심부정맥, 또는 이들의 조합의 발병 전, 도중, 또는 후에 상기 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV는 질병 또는 장애의 완화 기간 동안 상기 개체에게 투여된다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV는 개체에서 질병 또는 장애의 발 병 전에 투여된다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV는 질병 또는 장애를 발달시킬 위험이 있는 개체에게 투여된다.
- [0202] 상기 rAAV 바이러스의 투여 빈도는 다양할 수 있다. 예를 들어, 상기 rAAV 바이러스는 매주 약 1 회, 2주마다 약 1 회, 매월 약 1 회, 6 개월마다 약 1 회, 매년 약 1 회, 2 년마다 약 1 회, 3 년마다 약 1 회, 4 년마다 약 1 회, 5 년마다 약 1 회, 6 년마다 약 1 회, 7 년마다 약 1 회, 8 년마다 약 1 회, 9 년마다 약 1 회, 10 년마다 약 1 회, 또는 15 년마다 약 1 회 개체에게 투여될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 상기 rAAV 바이러스는 많 아도 매주 약 1 회, 많아도 2주에 약 2 회, 많아도 매달 약 1 회, 많아도 6개월마다 약 6 회, 많아도 매년 약 1 회, 많아도 2년마다 약 1 회, 많아도 3 년마다 약 1 회, 많아도 4 년마다 약 1 회, 많아도 5 년마다 약 1 회, 많아도 6 년마다 약 1 회, 많아도 7 년마다 약 1 회, 많아도 8 년마다 약 1 회, 많아도 9 년마다 약 1 회, 많 아도 10 년마다 약 1 회, 또는 많아도 15 년마다 약 1 회 개체에게 투여된다.
- [0203] **실시예**
- [0204] 상기에서 논의된 실시 양태의 일부 양상은 하기 실시예에서 더욱 상세히 개시되며, 이는 본 발명의 범위를 제한

하는 것이 아니다.

[0205] 실시예 1

[0206] 변이체 생성을 위한 AAV-PHP.B 발달

[0207] 보다 큰 CNS 형질도입 및 뉴런의 더 선택적인 형질도입을 제공하는 AAV-PHP.B의 변이체를 발달시키기 위해, 미국 특허 공보 제2015/0079038호(상기 내용은 본 발명에 참고로 인용됨)에 기재된 상기 AAV-PHP.B 7-mer 서열(서열번호: 40)은 7-mer 서열의 3 개의 아미노산 및 무작위 아미노산들과 7-mer를 측면에 위치시키는 2 개의 아미노산의 중첩 치환을 통해 부분적으로 무작위화되었다. AAV-PHP.B를 발달시키기 위한 이 전략의 개요를 도 1에 나타내었다(X는 20개의 표준 아미노산 중 임의의 하나를 나타낸다).

[0208] AAV-PHP.N

[0209] 2 회 선별 후, 다수의 변이체가 Cre 라인 중 하나 이상으로부터 회복된 서열에서 풍부한 것으로 밝혀졌다. 이들 서열 중 하나인 AAV-PHP.N (DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4))이 각각의 변이체로서 특성화를 위해 선택되었다.

[0210] 상기 DGT LAVPFKAQ 서열은 Vgat-IRES-Cre 마우스로부터 회복된 전체 서열의 8.1%, Vglut2-IRES-Cre 마우스로부터 회복된 서열의 4.4%, GFAP-Cre 마우스로부터 회복된 서열의 0% 및 간으로부터 회복된 서열의 0%(비-cre 의존적 회복)를 나타냈다. 이러한 데이터에 기초하여, DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4)가 별아교세포 상으로 뉴런을 형질도입하는데 선택적으로 더 효율적일 것으로 생각되었다. 상기 DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4) 아미노산 서열은 2개의 상이한 뉴클레오티드 서열로부터 독립적으로 선택되었다: (i) GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (서열번호: 54), (ii) GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (서열번호: 55). D/E-S/G-TLAVPFK (서열번호: 40)와 함께 일치하는 서열은 Vgat-IRES-Cre 마우스로부터 회복된 전체 서열의 18.9%, Vglut2-IRES-Cre 마우스로부터 회복된 서열의 15.6%, GFAP-Cre 마우스로부터 회복된 서열의 8.3%, 및 2 회 선별 후 간으로부터 회복된 서열의 0% (비-cre 의존적 회복)를 차지하였다.

[0211] AAV-PHP.N (DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4))에 대한 데이터는 도 2에 나타내었다. 상기 AAV-PHP.N 서열(서열번호: 46)을 포함하는 캡시드의 동정은 다수의 Cre 이식유전자를 가진 마우스 라인에서 동시 선별을 수행하기 위해 본 발명에 개시된 CREATE 방법의 사용을 통해 가능 하였다. 함께, (i) AAV-PHP.N 서열(서열번호: 46)이 CNS 뉴런으로부터 선택적으로 회복되었지만 CNS 별아교세포 또는 간으로부터는 회복되지 않았고 (ii) 상기 AAV-PHP.N 캡시드는 선택적으로 증강된 뉴런의 형질도입을 제공하나 교세포 및 간은 아니며 (AAV-PHP.B와 비교하여), 보다 바람직한 형질 도입 특징을 갖는 신규 벡터를 조작하기 위해 다중 세포 유형에서 생체 내 선별을 수행하는 것의 유용성을 입증한다.

[0212] AAV-PHP.S

[0213] 상기 AAV-PHP.S 변이체 (서열번호: 47)는 GFAP-Cre 발현 세포를 보다 효율적으로 표적으로 하는 AAV 캡시드를 선별함으로써 발견되었다. 상기 변이체는 캡시드 단백질의 아미노산 588-589 사이에 삽입된 무작위화된 서열의 7AA (7-mer)에서의 라이브러리로부터 동정되었다(VP1 번호 매김). 상기 AAV-PHP.S는 CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (서열번호: 56)의 핵산 서열에 의해 암호화되는 QAVRTSL (서열번호: 37)의 7-mer 서열을 갖는다.

[0214] AAV9는 심장 근육으로의 유전자 전달을 위한 주요한 후보 벡터이며 또한 혈관계를 통해 투여될 때 말초 신경의 형질도입을 제공한다. 도 3A-3D에 나타난 데이터는 몸 전체에 전달된 AAV-PHP.S (서열번호: 47)는 AAV-PHP.S 타겟팅 펩타이드를 포함하지 않는 AAV9 (서열번호: 45)보다 심장 및 감각 신경에서 현저하게 더 많은 발현을 제공한다는 것을 입증한다.

[0215] 실시예 2

[0216] 표적화된 Cre-재조합 기반 AAV 발달(CREATE)을 사용하여 새로운 AAV 캡시드 서열 회복

[0217] 지시된 발달은 중화 항체 (Maheshri et al 2006) 및 더 좋은 표적 신경교종세포 (McGuire et al. 2010), 기도 상피 (Excoffon et al. 2009) 및 유리체 내 주사 후 망막의 광 수용체 (Dalkara et al 2013)를 회피하는 AAV를 생성하기 위해 사용되어 왔다. 또한, 인간/마우스 키메라 간 모델을 사용하여, Lisowski et al. 인간 간세포를 특이적 및 효율적으로 표적화한 rAAV를 개발했다 (2013). 본 발명에 기재된 일부 실시 양태는 재조합-의존적 회복 전략을 사용하여 서열 변이체의 라이브러리로부터 바람직한 형질을 갖는 서열의 농축 및 선택적 회복 방법을 제공한다.

[0218] 향상된 조직/세포 유형 타겟팅(targeting)을 갖는 rAAV를 개발하기 위해 사용 된 하나의 접근법은 AAV 캡시드

유전자에 대한 지시된 발달을 수행하는 것이다. 전형적으로 이는 조직 친화성을 결정하는 캡시드 단백질에 대해 코딩하는 AAV cap 유전자에 무작위의 돌연변이를 도입하도록 변형된 복제 적격 AAV의 라이브러리를 만듦으로써 이루어진다. 상기 AAV 캡시드 바이러스 라이브러리는 그런 다음 동물에게 주사되거나 배양된 세포에 전달된다. 특정 시간 후, 목표 세포/조직에 있는 캡시드 서열이 회복된다. 그런 다음 이러한 회복된 서열은 새로운 바이러스 풀을 생성하기 위해 사용되고 상기 과정이 반복된다. 반복된 선별/서열 회복의 라운드(round)를 통해, 더 잘 기능하는 캡시드를 생성하는 서열 (즉, 반복적으로 선별 과정을 통과하는 서열)이 풍부해질 것이다. 그 다음, 표적을 형질도입 하기 위해 향상된 능력을 나타내는 상기 캡시드는 각각의 클론으로 회복 및 평가되거나 더 돌연변이가 되었고 추가적인 선별의 라운드를 수행할 수 있다.

[0219] 이 실시예는 생체 내에서 밝혀진 Cre-발현 세포 집단을 보다 효율적으로 형질 도입하는 AAV 캡시드의 개발을 가능하게 하는 표적화된 Cre-재조합 기반 AAV 발달 (CREATE)이라고 불리는 선별 전략에 사용되는 방법과 재료를 기재한다. 본 발명에 기재된 바와 같이, CREATE를 사용하여 정맥 내 주사 후 성체 마우스 중추 신경계 (CNS)를 효율적으로 광범위하게 형질도입하는 AAV 변이체를 생성시켰다. 이 방법을 사용하여 생성된 변이체는 현재의 표준인 AAV914-17보다 때때로 40배 더 높은 효율로 CNS 전체에 유전자를 전달할 수 있으며, 다수의 CNS 지역에 걸쳐 별아교세포 및 뉴런의 대부분을 형질도입 한다. 시험관 내 적용에서, 상기 변이체는 생물의학의 적용에 대한 맞춤형 AAV 벡터를 생성하기 위해 CREATE의 잠재력을 입증하는 AAV9보다 더 효율적으로 인간 뉴런 및 별아교세포를 형질도입 할 수 있다.

[0220] 실험 재료 및 방법

[0221] rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈 플라스미드를 변형하는 방법

[0222] rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈 플라스미드는 AAV2 ITR 측면에 위치한 3개의 주요 요소를 포함한다: (i) 합성 폴리아데닐화 서열40이 뒤이어 따르는 mCherry cDNA의 인간 UBC 유전자 상류로 398bp 단편으로 이루어진 mCherry 발현 카세트(cassette); (ii) AAV5 p41 프로모터 서열 (GenBank AF085716.1의 1680-1974) 및 AAV2 rep 유전자로부터 취한 스플라이싱(splicing) 서열로 이루어진 AAV9 캡시드 유전자 및 조절 서열; 및 (iii) 역전된 lox71 및 lox66 부위 측면에 위치한 SV40 폴리아데닐화 서열 (pA)로 이루어진 Cre-의존성 스위치(switch). 상기 rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈 플라스미드는 상기 캡시드 서열 내에 XbaI 및 AgeI 라는 2개의 고유한 제한 부위를 도입하기 위해 추가로 변형되었다. 이들 부위는 무작위화된 라이브러리 단편으로 대체된 지역 (AA450-592)의 측면에 위치한다. 상기 XbaI 사이트의 도입은 벡터 생산 또는 형질도입에 명백한 영향을 미치지 않는 K449R 돌연변이를 일으킨다. AgeI 사이트 삽입에 필요한 돌연변이는 침묵이다. 캡시드 라이브러리 클로닝(cloning)에 사용된 rAAV-ΔCap-in-cis 수용체 플라스미드의 경우, XbaI 및 AgeI 부위 사이의 코딩 지역을 제거하여 라이브러리 단편이 결핍된 수용체 플라스미드로부터의 바이러스 생성을 방지 하였다.

[0223] 라이브러리 단편의 주형으로서, 상기 변형된 AAV9의 XbaI 및 AgeI 부위에 걸친 영역을 PCR 증폭시켰다. 이 서열은 특이적 EarI 제한 부위를 제거하고 특이적 KpnI 부위를 삽입 (둘 다 침묵 돌연변이)하여 xE 단편을 생성하기 위해 변형되었다. 상기 변형된 xE 단편을 pCRII (Life Technologies)에 TA 클로닝하여 pCRII-9Cap-xE를 생성하였다. EarI 부위를 제거하는 것은 필요하다면 PCR에 의해 회복된 오염성 (AAV9) 캡시드 서열을 선택적으로 소화시키지만 라이브러리-유래 서열을 소화시키지 않는데 사용될 수 있는 두 번째 방법을 제공 하였다. 라이브러리를 클로닝하고 표준 PCR 예방 조치 (예를 들어, UV 처리 시약 및 피펫터(pipettors))를 취하기 위해 rAAV-ΔCap-in-cis 수용체를 사용하는 것은 오염을 방지하는데 충분하였다.

[0224] VP1 AAs: 6, 10, 142, 148 및 216에서 AAV9 유전자의 VP 해독틀(reading frame)의 코딩 서열에 5개의 종결 코돈을 도입함으로써 AAV2/9 REP-AAP 헬퍼 플라스미드를 구성하였다. 대체 가능한 해독틀 내에 암호화되는 AAP 단백질의 코딩 서열을 분열시키지 않기 위해 AA216에서 종결 코돈을 설계하였다.

[0225] 이 연구에서 몇 가지 rAAV 게놈이 사용되었다. 각각은 유비쿼터스 CMV-β-액틴-인트론-β-글로빈 하이브리드 프로모터 (CAG)에 의해 구동되는 리포터와 함께 단일 가닥 (ss) rAAV 게놈 내에 구성된다. 간략하게, 본 설명에서 상기 벡터 설명을 축약했다. ssAAV-CAG-GFP는 ssAAV-CAG-eGFP-2A-Luc-WPRE-SV40 폴리 A를 나타낸다. ssAAV-CAG-NLS-GFP는 GFP의 N- 및 C-말단 모두에 핵 부위 서열 PKKKRKV를 삽입함으로써 구성된 ssAAV-CAG-NLSGFP-WPRE-SV40 폴리 A를 나타낸다. ssAAV-CAG-mNeonGreen-f는 인간 성장 호르몬 폴리A 신호를 갖는 ssAAV-CAGmNeonGreen-f-WPRE를 나타낸다. 상기 mNeonGreen은 c-Ha-Ras로부터 막 타겟팅 (파르네실화 및 팔미토일화 신호) 서열로 변형되었다.

[0226] 캡시드 라이브러리 생성 방법

[0227] 무작위 7-mer 라이브러리 단편 (아미노산 588 및 589 사이에 삽입되는)을 Q5 Hot Start High-Fidelity DNA 중합 효소 (NEB; M0493), 프라이머 XF 및 7xMNN 및 pCRII-9Cap-xE를 주형으로 사용하여 PCR로 생성하였다. 대략의 프라이머 결합 부위를 나타내는 개략도를 도 8A-8B에 나타내었고 상기 프라이머 서열은 표 1에 제공된다. rAAV-기반 라이브러리를 생성하기 위해, 라이브러리 및 XbaI- 및 AgeI- 분해된 rAAV-ΔCap-in-cis 수용체 플라스미드를 포함하는 PCR 산물을 김슨 어셈블리(Gibson Assembly) (NEB; E2611)를 사용하여 조립하였다. 그런 다음 상기 반응 산물을 플라스미드 세이프(Plasmid Safe) (PS) DNase (에피센터(epicentre); E3105K)로 처리하여 조립되지 않은 임의의 조각을 분해하고 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen)를 사용하여 정제했다. 이 반응은 100ng 이상의 조립된 플라스미드 (PS DNase 분해 단계 후에 남아있는 DNA의 양으로 정해짐)를 전형적으로 산출하였다. 100ng은 10 ng/dish에서 10개의 150mm 조직 배양 접시를 트랜스펙션(transfection) 하기에 충분하다. 참고로, 상기 라이브러리는 또한 결찰 또는 김슨 어셈블리(Gibson Assembly)로 구성되고 그런 다음 대장균에서 증폭될 수 있지만 박테리아 형질전환은 라이브러리 다양성을 감소시킨다. 조립된 반응 산물을 직접 트랜스펙션 시킴으로써, 상기 라이브러리 다양성이 성공적으로 트랜스펙션된 HEK293 생산 세포의 수 대신 제한된다.

[0228] 표 2. 프라이머 서열

표 2

프라이머	목적	서열
9CapF	Step 1: 포워드(forward)	CAGGTCTTCACGGACTCAGACTATCAG (서열번호: 57)
CDF	Step 1: Cre에 의해 리버스 스왑(reversed)	CAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTAAATCG (서열번호: 58)
XF	Step 2: 포워드(forward)	ACTCATCGACCAATACTTGTACTATCTCTCTAGAAC (서열번호: 59)
AR	Step 2: 리버스(reverse)	GGAAGTATTCTTGGTTTGAACCA (서열번호: 60)
TF	qPCR 포워드(forward)	GGTCGCGGTTCTTGTGTGGAT (서열번호: 61)
TR	qPCR 리버스(reverse)	GCACCCTGAAGCGCATGAACTCT (서열번호: 62)
7xMNNN	588i 라이브러리 생성 리 버스(reverse)	GTATTCCTTGGTTTGAACCCAACCGGTCTGCGCCTGTGCMNN MNNMNNMNNMNNMNNMNNNTGGGCACTCTGGTGGTTTGTGTC (서열번호: 63)

[0230] 바이러스 생산 및 정제 방법

[0231] 재조합 AAV는 폴리에틸렌이민 (polyethylenimine, PEI)을 사용하여 293T 세포 (ATCC)의 3번의 트랜스펙션에 의해 생성되었다. 바이러스 입자를 트랜스펙션 후 72 시간째 배지 및 120 시간째 세포 및 배지로부터 수득하였다. 세포 펠릿(pellets)을 2mM MgCl₂, pH 8로 10mM Tris에 재현탁하고, 3회 동결-해동하고, 100 U/mL 벤조나아제 (Benzonase) (에피센터(epicentre))로 37 °C에서 적어도 1 시간 처리 하였다. 바이러스 배지를 Tris-MgCl₂에 재현탁된 500mM 염화나트륨을 함유한 8% 폴리에틸렌 글리콜 8000 (Sigma-Aldrich)으로 침전시켜 농축시키고 그 다음 용해물에 첨가하였다. 이어서, 합쳐진 스톡(stock)을 500mM NaCl로 조절하고, 37 °C에서 30 분 동안 배양하고, 2000 x g에서 원심 분리하여 정화시켰다. 상기 정화된 스톡을 아이오딕사놀(iodixanol) (Optiprep, Sigma; D1556) 단계 구배 (15%, 25%, 40% 및 60%)로 정제 하였다. 바이러스를 인산 완충 식염수 (PBS)에서 농축하고 제형화 하였다. 표준으로 선형화된 게놈 플라스미드로 qPCR을 수행하여 DNaseI 내성 vg의 수를 측정함으로써 바이러스 적정 농도를 결정 하였다.

[0232] 캡시드 라이브러리 바이러스 생성을 위해 동일한 세포에서 다수의 캡시드 서열의 존재로부터 발생할 수 있는 모자이크 캡시드의 생성을 감소시키기 위해 상기 바이러스 생산 프로토콜(protocol)에 2가지 변형이 이루어졌다. 먼저, 대부분의 트랜스펙션된 세포가 단지 하나의 캡시드 변이체 서열을 받아들일 가능성을 증가시키기 위해, rAAV-Cap-in-cis 라이브러리 플라스미드의 단지 10ng가 트랜스펙션 되었다(150mm 접시 당). 둘째, 상기 바이러스는 배지에 방출된 Raav 라이브러리 바이러스로 생산 세포의 이차 형질도입을 최소화하기 위해, 상기 기재한 바와 같이 72시간 및 120시간보다는 48시간 (배지) 및 60시간 (세포 및 배지)에서 수득되었다.

