



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0004114
(43) 공개일자 2022년01월11일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7038123
- (22) 출원일자(국제) 2020년04월24일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2021년11월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/029895
- (87) 국제공개번호 WO 2020/219933
국제공개일자 2020년10월29일
- (30) 우선권주장
62/839,548 2019년04월26일 미국(US)
62/923,924 2019년10월21일 미국(US)

- (71) 출원인
애드베룸 바이오테크놀로지스, 인코포레이티드
미국 캘리포니아 (우편번호 94063) 레드우드 시티
새기노 드라이브 800
- (72) 발명자
케라발라, 안나히타
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 새기노
드라이브 800 애드베룸 바이오테크놀로지스, 인코
포레이티드 내
케페다, 디아나
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 새기노
드라이브 800 애드베룸 바이오테크놀로지스, 인코
포레이티드 내
가스미, 메디
미국 94063 캘리포니아주 레드우드 시티 새기노
드라이브 800 애드베룸 바이오테크놀로지스, 인코
포레이티드 내
- (74) 대리인
양영준, 이상남

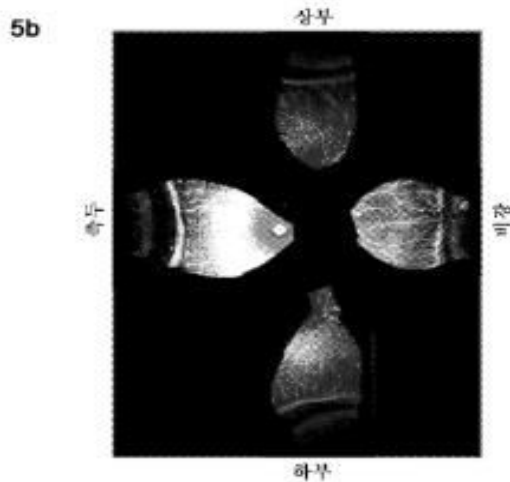
전체 청구항 수 : 총 46 항

(54) 발명의 명칭 **유리체내 전달을 위한 변이체 AAV 캡시드**

(57) 요약

변이체 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드 단백질 및 1종 이상의 변이체 AAV 캡시드 단백질을 갖는 재조합 AAV 비리온이 제공된다. 또한, 예컨대 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위한 재조합 AAV 비리온의 사용을 위한 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14145 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 비리온이며, 이는

(a) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질; 및

(b) 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열

을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.

청구항 2

제1항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 서열이 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 캡시드 서열을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 변이체 AAV5 또는 변이체 AAV2와 AAV5 하이브리드 비리온인 재조합 AAV 비리온.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 변이체 AAV2.5T 비리온인 재조합 AAV 비리온.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 세포에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.

청구항 11

제10항에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 광수용체, 망막 신경절 세포, 밀러 세포, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 및 망막 색소 상피 세포 중 1종 이상에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.

청구항 12

제10항 또는 제11항에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 색소 상피 세포에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유전자 산물이 siRNA, miRNA 또는 단백질인 재조합 AAV 비리온.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유전자 산물이 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물인 재조합 AAV 비리온.

청구항 15

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유전자 산물이 오피신인 재조합 AAV 비리온.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된 것인 재조합 AAV 비리온.

청구항 17

제16항에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체인 재조합 AAV 비리온.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR인 재조합 AAV 비리온.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, AAV2.5T와 비교하여 변경된 세포 향성을 갖는 재조합 AAV 비리온.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물.

청구항 21

(a) 숙주 세포를 rAAV 비리온이 생산되는 조건 하에 배양하는 단계이며, 여기서 숙주 세포는

(i) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(ii) rep 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;

(iii) 적어도 1개의 AAV ITR이 플랭킹된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트; 및

(iv) AAV 헬퍼 기능

을 포함하는 것인 단계; 및

(b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 비리온을 회수하는 단계

를 포함하는, rAAV 비리온을 생산하는 방법.

청구항 22

대상체에게 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 제조합 AAV 비리온 또는 제20항의 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 망막에 치료 유전자 산물을 제공하는 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 대상체가 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락막막 변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 바르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 및 색각 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 상태로 진단되었거나 그를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

청구항 24

망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제1항 내지 제19항 중 어느 한 항의 제조합 AAV 비리온 또는 제20항의 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

청구항 25

제24항에 있어서, 질환 또는 장애가 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락막막 변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 바르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 또는 색각 장애인 방법.

청구항 26

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 제조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제조합 AAV 비리온.

청구항 27

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체의 망막 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 제조합 AAV 비리온.

청구항 28

제26항 또는 제27항에 있어서, 질환 또는 장애가 연령-관련 황반 변성 (AMD), 습성-AMD, 건성-AMD, 망막 신생혈관화, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 망막병증, 증식성 당뇨병성 망막병증, 망막 정맥 폐쇄, 중심 망막 정맥 폐쇄, 분지 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증 또는 당뇨병성 망막 부종인 제조합 AAV 비리온.

청구항 29

모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 30

제29항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 31

제29항 또는 제30항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 33

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579에 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 34

제29항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 35

제29항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 캡시드 서열을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질.

청구항 36

제29항 내지 제35항 중 어느 한 항의 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산.

청구항 37

제36항의 핵산을 포함하며, 여기서 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터.

청구항 38

제37항에 있어서, rep 단백질을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 발현 벡터.

청구항 39

제37항 또는 제38항의 발현 벡터를 포함하는 세포.

청구항 40

제39항에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 세포.

청구항 41

제40항에 있어서, 치료 유전자 산물이 siRNA, miRNA 또는 단백질인 세포.

청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 치료 유전자 산물이 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물인 세포.

청구항 43

제40항 또는 제41항에 있어서, 치료제가 옴신인 세포.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된 것인 세포.

청구항 45

제44항에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체인 세포.

청구항 46

제44항 또는 제45항에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR인 세포.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호-참조
- [0002] 본 출원은 2019년 4월 26일에 출원된 미국 가출원 62/839,548 및 2019년 10월 21일에 출원된 미국 가출원 62/923,924를 우선권 주장하며, 이들 각각의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0003] ASCII 텍스트 파일의 서열 목록 제출
- [0004] 하기 ASCII 텍스트 파일의 제출 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다: 서열 목록의 컴퓨터 판독가능 형태 (CRF) (파일명: 627002001140SEQLIST.TXT, 기록 날짜: 2020년 4월 21일, 크기: 49 KB).

배경 기술

- [0005] 유전적 질환 및 장애 및 다른 질환 및 장애를 치료 및 예방하기 위한 유망한 접근법은 유전자 요법 벡터, 예컨대 비리온에 의한 치료 유전자 산물의 전달이다. 유전자 요법에 적합한 비리온의 예시적인 예는 레트로바이러스 비리온, 렌티바이러스 비리온, 아데노바이러스 비리온, 헤르페스 바이러스 비리온, 알파바이러스 비리온 및 아데노-연관 바이러스 (AAV) 비리온을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. AAV는 4.7 kb의 단일-가닥 DNA 바이러스이다. 야생형 AAV는 비병원성이고 임의의 공지된 질환과 병인학적 연관성을 갖지 않기 때문에, AAV를 기반으로 하는 재조합 비리온 (rAAV 비리온)은 탁월한 임상 안전성과 연관된다. 추가로, AAV는 눈, 근육, 폐 및 뇌를 포함한 수많은 조직에서 고도로 효율적인 유전자 전달 및 지속적인 트랜스진 발현 능력을 제공한다.
- [0006] 유전자 요법에 사용하기 위한 비리온의 설계와 관련하여 남아있는 특정 도전과제는 바이러스 세포 향성의 최적화 및 특히 눈의 유전자 요법에 관해서는 망막으로의 전달의 최적화를 포함한다. 따라서, 선택된 포유동물 세포에서 유전자를 발현시키기 위한 최적화된 비리온에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 재조합 AAV 비리온의 목적하는 세포 및 조직으로의 전달에 유리한 변형된 AAV 캡시드 단백질을 제공함으로써 이러한 필요성을 다룬다.

발명의 내용

- [0007] 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 비리온이며, 이는 (a) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별 번호(SEQ ID NO): 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질; 및 (b) 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온이 본원에 제공된다.
- [0008] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡

시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질이다.