[0233] 동물

[0234] 마우스 GFAP 프로모터 (012886) 및 C57Bl/6J 마우스 (000664)의 조절 하에 Cre를 발현하는 GFAP-Cre 마우스를 Jackson Laboratory (JAX)로부터 구입 하였다. rAAV 벡터의 정맥 내 투여는 레트로오비탈 사이너스 (retroorbital sinus)에 바이러스를 주입함으로써 수행 하였다. 마우스를 예정된 샘플 크기의 그룹에 무작위로

할당 하였다. 이러한 분석으로부터 제외된 마우스는 없었다. 실험자들은 샘플 그룹을 볼 수 있었다.

[0235] 생체 내 선별

[0236] GFAP-Cre 마우스에서 선별을 위해, 캡시드 라이브러리의 1×10^{11} vg를 성체 암수 Cre⁺ 마우스에 정맥 내 주사 하였다. 주사 후 7일 내지 8일 후, 마우스를 안락사 시키고 뇌 및 척수를 채취하였다. 벡터 DNA는 트리졸(Trizol) (Life Technologies, 15596)의 4-5 ml를 사용하여 뇌의 한쪽 반구와 척수 절반으로부터 회복되었다. 바이러스 DNA를 정제하기 위해, 제조자의 추출 프로토콜에 따라 상부 수성 분획을 수득 하였다. 본 발명자는 수성 분획이 RNA뿐만 아니라 바이러스 DNA 게놈의 중요한 부분을 포함한다는 것을 발견했다. RNA를 37 °C에서 하룻밤 동안 RNase A (Qiagen) 1 uL로 처리하여 분해시켰다. 다음으로, 2 단계 PCR 증폭 전략을 사용하여 Cre 재조합 게놈으로부터 Cap 서열을 선택적으로 회복 하였다. 제 1 증폭 단계는 프라이머 9CapF 및 CDF를 사용하여 Cre-재조합된 rAAV-Cap-in-cis-lox 서열을 우선적으로 증폭시킨다 (도 8A-8B 참조). 상기 PCR은 Q5 Hot Start High-fidelity DNA 중합효소를 사용하여 95°C에서 20초, 60°C에서 20초, 72°C에서 30초 동안 20-26주기 동안 수행되었다. 그 후 상기 PCR 산물을 1:10 또는 1:100으로 희석한 다음, 프라이머 XF 및 AR (도 8A-8B 및 표 2)을 사용하여 두 번째 Cre-독립적 PCR 반응에 대한 주형으로 사용 하였다. 두 번째 PCR은 상기에서 기재한 바와 같이 rAAV-Δ Cap-in-cis 수용체 플라스미드로 다시 클로닝된 단편을 생성하였다. 1 μL의 김슨 어셈블리(Gibson Assembly) 반응물을 시퀀싱을 위한 각각의 클론을 생성하기 위해 1:10으로 희석하고 SURE2 적격 세포 (에질런트(Agilent); 200152)로 형질 전환하였다.

[0237] 농축의 증거를 보인 변이체를 AAV Rep-Cap 플라스미드에 클로닝하고 DH5 α 적격 세포(NEB)로 형질 전환시켰다. 그 후 신규한 AAV Rep-Cap 변이체, 또는 대조군으로서 AAV2/9 Rep-Cap을 상기에서 기재한 리포터 게놈 중 하나를 사용하여 평가 하였다.

[0238] 벡터 생체 내 분포

[0239] 6 주 된 암컷 C57B1/6 마우스에게 지시된 AAV 캡시드 내에 패키징된 1×10^{11} vg의 ssAAV-CAG-GFP 벡터를 정맥 내 주사 하였다. 동물들은 무작위로 그룹에 배정되었다. 주사 후 25 일째, 상기 마우스를 안락사 시키고 조직 및 지시된 뇌 지역을 채취하고 -80°C에서 동결시켰다. DNA를 Qiagen DNeasy 혈액 및 조직 키트를 사용하여 조직 샘플로부터 분리 하였다. 벡터 게놈은 WPRE 요소에 결합하고 마우스 글루카곤 유전자에 특이적인 프라이머를 사용하여 마우스 게놈으로 정규화된 PCR 프라이머를 사용하여 검출 되었다. 절대적인 정량화는 알려진 농도 46의 선형화된 플라스미드 표준의 연속 희석액을 사용하여 수행 되었다. AAV-PHP.B가 주사된 무작위로 선택된 동물 한 마리를 조직학적 분석을 위한 생체 내 분포 연구로부터 제거했다.

[0240] 조직 준비, 면역조직화학염색 및 이미징

[0241] 마우스를 Nembutal로 마취시키고 pH7.4의 실온(RT)에서 0.1M 인산 완충액 (PB)으로 경막 외 관류시킨 후 PB에서 신선하게 제조한 빙냉된 4% 파라포름알데히드 (PFA)로 관류시켰다. 뇌를 밤새 4% PFA에 고정시킨 후 바이브라토 (vibratome)로 절단하거나 저온유지장치(cryostat)로 크리오프로텍트 하고(cryoprotected) 절단 하였다. IHC 는 10% 염소 또는 당나귀 혈청 및 0.5 % Triton X-100 (GAD67 염색을 위해 세제가 사용되지 않음)을 포함하는 PBS에 1차 및 2차 항체와 함께 부유하는 절편에서 수행되었다. 사용된 일차 항체는 마우스 항-AAV 캡시드 (1:20; American Research Products, 03-65158, 클론 B1), 토끼 항-GFP (1:1000; Invitrogen, A11122), 닭 항-GFP (1:1000; Abcam, ab13970), 마우스 항-CC1 (1:200; Calbiochem, OP80), 토끼 항-GFAP (1:1000; Dako, Z0334), 마우스 항-NeuN (1:500; Millipore, MAB377), 토끼 항-Iba1 (1:500; Biocare Medical, CP290), 마우스 항-칼빈딘 D28K (1:200; Sigma, CB-955), 토끼 항-칼레티닌 (1:1000; Chemicon, AB5054), 마우스 항-GAD67 (1:1000; Millipore, MAB5406), 기니아 피그 항-MAP2 (1:1000; Synaptic Systems, 188004), 마우스 항-파브알 부민 (1: 1000; Sigma), 티로신 수산화효소 (1:1000, Aves) 및 토끼 항-CD31 (1:50; Abcam, ab28364)이다. 일차 항체 배양을 실온에서 16-24 시간 동안 수행 하였다. 상기 절편을 세척한 후 2차 Alex-접합 항체 (1:1000; Invitrogen)와 2-16 시간 동안 배양 하였다. 내부 항원 결정기를 인식하는 B1 항체로 캡시드를 검출하기 위해, 부유 절편을 2M HCl로 37°C에서 15 분 동안 처리한 다음 PBS로 광범위하게 세척하여 1 차 항체와 배양했다. 일부 이미지의 경우 16-비트 녹색 채널 (GFP) 감마를 조절하여 같은 시야 내에 있는 낮은 GFP 발현 세포와 높은 GFP 발현 세포의 시각화 (과포화 없이)를 가능하게 하였다. 모든 경우에 있어, 현미경 및 레이저 설정 뿐만 아니라 감마 또는 명암의 변화는 이미지 세트 전체에 걸쳐 일관되게 유지되었다. 이미지는 하기 목표에 적합한 Zeiss LSM 780 공초점 현미경으로 보여졌다: Fluar 5x/0.25 M27 Plan-Apochromat 10x/0.45 M27 (작동 거리 2.0mm), Plan-Apochromat 25x/0.8 Imm Corr DIC M27 멀티-엑침 및 LD Apochromat 40x/1.1W Korr 및 Plan-

Apochromat 100x/1.46 오일 DIC 목표. 3D MIP 이미지 및 보조적인 무비(Movies)들은 Imaris(비트플레인(Bitplane))로 생성되었다.

[0242] 세포 유형-특이적 형질도입의 정량화

[0243] 6주된 암컷 생쥐를 무작위로 그룹에 할당하고 AAV9, AAV-PHP.B 또는 AAV-PHP.A에 패키징된 2×10^{12} vg의 ssAAV-CAG-NLS-GFP를 정맥 내 주사하였다. 3주 후, 상기 마우스를 관류시키고 상기에 기재된 바와 같이 뇌를 처리하고 지시된 항원에 대해 면역 염색시켰다. 그룹 당 동물의 수는 사전에 확립되었다; 어떤 동물도 분석에서 제외되지 않았다. 세포 유형-특이적 면역 염색 및 자연 NLS-GFP 형광의 공초점 단일 평면 이미지를 촬영하였다. 편향을 방지하기 위해, 이미지 획득 이전에, GFP 발현으로부터 보다는 세포 유형-특이적 면역 염색 채널만을 보고 식별된 상기 표시된 매치되는 지역으로부터 이미지를 가져왔다. 마찬가지로, 세포 계수는 IHC 채널을 관찰하여 세포-특이적 항원에 의해 염색된 각 세포를 먼저 세고 표시함으로써 수행되었다. 다음으로, 자연 GFP 형광에 대해 양성인 표시된 IHC+ 세포를 계수 하였다. 캡시드 사이의 뚜렷한 형질도입 효율 차이 때문에, 그룹에 의한 계수는 블라인드(blind)가 아니었다.

[0244] 조직 클리어링(clearing)

[0245] 마우스는 상기와 같이 분당 14 mL의 유속으로 PB에서 60-80 mL의 빙냉된 4% PFA로 관류되었다. 이어서 유속을 2-3 mL/분으로 감소시키고 실온에서 2시간 동안 계속 하였다. 마우스는 다음으로 개별 맞춤형 챔버에 배치되고 PB에서 2-3 mL/min로 하룻밤 PB에서 재순환 RT 4% 아크릴아마이드 200mL로 관류되며 2시간 관류 후 혈관계로부터 잔여 폴리머(polymer)/모노머(monomer)를 제거하기 위해 PB로 씻어내었다. 42°C의 수조에 챔버를 넣고, 전달하고, 0.25 % VA-044 개시제를 포함하는 가스가 제거된 PB를 200mL 재순환 하여 2-4시간 동안 관류 (2-3 mL/분)함으로써 중합 과정을 시작하였다. 그 후 마우스를 7일 동안 PB, pH7.5에서 8% SDS로 관류시켰다. 상기 SDS 포함 용액을 7일 동안 2 회 리프래시(refresh)한 다음 2 리터의 비-재순환 PB의 관류에 의해 하룻밤 동안 씻어내었다. 클리어된 조직 샘플을 이미징을 위해 RIMS 용액 (글절룰 1.46)에 고정하였다.

[0246] 인간 iPSC 유래 피질 회전타원체의 생성

[0247] 인간 피질 회전타원체는 상기에서 기재한 바와 같이 iPSC로부터 생성되었다. 간략하게, 2명의 건강한 대조군 개체로부터 유래된 iPSC 라인은 하기 배지에서 비활성화된 마우스 배아 섬유아세포 피더(feeder)로 배양되었다: DMEM/F12, 녹아웃(Knockout) 혈청 20%, 1mM 비필수 아미노산 (1:100), 글루타맥스(GlutaMax) (1:200), β -머캅토에탄올(mercaptoethanol) (0.1 mM), 페니실린 및 스트렙토마이신 (1:100) (Life Technologies). 배양물은 정기적으로 테스트 되었고 마이코플라스마(mycoplasma)를 자유롭게 유지하였다. iPSC의 콜로니는 디스파제(dispass) (0.35 mg/ml, Invitrogen)로 온전하게 분리되었고 도소몰핀(dorsomorphin) (5 μ M, Sigma) 및 SB-431542 (10 μ M, Tocris)로 보충된 iPSC 배지에서 저-부착 플레이트에 전달되었으며, 상기 배지는 매일 바뀌었다. 시험관 내 분화 6일째에 신경 회전타원체가 24일 까지 EGF (20 ng/ml) 및 FGF2 (20 ng/ml)로 보충된 NPC 배지 (뉴로바살(Neurobasal) A, 비타민 A가 없는 B27, 글루타맥스(GlutaMax) (1:100), 페니실린 및 스트렙토마이신; Life Technologies)에 전달되었고, 다음으로 25일부터 42 일까지 BDNF (20 ng/ml) 및 NT3 (20 ng/ml)로 보충되었다. 43 일 이후부터 피질 회전타원체는 NPC 배지에서 유지되었고, 이는 매 4 일마다 바뀌었다.

[0248] 피질 회전타원체의 해리 및 바이러스 감염

[0249] 효소 해리 및 단층에서의 배양을 위해, 시험관 내 분화 (한 개체로부터 iPSC 라인의 2개의 독립적인 신경 분화 및 다른 개체로부터의 iPSC 라인의 하나의 분화)의 170 내지 200 일에서 피질 회전타원체를 아큐타제(Accutase) (이노베이트 셀 테크놀로지(Innovative Cell Technologies))로 37°C에서 25분 동안 배양한 후, NPC 배지로 3번 세척하고 P-200 피펫으로 부드럽게 분쇄했다. 세포를 ~300,000 세포/well로 폴리오르니틴(poly-ornithine) 및 라미닌(laminin) 코팅된 유리 커버슬립(coverlip) (15mm)에 평판 배양하고 처음 24 시간 동안 BDNF (20 ng/ml)와 NT3 (20 ng/ml)로 보충된 NPC 배지에서 유지 시켰고, 그런 다음 성장 인자 없이 NPC 배지에서 유지 시켰다.

[0250] 커버슬립에서 배양된 배양액을 각각의 바이러스로 1×10^9 vg/well의 역가로 감염시키고 5일 후 4% 파라포름알데히드 (PFA)로 10분 동안 고정시켰다. 면역 세포 화학법을 위해, 세포를 0.2% Triton X-100으로 10분간 침투시키고 PBS에서 10% 염소 혈청으로 1 시간 동안 블로킹(blocking)시켰다. 그 다음 커버슬립은 2시간 동안 블로킹 용액에서 희석된 항체로 배양 하였다. 핵을 Hoechst 33258 (Life Technologies, 1:10,000)으로 시각화 하였다.

[0251] 세포는 40배 대물 렌즈를 사용하여 Zeiss M1 Axioscope로 이미지화 하였다. GFAP 또는 MAP2 둘 중 하나와 동등

표시된 GFP⁺ 세포의 비율은 각 실험 조건에 대한 커버슬립 당 10개의 랜덤(random) 영역의 이미지에서 정량화되었다. 제시된 결과는 두 개의 분리된 해리 및 감염 실험의 평균이다.

[0252] 온전한 3D 배양액을 AAV로 감염시키기 위해, 시험관 내 분화의 197 일째 날에 단일 인간 피질 회전타원체를 NPC 배지에서 6×10^9 vg/400 μ l를 포함하는 1.5 ml 에펜도르프(Eppendorf) 튜브로 하룻밤 동안 이동시키고, 7일 후에 4% PFA에서 하룻밤 동안 고정시켰다. 그 다음, 고정된 회전타원체를 24시간 동안 30% 차당으로 이동시키고, O.C.T. (Fisher Scientific)에 끼워넣고 14 μ m 절편으로 잘랐다. 면역 조직 화학 염색을 위해 절편을 0.3% Triton-X100을 포함하는 PBS에서 10% 염소 혈청으로 1시간 동안 블로킹 시켰다. 이미지는 Leica TCS SP8 공초점 현미경으로 얻었다.

[0253] CREATE를 이용한 rAAV 변이체의 생성

[0254] CREATE는 AAV *Rep* 유전자 (도 4B)로부터의 조절 요소에 의해 조절되는 전체 길이 AAV *Cap* 유전자와 Cre 역전 스위치 (도 4B)를 연결시키는 rAAV 캡시드 게놈 (rAAV-Cap-in-cis-lox)을 사용한다. rAAV-Cap-in-cis-lox 백본 (backbone) 내에 캡시드 라이브러리를 구축하고 정의된 세포 집단에서 Cre 발현을 갖는 동물에게 바이러스 라이브러리를 전달함으로써, 시스템은 표적 집단을 형질도입한 서열의 선택적인 증폭 및 회복을 가능하게 한다 (도 4C). rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈은 기능적인 *Rep* 유전자가 없기 때문에, *Rep*는 바이러스 생산을 위해 트랜스로 제공되어야 한다. 이러한 목적으로, AAV2/9 rep-cap 플라스미드는 각 캡시드 단백질, VP1-3 (도 4D)에 대한 해독틀(reading frame) 내에 인-프레임 종결 코돈을 삽입함으로써 캡시드 단백질 발현을 제거하도록 변형될 수 있다. 이러한 종결 코돈은 *Cap* gene22 내에 다른 대체 해독틀로부터 발현되는 어셈블리(assembly) 활성화 단백질(AAP)의 아미노산 서열을 변경시키지 않는다. 이 분리된 rAAV-Cap-in-cis-lox 게놈 및 Rep-AAP AAV 헬퍼 시스템은 rAAV를 효율적으로 생성하고 (도 4e), 이는 이중 조직 샘플 내에 유전적으로 정의된 Cre-발현 세포 집단으로부터 캡시드 서열 회복을 가능하게 하는 CREATE 선별 플랫폼(platform)의 기초이다 (도 8A-8B 참조).

[0255] rAAV-Cap-in-cis-lox 수용체 게놈 내에서 AAV9 캡시드의 AA588-589 (VP1 위치) 사이에 무작위화된 서열의 7개의 아미노산(AA) (7-mer)을 삽입함으로써 라이브러리가 AAV 변이체로 생성되었다 (도 4F-4G). CNS 전체에 걸쳐 BBB 및 형질도입된 세포를 교차하는 벡터를 선별하기 위해, 상기 캡시드 라이브러리를 별야교세포에 Cre를 발현하는 성체 GFAP-Cre 마우스에 정맥 내 투여 하였다. 일주일 후, DNA를 뇌 및 척수 조직으로부터 분리하고 Cre-매개 재조합을 수행한 바이러스 게놈으로부터 PCR로 캡시드 서열을 회복하였다. 상기 회복된 Cap 서열의 전체 라이브러리를 라이브러리 GFAP1을 생성하기 위해 rAAV-Cap-in-cis-lox 수용체 게놈에 다시 클로닝하고 시퀀싱을 위해 무작위로 13개의 클론을 선택 하였다. 상기 GFAP1 라이브러리로부터 회복된 모든 테스트된 서열은 특이적이었고, 따라서 GFAP1 플라스미드 라이브러리는 제 2 바이러스 라이브러리를 생성하는데 사용되고 GFAP-Cre 마우스에서 선별의 추가적인 라운드를 수행 하였다. 두 번째 선별 후, 여러 변이체가 풍부 해졌으며 (표 3 참조), 향상된 CNS 형질도입이 나타났다 (도 9A). 가장 풍부한 변이체, AAV-PHP.B는 생체 내에서 추가로 친화성 평가를 위해 선택되었다. AAV-PHP.B는 회복된 라이브러리 서열의 25%를 나타내고, 7-mer 서열 TLAVPFK (서열번호: 40)를 암호화한다.

[0256] AAV-PHP.B 및 AAV9 캡시드는 유비쿼터스(ubiquitous) CAG 프로모터 (ssAAV-CAG-GFP)에 의해 구동되는 단일 가닥 (ss) GFP 리포터 벡터를 패키징 하는데 사용되었다. AAV-PHP.B 및 AAV9 모두 유사한 효율을 갖는 바이러스를 생산 하였다(도 9B). 6주된 마우스에게 정맥 내 주사에 의해 어느 벡터의 벡터 게놈 (vg)을 1×10^{12} 의 양으로 투여 하였다. 형질 도입은 3주 후에 GFP 발현에 의해 평가되었다. 상기 데이터는 AAV-PHP.B가 여러 뇌 영역 (도 5B), 척수 (도 5C), 및 망막 (도 5D)에서 GFP 면역 조직 화학법 (IHC) (도 5A) 또는 자연 eGFP 형광에 의해 표시된 바와 같이 고효율로 전체 성체 CNS를 형질도입 하였다는 것을 나타낸다. 전신 조직 clearing24에 대한 PARS 기반 CLARITY를 사용하여, 자연 eGFP 형광은 척수 (도 5C), 피질 및 선조체 (도 5E)로부터 조직의 클리어링된 섹션을 통해 검출되었다. 이러한 3D 렌더링(rendering)은 AAV-PHP.B 벡터로 광범위하고 효율적인 CNS 형질 도입을 입증한다. CNS 밖에서, AAV-PHP.B 및 AAV9의 세포 수준 친화성은 AAV-PHP.B에 의한 형질도입 효율이 AAV9와 비교하여 감소된 채장을 제외하고 몇몇 기관에서 유사하게 나타났다(도 5f).

[0257] AAV9와 비교하여 AAV-PHP.B에 의한 CNS 및 말초 기관으로의 유전자 전달 효율을 정량화하기 위해, 존재하는 바이러스 게놈의 수를 여러 뇌 영역 및 기관에서 주사 후 25일 측정 하였다(도 5G). AAV-PHP.B는 실험된 각각의 상기 CNS 영역에 AAV9보다 유의하게 많은 유전자 전달을 제공했다: 피질 (40배), 선조체 (92배), 시상 (76배), 소뇌 (41배) 및 척수(75배). CNS 외부의 벡터 게놈 생체 내 분포는 AAV-PHP.B가 AAV9보다 효율적으로 채장 및 부신에 유전자를 전달함을 나타내었다(도 5G). 간, 심장, 골격근 및 신장에서 두 벡터 사이에 유의한 차이는 발

견되지 않았다. 소뇌를 제외한 모든 CNS 영역에서 CNS 생체 내 분포 데이터와 함께 고려할 때, AAV-PHP.B로 치료된 마우스에서 검출된 바이러스 계층의 수는 간, AAV921,25에 의해 효율적으로 형질도입된 기관에서 측정된 것과 유사하고, 다른 기관에서 관찰된 것보다는 많다. 대조적으로, 실험된 CNS 영역의 각각으로 AAV9-매개된 유전자 전달은 간에서 보다 적어도 120 배 더 낮았다. 따라서, AAV-PHP.B의 친화성은 CNS 특이적이지 않지만, 이 벡터의 향상된 유전자 전달 특성은 CNS 특이적이다.

[0258] AAV9는 성체 마우스 및 비인간 영장류에 정맥 내로 전달 될 때 별아교세포를 우선적으로 형질도입 시키지만, 또한 여러 영역에서 뉴런을 형질도입 시킨다. AAV-PHP.B에 의해 형질도입된 세포 유형을 조사하기 위해 GFP와 여러 세포 유형 마커의 공편재화(co-localization)를 분석하였다. 고효율의 형질도입으로 인해, 각각의 GFP 발현 별아교세포는 1×10^{12} vg AAV-PHP.B를 도입한 쥐에서 분별하기가 어려웠지만(도 5A), 10배 이하의 바이러스(도 5A-5B)를 도입한 동물에서 그들의 간편한, 고분지된 과정에 의해 및 GFAP에 대한 IHC와의 공편재화(도 6A)에 의해 형태학상으로 더 쉽게 확인될 수 있었다. 별아교세포에 더해서, AAV-PHP.B는 중뇌 티로신 하이드록실라제 (TH)⁺ 도파민성 뉴런 (도 6D), 칼빈딘+ 소뇌 푸르킨에 세포 (도 6E), 및 몇몇 신경계 개체군 (도 10A-10D) 뿐만 아니라 뇌 전체에 걸친 NeuN + (도 6C)를 포함하여 조사된 CC1+ 희소 돌기 세포 (도 6B) 및 모든 뉴런 서브 타입을 형질도입 시켰다. AAV-PHP.B는 또한 CD31+ 내피 세포를 형질도입 시켰지만 (도 10E) Iba1+ 미세아교세포를 형질도입시키지 않은 것으로 나타났다(도 10F-10G). 정맥 내 AAV-PHP.B 전달 후 나타나는 상기 GFP+ 미세아교세포의 빈도는 이 세포 집단14,27-30에서 희귀하거나 존재하지 않는 AAV 매개 유전자 발현의 이전 보고와 일치한다. AAV-PHP.B의 투여 후 1 년 이상 뇌 전체에 걸쳐 GFP 단백질 발현으로부터의 자연 GFP 형광이 관찰되었으며, 이는 AAV-PHP.B가 장기간 CNS-지시된 이식유전자 발현을 제공할 수 있음을 시사한다(도 11).

[0259] 다음으로, AAV-PHP.B에 의해 형질도입된 몇몇 세포 유형의 부분을 정량화하고 AAV9와 비교 하였다. 신뢰할 수 있는 각각의 세포 카운팅을 용이하게 하기 위해, CAG 프로모터인 ssAAV-CAG-NLS-GFP의 조절 하에 핵 위치된 GFP (NLS-GFP)를 발현하는 벡터를 제작 하였다. ssAAV-PHP.B: CAG-NLS-GFP의 2×10^{12} vg/마우스 단일 주사는 대다수의 Aldh1L1+ 별아교세포 (도 6F 및 12A) 및 NeuN+ 뉴런 (도 6G 및 12B) 뿐만 아니라 조사된 모든 뇌 영역에 걸친 Olig2+ 희소돌기아교 혈통 세포 (도 6H 및 12C)의 별로 많지 않은 부분을 형질도입 시켰다. 모든 경우에서, AAV-PHP.B는 동일한 용량의 AAV9에 비해 현저하게 향상된 형질도입을 제공하였다. 간단히, AAV-PHP.B는 또한 척수 (도 3I), $91.4 \pm 1.6\%$ 의 TH+ 중뇌 도파민성 신경 내막 (도 12D) 및 $91.7 \pm 5.8\%$ 의 칼빈딘+ 푸르킨에 세포 전체에 걸쳐 Chat+ 운동 뉴런의 94% 이상을 형질도입 시켰다(n=5). 요약하면, AAV-PHP.B의 성체 정맥 내 투여는 성체 마우스에서 여러 개의 신경 세포 및 신경 교종 세포 유형을 효율적으로 타겟팅한다.

[0260] AAV-PHP.B를 확인하는데 사용되는 방법은 표적 세포 집단의 형질도입만을 선택한다; 그것은 반드시 특이성을 선택하는 것은 아니다. 그럼에도 불구하고 GFAP-Cre 마우스에서의 별도의 실험에서 (생체 내 선별 2 라운드 후) 또 다른 AAV 캡시드 변이체인 AAV-PHP.A가 확인되었다. AAV-PHP.A는 AAV9에 비해 더 효율적이고 선택적인 CNS 별아교세포 형질도입(도 7A-7D)뿐만 아니라, 간(도 7E-7F) 및 다른 말초 기관에 대한 친화성 감소를 나타내는 7-mer 서열 YTL SQGW (서열번호: 38)를 포함한다 (도 7A 및 7B). AAV-PHP.A 대 AAV9에 의해 제공되는 간에 CNS로의 유전자 전달에 대한 특이성 증가는 향상된 성체 CNS 유전자 전달(특이적 지역에 2.6 내지 8배 더 의존하는)의 조합 및 감소된 간 유전자 전달(152배)로부터 나타나는 400-1200배 이다. 이 실험에서 풍부해진 두 가지 다른 변이체 (도 9A)는 AAV9와 비교하여 CNS 뉴런 또는 교세포에서 향상된 GFP 발현을 나타내지 않았다.

[0261] AAV-PHP.A 및 AAV-PHP.B가 인간 신경 세포를 형질도입시킬 수 있는지를 알아내기 위해, 상기 변이체들을 3D 분화 방법을 사용하여 인간 유도 다능성 줄기 세포 (hiPSCs)에서 유래된 피질 뉴런과 별아교세포에서 테스트 하였다. 두 개체로부터의 HiPSC 계통은 3D 대뇌 피질-유사 구조(피질 회전타원체)로 분화되었고, 최대 200일 동안 시험관 내에서 유지되었다. 노화된 피질 회전타원체는 표층 및 심층 피질 흥분성 뉴런 및 최대 20%까지의 별아교세포31을 포함한다. 단층에서 세 바이러스에 노출된 해리된 피질 회전타원체에서, AAV-PHP.B는 AAV9 또는 AAV-PHP.A 둘 중 하나와 비교하여 GFAP-발현 별아교세포와 MAP2-발현 뉴런을 보다 효율적으로 형질도입시켰다(도 12; 양방향 ANOVA $p < 0.01$, n=3). 또한, 세 바이러스 모두 온전한 3D 피질 회전타원체를 형질도입할 수 있었다 (도 5C).

[0262] 별아교세포 표적화에 대한 2 가지 실험에서, 변이체, AAV-PHP.B, B2 및 B3가 확인되었다(도 9). 상기 변이체들은 뉴런과 교세포 둘 다의 광범위한 CNS 형질도입 및 보다 효율적인 별아교세포 형질도입을 선택적으로 제공하는 AAV-PHP.A를 제공한다. 동일한 선별 계획으로부터 별개의 특성을 가지는 캡시드의 확인은 회복 방법이 임의의 특이적 중간 단계, 예컨대, 뇌 혈관 관련, BBB 통과세포외배출 또는 별아교세포 결합/내재화 보다 별아교세포 형질도입을 위해 선택된 것을 사용한 회복 방법을 제공하는 것으로 예상되었다. 따라서, 이러한 임의의 중간

단계에서 보다 효율적인 캡시드 변이체는 선별 과정에서 회복되어야 한다.

[0263]

캡시드에 대한 면역 염색을 통해 AAV-PHP 캡시드는 AAV9과는 달리, 정맥 내 투여 직후에 쉽게 뇌 혈관계에 위치된다는 것을 알 수 있었다(도 14a-14b). 또한, 투여 후 24시간까지, AAV9 또는 AAV-PHP.A를 투여한 마우스와 비교하여 AAV-PHP.B를 투여한 마우스의 뇌 혈관계를 따라 유의적으로 많은 GFP 발현 세포가 관찰되었다(도 14C-14D). 생체 내 (도 5A-5G, 6A-6I 및 7A-7F) 및 인간 신경 배양물 (도 13A-C)에서 AAV-PHP.B 및 AAV-PHP.A의 형질도입 특징과 함께 고려했을 때, 이들 데이터는 두 AAV-PHP 벡터가 뇌 혈관계와 보다 효율적으로 연관되는 반면, 그 다음 세포 유형-특이적 엔트리(entry) 또는 수송 단계(들)에서 다를 수 있음을 제시한다.

표 3

[0264]

변이체	AA 서열	뉴클레오타이드 서열	전체 %	생체 내 특성	생산
AAV-PHP.B	TLAVPFK (서열번호: 40)	ACTTTGGCGGTGCCTTTTAAG (서열번호: 74)	25.00%	광범위한 CNS 형질도입	종음
AAV-PHP.B2	SVSKPFL (서열번호: 41)	AGTGTGAGTAAGCCTTTTTTG (서열번호: 75)	11.76%	광범위한 CNS 형질도입	종음
AAV-PHP.B3	FTLTTPK (서열번호: 42)	TTTACGTTGACGACGCTAAG (서열번호: 76)	7.35%	광범위한 CNS 형질도입	종음
AAV-PHP.A	YTLSQGW (서열번호: 38)	TATACTTTGTGCGAGGGTTGG (서열번호: 77)	40.00%	증가된 별아교세포 선택성	나쁨
G2A12	QAVRTSL (서열번호: 37)	CAGGCGGTTAGGACGCTTTG (서열번호: 78)	33.33%	뇌에서의 AAV9과 유사	아주 좋음
G2A15	LAKERLS (서열번호: 39)	CTTGCGAAGGAGCGGCTTCG (서열번호: 79)	20.00%	뇌에서의 AAV9과 유사	아주 좋음

[0265]

CREATE를 사용하여, 정맥 내 투여 후 성체 마우스 CNS에 효율적인 광범위한 유전자 전달을 가능하게 하는 새로운 AAV 변이체가 개발되었다. 이 시스템의 중요한 이점은 효율적인 세포 내 수송 및 단일 가닥 바이러스 게놈의 장기간 전달에 필요한 지속적인 이중 가닥 DNA (dsDNA) 형태로의 변환을 매개하는 캡시드에 대해 선택적인 압력을 가한다는 점이다(오직 dsDNA 게놈만 Cre에 대한 기질로 사용해야 한다). 기능성 캡시드에 대한 이러한 추가적인 선택적 압력은 오직 생체 내 선별의 2라운드 후에 독립적인 실험에서 AAVPHP.A 및 AAV-PHP.B 변이체 (본 발명에서 개시된)의 확인에 기여해왔다. 이와 비교하여, 많은 이전의 생체 내 및 시험관 내 AAV 캡시드 선별 방법은 향상된 특성을 갖는 캡시드 변이체를 확인하기 위해 3-10 라운드 선별을 적용해왔다.

[0266]

특정 이론에 구속됨이 없이, CREATE는 임의의 기관에서 정해진 CRE-발현 세포 유형을 표적으로 하는 AAV 캡시드 변이체를 발견하는데 적용될 수 있다고 믿어진다. 따라서, 여기에 제시된 바와 같이, 상기 CREATE는 유전자이식 동물에서뿐만 아니라 (i) 회전자원체 배양물 또는 유기체 배양물에서 특이적 Cre⁺ 세포 유형, 을 목표로하는 AAV 변이 형을 개발할 수 있으며, (ii) 비-유전자이식 동물에서 예를 들어, 집단-, 투영33- 또는 활성-기반 Cre 발현에 의해 Cre⁺를 만드는 세포, 또는 (iii) 사람/마우스 키메라 동물에서 Cre⁺ 인간 세포를 표적으로 하는 AAV 변이체를 개발하는데 사용될 수 있다. 동물 모델과 사람 사이에서 보고된 AAV 친화성 차이를 고려해 볼 때, 생체 내에서의 인간 Cre⁺ 세포, 3차원의 hiPSC-유래 세포 모델에서의 세포-특이적 Cre 발현, 또는 미래 Cre 유전자이식 마모셋(marmoset)을 사용하는 선별 계획은 임상적 적용을 위해 향상된 벡터를 개발하는데 바람직할 것이다. 또한, AAV-기반 유전자 치료, 특히 전신 전달을 필요로 하는 유전자 치료의 성공은 인간 집단에서 중화 AAV 캡시드 항체의 존재에 의해 방해 받을 수 있다. CREATE를 인간 혼합 혈청에 대한 AAV 라이브러리의 노출과 함께 사용함으로써, 또한 항체-매개 중화에 덜 민감한 보유 또는 강화된 형질도입 특성을 가진 캡시드를 동시에 선별하는 계획을 할 수 있었다.

[0267]

CREATE는 또한 상기 변이체들을 각각 테스트하기 전에 회복된 서열의 특성을 보다 정확하게 예측하기 위해 차세대 시퀀싱(sequencing)과 함께 사용될 수 있다. 선별되지 않은 바이러스 라이브러리와 함께 Cre-발현 표적 세포로부터 회복된 변이체의 전체 풀(pool) 모두를 시퀀싱하여 각각의 회복된 서열의 농도의 상대적인 정도를 정량화 할 수 있어야 한다. 또한, 여러 Cre-발현 또는 Cre-비발현 집단으로부터 회복된 캡시드를 시퀀싱하여 단일 실험에서 여러 세포 유형에서의 양성 및 음성적인 선별 모두를 수행하기 위해 평균을 제공할 수 있었다. 이러한 생체 내(in vivo)-인실리코(in silico) 선별 접근법은 CNS 및 표적으로 하기 어려운 다른 세포 집단에 유전자 전달을 향상시키기 위해 CREATE의 능력을 증가시켜야 한다.

[0268] 본 발명은 CREATE 방법의 사용을 통해 개발된 신규한 CNS 타겟팅(targeting) 서열을 제공한다. 일부 실시 양태에서, AAV9 캡시드 단백질의 아미노산 588-599 사이에 7-mer 삽입 서열을 갖는 DNA 라이브러리를 제조하였다. DNA 라이브러리로부터 바이러스 라이브러리를 생성한 후, 상기 CREATE 방법은 투여 일주일 후 Cre 발현 세포를 형질도입시킨 신규한 AAV 캡시드 서열을 선별하고 회복하는데 사용되었다. 상기 선별 과정으로부터 회복된 변이체를 표 4에 나타내었다.

표 4

[0269]

명칭	AA 서열	회복된 클론 %	표현형
PHP.A	YTLSQGW (서열번호: 38)	40.0%	향상된 별아교세포 형질도입, 낮은 바이러스 생산, 감소된 말초 형질도입
PHP.S	QAVRTSL (서열번호: 37)	33.3%	향상된 말초 뉴런 및 심근 세포 형질도입, CNS 내 AAV9과 유사
G2A3	LAKERLS (서열번호: 39)	20.0%	유사한 AAV9 향상된 CNS 형질도입, 광범위한 형질도입
PHP.B	TLAVPFK (서열번호: 40)	25.0%	CNS 외부 (AAV9과 유사)
PHP.B2	SVSKPFL (서열번호: 41)	10.0%	향상된 CNS 형질도입
PHP.B3	FTLTTPK (서열번호: 42)	7.5%	향상된 CNS 형질도입
G2B4	MNSTKNV (서열번호: 43)	5.0%	AAV9과 유사
G2B5	VSGGHHS (서열번호: 44)	2.5%	AAV9과 유사

[0270]

CREATE는 3개의 CNS 집단: GFAP-Cre (별아교세포), Vgat-IRES-Cre (GABA활성화 뉴런) 및 Vglut2-IRES-Cre (글루탐산성 뉴런의 서브세트(subset))의 형질도입을 밝히는데 사용되었다. 뇌 및 척수로부터 분리된 후, 회복된 변이체가 선별의 2 라운드 후에 클론 및/또는 차세대 시퀀싱에 의해 평가되었다. 이 접근법은 효율적인 CNS 형질도입을 나타내는 벡터의 확인을 이끌었다(표 5 참조). 다수의 확인된 벡터가 PHP.B-DGT (PHP.N), PHP.B-EST 및 PHP.B-ATT와 같은 PHP.B보다 CNS 형질도입에서 더 효과적임이 밝혀졌다.