- [0009] 일부 실시양태에서, 변형된 서열은 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 캡시드 서열을 포함한다.
- [0010] 일부 실시양태에서, rAAV 비리온은 변이체 AAV5 또는 변이체 AAV2와 AAV5 하이브리드 비리온이다. 일부 실시양태에서, rAAV 비리온은 변이체 AAV2.5T 비리온이다.
- [0011] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 세포에 형질도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 광수용체, 망막 신경절 세포, 필러 세포, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 및 망막 색소 상피 세포 중 1종 이상에 형질도입할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 색소 상피 세포에 형질도입할 수 있다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 siRNA, miRNA 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물이다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 옵신이다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 AAV ITR은 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR이다.
- [0014] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 AAV2.5T와 비교하여 변경된 세포 향성을 갖는다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온은 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온은 대상체의 망막 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 것이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 연령-관련 황반 변성 (AMD), 습성-AMD, 건성-AMD, 망막 신생혈관화, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 망막병증, 증식성 당뇨병성 망막병증, 망막 정맥 폐쇄, 중심 망막 정맥 폐쇄, 분지 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증 또는 당뇨병성 망막 부종이다.
- [0016] 또한, 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물이 본원에 제공된다.
- [0017] 또한, (a) 숙주 세포를 rAAV 비리온이 생산되는 조건 하에 배양하는 단계이며, 여기서 숙주 세포는 (i) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; (ii) rep 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; (iii) 적어도 1개의 AAV ITR이 플랭킹된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트; 및 (iv) AAV 헬퍼 기능을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 비리온을 회수하는 단계를 포함하는, rAAV 비리온을 생산하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0018] 또한, 대상체에게 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온 또는 본원에 개시된 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 망막에 치료 유전자 산물을 제공하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 대상체는 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락막 변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 바르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 및 색각 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 상태로 진단되었거나 그를 갖는

것으로 의심된다.

- [0020] 또한, 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온 또는 본원에 개시된 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락막변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 바르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 또는 색각 장애이다.
- [0022] 또한, 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질이 본원에 제공된다.
- [0023] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질이다.
- [0024] 일부 실시양태에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579에 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 캡시드 서열을 포함한다.
- [0025] 또한, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산이 본원에 제공된다.
- [0026] 또한, 본원에 개시된 핵산을 포함하며, 여기서 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 rep 단백질을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다.
- [0027] 또한, 본원에 개시된 발현 벡터를 포함하는 세포가 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 세포는 치료 유전자 산물을 코딩하는 핵산을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 siRNA, miRNA 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 옵신이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 AAV ITR은 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR이다.
- [0029] 특허 출원 및 공개를 포함한 본원에 인용된 모든 참고문헌은 그 전문이 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

- [0030] 도 1a는 망막 및 중심 샘플 펀치 위치의 개략적 표현을 보여준다. 펀치 1은 황반 (작은 원형 압입부)을 함유하고; 펀치 2는 중심와부근을 함유하고; 나머지 조직은 혈관궁을 포함한 주변 망막을 함유한다.
- 도 1b-1e는 선택 과정의 상이한 단계에서 캡시드 변이체의 상대 존재비를 보여준다. 도 1b는 원래 라이브러리 내의 상위 100개 변이체의 백분율을 보여주고; 도 1c는 제2 스크리닝 라운드로부터 중심와부근, 황반 또는 주변 망막 영역에서 확인된 상위 100개 변이체의 백분율을 보여준다. 도 1d는 중심와부근으로부터 기원하는 라운드 2 라이브러리로부터 중심와부근 및 RPE 세포에 성공적으로 형질도입한 상위 50개의 진화된 변이체의 백분율을

보여준다. 도 1e는 중심와부근으로부터 기원하는 라운드 2 라이브러리로부터의 황반 + 주변부 세포에 성공적으로 형질도입한 상위 50개의 진화된 변이체의 백분율을 보여준다.

도 2는 AAV2.5T 및 변이체 캡시드 AAV2.5T.LSV1로부터의 헤파린 칼럼 분획의 도트 블롯 결과를 보여준다. 용리액 E1 내지 E10은 0.1M (E1), 0.2M (E2), 0.3M (E3), 0.4M (E4), 0.5M (E5), 0.6M (E6), 0.7M (E7), 0.8M (E8), 0.9M (E9) 및 1.0M (E10)의 증가하는 농도의 NaCl을 갖는다.

도 3은 2 E+10 vg (즉, 2E10 vg) 또는 4 E+10 vg (즉, 4E10 vg)의 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온에 의한 감염 후 제7일 또는 제14일에 6 mm 패지 망막 체외이식편에서의 GFP 발현의 라이브 영상을 보여준다.

도 4a-4c는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 제14일 (도 4a), 제21일 (도 4b) 및 제28일 (도 4c)에 아프리카 녹색 원숭이의 망막의 OTC 자가형광 영상을 제공하며, 이는 중심와 및 혈관궁 내에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 4d-4e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 제28일에 아프리카 녹색 원숭이의 좌측 (도 4d) 및 우측 (도 4e) 망막의 하이텔베르크 스펙트랄리스 영상을 제공하며, 이는 중심와 및 혈관궁 내에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 5a-5b는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 편평-탐재된 망막의 형광 영상을 제공한다.

도 5c-5d는 좌안 (도 5c) 및 우안 (도 5d)에 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 편평-탐재된 망막의 형광 영상을 제공한다.

도 5e는 도 5c-5d에 제시된 눈에 대한 황반으로부터 모양체까지의 거리에 걸쳐 플롯팅된 GFP 강도 프로파일을 제공한다. 중심와 중심에 대한 평균 거리로부터 망막 영역 위치를 계산하였다.

도 6a-6c는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 중심와에서 모양체까지의 형광 영상을 제공한다. 도 6a는 GFP 발현을 보여준다. 도 6b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 6c는 도 6a 및 도 6b의 복합 영상이다.

도 7은 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 중심와에서 발현된 GFP의 형광 영상을 제공한다.

도 8은 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 중심와에서 발현된 GFP의 형광 영상을 제공한다.

도 9a-9d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 중심와의 형광 영상을 제공한다. 도 9a는 도 9b-9d의 복합 영상을 보여준다. 도 9b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 9c는 GFP 발현을 보여준다. 도 9d는 간상 광수용체 세포의 로돕신 항체 표지를 보여준다.

도 10a-10d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 중심와의 형광 영상을 제공한다. 도 10a는 도 10b-10d의 복합 영상을 보여준다. 도 10b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 10c는 GFP 발현을 보여준다. 도 10d는 밀러 세포의 글루타민 신테타제 항체 표지를 보여준다.

도 11은 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막에서 발현된 GFP의 형광 영상을 제공한다.

도 12a-12c는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 12a는 도 12b 및 도 12c의 복합 영상이다. 도 12b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 12c는 GFP 발현을 보여준다.

도 13a-13d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 13a는 도 13b-13d의 복합 영상을 보여준다. 도 13b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 13c는 GFP 발현을 보여준다. 도 13d는 밀러 세포의 글루타민 신테타제 항체 표지를 보여준다.

도 14a-14d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 14a는 도 14b-14d의 복합 영상을 보여준다. 도 14b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 14c는 GFP 발현을 보여준다. 도 14d는 밀러 세포의 글루타민 신테타제 항체 표지를 보여준다.

도 15a-15d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형

광 영상을 제공한다. 도 15a는 도 15b-15d의 복합 영상을 보여준다. 도 15b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 15c는 GFP 발현을 보여준다. 도 15d는 밀러 세포의 글루타민 신테타제 항체 표지를 보여준다.

도 16a-16e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 16a는 도 16b-16e의 복합 영상을 보여준다. 도 16b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 16c는 GFP 발현을 보여준다. 도 16d는 양극성 세포의 PCK-알파 항체 표지를 보여준다. 도 16e는 망막 신경절 축삭 말단 경로의 TUJ-1 항체 표지를 보여준다.

도 17a-17d는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 17a는 도 17b-17d의 복합 영상을 보여준다. 도 17b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 17c는 GFP 발현을 보여준다. 도 17d는 양극성 세포의 PCK-알파 항체 표지를 보여준다.

도 18a-18e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 18a는 도 18b-18e의 복합 영상을 보여준다. 도 18b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 18c는 GFP 발현을 보여준다. 도 18d는 원추 광수용체 세포의 원추 아레스틴 항체 표지를 보여준다. 도 18e는 간상 광수용체 세포의 로돕신 항체 표지를 보여준다.