표 5

[0271]

명칭	AA 서열	서열번호	관찰 결과
PHP.B-DGT (PHP.N)	DGTLAVPFKAQ	서열번호: 4	광범위한 CNS 친화성, 강한 CNS 형질도입
PHP.B-EST	ESTLAVPFKAQ	서열번호: 5	강한 CNS 형질도입, 특히 별아교세포 및 푸르킨에 세포에서 강함
PHP.B-GGT	GGTLAVPFKAQ	서열번호: 6	강한 CNS 형질도입
PHP.B-ATP	AQTLATPFKAQ	서열번호: 7	강한 CNS 형질도입
PHP.B-ATT-T	ATTLATPFKAQ	서열번호: 8	강한 CNS 형질도입
PHP.B-DGT-T	DGTLATPFKAQ	서열번호: 9	강한 CNS 형질도입
PHP.B-GGT-T	GGTLATPFKAQ	서열번호: 10	강한 CNS 형질도입
PHP.B-SGS	SGSLAVPFKAQ	서열번호: 11	강한 CNS 형질도입
PHP.B-AQP	AQTLAQPFKAQ	서열번호: 12	강한 CNS 형질도입
PHP.B-QQP	AQTLQQPFKAQ	서열번호: 13	강한 CNS 형질도입
PHP.B-SNP(3)	AQTLNPFKAQ	서열번호: 14	강한 CNS 형질도입
PHP.B-SNP	AQTLAVPFSNP	서열번호: 15	뉴런에 대해 높은 특이성을 가진 강한 CNS 형질도입

[0272]

실시예 3

[0273]

CNS 뉴런 및 교세포의 효율적인 형질도입을 위한 AAV-PHP.B의 변이체를 만드는 방법

[0274]

상기 AAV-PHP.B 7-mer 펩타이드 및 측면 서열은 3개의 연속적인 아미노산의 부위 포화 돌연변이 유발을 통해 추

가로 발달되었다(도 13 참조). PCR에 의해 5개의 포화 라이브러리 (XXX1-XXX5)를 생성하고, 동일한 양으로 혼합하여 DNA를 생성하는데 사용하였다. 상기 DNA는 AAV 캡시드 라이브러리를 생성하는데 사용되었다. CREATE를 사용하여, 3개의 CNS 집단: GFAP-Cre (별아교세포), Vgat-IRES-Cre (GABA활성화 뉴런) 및 Vglut2-IRES-Cre (글루탐산성 뉴런의 서브세트(subset))의 형질도입을 위해 선별이 동시에 진행되었다. DNA가 뇌 및 척수로부터 분리되었다. 회복된 변이체는 선별의 2 라운드 후 클론 및/또는 자세대 시퀀싱에 의해 평가되었다. 이 접근법은 효율적인 CNS 형질도입을 나타내는 추가적인 백터의 확인을 이끌었다(표 3 및 4 참조). 서열은 하기 기준 중 하나 이상에 기초하여 각각의 확인을 위해 선별되었다 (i) 선별의 2 라운드 후 각 변이체가 존재하는 빈도 (높은 빈도로 존재하는 서열은 생체 내 선별 중에 농축되었을 가능성이 높음), (ii) 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 다수의 핵산 서열 변이체의 존재, 및 (iii) 바이러스 라이브러리와 비교하여 관찰된 농축.

[0275] 실시예 4

[0276] AAV-PHP.B의 변이체 제조

[0277] 7-mer 서열의 3개의 아미노산 및 7-mer 측면에 있는 2개의 아미노산이 무작위의 아미노산으로 중첩 치환됨으로써 상응하는 변이체를 만들기 위해 AAV-PHP.B 7-mer (서열번호: 40)가 부분적으로 무작위화되었다. AAV-PHP.B의 변이체를 제조하기 위한 전략의 개요를 도 21에 나타내었다.

[0278] 선별의 2 라운드 후, DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4) 서열이 특성화를 위해 선별 되었다. 상기 DGT LAVPFKAQ (서열번호: 4) 서열은 2개의 상이한 아미노산 서열로부터 독립적으로 선별되었다: (i) GAT GGG ACT TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (서열번호: 54) 및 (ii) GAT GGG ACG TTG GCG GTG CCT TTT AAG GCA CAG (서열번호: 55).

[0279] 일부 실시 양태에서, 7AA (7-mer) 서열은 AAV9 캡시드 단백질의 아미노산 588-589 사이에 삽입되었다. AAV-PHP.S 7-mer 삽입 (서열번호: 37)은 하기 7-mer 서열을 갖는다: QAVRTSL (서열번호: 37). 이는 뉴클레오타이드 서열로부터 선별되었다: CAG GCG GTT AGG ACG TCT TTG (서열번호: 56).

[0280] 실시예 5

[0281] AAV-PHP.N (서열번호: 46) 및 AAV-PHP.S (서열번호: 47)의 특성화

[0282] 이 실시예는 2개의 AAV 변이체, AAV-PHP.N (서열번호: 46) 및 AAV-PHP.S (서열번호: 47)의 추가적인 특성화를 제공한다. AAV-PHP.N은 2개의 아미노산 치환 (A587D 및 Q588G)에 의해 AAV-PHP.B와 다르다. AAV-PHP.B 캡시드는 AAV-PHP.N 캡시드와 비교하여 몇몇 CNS 뉴런 집단에 유전자 전달의 증가된 효율을 나타내었으며, 세포의 더 많은 부분으로 유전자 전달을 가능하게 하거나 더 적은 양의 바이러스로 고효율의 형질도입을 가능하게 할 수 있다.

[0283] AAV-PHP.N (서열번호: 46) 및 AAV-PHP.B의 형질도입 효율을 정량적으로 평가하기 위해, 어린 성체 마우스에게 AAV-PHP.N (서열번호: 46) 또는 AAV-PHP.B 둘 중 하나에 패키징된 단일 가닥 (ss) AAV-CAG-NLS-GFP의 1×10^{11} vg를 정맥 내 주사 하였다(도 23A-E). 투여 3주 후, 피질 및 선조체에서 핵에 위치한 GFP를 발현하는 DAPI⁺ 세포의 부분을 평가하였다. AAV-PHP.N (서열번호: 46)은 AAV-PHP.B 보다 피질에서 유의적으로 많은 DAPI⁺ 세포의 부분을 형질도입 시켰다(도 24A, 24D). 유사한 경향이 선조체에서도 관찰되었다($p=0.054$). 그 다음, 소뇌 (칼빈딘⁺)에서의 피질 및 선조체 (Neun⁺) 및 푸르킨예 뉴런에서 각 백터에 의해 형질도입된 뉴런의 백분율(도 24B, 24E)을 확인하였다. AAV-PHP.N은 각 영역에서 유의적으로 더 효율적인 뉴런의 형질도입을 제공하였다. AAV-PHP.B와 비교하여 AAV-PHP.N에 의한 형질도입의 증가된 효율성의 추가적인 뒷받침으로, AAV-PHP.N (서열번호: 46)이 도입된 마우스의 뇌에서 세포 당 GFP 형광 강도 (핵 당 GFP 형광 강도의 중간값의 평균)의 유의적인 증가(도 24G)가 관찰되었다.

[0284] 실시예 6

[0285] AAV-PHP.S에 의한 형질도입의 정량화

[0286] AAV-PHP.S (서열번호: 47) 캡시드는 후근신경절 (DRG) 및 장 신경계를 포함하는 내장 기관에서 말초 감각 뉴런의 효율적인 형질도입을 제공한다. AAV9 (서열번호: 45)와 비교하여 말초 뉴런의 AAV-PHP.S (서열번호: 47)로의 형질도입 효율을 조사하였다. AAV-PHP.S 및 AAV9는 상기에서 사용된 동일한 ss AAV-CAG-NLS-GFP 게놈을 패키징하는데 사용되었고, 상기 바이러스들을 어린 성체 마우스에게 1×10^{12} vg의 용량으로 정맥 내 주사 하였다. 3주 후 두 백터에 의해 형질도입된 PGP9.5⁺ DRG 뉴런의 백분율이 정해졌다. AAV-PHP.S를 도입한 마우스에서, 핵 GFP

를 발현한 PGP9.5⁺ 세포의 백분율 및 세포 당 GFP 발현 (형광 강도로 측정)에서 유의한 증가가 관찰되었다. 또한, 심장신경절 내 세포에서의 평균 GFP 강도 역시 AAV9에 비해 증가되었다(도 24A-G).

[0287] 특정 이론에 구애됨이 없이, AAV-PHP.S는 프리드라이히 운동실조, 심부전, 허혈성 심장 질환, 심근 비대증, 만성 통증, 및 말초 신경 손상을 포함하나, 이에 제한되지 않는 다양한 질병 및 손상을 연구하고 치료하는데 유용할 것으로 기대된다.

[0288] 실시예 7

[0289] 타겟팅 펩타이드를 이용한 치료 방법

[0290] 개체 내에 발현되는 핵산의 적용에 의해 치료될 수 있는 장애를 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 발현되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 치료 단백질에 대해 암호화한다. 개체 내에 적절한 계통에 발현될 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하거나, 또는 이로 이루어진 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 발현되는 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체 내 적절한 계통에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0291] 실시예 8

[0292] 헌팅틴병을 치료하는 방법

[0293] 헌팅틴병이 있는 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 발현되는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 상기 폴리뉴클레오티드는 치료 단백질에 대해 암호화한다. 개체 내에 신경계에 발현되는 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 발현되는 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체 내 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0294] 실시예 9

[0295] 헌팅틴병을 치료하는 방법

[0296] 헌팅틴병이 있는 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 그의 서열에 의한 헌팅틴 단백질의 발현을 감소 시키도록 구성된 작은 비-코딩 RNA (작은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA))에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 신경계에 상기 폴리뉴클레오티드의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 작은 비-코딩 RNA의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0297] 실시예 10

[0298] 헌팅틴병을 치료하는 방법

[0299] 헌팅틴병이 있는 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 헌팅틴 (HTT) 유전자의 전사를 억제하도록 조작된 아연 핑거 단백질 (ZFP)에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 다른 기관들 중 신경계에 상기 ZFP의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함할 것이다. 필요한 경우, 상기 ZFP의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0300] 실시예 11

[0301] 헌팅틴병의 방법

[0302] 헌팅틴병이 있는 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 헌팅틴 단백질의 발현을 감소시키기 위해 당업자에 의해 설계된 작은 비-코딩 RNA (작은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA))에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 다른 기관들 중 신경계에 상기 폴리뉴클레오티드의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함할 것이다. 필요한 경우, 상기 작은 비-코딩

RNA의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0303] 실시예 12

[0304] 알츠하이머병을 치료하는 방법

[0305] 알츠하이머병을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 항-Abeta 항체 또는 항체 단편에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 신경계에 발현될 상기 항체 또는 항체 단편의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 항체 또는 항체 단편의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0306] 실시예 13

[0307] 알츠하이머병을 치료하는 방법

[0308] 알츠하이머병을 가진 대상을 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 아포리포프로테인 E (apolipoprotein, ApoE) 단백질, 바람직하게는 인간 apoE 폴리펩타이드 apoE2 또는 apoE2의 변형된 변이체에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 신경계에 발현될 상기 항체 또는 항체 단편의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 ApoE 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0309] 실시예 14

[0310] SMA를 치료하는 방법

[0311] 척수근위축증 (SMA)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 생존 운동 뉴런1(SMN1) 폴리펩타이드에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 투여한다. 신경계에 발현될 상기 SMN 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 SMN 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0312] 실시예 15

[0313] 프리드라이히 운동실조를 치료하는 방법

[0314] 프리드라이히 운동실조(Friedreich's Ataxia)를 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 프라탁신(frataxin)에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 다른 기관들 중 신경계 및 심장에 발현될 상기 프라탁신(frataxin) 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 프라탁신(frataxin) 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계 및 심장에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0315] 실시예 16

[0316] 폼페병을 치료하는 방법

[0317] 폼페병(Pompe disease)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 산성 알파-글루코시다제 (acid alpha-glucosidase, GAA)에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 다른 기관들 중 신경계 및 심장에 발현될 상기 GAA 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 GAA 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계 및 심장에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.

[0318] 실시예 17

- [0319] 후기 유아 신경원성 세로이드 리포푸신증을 치료하는 방법
- [0320] 후기 유아 신경원성 세로이드 리포푸신증(Late Infantile neuronal ceroid lipofuscinosis, LINCL)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 트리펩티딜 펩티다아제(tripeptidyl peptidase) 1 단백질에 대해 암호화하는 CLN2 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 트리펩티딜 펩티다아제(tripeptidyl peptidase) 1 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 트리펩티딜 펩티다아제(tripeptidyl peptidase) 1 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0321] 실시예 18
- [0322] 배튼병을 치료하는 방법
- [0323] 배튼병(Batten disease)의 청소년 NCL 유형을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 배트닌(battenin) 단백질에 대해 암호화하는 CLN3 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 배트닌(battenin) 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 배트닌(battenin) 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0324] 실시예 19
- [0325] 카나반병을 치료하는 방법
- [0326] 카나반병(Canavan disease)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 아스파르토아실라제(aspartoacylase) 단백질에 대해 암호화하는 ASPA 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 아스파르토아실라제(aspartoacylase) 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 아스파르토아실라제(aspartoacylase) 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0327] 실시예 20
- [0328] 파킨슨병을 치료하는 방법
- [0329] 파킨슨병(Parkinson's disease)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 비-도파민성 세포로부터의 도파민의 생산 증가를 위해 필요한 효소(들)를 암호화하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드(들)를 각각 포함하는 하나 이상의 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 효소(들)의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 효소(들)의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0330] 실시예 21
- [0331] 파킨슨병을 치료하는 방법
- [0332] 파킨슨병(Parkinson's disease)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 변형된, 내인성 알파-시누클레인(alpha-synuclein)의 응집을 감소시키는 알파-시누클레인(alpha-synuclein) 단백질의 응집-저항성 유형을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 응집-저항성 알파-시누클레인(alpha-synuclein) 단백질의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 단백질의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0333] 실시예 22
- [0334] 근위축성 측삭 경화증 또는 전두엽 치매를 치료하는 방법

- [0335] C9ORF72에서의 돌연변이에 의해 유발된 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 또는 전두엽 치매(frontal dementia)를 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체 세포에서 핵사뉴클레오티드 확장(GGGGCC)에 의해 유발된 핵 RNA 초점을 감소시키는 비-코딩 RNA(들)을 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 상기 개체에 투여한다. 신경계에 발현될 상기 RNA(들)의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 RNA(들)의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0336] 실시예 23
- [0337] 다발성 경화증을 치료하는 방법
- [0338] 다발성 경화증(multiple sclerosis)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 상기 개체에 영양 인자 또는 면역조절 인자, 예를 들어 백혈병 억제 인자 (LIF) 또는 섬유 신경 영양 인자 (CNTF)를 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 전신 투여한다. 신경계에 발현될 상기 인자의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 인자의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0339] 실시예 24
- [0340] 근위축성 측삭 경화증을 치료하는 방법
- [0341] SOD1 돌연변이에 의해 유발된 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis)을 가진 개체를 확인한다. 그런 다음, 돌연변이 SOD1 단백질의 발현을 감소시키기 위해 당업자에 의해 설계된 작은 비-코딩 RNA (작은 헤어핀 RNA (shRNA) 또는 마이크로RNA (miRNA))에 대해 암호화하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 AAV 벡터의 첫 번째 양을 상기 개체에 투여한다. 신경계에 발현될 상기 작은 비-코딩 RNA의 적절한 타겟팅을 허용하기 위해, 상기 AAV 벡터는 서열번호: 1-44, 48-53, 65-68, 및 74-93 중 어느 것을 포함하는 타겟팅 펩타이드 부분을 포함하는 캡시드 단백질을 포함한다. 필요한 경우, 상기 작은 비-코딩 RNA의 치료학적으로 유효한 양이 개체의 신경계에서 발현될 때까지, 상기 개체에 벡터의 두 번째 또는 세 번째 투여량을 투여한다.
- [0342] 특허, 특허 출원, 논문, 교과서 등을 포함하여 본 발명에 인용된 모든 참고 문헌 및 벗어난 범위로 인용된 참고 문헌은 본 발명의 전체에서 참고 문헌으로 포함된다. 본 발명에 포함된 참고 문헌에서 제공된 임의의 정의 또는 용어가 본 발명에서 제공된 용어 및 논의와 다를 경우, 본 발명의 용어 및 정의가 컨트롤한다.
- [0343] 상기에서 상술한 명세서는 당업자가 본 발명을 실시 가능하게 하기에 충분하다고 여겨진다. 상기에서 기재한 설명 및 실시예들은 본 발명의 소정의 바람직한 실시 양태를 상세하게 설명하고 본 발명자에 의해 고안된 최상의 방법을 설명한다. 그러나, 상세하게 기재한 내용이 본문에 어느 정도 나타나더라도, 본 발명은 여러 방식으로 실시될 수 있으며, 본 발명은 첨부된 청구 범위 및 그 등가물에 따라 해석 되어야 한다.
- [0344] 상기에서 기재한 실시 양태들 중 적어도 일부에서, 일 실시 양태에서 사용된 하나 이상의 요소들은 대체가 기술적으로 실현 가능하지 않은 것이 아니라면 다른 실시 양태에서 교환 가능하게 사용될 수 있다. 본 기술 분야의 당업자는 청구된 주제의 범위를 벗어나지 않고 상술한 방법 및 구조에 대해 다양한 다른 생략, 추가 및 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 모든 수정 및 변경은 첨부된 청구 범위에 의해 한정된 것으로서, 본 발명의 주제 범위 내에 속한다.
- [0345] 본 발명에서 실질적으로 임의의 복수 및/또는 단수의 사용과 관련하여, 당업자는 복수에서 단수 및/또는 단수에서 복수로 번역 할 수 있다. 다양한 단수/복수 치환은 명확성을 위해 본 발명에서 명확하게 제시할 수 있다.
- [0346] 일반적으로, 본 명세서에서 사용 된 용어, 및 특히 첨부된 청구 범위 (예를 들어, 첨부된 청구 범위의 본문)는 일반적으로 "공개된(open)" 용어로 의도된다는 것을 당업자는 이해할 것이다 (예를 들어, "포함하는(including)"이라는 용어는 "포함하나 이에 제한되지 않는(including but not limited to)", "가지는(having)"이라는 용어는 "적어도 가지는(having at least)", "포함한다(includes)"는 용어는 "포함하나 이에 제한되지 않는다(includes but is not limited to)", 등으로 해석되어야 한다.). 특정 수의 도입된 청구항 설명이 의도된다면, 그러한 의도는 청구항에서 명시적으로 언급될 것이고, 그러한 기재가 없을 경우, 그러한 의도는 존재하지 않는다는 것이 당업자에 의해 더 잘 이해될 것이다. 예를 들어, 이해를 돕기 위해, 하기에 첨부된 청구항은 "적어도 하나(at least one)" 및 "하나 이상(one or more)"이라는 도입 문구의 사용을 포함할 수 있다.

그러나, 동일한 청구항이 "하나 이상(one or more)" 또는 "적어도 하나(at least one)"라는 도입 문구 및 "a" 또는 "an"과 같은 부정관사 (예를 들어, "a" 및/또는 "an"은 "적어도 하나(at least one)" 또는 "하나 이상(one or more)"를 의미한다고 이해되어야 한다)를 포함할 때도, 이러한 문구의 사용은 부정관사 "a"또는 "an"에 의한 청구항의 도입이 그 도입된 청구항 설명을 포함하는 임의의 특정 청구항을 단지 그러한 설명 하나만 포함하는 실시 양태로 제한한다는 것을 의미하는 것으로 해석되어서는 안된다; 청구항 설명을 소개하기 위해 사용되는 정관사의 사용에 대해서도 마찬가지다. 또한, 도입된 청구항 설명의 특정 숫자가 명시적으로 나열되더라도, 당업자라면 그러한 설명이 적어도 나열된 숫자를 의미하는 것으로 해석되어야 한다는 것을 인식할 것이다 (예를 들어, 다른 수식어 없이, "2 개의 설명(two recitations)"뿐인 설명은 적어도 2개의 설명, 또는 2개 이상의 설명을 의미한다). 또한, "A, B, 및 C, 등 중 적어도 하나"와 유사한 규칙이 사용되는 경우, 일반적으로 그러한 구성은 당업자가 규칙 (예를 들어, "A, B 및 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 함께, A 및 C 함께, B 및 C 함께, 및/또는 A, B, 및 C 함께, 등을 가지는 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않는다.)을 이해하는 의미에서 의도된다. "A, B, 또는 C, 등 중 적어도 하나"와 유사한 규칙이 사용되는 경우, 일반적으로 그러한 구성은 당업자가 규칙 (예를 들어, "A, B, 또는 C 중 적어도 하나를 갖는 시스템"은 A 단독, B 단독, C 단독, A 및 B 함께, A 및 C 함께, B 및 C 함께, 및/또는 A, B, 및 C 함께, 등을 가지는 시스템을 포함하나 이에 제한되지 않는다.)을 이해하는 의미에서 의도된다. 설명, 청구 범위 또는 도면에서 두 개 이상의 대안적인 용어를 제시하는 사실상 임의의 이원적인 단어 및/또는 어구가 용어, 용어 중 어느 하나, 또는 용어 둘 다 중 하나를 포함하는 가능성을 고려하도록 이해되어야 한다는 것이 당업자들에 의해 이해될 것이다. 예를 들어, "A 또는 B" 라는 문구는 "A" 또는 "B" 또는 "A 및 B"의 가능성을 포함하는 것으로 이해될 것이다.