도 19a-19e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 19a는 도 19b-19e의 복합 영상을 보여준다. 도 19b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 19c는 GFP 발현을 보여준다. 도 19d는 원추 광수용체 세포의 원추 아레스틴 항체 표지를 보여준다. 도 19e는 간상 광수용체 세포의 로돕신 항체 표지를 보여준다.

도 20a-20e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막의 형광 영상을 제공한다. 도 20a는 도 20b-20e의 복합 영상을 보여준다. 도 20b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 20c는 GFP 발현을 보여준다. 도 20d는 원추 광수용체 세포의 원추 아레스틴 항체 표지를 보여준다. 도 20e는 간상 광수용체 세포의 로돕신 항체 표지를 보여준다.

도 21a-21e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막 색소상피 (RPE)의 형광 영상을 제공한다. 도 21a는 도 21b-21e의 복합 영상을 보여준다. 도 21b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 21c는 항체 표지가 부재하는 천연 GFP 발현을 보여준다. 도 21d는 원추 광수용체 세포의 RPE 65 항체 표지를 보여준다. 도 21e는 647 nm에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 22a-22e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막 색소상피 (RPE)의 형광 영상을 제공한다. 도 22a는 도 22b-22e의 복합 영상을 보여준다. 도 22b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 22c는 항체 표지가 부재하는 천연 GFP 발현을 보여준다. 도 22d는 원추 광수용체 세포의 RPE 65 항체 표지를 보여준다. 도 22e는 647 nm에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 23a-23e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막 색소상피 (RPE)의 평면 형광 영상을 제공한다. 도 23a는 도 23b-23e의 복합 영상을 보여준다. 도 23b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 23c는 항체 표지가 부재하는 천연 GFP 발현을 보여준다. 도 23d는 원추 광수용체 세포의 RPE 65 항체 표지를 보여준다. 도 23e는 647 nm에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 24a-24e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막 색소상피 (RPE)의 평면 형광 영상을 제공한다. 도 24a는 도 24b-24e의 복합 영상을 보여준다. 도 24b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 24c는 항체 표지가 부재하는 천연 GFP 발현을 보여준다. 도 24d는 원추 광수용체 세포의 RPE 65 항체 표지를 보여준다. 도 24e는 647 nm에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 25a-25e는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈의 망막 색소상피 (RPE)의 평면 형광 영상을 제공한다. 도 25a는 도 25b-25e의 복합 영상을 보여준다. 도 25b는 핵의 DAPI 염색을 보여준다. 도 25c는 항체 표지가 부재하는 천연 GFP 발현을 보여준다. 도 25d는 원추 광수용체 세포의 RPE 65 항체 표지를 보여준다. 도 25e는 647 nm에서의 GFP 발현을 보여준다.

도 26a-26c는 GFP를 코딩하는 AAV2.5T.LSV1 비리온의 유리체내 투여 후 아프리카 녹색 원숭이의 눈 내의 망막 내의 다양한 영역에서의 GFP 양성 양극성 세포 (도 26a), 원추 세포 (도 26b) 및 RPE 세포 (도 26c)의 평균 퍼센트를 제공한다.

도 27a-27b는 AAV2.5T.LSV1 및 AAV2에 대한 중화 항체 (nAB) 프로파일을 제공한다. 폴링된 인간 IgG 항체 (감마가드 IVIG)를 AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP 또는 AAV2-CMV-GFP와 혼합하였다. 293T 세포에 혼합물을 형질도입하고, 3

일 동안 인큐베이션한 후, GFP 발현을 측정하였다. 도 27a는 AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP에 대한 IVIG의 중화 항체 프로파일을 보여준다 (각각의 회석물에 대해 N=3). 도 27b는 AAV2-CMV-GFP에 대한 IVIG의 중화 항체 프로파일을 보여준다 (각각의 회석물에 대해 N = 2 또는 3).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0031] 본 개시내용은 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 1종 이상의 변이체 AAV 캡시드 단백질을 갖는 재조합 아테노-연관 바이러스 (AAV) 비리온을 제공한다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 하기 특징 중 1종 이상을 나타낸다: 1) 망막 세포의 증가된 감염성; 2) 변경된 항성; 3) 헤파린 및/또는 헤파란 술페이트 프로테오글리칸 및/또는 내부 제한 막 (ILM)에 대한 증가된 결합; 및 4) 본원에 개시된 변형된 캡시드 단백질 대신에 그의 천연, 야생형 및/또는 모 캡시드 단백질을 포함하는 상응하는 바이러스 벡터와 비교하여, 유리체내로 투여되는 경우에 ILM을 가로질러 치료 유전자 산물을 감염시키고/거나 전달하는 증가된 능력. 또한, 예를 들어 질환 또는 장애의 치료 또는 예방을 위해 개체 내 세포, 예를 들어 망막 세포에서 치료 유전자 산물의 발현을 촉진하기 위한 본원에 개시된 임의의 조성물의 사용을 위한 제약 조성물 및 방법이 제공된다.
- [0032] I. 정의
- [0033] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.
- [0034] 본원에 사용된 용어는 단지 특정한 예를 기재하려는 목적을 위한 것이며, 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본원에 사용된 단수 형태는 문맥이 달리 명확하게 나타내지 않는 한 복수 형태를 또한 포함하는 것으로 의도된다. 추가로, 용어 "포함한", "포함한다", "갖는", "갖는다", "가진" 또는 그의 변형이 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 정도까지, 이러한 용어들은 용어 "포함하는"과 유사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다. 본원에 사용된 용어 "포함하는"은 "포함한" 또는 "함유하는"과 동의어이고, 포괄적이거나 개방적이다.
- [0035] 본원에서 "또는"에 대한 임의의 언급은 달리 언급되지 않는 한 "및/또는"을 포괄하는 것으로 의도된다.
- [0036] 본원에서 "약" 값 또는 파라미터에 대한 언급은 그 값 또는 파라미터 자체에 대한 변동을 포함 (및 기재)한다. 예를 들어, "약 X"를 언급하는 기재는 "X"의 기재를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 일부 실시양태에서, "개체" 또는 "대상체"는 포유동물이다. 포유동물은 가축 (예를 들어, 소, 양, 고양이, 개 및 말), 영장류 (예를 들어, 인간 및 비-인간 영장류, 예컨대 원숭이), 토끼 및 설치류 (예를 들어, 마우스 및 래트)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 특정 실시양태에서, 개체 또는 대상체는 인간이다.
- [0038] 본원에 사용된 용어 "치료하다", "치료하는", "치료", "호전시키다" 또는 "호전시키는" 및 다른 문법적 등가물은 안구 질환 또는 장애 또는 안구 질환 또는 장애의 증상을 완화, 약화 또는 호전시키거나, 안구 질환 또는 장애의 추가의 증상을 예방하거나, 증상의 기저 대사 원인을 호전시키거나, 안구 질환 또는 장애를 억제하거나, 예를 들어 안구 질환 또는 장애의 발생을 정지시키거나, 안구 질환 또는 장애를 경감시키거나, 안구 질환 또는 장애의 퇴행을 유발하거나, 또는 안구 질환 또는 장애의 증상을 중지시키는 것을 지칭한다. 상기 용어는 치료 이익을 달성하는 것을 추가로 포함한다. 용어 "치료 이익"은 치료될 안구 질환 또는 장애의 근절 또는 호전을 지칭한다. 또한, 치료 이익은, 일부 실시양태에서 환자, 대상체 또는 개체가 여전히 안구 질환 또는 장애를 앓고 있음에도 불구하고 환자, 대상체 또는 개체에서 개선이 관찰되도록 하는 안구 질환 또는 장애와 연관된 생리학적 증상 중 1종 이상의 근절 또는 호전으로 달성된다.
- [0039] 일부 실시양태에서, 본 발명의 방법은 예방적 이익을 제공하며; 예를 들어, 제약 조성물은 안구 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있는 환자, 대상체 또는 개체에게 또는 질환 또는 장애의 진단이 이루어지지 않은 경우에도 안구 질환 또는 장애의 생리학적 증상 중 1종 이상을 보고하는 환자, 대상체 또는 개체에게 투여된다.
- [0040] 본원에 사용된 용어 "투여하다", "투여하는", "투여" 등은 치료제 또는 제약 조성물을 목적하는 생물학적 작용 부위에 전달할 수 있게 하는데 사용되는 방법을 지칭할 수 있다. 이들 방법은 눈에 대한 유리체내 또는 망막하 주사를 포함한다.
- [0041] 본원에 사용된 용어 "유효량", "치료 유효량" 또는 "제약 유효량"은 치료될 안구 질환 또는 장애의 증상 중 1종 이상을 어느 정도 경감시킬, 투여될 적어도 1종의 제약 조성물 또는 화합물의 충분한 양을 지칭할 수 있다. 제약 조성물의 "유효량", "치료 유효량" 또는 "제약 유효량"은 그를 필요로 하는 대상체에게 단위 용량 (본원의

다른 곳에 추가로 상세하게 기재된 바와 같음)으로서 투여될 수 있다.

- [0042] 본원에 사용된 용어 "제약상 허용되는"은 본원에 개시된 화합물의 생물학적 활성 또는 특성을 제거하지 않고 비교적 비독성인 물질, 예컨대 담체 또는 희석제를 지칭할 수 있다 (즉, 물질이 개체에게 투여되는 경우에, 이는 바람직하지 않은 생물학적 효과를 유발하지도 않고, 이것이 함유되어 있는 조성물의 임의의 성분과 유해한 방식으로 상호작용하지도 않음).
- [0043] 본원에 사용된 용어 "제약 조성물"은 적어도 1종의 제약상 허용되는 화학적 성분, 예컨대 담체, 안정화제, 희석제, 분산제, 현탁화제, 증점제, 부형제 등 (이에 제한되지는 않음)과 임의로 혼합된 생물학적 활성 화합물을 지칭할 수 있다.
- [0044] 본원에 사용된 "AAV 벡터" 또는 "rAAV 벡터"는 표적 세포 또는 표적 조직 내로의 형질도입을 위한, AAV 기원이 아닌 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, AAV에 대해 이중인 폴리뉴클레오티드, 예컨대 치료 트랜스진, 예를 들어 아플리베르셉트를 코딩하는 핵산 서열)을 포함하는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 또는 재조합 AAV (rAAV) 벡터를 지칭한다. 일반적으로, 이중 폴리뉴클레오티드에는 적어도 1개, 일반적으로 2개의 AAV 역전된 말단 반복 서열 (ITR)이 플랭킹된다. 용어 rAAV 벡터는 rAAV 벡터 입자 및 rAAV 벡터 플라스미드 둘 다를 포괄한다. rAAV 벡터는 단일-가닥 (ssAAV) 또는 자기-상보적 (scAAV)일 수 있다.
- [0045] "AAV 바이러스" 또는 "AAV 바이러스 입자" 또는 "rAAV 벡터 입자" 또는 "rAAV 입자" 또는 "재조합 AAV 비리온"은 적어도 1종의 AAV 캡시드 단백질 및 폴리뉴클레오티드 rAAV 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 지칭한다. 입자가 이중 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 야생형 AAV 계통 이외의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 표적 세포 또는 표적 조직에 전달될 트랜스진)를 포함하는 경우에, 이는 전형적으로 "rAAV 벡터 입자" 또는 "rAAV 벡터"로 지칭된다.
- [0046] 본원에 사용된 용어 "패키징"은 rAAV 입자의 조립 및 캡시드화를 유발할 수 있는 일련의 세포내 사건을 지칭할 수 있다.
- [0047] AAV "rep" 및 "cap" 유전자는 아데노-연관 바이러스의 복제 및 캡시드화 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 지칭한다. AAV rep 및 cap는 본원에서 AAV "패키징 유전자"로 지칭된다.
- [0048] 용어 "폴리펩티드" 또는 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하는 것으로 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 변형된 아미노산을 포함할 수 있으며, 비-아미노산이 개재될 수 있다. 상기 용어는 또한 자연적으로 또는 개입에 의해; 예를 들어, 디설피드 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화 또는 임의의 다른 조작 또는 변형, 예컨대 표지 성분 또는 독소와의 접합에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포괄한다. 또한, 예를 들어 아미노산의 1종 이상의 유사체 (예를 들어, 비천연 아미노산 등 포함), 뿐만 아니라 관련 기술분야에 공지된 다른 변형을 함유하는 폴리펩티드가 상기 정의 내에 포함된다.
- [0049] 용어 "폴리뉴클레오티드"는 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드 또는 그의 유사체를 포함한 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화 뉴클레오티드 및 뉴클레오티드 유사체를 포함할 수 있고, 비-뉴클레오티드 성분이 개재될 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오티드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 폴리뉴클레오티드는 이중- 및 단일-가닥 분자를 지칭할 수 있다.
- [0050] 본원에 사용된 "재조합"은 (1) 그의 자연 발생 환경으로부터 제거되었거나, (2) 유전자가 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드의 모두 또는 부분과 회합되지 않거나, (3) 자연에서는 연결되지 않는 폴리뉴클레오티드에 작동적으로 연결되거나, 또는 (4) 자연에서는 발생하지 않는 생체분자, 예를 들어 유전자 또는 단백질을 지칭할 수 있다. 용어 "재조합"은 클로닝된 DNA 단리물, 화학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 폴리뉴클레오티드 유사체, 뿐만 아니라 이러한 핵산에 의해 코딩된 단백질 및/또는 mRNA와 관련하여 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 미생물에 의해 합성된 단백질은, 예를 들어 세포에 존재하는 재조합 유전자로부터 합성된 mRNA로부터 합성되는 경우에 재조합이다.
- [0051] 용어 "항-VEGF 유전자 산물"은 내인성 VEGF 및/또는 내인성 VEGF 수용체 (VEGFR)의 활성 또는 기능 또는 생체내 VEGF-VEGFR 상호작용 또는 경로를 감소, 방해, 파괴, 차단 및/또는 억제할 수 있는 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 융합 단백질, 다량체 단백질, 항체, 인간 모노클로날 항체, 항체 단편, 압타머, 키나제 억제제, 수용체 또는 수용체 단편 또는 핵산 분자를 포함한 임의의 치료제를 포함한다. 항-VEGF 유전자 산물은 세포, 조직 또는 대상체 내로 생체내 전달되는 경우에 새로운 혈관 성장 또는 형성 및/또는 부종 또는 종창을 감소시킬 수 있

는 공지된 치료 유전자 산물, 예를 들어 라니비주맙, 브롤루시주맙 또는 베바시주맙 중 어느 하나일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 유전자 산물은 자연 발생, 비-자연 발생 또는 합성일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 유전자 산물은 항-VEGF 활성을 부여하기 위해 후속적으로 변형 또는 돌연변이된 자연 발생 분자로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 유전자 산물은 융합 또는 키메라 단백질이다. 이러한 단백질에서, 기능적 도메인 또는 폴리펩티드는 모이머티 또는 폴리펩티드에 인공적으로 융합되어 생체내에서 VEGF를 격리하거나 VEGFR 디코이로서 기능할 수 있는 융합 또는 키메라 단백질을 제조한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 유전자 산물은 내인성 VEGFR이 그의 리간드와 상호작용하는 것을 차단하는 융합 또는 키메라 단백질이다.

[0052] 본원에 사용된 "VEGF"는 달리 요구되지 않는 한, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, 태반 성장 인자 (PGF) 또는 그의 임의의 조합 또는 임의의 기능적 단편 또는 변이체를 포함하나 이에 제한되지 않는 VEGF 또는 VEGF 패밀리를 구성원의 임의의 이소형을 지칭할 수 있다. 본원에 사용된 "VEGF 수용체" 또는 "VEGFR" 또는 "VEGF-R"은 VEGFR-1 (또는 Flt-1), VEGFR-2 (또는 Flk-1/KDR) 및 VEGFR-3 (또는 Flt-4)을 포함하나 이에 제한되지 않는 VEGF의 수용체 중 어느 하나를 지칭하는데 사용될 수 있다. VEGFR은 막 결합 또는 가용성 형태일 수 있거나 또는 수용체의 기능적 단편 또는 말단절단물일 수 있다.

[0053] 본원에 사용된 "sFlt-1 단백질"은 달리 명백하게 언급되지 않는 한, sFlt-1 단백질 또는 폴리펩티드가 VEGF 및/또는 VEGF 수용체에 결합하도록 자연 발생 인간 sFLT-1 서열에 대해 적어도 90% 또는 그 초과와 상동성을 갖는 폴리펩티드 서열 또는 그의 기능적 단편을 지칭한다. 상동성은 2개의 서열 사이의 정렬 잔기의 % 보존을 지칭한다. 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질은 기능적 단편, 삽입, 결실, 치환을 포함하는 서열, 가성단편, 가성유전자, 스플라이스 변이체 또는 인공적으로 최적화된 서열을 포함하나 이에 제한되지 않는 sFLT-1의 임의의 적합한 변이체를 포함할 수 있다.