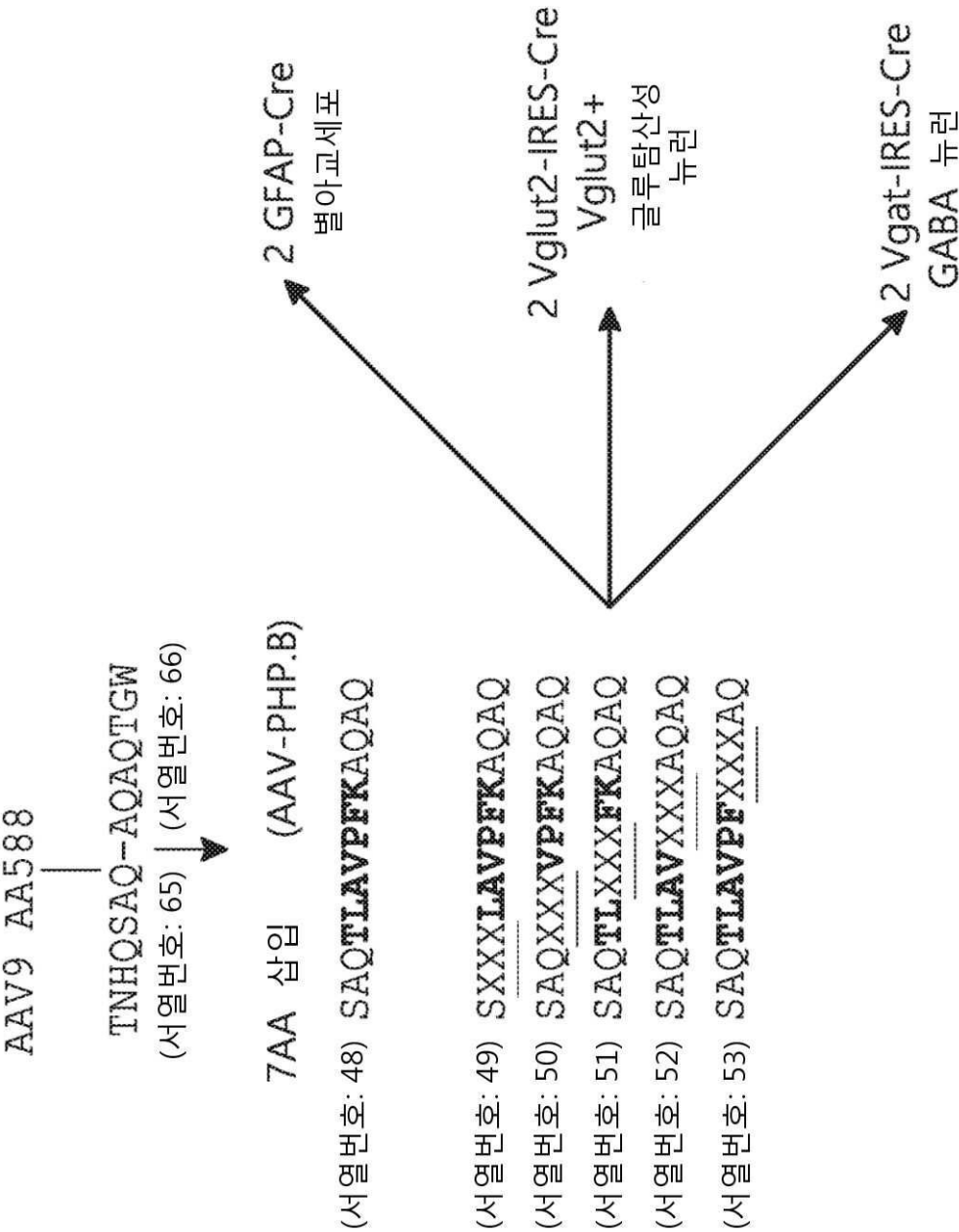
[0347] 또한, 본 발명의 특징 또는 양상이 마쿠시(Markush) 그룹의 용어로 기재되는 경우, 본 기술 분야의 당업자는 본 발명이 또한 마쿠시(Markush) 그룹의 임의의 구성원 또는 구성원의 서브그룹의 관점에서 기술됨을 인식 할 것이다.

[0348] 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 기술된 설명을 제공하는 관점에서와 같은 임의의 목적 및 모든 목적을 위해, 본 발명에 개시된 모든 범위는 또한 임의의 및 가능한 모든 하위 범위 및 그 하위 범위의 조합을 포함한다. 나열된 범위는 동일한 범위가 적어도 동일한 2분의 1, 3분의 1, 4분의 1, 5분의 1, 10분의 1, 등으로 나누어지는 것을 충분히 기술하고 가능하게 함으로써 쉽게 인식될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 본 발명에서 논의된 각 범위는 하위 3분의 1, 중위 3분의 1, 상위 3분의 1로 쉽게 분해 될 수 있다. 또한, 당업자는 "~까지(up to)", "적어도(at least)", "~보다 큰(greater than)", "~미만(less than)", 등은 설명된 숫자를 포함하고 상기에서 논의된 바와 같이 하위 범위로 나뉠 수 있는 범위를 나타낸다. 마지막으로, 당업자가 이해할 수 있는 바와 같이, 범위는 각각의 구성원을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1 내지 3개의 조항(article)을 갖는 그룹은 1, 2, 또는 3개의 조항을 갖는 그룹을 나타낸다. 유사하게, 1-5 개의 조항을 갖는 그룹은 1, 2, 3, 4, 또는 5개의 조항을 갖는 그룹을 나타낸다, 등등.

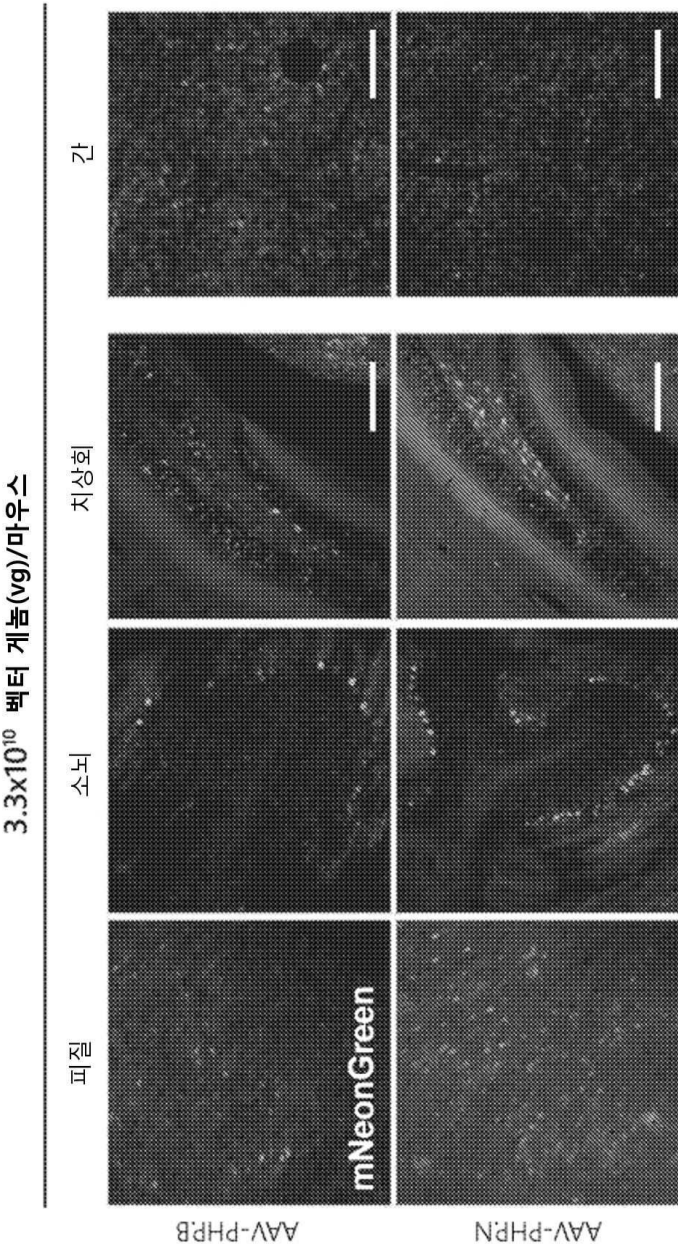
[0349] 다양한 양상들 및 실시 양태들이 본 발명에 개시되었지만, 다른 양상들 및 실시 양태들은 당업자에게 명백할 것이다. 본 발명에 개시된 다양한 양상들 및 실시 양태는 예시의 목적을 위한 것이며, 이하의 청구 범위에 의해 명시되는 정확한 범위 및 사상과 함께 제한되는 것을 의미하지는 않는다.

도면

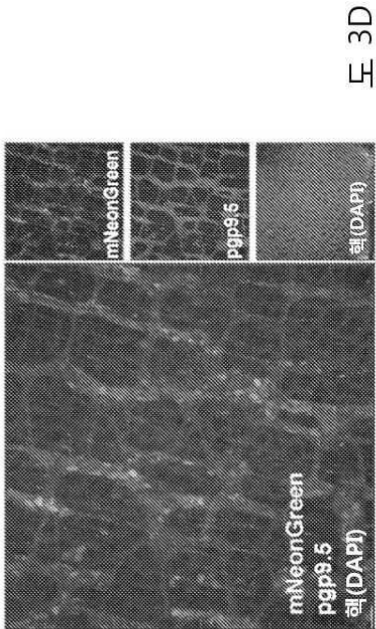
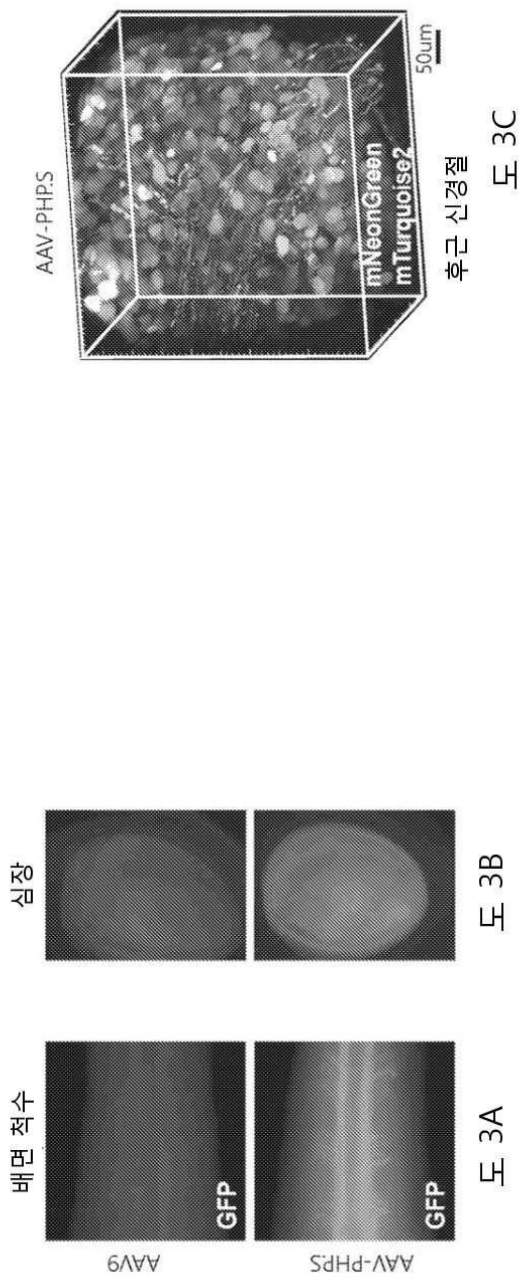
도면1



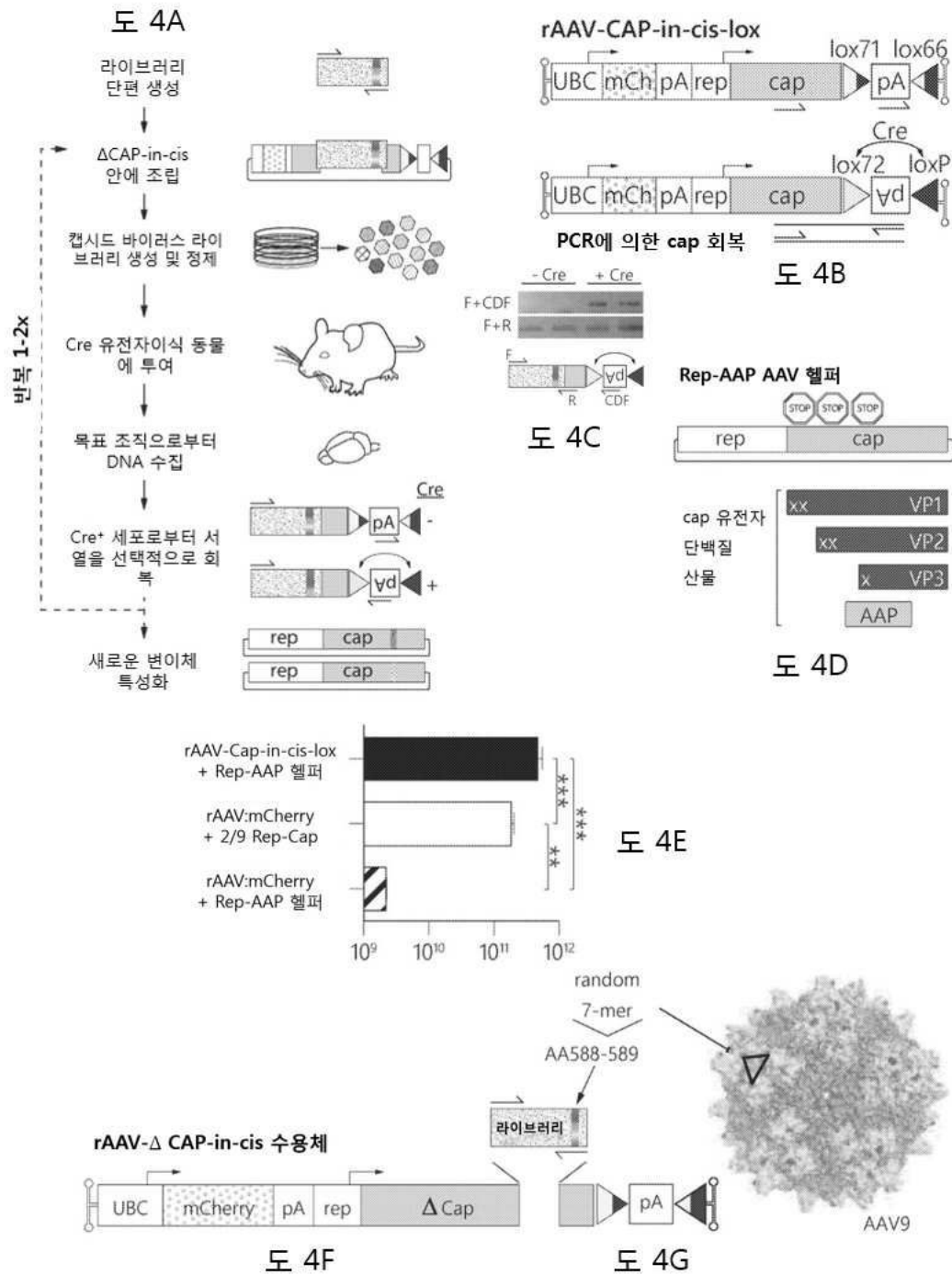
도면2



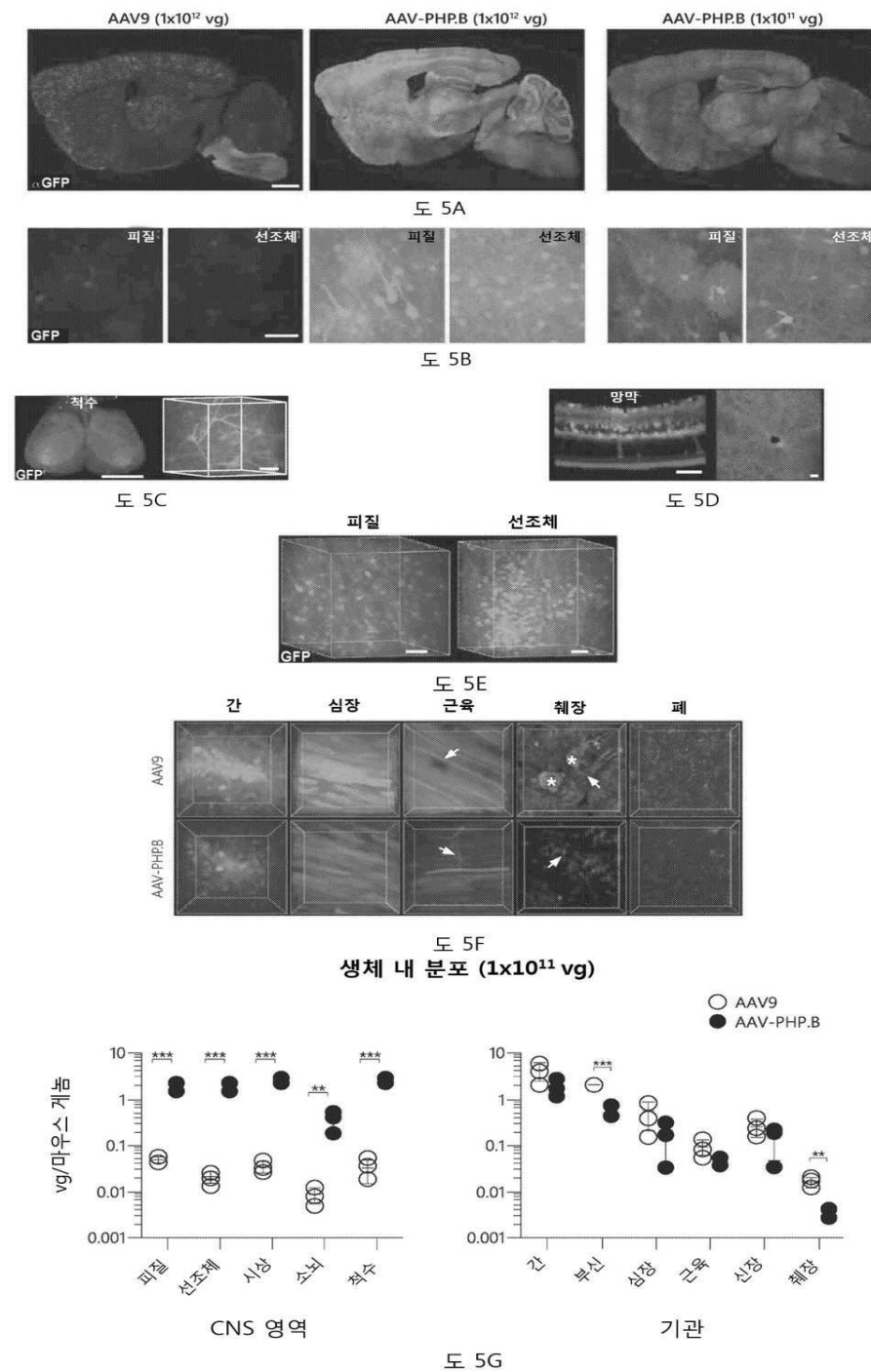
도면3



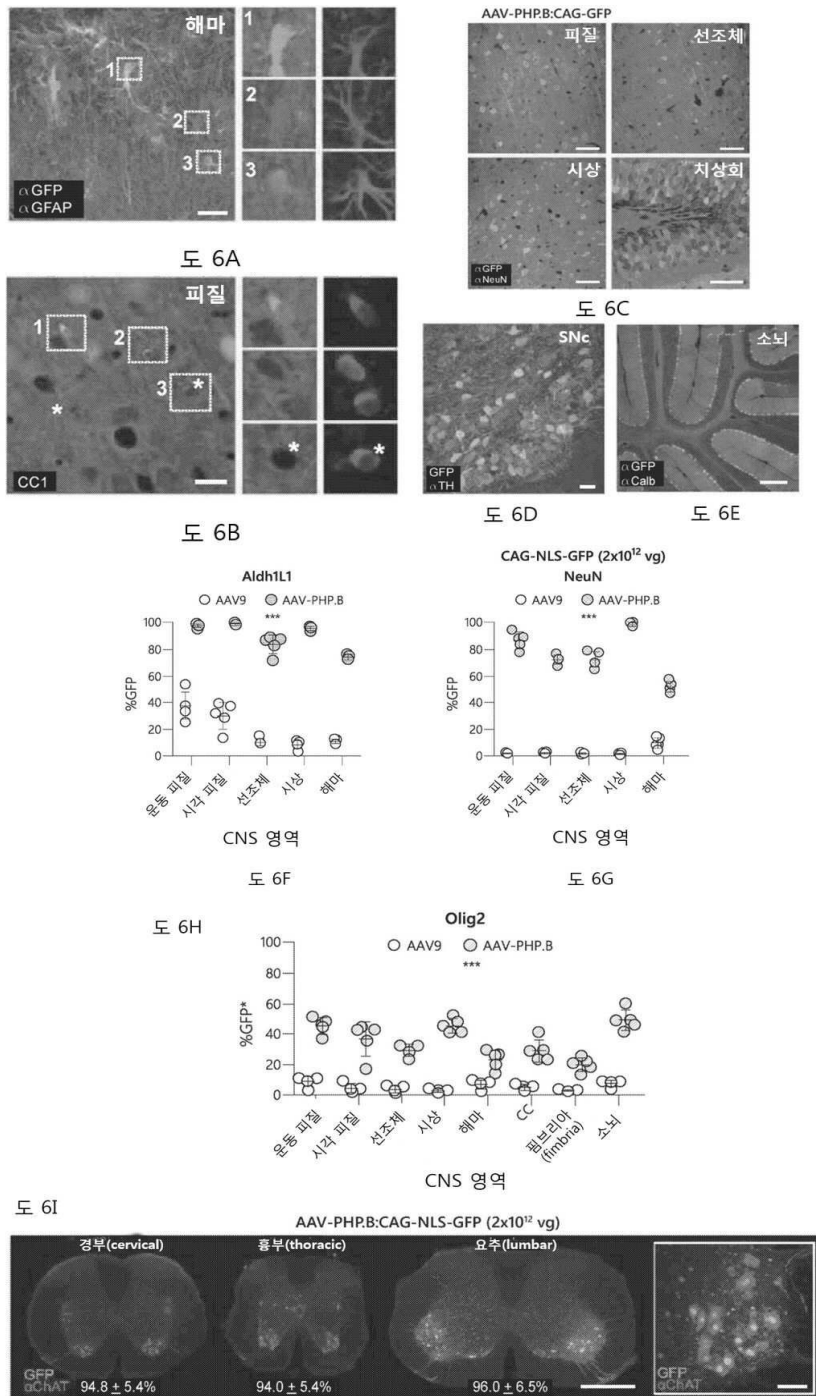
도면4



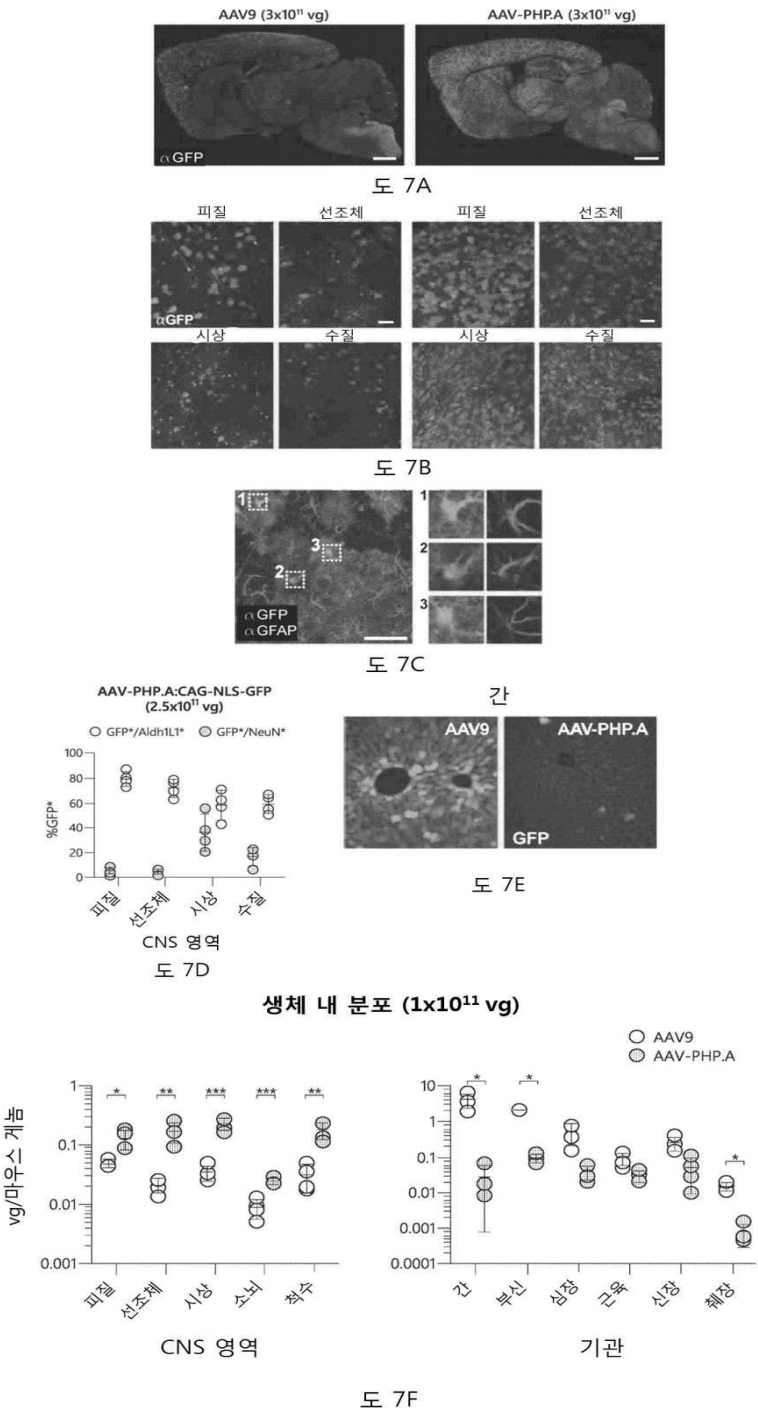
도면5



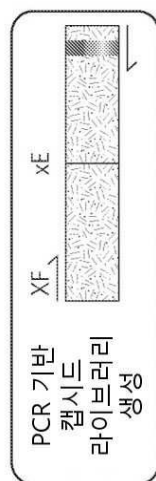
도면6



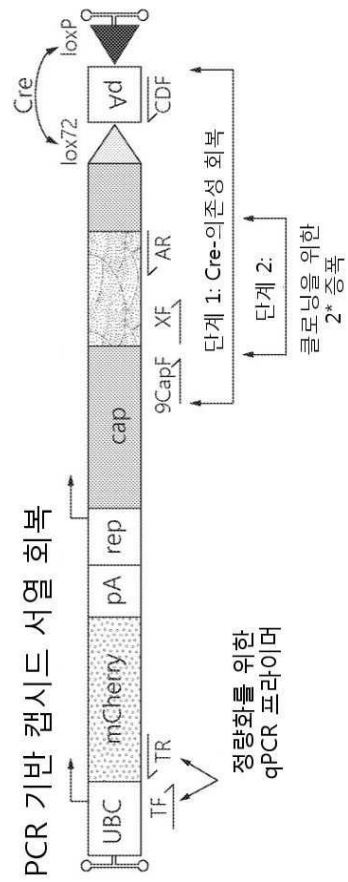
도면7



도면8

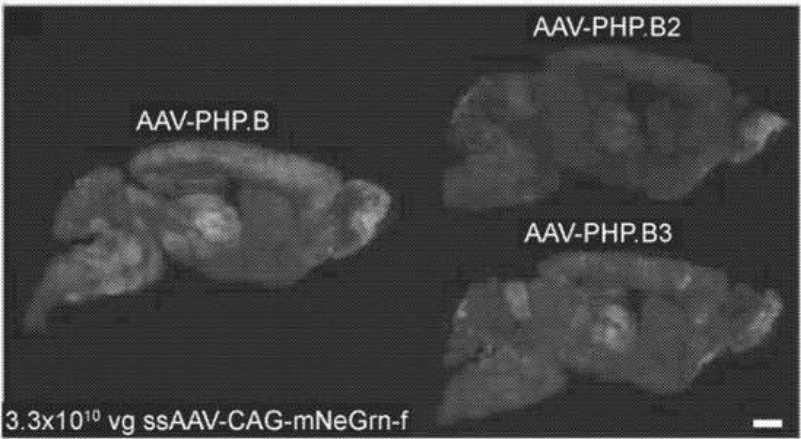


8A

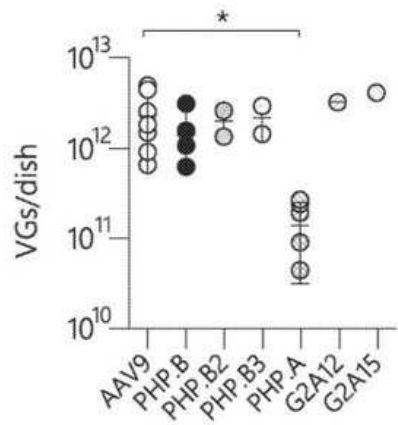


88F

도면9



도 9A



도 9B

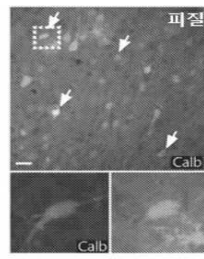
도면10



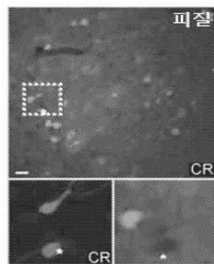
도 10A



도 10B

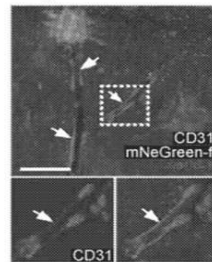


도 10C

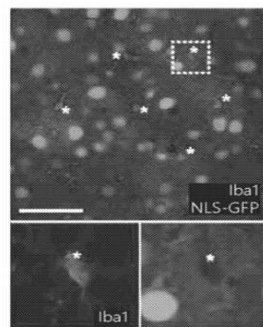


도 10D

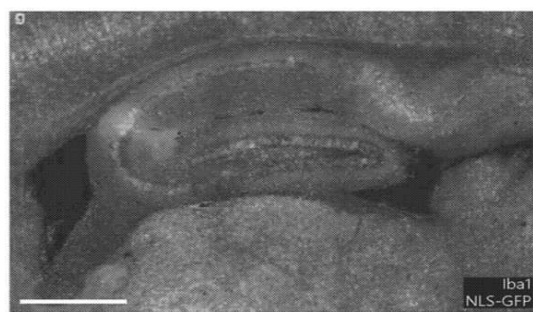
3.3x10¹⁰ vg ssAAV-CAG-mNeGrn-f



도 10E



도 10F

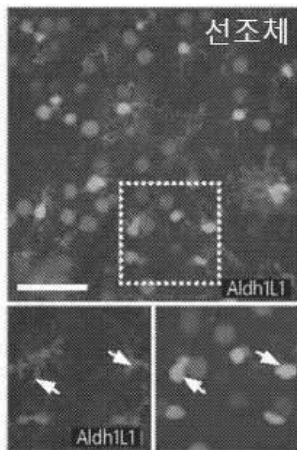


도 10G

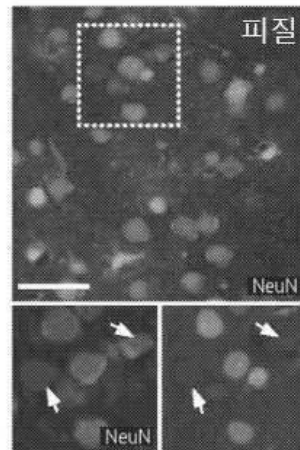
도면11



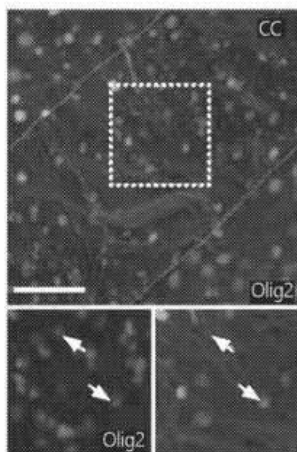
도면12



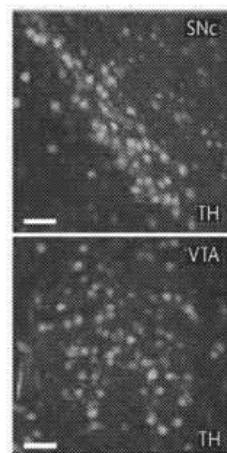
도 12A



도 12B

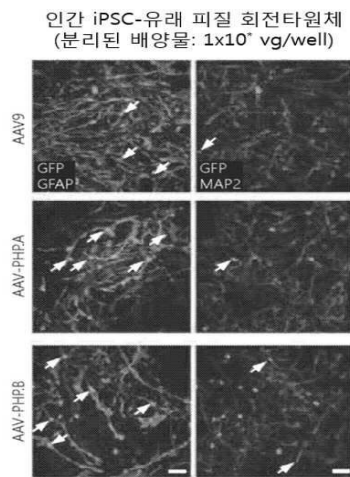


도 12C

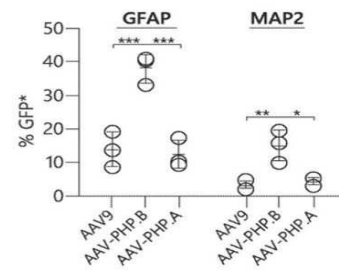


도 12D

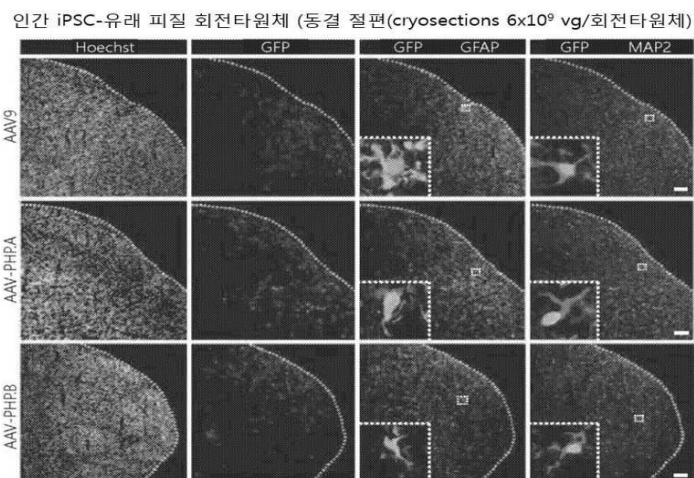
도면13



도 13A

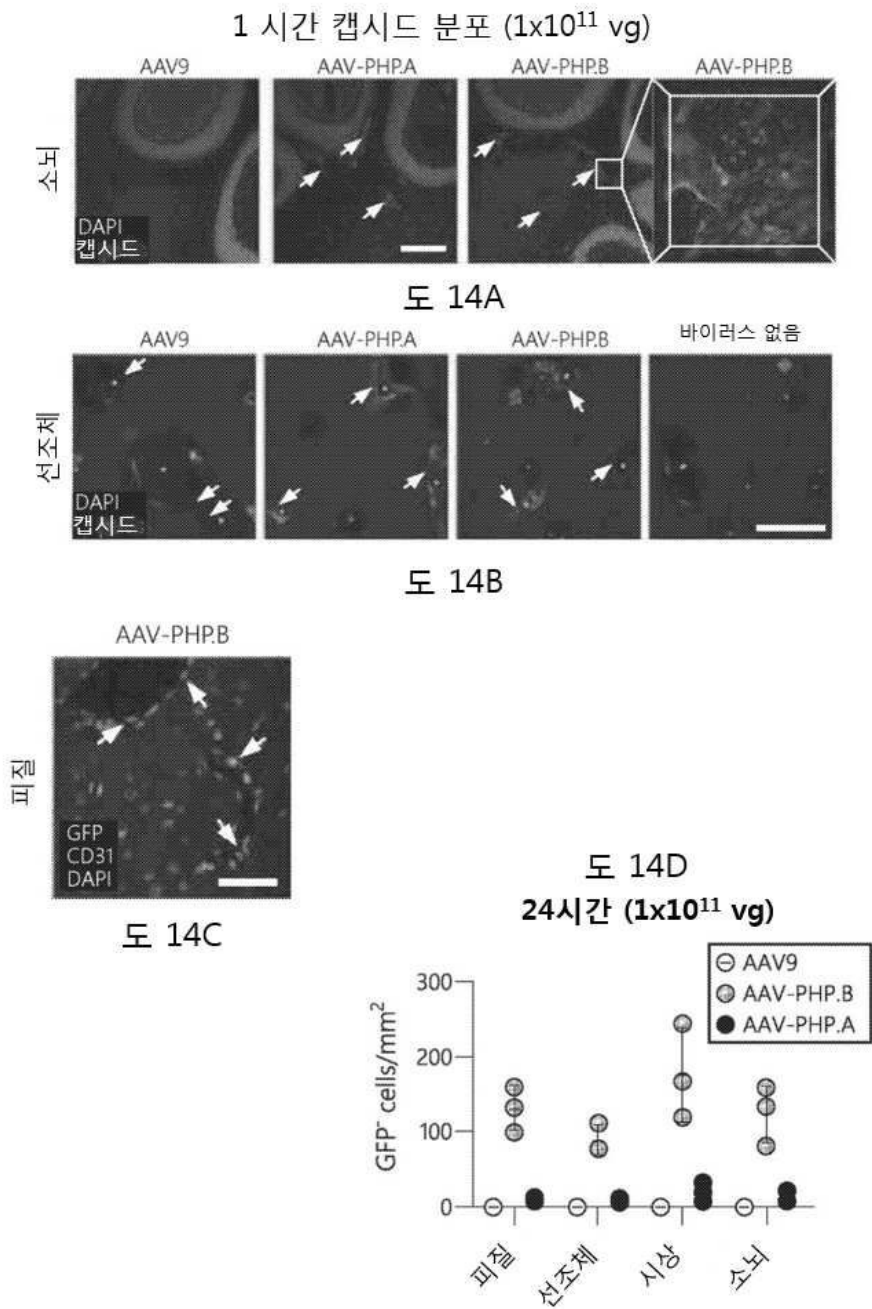


도 13B

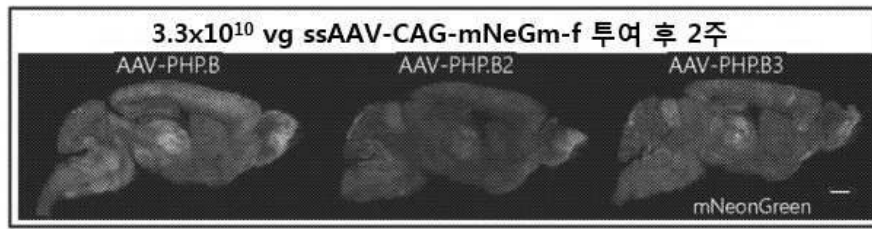


도 13C

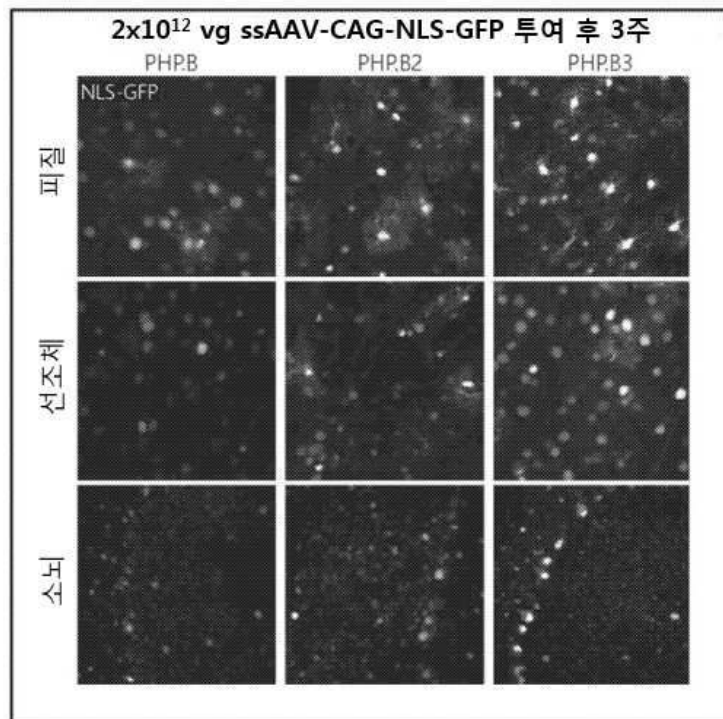
도면14



도면15

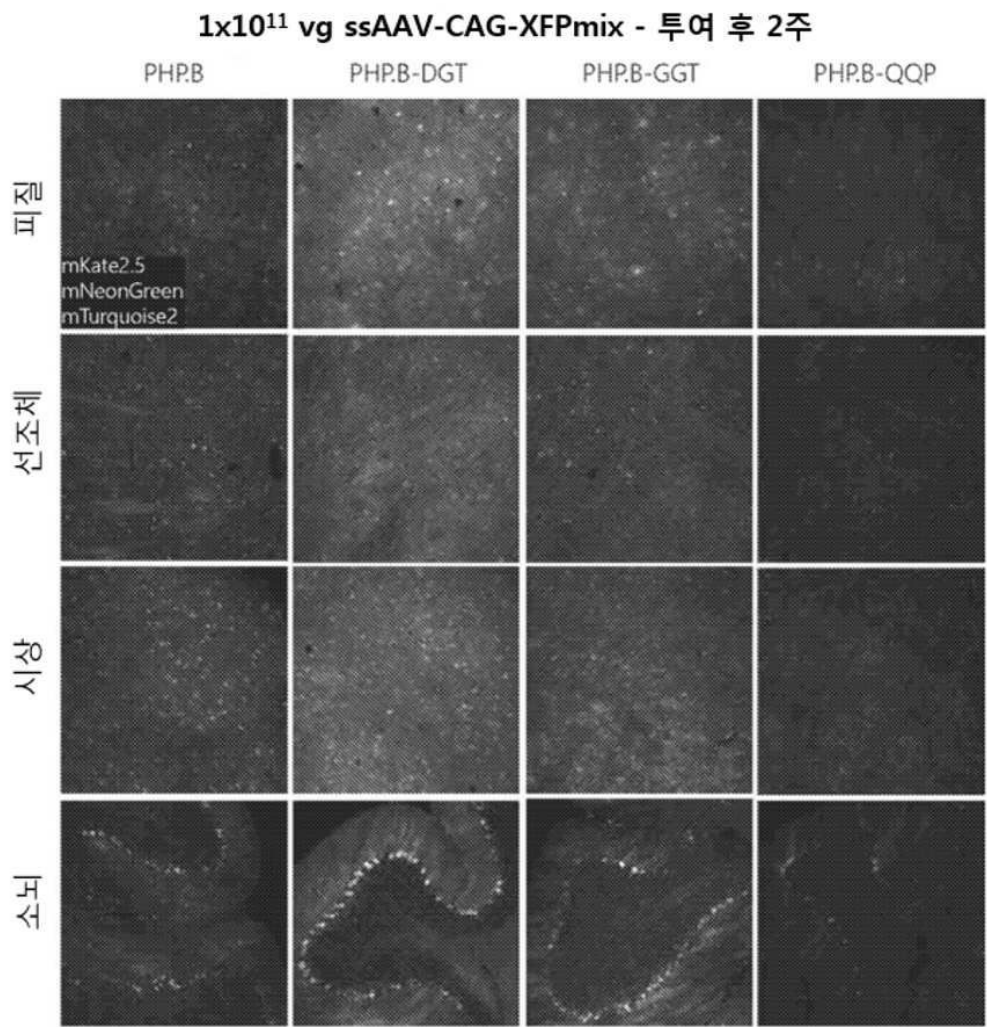


도 15A

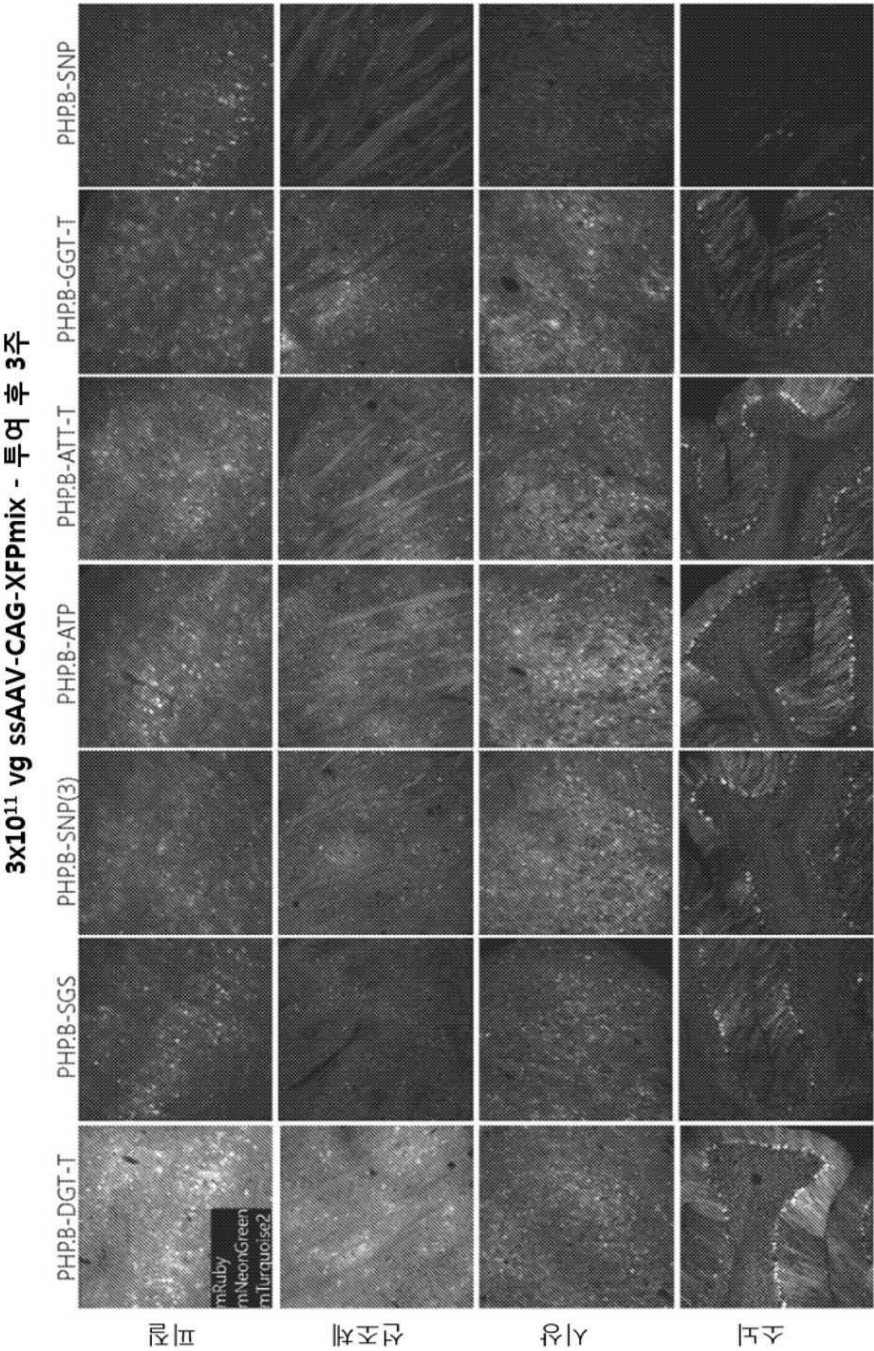


도 15B

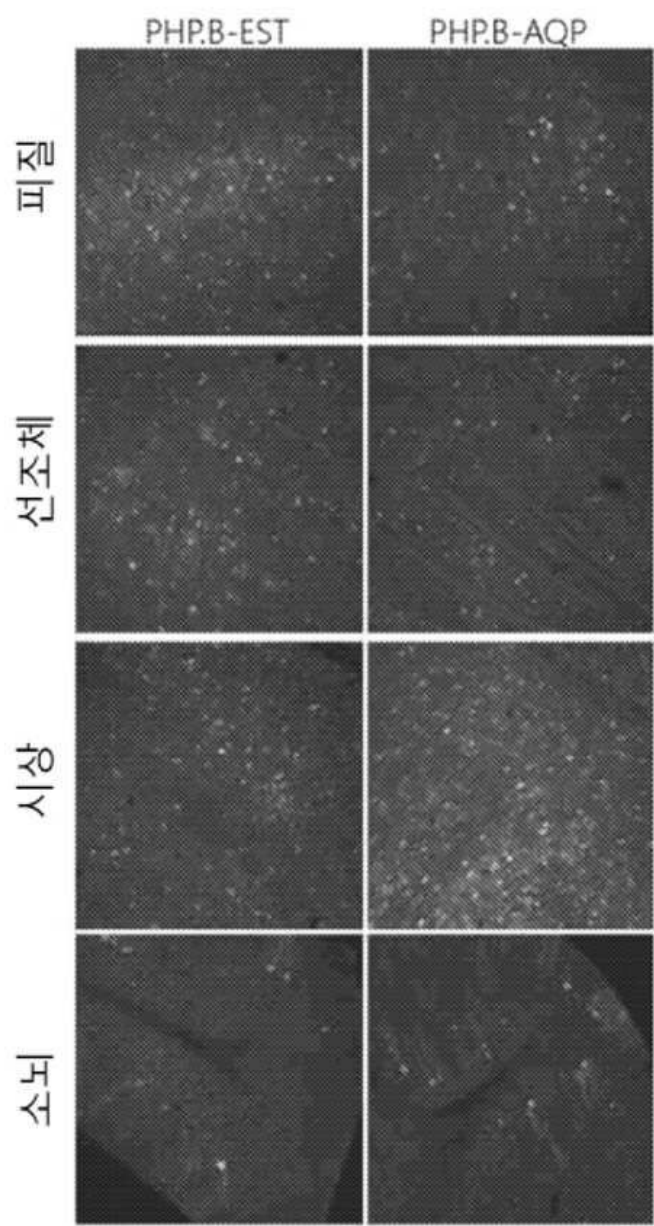
도면16



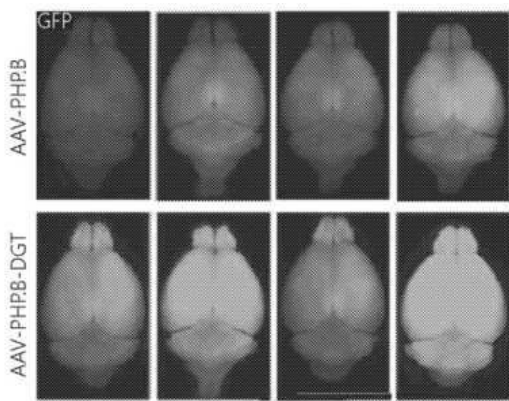
도면17



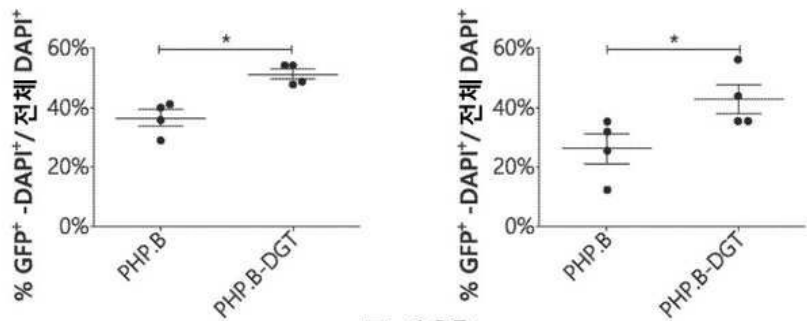