[0054] "작동적으로 연결된" 또는 "작동가능하게 연결된" 또는 "커플링된"은 유전자 요소들의 병치이며, 여기서 요소들이 예상된 방식으로 작동하는 것을 허용하는 관계에 있는 것을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사를 개시하는 것을 돕는 경우에 프로모터는 코딩 영역에 작동적으로 연결될 수 있다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한 프로모터와 코딩 영역 사이에 개재 잔기가 존재할 수 있다.

[0055] 본원에 사용된 "발현 벡터"는 관심 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 상기 논의된 바와 같은 또는 관련 기술분야에 공지된 바와 같은 벡터, 예를 들어 플라스미드, 미니서클, 바이러스 벡터, 리포솜 등을 포괄하고, 이는 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현을 실시하는데 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적에서 유전자 산물의 발현을 용이하게 하기 위해 코딩 영역에 작동적으로 연결된 제어 요소를 포함할 수 있다. 제어 요소, 예를 들어 프로모터, 인핸서, UTR, miRNA 표적화 서열 등과 발현을 위해 작동가능하게 연결된 유전자 또는 유전자들의 조합은 때때로 "발현 카세트"로 지칭된다. 많은 이러한 제어 요소는 관련 기술분야에 공지되어 있고 이용가능하거나 또는 관련 기술분야에서 이용가능한 성분으로부터 용이하게 구축될 수 있다.

[0056] "유전자 산물"은 특정한 유전자의 발현으로부터 생성된 분자이다. 유전자 산물은, 예를 들어 폴리펩티드, 압타머, 간섭 RNA, mRNA 등을 포함한다. 특정한 실시양태에서, "유전자 산물"은 폴리펩티드, 펩티드, 단백질 또는 간섭 RNA, 예컨대 짧은 간섭 RNA (siRNA), miRNA 또는 소형 헤어핀 RNA (shRNA)이다. 특정한 실시양태에서, 유전자 산물은 치료 유전자 산물, 예를 들어 치료 단백질이다.

[0057] 용어 "이종"은 개체가 비교될 나머지 개체와 유전자형적으로 구별되는 것을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 상이한 종으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 유전 공학 기술에 의해 도입된 폴리뉴클레오티드는 이종 폴리뉴클레오티드일 수 있다. 천연 코딩 서열로부터 제거되고 자연적으로 연결된 것으로 발견되지 않는 코딩 서열에 작동적으로 연결된 프로모터는 이종 프로모터일 수 있다.

[0058] 본원에 기재된 방법, 조성물 및 키트는, 달리 나타내지 않는 한, 관련 기술분야의 통상의 기술자의 기술 내에 있는 분자 생물학 (재조합 기술 포함), 세포 생물학, 생화학, 면역화학 및 안과 기술의 통상적인 기술 및 기재를 사용할 수 있다. 이러한 통상적인 기술은 대상체에서의 망막 또는 시각의 관찰 및 분석 방법, 재조합 바이러스의 클로닝 및 증식, 제약 조성물의 제제화, 및 생화학적 정제 및 면역화학을 포함한다. 적합한 기술의 구체적인 예시는 본원의 실시예를 참조하여 얻을 수 있다. 그러나, 물론 등가의 통상적인 절차가 사용될 수도 있다. 이러한 통상적인 기술 및 기제는 표준 실험실 매뉴얼, 예컨대 문헌 [Green, et al., Eds., Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (Vols. I-IV) (1999); Weiner, et al., Eds., Genetic Variation: A Laboratory Manual (2007); Dieffenbach, Dveksler, Eds., PCR Primer: A Laboratory Manual (2003); Bowtell and Sambrook, DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual (2003); Mount, Bioinformatics: Sequence and

Genome Analysis (2004); Sambrook and Russell, Condensed Protocols from Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2006); 및 Sambrook and Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2002) (모두 Cold Spring Harbor Laboratory Press로부터); Stryer, L., Biochemistry (4th Ed.) W.H. Freeman, N.Y. (1995); Gait, "Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach" IRL Press, London (1984); Nelson and Cox, Lehninger, Principles of Biochemistry, 3rd Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2000); 및 Berg et al., Biochemistry, 5th Ed., W.H. Freeman Pub., New York (2002)]에서 찾아볼 수 있으며, 이들 모두는 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0059] 본원에 사용된 "변이체 AAV 캡시드 단백질"은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 적어도 1개의 아미노산 차이 (예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)를 포함하며, 자연 발생 AAV 캡시드 단백질에 존재하는 아미노산 서열에 상응하지 않는 AAV 캡시드 단백질을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 결함과 비교하여 해파린 및/또는 해파린 술페이트 프로테오글리칸에 대한 증가된 결함을 부여한다. 특정 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 다음을 부여한다: a) 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성; b) 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온의 향성과 비교하여 변경된 세포 향성; 및/또는 c) 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온과 비교하여 ILM에 결합하고/거나 그를 가로지르는 증가된 능력.

[0060] 본원에 사용된 "변형된 서열"은 모 AAV 또는 모 AAV 캡시드 단백질의 상응하는 서열과 비교하여 1개 이상의 치환, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 서열을 지칭한다.

[0061] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 AAV (예를 들어, 야생형 AAV)가 포유동물 세포에 의해 복제 및 패키징되도록 하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예컨대 백시니아를 포함한, AAV에 대한 다양한 이러한 헬퍼 바이러스가 관련 기술분야에 공지되어 있다. 아데노바이러스는 다수의 상이한 하위군을 포괄하지만, 하위군 C의 아데노바이러스 유형 5가 가장 통상적으로 사용된다. 인간, 비-인간 포유동물 및 조류 기원의 수많은 아데노바이러스가 공지되어 있고, 기탁기관, 예컨대 ATCC로부터 입수가 가능하다. 헤르페스 패밀리의 바이러스는, 예를 들어 단순 포진 바이러스 (HSV) 및 엡스타인-바르 바이러스 (EBV), 뿐만 아니라 시토크갈로바이러스 (CMV) 및 가성광견병 바이러스 (PRV)를 포함하며; 이들은 또한 기탁기관, 예컨대 ATCC로부터 입수가 가능하다.

[0062] "헬퍼 기능(들)"은 AAV 복제 및 패키징을 (본원에 기재된 복제 및 패키징을 위한 다른 요건과 함께) 가능하게 하는 헬퍼 바이러스 게놈에 코딩된 기능(들)을 지칭한다. 본원에 기재된 바와 같이, "헬퍼 기능"은 헬퍼 바이러스를 제공하거나 또는 예를 들어 필수적인 기능(들)을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 생산자 세포에 트랜스로 제공하는 것을 포함한 다수의 방식으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 1종 이상의 아데노바이러스 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 플라스미드 또는 다른 발현 벡터를 rAAV 벡터와 함께 생산자 세포 내로 형질감염시킨다.

[0063] "감염성" 비리온 또는 바이러스 입자는 능숙하게 조립된 바이러스 캡시드를 포함하고 바이러스 종이 향성을 나타내는 세포 내로 폴리뉴클레오티드 성분을 전달할 수 있는 것이다. 상기 용어는 반드시 비리온의 임의의 복제 능력을 암시하는 것은 아니다. 감염성 비리온을 계수하기 위한 검정은 본 개시내용의 다른 곳 및 관련 기술분야에 기재되어 있다. 바이러스 감염성은 총 비리온에 대한 감염성 비리온의 비로 표현될 수 있다. 총 비리온에 대한 감염성 비리온의 비를 결정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Grainger et al. (2005) Mol. Ther. 11:S337 (TCID50 감염 역가 검정을 기재함); 및 Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6:973]을 참조한다.

[0064] II. 변이체 AAV 캡시드 단백질

[0065] 변이체 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드 단백질이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질은 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 $X_1X_2HKFKSGDX_3$ (서열식별번호: 2)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하고, 여기서 X_{1-3} 은 독립적으로 임의의 아미노산일 수 있다. 일부

실시양태에서, 각각의 X_{1-3} 은 독립적으로 A, L, G, S 및 T로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 각각의 X_{1-3} 은 독립적으로 A, L, G, S 및 T로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X_1 은 L이다. 일부 실시양태에서, X_2 는 A이다. 일부 실시양태에서, X_3 은 A이다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3), 서열식별번호: 3과 적어도 80% 또는 적어도 90% 상동성을 갖는 서열; 서열식별번호: 3과 적어도 80% 또는 적어도 90% 서열 동일성을 갖는 서열; 또는 서열식별번호: 3 내에 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상 또는 9개 이상의 연속 아미노산을 갖는 서열을 포함하며, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응한다. 일부 실시양태에서, 변형된 서열은 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함한다.

[0066] AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 아미노산 넘버링을 사용하여 캡시드 단백질의 아미노산 변형 (특정 아미노산 치환 및 삽입 포함)이 본원에서 언급되지만, 이들 아미노산 변형 중 임의의 것은 또한 다른 혈청형의 AAV의 캡시드 단백질에, 예를 들어 AAV5 VP1의 것에 상응하는 위치에 도입될 수 있는 것으로 이해된다. AAV 단백질 서열은 유의한 상동성 및 유사한 아미노산 넘버링을 공유하고, 통상의 기술자는 AAV5 VP1에 대해 본원에 구체적으로 기재된 것에 상응하는 다른 AAV 혈청형에서의 아미노산 잔기를 용이하게 결정할 수 있다.

[0067] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 야생형 AAV 캡시드 단백질, 예를 들어 AAV 유형 1 (AAV1), AAV 유형 2 (AAV2), AAV 유형 3 (AAV3), AAV 유형 4 (AAV4), AAV 유형 5 (AAV5), AAV 유형 6 (AAV6), AAV 유형 7 (AAV7), AAV 유형 8 (AAV8), 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 VP1 캡시드 단백질이다.

[0068] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 변이체 AAV 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 VP1 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 AAV5 VP1 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 AAV5 VP1 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 하이브리드 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2 캡시드 단백질과 AAV5 캡시드 단백질의 하이브리드이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T 캡시드 단백질에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV 2.5T 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T 캡시드 단백질에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV 2.5T 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 (서열식별번호: 5)에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 (서열식별번호: 5)에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체이다.

[0069] 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 서열 동일성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7을 포함한다. 일부 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 7을 포함한다.

[0070] 특정한 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은, 재조합 AAV 비리온에 존재하는 경우에, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 부여한다. 특정한 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은, 재조합 AAV 비리온에 존재하는 경우에, 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 망막 세포의 증가된 감염성을 부여한다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 광수용체 세포 (예를 들어, 간상세포; 원추세포), 망막 신경절 세포 (RGC), 망막 색소 상피 (RPE) 세포, 밀러 세포, 무축삭 세포, 양극성 세포 및 수평 세포 중 1종 이상이다. 특정한 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은, 재조합 AAV 비리온에 존재하는 경우에, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온의 향성과 비교하여 변경된 향성을 재조합 AAV 비리온에 부여한다. 특정한 실시양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은, 재조합 AAV 비리온에 존재하는 경우에, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온과 비교하여 해파린 및/또는 해파린 슬레이트에 대한 증가된 결합 및/또는 유리체내 주사 후 내부 제한 막 (ILM)에 결합하고 그를 가로지르는 증가된 능력을 부여한다.

[0071] III. 폴리뉴클레오티드 및 세포

[0072] 또한, 본원에 기재된 1종 이상의 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 본원에 제공된다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터이다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터는 프로모터 서열, 예를 들어 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 구동하는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 기재된 변형된 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 세포는 숙주 세포이다. 숙주 세포는 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 비리온을 생산하는데 사용될 수 있다. 예시적인 숙주 세포는 포유동물 세포 (예를 들어 HEK293 세포), 곤충 세포 (예를 들어 SF9 세포), 미생물 및 효모를 포함한다. 일부 실시양태에서, 세포는 AAV rep 유전자, 예컨대 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV rep 단백질 또는 그의 변이체를 코딩하는 AAV rep 유전자를 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자는 세포에서 안정하게 유지된다.

[0073] 또한, 본원에 기재된 변형된 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 또는 벡터를 포함하는 세포가 본원에 제공된다. 특정한 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 발현 벡터이고, 발현 벡터는 프로모터 서열, 예를 들어 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 구동하는 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 본원에 기재된 변이체 캡시드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 세포에서 안정하게 유지된다. 일부 실시양태에서, 세포는 AAV rep 유전자를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자는 세포에서 안정하게 유지된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 또는 벡터는 rep 단백질, 예를 들어 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV rep 단백질 또는 그의 변이체를 코딩하는 서열을 추가로 포함한다.

[0074] 일부 실시양태에서, 세포는 유전자 산물, 예를 들어 치료 유전자 산물, 예컨대 본원에 기재된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 카세트에 1개 이상의 AAV 역전된 말단 반복부 (ITR)가 플랭킹된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 카세트에 AAV ITR이 5' 및 3' 말단 상에 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 뉴클레오티드의 1개 이상의 삽입, 결실 및/또는 치환을 포함하는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR이다.

[0075] IV. 비리온 및 그의 생산 방법

[0076] 또한, 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 비리온, 예를 들어 재조합 AAV 비리온이 본원에 제공된다.

[0077] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 유전자 산물, 예를 들어 치료 유전자 산물, 예컨대 본원에 기재된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 카세트에 1개 이상의 AAV 역전된 말단 반복부 (ITR), 예컨대 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5,

AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체가 플랭킹된다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드 카세트에 AAV ITR이 5' 및 3' 말단 상에 플랭킹된다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 뉴클레오티드의 1개 이상의 삽입, 결실 및/또는 치환을 포함하는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR이다. 일부 실시양태에서, 1개 이상의 ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR이다.

[0078] 특정 실시양태에서, 유전자 산물은 대상체의 망막에서 신생혈관화, 예를 들어 맥락막 신생혈관화 (CNV)를 억제한다. 많은 세포 인자가 CNV 생성의 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이 중에는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF 수용체 (VEGFR), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 저산소증 유도성 인자 (HIF), 안지오펜이에틴 (Ang) 및 다른 시토카인, 미토겐-활성화 단백질 키나제 (MAPK)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang 및 MAPK 중 1종 이상의 억제제이다.

[0079] 특정 실시양태에서, 유전자 산물은 대상체의 망막에서 신생혈관화, 예를 들어 맥락막 신생혈관화 (CNV)를 억제한다. 많은 세포 인자가 CNV 생성의 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이 중에는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF 수용체 (VEGFR), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 저산소증 유도성 인자 (HIF), 안지오펜이에틴 (Ang) 및 다른 시토카인 및 미토겐-활성화 단백질 키나제 (MAPK)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang 및 MAPK 중 1종 이상의 억제제이다.

[0080] 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 간섭 RNA, 압타머 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 간섭 RNA, 압타머 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 siRNA, miRNA 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 유전자 기능의 부위-특이적 녹-다운을 제공하는 부위-특이적 뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 간섭 RNA이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 siRNA 또는 miRNA이다.

[0081] 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 항-VEGF 유전자 산물이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 항-VEGF 간섭 RNA이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 항-VEGF siRNA 또는 miRNA이다.