도면18



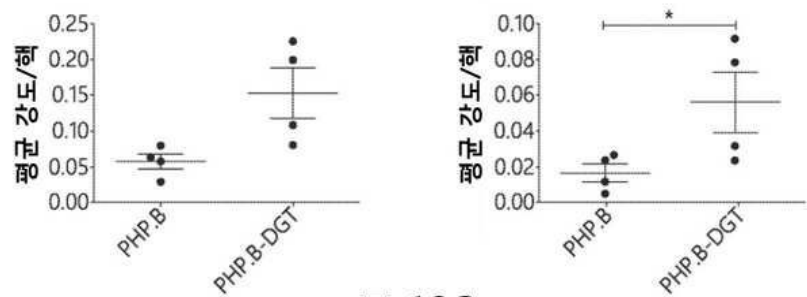
도면19



도 19A

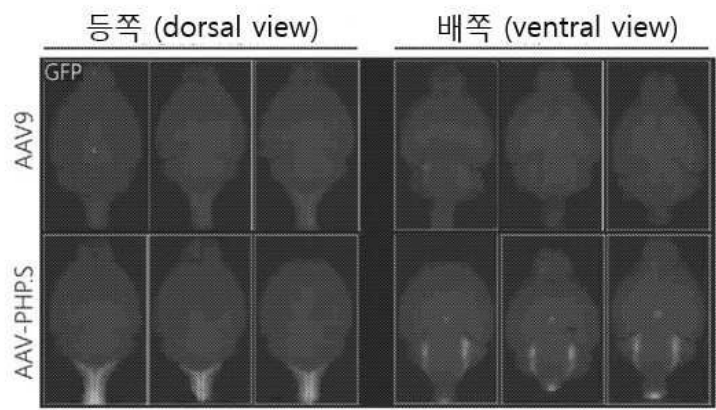


도 19B

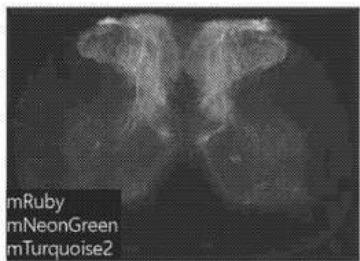


도 19C

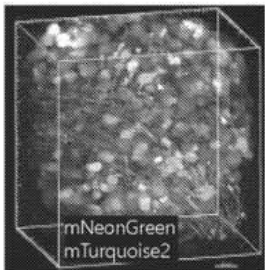
도면20



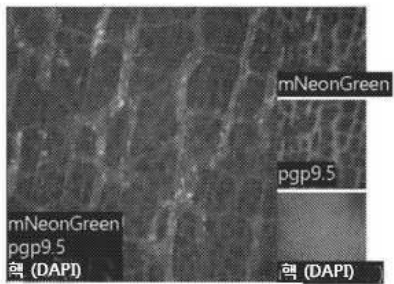
GFP 형광 - 전체 뇌 이미지
도 20A



척수
도 20B



후근신경절
도 20C



장(intestine)
도 20D

도면21

PHP:B 7-mer - AA 588-589 사이에 삽입됨	XXX1	SXXXLAVPFKAQAQ	(서열번호: 49)
	XXX2	SAQXXXVPFKAQAQ	(서열번호: 50)
	XXX3	SAQTLXXXFKAQAQ	(서열번호: 51)
PHP:B SAQTLAVPFKAQAQ (서열번호: 48)	XXX4	SAQTLAVXXXXAQAQ	(서열번호: 52)
	XXX5	SAQTLAVPFXXXXAQAQ	(서열번호: 53)

도면22

AAV-PHP.N VP1 캡시드 서열
서열번호: 46

도 22A

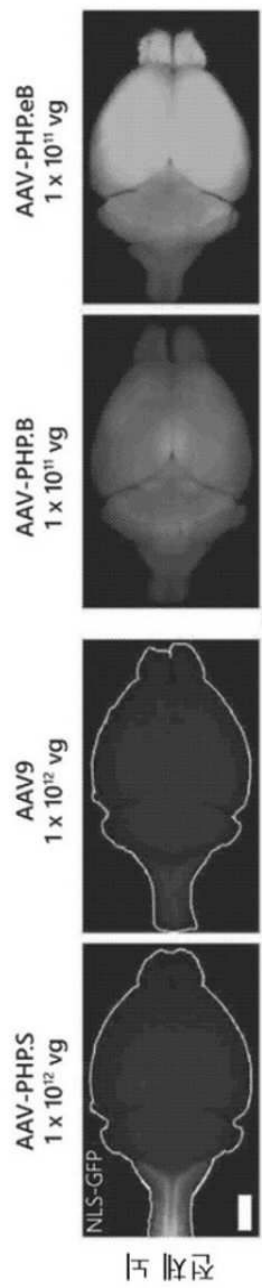
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEP
VNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEP
LGLVEEAAKTA PGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPP
AAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSGNWHCDSQLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRQWRLINNNWGFRPKRLNFKLENI
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLD
GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQSLDRLMNP LIDQYLYYLS
RTINGSGQNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALN
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES
YGQVATNHQS DGTLAVPFKAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRD VYLQGP I WAKIPIHTDGNFHPSP
LMGGFGMKHPPPPQILIKNTTPVPADPPTAFNKKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNP
EIQYTSNYKSNNVFAVNTGVSEPRPIGTRYLTRNL