[0082] 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 압타머이다. 예시적인 관심 압타머는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 대한 압타머를 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Ng et al. (2006) Nat. Rev. Drug Discovery 5:123; 및 Lee et al. (2005) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:18902]을 참조한다. 또한, PDGF-특이적 압타머, 예를 들어 E10030이 사용하기에 적합하며; 예를 들어, 문헌 [Ni and Hui (2009) Ophthalmologica 223:401; 및 Akiyama et al. (2006) J. Cell Physiol. 207:407]을 참조한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 단백질이다. 단백질은 일반적으로 망막 세포의 기능, 예를 들어 간상 또는 원추 광수용체 세포, 망막 신경절 세포, 밀러 세포, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 또는 망막 색소성 상피 세포의 기능을 증진시키는 단백질이다. 예시적인 단백질은 신경보호 폴리펩티드 (예를 들어, GDNF, CNTF, NT4, NGF 및 NTN); 항혈관신생 폴리펩티드 (예를 들어, 가용성 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체; VEGF-결합 항체; VEGF-결합 항체 단편 (예를 들어, 단일쇄 항-VEGF 항체); 엔도스타틴; 틱스타틴; 안지오펜이에틴; 가용성 Flt 단백질 (Lai et al. (2005) Mol. Ther. 12:659); 가용성 Flt 단백질을 포함하는 Fc 융합 단백질 (예를 들어, 문헌 [Pechan et al. (2009) Gene Ther. 16:10] 참조); 색소 상피-유래 인자 (PEDF); 가용성 Tie-2 수용체 등); 메탈로프로테이나제-3의 조직 억제제 (TIMP-3); 옵신, 예를 들어 로돕신; 항아포토시스 폴리펩티드 (예를 들어, Bcl-2, Bcl-X1) 등을 포함한다. 적합한 폴리펩티드는 신경교세포 유래 신경영양 인자 (GDNF); 섬유모세포 성장 인자 2; 뉴르투린 (NTN); 섬유 신경영양 인자 (CNTF); 신경 성장 인자 (NGF); 뉴르트로핀-4 (NT4); 뇌 유래 신경영양 인자 (BDNF); 표피 성장 인자; 로돕신; 아포토시스의 X-연관 억제제; 및 소닉 헤지호그를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0084] 적합한 옵신은, 예를 들어 미국 특허 공개 번호 2007/0261127 (예를 들어, Chr2; Chop2); 미국 특허 공개 번호 2001/0086421; 미국 특허 공개 번호 2010/0015095; 및 문헌 [Diester et al. (2011) Nat. Neurosci. 14:387]에 기재된 바와 같은 광-반응성 옵신을 포함한다.

- [0085] 적합한 단백질은 또한 레티노스키신을 포함한다. 적합한 폴리펩티드는, 예를 들어 색소성 망막염 GTPase 조절제 (RGPR)-상호작용 단백질-1 (예를 들어, 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 Q96KN7, Q9EPQ2 및 Q9GLM3 참조); 페리페린-2 (Prph2) (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_000313; 및 문헌 [Travis et al. (1991) Genomics 10:733 참조]; 페리페린; 망막 색소 상피-특이적 단백질 (RPE65) (예를 들어, 진뱅크 AAC39660; 및 문헌 [Morimura et al. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:3088] 참조) 등을 포함한다.
- [0086] 적합한 단백질은 또한, 결합되거나 누락되는 경우에 맥락막결손을 유발하는 폴리펩티드인 CHM (맥락막결손 (Rab 에스콧 단백질 1)) (예를 들어, 문헌 [Donnelly et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3:1017; 및 van Bokhoven et al. (1994) Hum. Mol. Genet. 3:1041] 참조); 및 결합되거나 누락되는 경우에 레베르 선천성 흑암시 및 색소성 망막염을 유발하는 폴리펩티드인 크럼스 상동체 1 (CRB 1) (예를 들어, 문헌 [den Hollander et al. (1999) Nat. Genet. 23:217]; 및 진뱅크 수탁 번호 CAM23328 참조)을 포함한다.
- [0087] 적합한 단백질은 또한, 결합되거나 누락되는 경우에 완전색맹으로 이어지는 단백질을 포함하며, 여기서 이러한 폴리펩티드는, 예를 들어 원추 광수용체 cGMP-게이팅 채널 서브유닛 알파 (CNGA3) (예를 들어, 진뱅크 수탁 번호 NP_001289; 및 문헌 [Booij et al. (2011) Ophthalmology 118:160-167] 참조); 원추 광수용체 cGMP-게이팅 양이온 채널 베타-서브유닛 (CNGB3) (예를 들어, 문헌 [Kohl et al.(2005) Eur J Hum Genet. 13(3):302] 참조); 구아닌 뉴클레오티드 결합 단백질 (G 단백질); 알파 형질도입 활성 폴리펩티드 2 (GNAT2) (ACHM4); 및 ACHM5; 및 결합되거나 결여되는 경우에 다양한 형태의 색맹으로 이어지는 폴리펩티드 (예를 들어, L-옵신, M-옵신 및 S-옵신)를 포함한다. 문헌 [Mancuso et al. (2009) Nature 461(7265):784-787]을 참조한다.
- [0088] 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 항-VEGF 단백질이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 단백질은 sFlt-1 단백질 또는 그의 단편 또는 항-VEGF 항체 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 단백질은 항-VEGF 항체 또는 그의 단편, 예컨대 아플리베르셉트, 라니비주맙 및 베바시주맙 또는 그의 단편이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 단백질은 sFlt-1 단백질이다.
- [0089] VEGF 수용체 FLT-1의 가용성 말단절단 형태인 sFLT-1은 VEGF의 유일한 공지된 내인성 특이적 억제제이다. 사실상, 이는 대안적 mRNA 스플라이싱에 의해 생성되고, 막-근위 이류노글로블린-유사 도메인, 막횡단 관통 영역 및 세포내 티로신-키나제 도메인이 결합된다. 구조적으로, FLT-1 및 sFLT-1 단백질은 둘 다 다수의 기능적 도메인을 포함할 수 있다. 일부 변이체에서, FLT 및 sFLT 단백질은 통상적으로 6개의 상호연결된 도메인; 단백질의 이량체화에 수반되는 3개의 도메인 및 리간드, 예컨대 VEGF의 결합에 수반되는 3개의 도메인을 공유한다. sFLT-1은 세포 막에 제한되지 않는다. 미결합 sFLT-1은 세포외 공간 또는 용액에서 자유롭게 확산할 수 있다.
- [0090] sFLT-1과 VEGF 수용체 사이의 상호작용은 특이적이고, 100배 과량의 비표지된 VEGF와 경쟁할 수 있다. 일부 경우에, sFLT-1의 혈관신생억제 활성은 다음 2가지 메커니즘에 의한 VEGF의 억제로부터 유발될 수 있다: i) 그가 고친화도로 결합하는 VEGF의 격리 및 ii) VEGF 수용체 FLT-1 및 FLK-1/KDR의 막-관통 이소형과 불활성 이중이량체의 형성. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, 시험관내 결합 검정은 sFLT-1이 VEGF에 고친화도로 결합하고, 또한 인간 제대 정맥 내피 세포의 VEGF 구동된 증식을 억제할 수 있음을 나타냈다. 암에 대한 동물 모델에서, sFLT-1은 종양 성장을 억제한다. 일부 경우에, sFLT-1은 아화학량론적 또는 우성 음성 방식으로 기능할 수 있으며, 이는 세포외 공간 내의 과량의 VEGF가 VEGF 수용체에 결합하고 후속적으로 이를 활성화시키는 것이 방지될 수 있기 때문이다. sFLT-1의 이들 특성은 문헌 [Kendall and Thomas, 1993; Proc Natl Acad Sci. 90: 10705-10709]에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다. sFLT-1의 기능적 단편이 전장 단백질 대신에 사용될 수 있다. 보다 구체적으로, VEGF 결합 도메인 (도메인 2), 또는 대안적으로 sFLT-1의 도메인 2 플러스 sFLT1, KDR 또는 또 다른 패밀리 구성원으로부터의 도메인 3은 VEGF에 결합하고 이를 불활성화시키는데 사용될 수 있다. 이러한 기능적 단편은 문헌 [Wiesmann et al., 1997; Cell, 91: 695-704]에 기재되어 있으며, 이는 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.
- [0091] 일부 실시양태에서, sFlt-1 단백질은 미국 특허 번호 5,861,484에 기재된 바와 같은 자연 발생 단백질 sFlt-1이며, US2013/0323302의 서열식별번호: 109에 의해 개시된 서열이다. 예시적인 sFlt-1 아미노산 서열은 서열식별번호: 13으로서 본원에 개시된다. 이는 또한 sFlt-1 도메인 2의 서열 또는 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0323302의 서열식별번호: 121에 제시된 것을 포함한 그의 기능적 단편, 뿐만 아니라 관련 구축물, 예컨대 미국 특허 번호 7,635,474에 개시된 VEGF-결합 융합 단백질을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 예시적인 sFlt-1 기능적 단편은 서열식별번호: 14로서 본원에 개시된다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 서열식별번호: 13 또는 서열식별번호: 14에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 상동이다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 서열식별번호: 13 또는

서열식별번호: 14와 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 항-VEGF 단백질은 또한 미국 특허 출원 공개 번호 2013/0323302에 기재된 임의의 sFLT-1 단백질, 그의 변이체 또는 단편을 포함할 수 있다.