AAV-PHP.S VP1 캡시드 서열
서열번호: 47

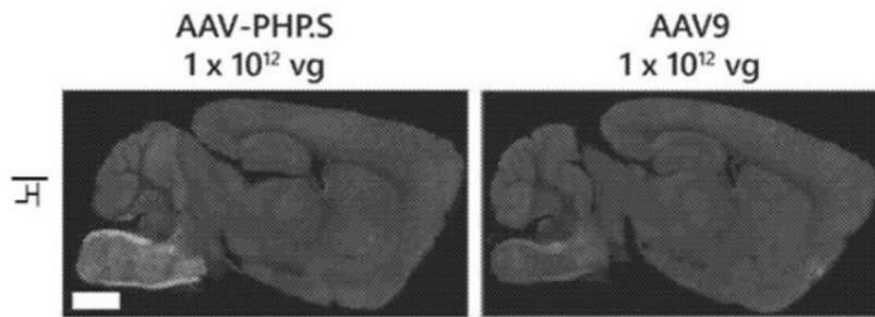
도 22B

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGNGLDKGEP
VNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLLEP
LGLVEEAAKTA PGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPP
AAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSGNWHCDSQLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL
YKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRQWRLINNNWGFRPKRLNFKLENI
QVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLD
GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQSLDRLMNP LIDQYLYYLS
RTINGSGQNQQT LKFSVAGPSNMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNSEFAWPGASSWALN
GRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATES
YGQVATNHQS AQAQVRTSLAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRD VYLQGP I WAKIPIHTDGNFHPSP
LMGGFGMKHPPPPQILIKNTTPVPADPPTAFNKKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNP
EIQYTSNYKSNNVFAVNTGVSEPRPIGTRYLTRNL

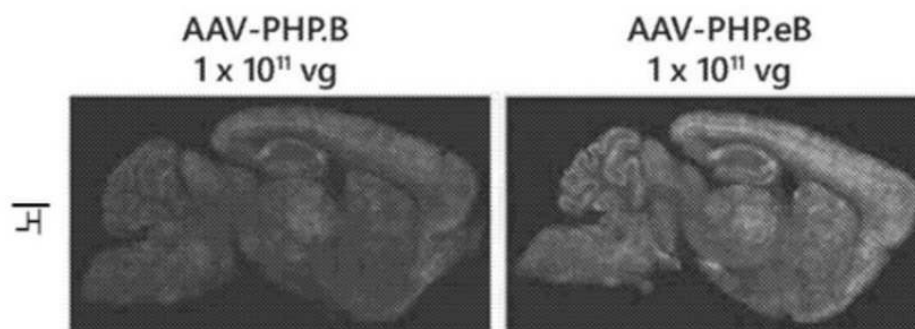
도면23a



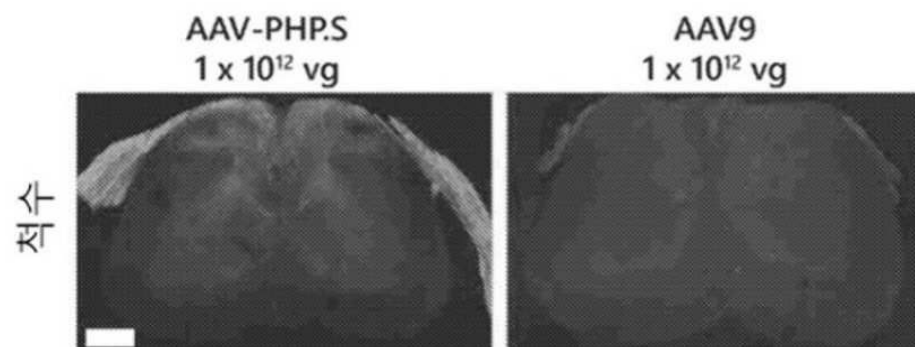
도면23b



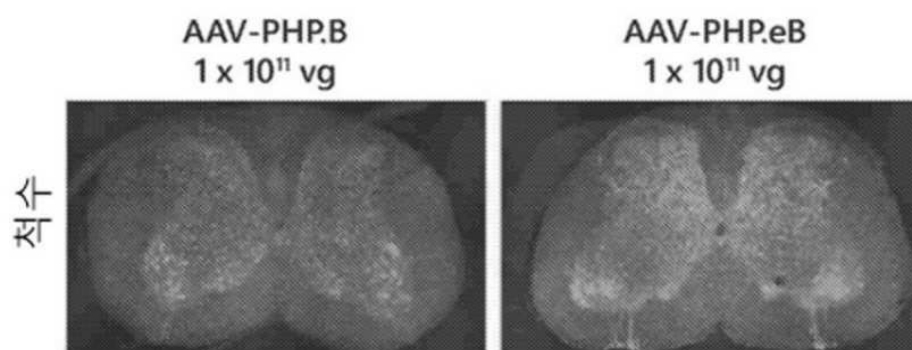
도면23c



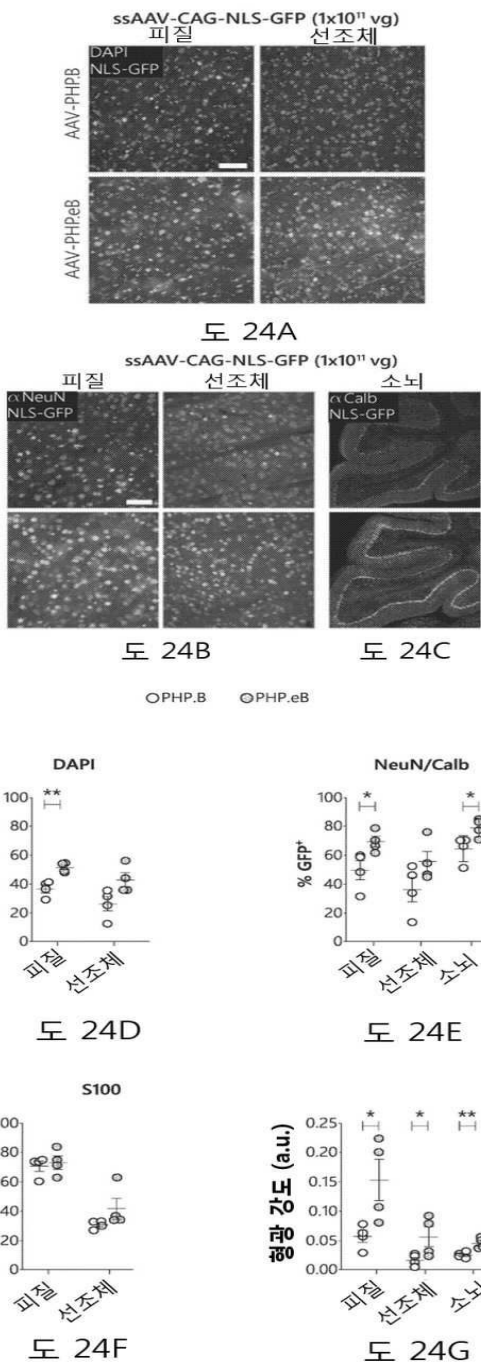
도면23d



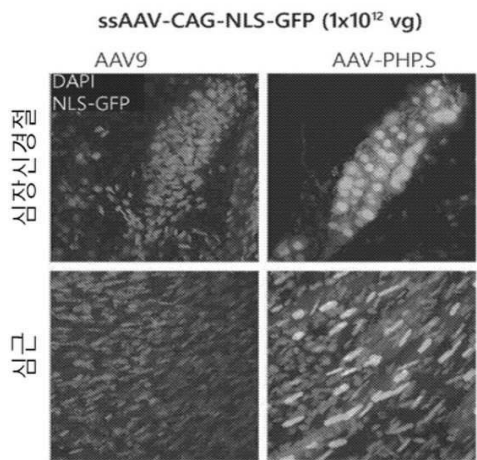
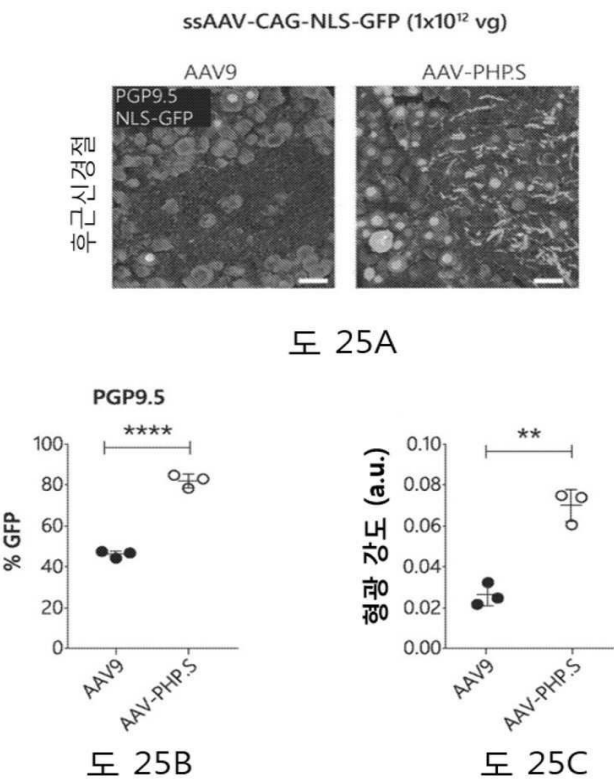
도면23e



도면24



도면25



도 25D

서열 목록

<110> California Institute of Technology
Deverman, Benjamin E.
Gradinaru, Viviana
Chan, Ken Y.
<120> TARGETING PEPTIDES FOR DIRECTING ADENO-ASSOCIATED VIRUSES (AAVs)
<130> MPI18-005

<150> US 62/266184
 <151> 2015-12-11
 <150> US 62/421891
 <151> 2016-11-14
 <150> PCT/US 2016/065969
 <151> 2016-12-09
 <160> 93
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > PHP.B
 <400> 1
 Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B2
 <400> 2
 Ala Gln Ser Val Ser Lys Pro Phe Leu Ala Gln
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B3
 <400> 3
 Ala Gln Phe Thr Leu Thr Thr Pro Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 4

<211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.N/PHP.B-DGT
 <400> 4
 Asp Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 5
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-EST
 <400> 5
 Glu Ser Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 6
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-GGT
 <400> 6
 Gly Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 7
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-ATP
 <400> 7
 Ala Gln Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 8
 <211> 11
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-ATT-T

<400> 8

Ala Thr Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-DGT-T

<400> 9

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-GGT-T

<400> 10

Gly Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 11

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-SGS

<400> 11

Ser Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 12

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-AQP

<400> 12

Ala Gln Thr Leu Ala Gln Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-QQP

<400> 13

Ala Gln Thr Leu Gln Gln Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-SNP(3)

<400> 14

Ala Gln Thr Leu Ser Asn Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-SNP

<400> 15

Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Ser Asn Pro

1 5 10

<210> 16

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-QGT

<400> 16
 Gln Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 17
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-NQT
 <400> 17
 Asn Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-EGS
 <400> 18
 Glu Gly Ser Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 19
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-SGN
 <400> 19
 Ser Gly Asn Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10
 <210> 20
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-EGT
 <400> 20
 Glu Gly Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-DST

<400

> 21

Pro His Pro Asx Asp Ser Thr

1	5	
---	---	--

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-DST

<400> 22

Ala Val Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-STP

<400> 23

Ala Gln Thr Leu Ser Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 24

<211> 11

<212

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-PQP

<400> 24

Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln

1	5	10
---	---	----

<210> 25
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-SQP
 <400> 25

Ala Gln Thr Leu Ser Gln Pro Phe Lys Ala Gln
 1 5 10

<210> 26
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-QLP
 <400> 26

Ala Gln Thr Leu Gln Leu Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-TMP
 <400> 27

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PHP.B-TTP
 <400> 28

Ala Gln Thr Leu Thr Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 29
 <211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.A

<400> 29

Ala Gln Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp Ala Gln

1 5 10

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 30

Ala Gln Met Asn Ala Thr Lys Asn Val Ala Gln

1 5 10

<210> 31

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 31

Ala Gln Val Ser Gly Gly His His Ser Ala Gln

1 5 10

<210> 32

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 32

Ala Gln Thr Leu Pro Gln Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B-ATP

<400> 33

Ala Gln Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 34

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 34

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 35

Ala Gln Thr Leu Thr Met Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 36

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 36

Ala Gln Thr Leu Ser Lys Pro Phe Lys Ala Gln

1 5 10

<210> 37

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-PHP.S

<400> 37

Gln Ala Val Arg Thr Ser Leu

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.A

<400> 38

Tyr Thr Leu Ser Gln Gly Trp

1 5

<210> 39

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G2A3

<400> 39

Leu Ala Lys Glu Arg Leu Ser

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B

<400> 40

Thr Leu Ala Val Pro Phe Lys

1 5

<210> 41

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> PHP.B2

<400> 41

Ser Val Ser Lys Pro Phe Leu

1 5

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><

223> PHP.B3

<400> 42

Phe Thr Leu Thr Thr Pro Lys

1 5

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G2B4

<400> 43

Met Asn Ser Thr Lys Asn Val

1 5

<210> 44

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> G2B5

<400> 44

Val Ser Gly Gly His His Ser

1 5

<210> 45

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV9 Capsid Sequence

<400> 45

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
 Arg 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> 46

<211> 743

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-PHP.N VP1 Capsid Sequence

<400> 46

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

Arg 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 Asp Gly Thr Leu Ala Val
 580 585 590
 Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile
 595 600 605

 Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro
 610 615 620
 Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro
 625 630 635 640
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
 645 650 655
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp
 660 665 670
 Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val

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

740

<210> 47

<211> 743

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV-PHP.S VP1 Capsid Sequence

<400> 47

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

 625 630 635 640
 Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile
 645 650 655
 Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp
 660 665 670
 Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val
 675 680 685
 Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro

690 695 700

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe

705 710 715 720

Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr

725 730 735

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

740

<210> 48

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 48

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

1 5 10

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> VARIANT

<222> (2)..(4)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 49

Ser Xaa Xaa Xaa Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln

1 5 10

<210> 50

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> VARIANT

<222> (4)..(6)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 50

Ser Ala Gln Xaa Xaa Xaa Val Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln

1 5 10

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> VARIANT

<222> (6)..(8)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 51

Ser Ala Gln Thr Leu Xaa Xaa Xaa Phe Lys Ala Gln Ala Gln

1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> VARIANT

<222> (8)..(10)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 52

Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Xaa Xaa Xaa Ala Gln Ala Gln

1 5 10

<210> 53

<211> 14

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<220><221> VARIANT

<222> (10)..(12)

<223> Xaa = any amino acid

<400> 53

Ser Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe Xaa Xaa Xaa Ala Gln

1 5 10

<210> 54

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 54

gatgggactt tggcgggtgcc ttttaaggca cag 33

<210> 55

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 55

gatgggacgt tggcgggtgcc ttttaaggca cag 33

<210> 56

<211> 21

<

212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 56

caggcgggta ggacgtcttt g 21

<210> 57

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 57

caggtcttca cggactcaga ctatcag 27

<210> 58

<211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 58
 caagtaaaac ctctacaaat gtggtaaaat cg 32

<210> 59
 <211> 36
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 59
 actcatcgac caatacttgt actatctctc tagaac 36

<210> 60
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 60
 ggaagtattc cttggttttg aaccca 26

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 61
 ggtcgcggtt cttgtttgtg gat 23

<210> 62
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence

<400> 62

cgaccttgaa gcgcatgaac tcct 24

<210> 63

<211> 83

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<220><221> misc_feature

<222> (42)..(43)

<223> n = a, c, t or g

<400> 63

gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcctgtgc mnnnnnnnnnnm nnnnnnnnnm 60

nttgggcact ctggtggttt gtc 83

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 65

Thr Asn His Gln Ser Ala Gln

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 66

Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp

1 5

<210> 67

<211> 9

<212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <400> 67

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys

1 5

<210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <220><221> VARIANT
 <222> (10)..(11)

<223> Xaa = any amino acid
 <400> 68

Asp Gly Thr Leu Ala Thr Pro Phe Lys Xaa Xaa

1 5 10

<210> 69
 <211> 64
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (36)..(37)

<223> n = a, c, t or g

<400> 69
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct gcgcmnnmnn mnnaaaaggc accgccaaag 60
 tttg 64

<210

> 70

<211> 70
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic nucleotide sequence

<220><221> misc_feature
 <222> (42)..(43)
 <223> n = a, c, t or g
 <400> 70
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct ggcctgtgc mnnmnmnnc accgcaaag 60
 tttgggcact 70
 <210> 71
 <211> 77
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <220><221> misc_feature

 <222> (48)..(49)
 <223> n = a, c, t or g
 <400> 71
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct ggcctgtgc cttaaamnm nmnncaaag 60
 tttgggcact ctggtgg 77
 <210> 72
 <211> 83
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic nucleotide sequence
 <220><221> misc_feature
 <222> (54)..(55)
 <223> n = a, c, t or g
 <400> 72
 gtattccttg gttttgaacc caaccggtct ggcctgtgc cttaaaggc acmnnmnmn 60

 nttgggcact ctggtggttt gtg 83
 <210> 73
 <211> 90
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Reverse primer sequence used to generate the AAV-PHP.B-XXX


```

libraries
<220><221>    misc_feature
<222>    (57)..(58)
<223>    n = a, c, t or g
<400>    73
ttccttggtt ttgaacccaa cgggtctgcg cctgtgcctt aaaaggcacc gccaaamnnmn    60
nmnnactctg gtggtttgtg gccacttgtc    90
<210>    74

<211>    21
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    Synthetic nucleotide sequence
<400>    74
actttggcgg tgccttttaa g    21
<210>    75
<211>    21
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    Synthetic nucleotide sequence
<400>    75
agtgtgagta agcctttttt g    21
<210>    76
<211>    21
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    Synthetic nucleotide sequence

<400>    76
tttacgttga cgacgcctaa g    21
<210>    77
<211>    21
<212>    DNA
<213>    Artificial Sequence
<220><223>    Synthetic nucleotide sequence

```

<400> 77
tatactttgt cgcagggttg g 21

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide sequence
<400> 78
caggcgggta ggacgtcttt g 21

<210> 79
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic nucleotide sequence
<400> 79
cttgccaagg agcggctttc g 21

<210> 80
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic amino acid sequence
<400> 80
Leu Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln
1 5
<210> 81
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 81
Val Pro Phe Lys Ala Gln
1 5
<210> 82

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <400> 82

Phe Lys Ala Gln

1
 <210> 83
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <400> 83

Ala Gln Thr Leu Ala Val

1 5
 <210> 84
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 84
 Ala Gln Thr Leu Ala Val Pro Phe

1 5
 <210> 85
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Synthetic amino acid sequence
 <400> 85

Gln Ala Val Arg

1
 <210> 86
 <211> 4
 <212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 86

Ala Val Arg Thr

1

<210> 87

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 87

Val Arg Thr Ser

1

<210> 88

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 88

Arg Thr Ser Leu

1

<210> 89

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 89

Gln Ala Val Arg Thr

1 5

<210> 90

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 90

Ala Val Arg Thr Ser

1 5

<210> 91

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 91

Val Arg Thr Ser Leu

1 5

<210> 92

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 92

Gln Ala Val Arg Thr Ser

1 5

<210> 93

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic amino acid sequence

<400> 93

Ala Val Arg Thr Ser Leu

1 5