[0092] 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 서열에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 상동이다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 서열에 대해 최대 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 상동이다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 서열과 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 서열과 최대 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는다. 일부 실시양태에서, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 입체형태에 대해 적어도 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 공간적으로 상동이다. 일부 경우에, sFLT-1 단백질은 자연 발생 인간 sFLT-1 단백질 입체형태에 대해 최대 약 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.9%, 99.99% 또는 100% 공간적으로 상동이다.

[0093] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 단백질은 항-VEGF 항체이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 단백질은 라니비주맙 (상표명 루센티스(Lucentis)® (제넨테크(Genentech), 캘리포니아주 샌프란시스코) 하에 상업적으로 입수가가능함, 라니비주맙의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에 대해 미국 특허 번호 7,060,269의 도 1 참조); 베바시주맙 (상표명 아바스틴(Avastin)® (제넨테크, 캘리포니아주 샌프란시스코) 하에 상업적으로 입수가가능함, 베바시주맙의 중쇄 및 경쇄 가변 영역 서열에 대해 미국 특허 번호 6,054,297의 도 1 참조); 아플리베르셉트 (상표명 아일리아(Eylea)® (레게네론(Regeneron), 뉴욕주 태리타운) 하에 상업적으로 입수가가능함); 또는 브롤루시주맙 (미국 특허 번호 10,035,850 참조)이다. 특정 실시양태에서, 베바시주맙은 각각 하기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGYFTFTNYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGPEPTAADFRRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPHY YGSSHWFYFDVWVGQGTL (서열식별번호: 8); 및 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGT KVEIKRTV (서열식별번호: 9). 특정 실시양태에서, 라니비주맙은 각각 하기 중쇄 및 경쇄 가변 도메인 서열을 포함한다:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGYDFTHYGMNWRQAPGKGLEWVGWINTYTGPEPTAADFRRRFTFSLDTSKSTAYLQMNLSRAEDTAVYYCAKYPYY YGTSHWFYFDVWVGQGTL (서열식별번호: 10); 및 DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDISNYLNWYQKPKGKAPKVL IYFTSSLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGT KVEIKRTV (서열식별번호: 11). 특정 실시양태에서, 아플리베르셉트는 하기 아미노산 서열을 포함한다:

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNPI TVTLKKFPLDTLIPDGKRI IWDSRKGFI ISNATYKEIGL LTCEATVNGHLYKTYLTHRQNTI IDVVLSPSHGIELSVGKLVNCTARTELNVGIDFNWEYPSKQHKHKL VNRDLKTQSGSEMKKFLSTLTIDGVTRS DQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKDKHTHTCPPAPELLGGPSVFLFPKPKDLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCVSMHEALHNHYTQKLSLSPGK (서열식별번호: 12). 특정 실시양태에서, 아플리베르셉트는 하기 아미노산 서열을 포함한다: EIVMTQSPSTLSASVGDRTITCQASEI IHSWLAWYQKPKGKAPKLL IYLASTLASGVPVSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDFATYYCQNVYLASTNGANFG QGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRRLSCTASGFSLTDYYMTWVRQAPGKGLEWVGFDIDDDPPYATWAKGRFTISRDN SKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWVGQGLTVTVSS (서열식별번호: 15).

[0094] 이들 서열은 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이해되는 표준 기술인 유전자 코드를 사용하여 이러한 서열을 코딩하는 DNA로부터 발현될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 인지될 수 있는 바와 같이, 유전자 코드의 축중성으로 인해, 항-VEGF 단백질 서열은 다수의 상이한 DNA 서열로부터 용이하게 발현될 수 있다.

[0095] 일부 경우에, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 유전자 기능의 부위-특이적 녹-다운을 제공하는 부위-특이적 엔도뉴클레아제이며, 예를 들어 여기서 엔도뉴클레아제는 망막 질환과 연관된 대립유전자를 녹아웃시킨다. 예를 들어, 우성 대립유전자가, 야생형인 경우에 망막 구조 단백질이고/거나 정상 망막 기능을 제공하는 유전자의 결함있는 카피를 코딩하는 경우에, 부위-특이적 엔도뉴클레아제는 결함있는 대립유전자에 표적화되어 결함있는 대립유전자를 녹아웃시킬 수 있다.

[0096] 결함있는 대립유전자를 녹아웃시키는 것에 추가로, 부위-특이적 뉴클레아제는 또한 결함있는 대립유전자에 의해

코딩되는 단백질의 기능적 카피를 코딩하는 공여자 DNA와의 상동 재조합을 자극하는데 사용될 수 있다. 따라서, 예를 들어 바이러스 벡터는 결합있는 대립유전자를 녹아웃시키는 부위-특이적 엔도뉴클레아제를 전달하는데 사용될 수 있고, 결합있는 대립유전자의 기능적 카피를 전달하여 결합있는 대립유전자의 복구를 유발함으로써 기능적 망막 단백질 (예를 들어, 기능적 레티노스키신, 기능적 RPE65, 기능적 페리페린 등)의 생산을 제공하는데 둘 다에 사용될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Li et al. (2011) Nature 475:217]을 참조한다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 부위-특이적 엔도뉴클레아제를 코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열; 및 결합있는 대립유전자의 기능적 카피를 코딩하는 이중 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 여기서 기능적 카피는 기능적 망막 단백질을 코딩한다. 기능성 망막 단백질은, 예를 들어 레티노스키신, RPE65, 색소성 망막염 GTPase 조절제 (RGPR)-상호작용 단백질-1, 페리페린, 페리페린-2 등을 포함한다.

[0097] 사용하기에 적합한 부위-특이적 엔도뉴클레아제는, 예를 들어 아연 핑거 뉴클레아제 (ZFN); 및 전사 활성화제-유사 이펙터 뉴클레아제 (TALEN)를 포함하며, 여기서 이러한 부위-특이적 엔도뉴클레아제는 비-자연 발생이고, 특이적 유전자를 표적화하도록 변형된다. 이러한 부위-특이적 뉴클레아제는 게놈 내의 특이적 위치를 절단하도록 조작될 수 있고, 이어서 비-상동 말단 연결은 여러 뉴클레오티드를 삽입 또는 결실시키면서 파괴를 복구할 수 있다. 이어서, 이러한 삽입 또는 결실 (또한 "INDEL"로도 지칭됨)은 단백질을 프레임 밖으로 밀어내고, 유전자를 효과적으로 녹아웃시킨다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2011/0301073을 참조한다.

[0098] 일부 실시양태에서, 유전자 산물을 코딩하는 서열은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물을 코딩하는 서열은 구성적 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다른 실시양태에서, 관심 유전자 산물을 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 유전자 산물을 코딩하는 서열은 조직-특이적 또는 세포 유형-특이적 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 일부 경우에, 유전자 산물을 코딩하는 서열은 광수용체-특이적 조절 요소 (예를 들어, 광수용체-특이적 프로모터), 예를 들어 광수용체 세포에서 작동가능하게 연결된 유전자의 선택적 발현을 부여하는 조절 요소에 작동가능하게 연결된다. 적합한 광수용체-특이적 조절 요소는, 예를 들어 로돕신 프로모터; 로돕신 키나제 프로모터 (Young et al. (2003) Ophthalmol. Vis. Sci. 44:4076); 베타 포스포디에스테라제 유전자 프로모터 (Nicoud et al. (2007) J. Gene Med. 9:1015); 색소성 망막염 유전자 프로모터 (Nicoud et al. (2007) 상기 문헌); 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 (IRBP) 유전자 인핸서 (Nicoud et al. (2007) 상기 문헌); IRBP 유전자 프로모터 (Yokoyama et al. (1992) Exp Eye Res. 55:225)를 포함한다.

[0099] 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은, 예를 들어 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 헤파린 및/또는 헤파란 술페이트 프로테오글리칸 (HSPG)에 결합할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은, 예를 들어 AAV5 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 헤파린 및/또는 헤파란 술페이트 프로테오글리칸 (HSPG)에 결합할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은, 예를 들어 AAV2.5T 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 헤파린 및/또는 헤파란 술페이트 프로테오글리칸 (HSPG)에 결합할 수 있다.

[0100] 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온과 비교하여, 예를 들어 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 내부 제한 막 (ILM)에 결합할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은, 예를 들어 AAV5 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 내부 제한 막 (ILM)에 결합할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은, 예를 들어 AAV2.5T 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배의 친화도로 내부 제한 막 (ILM)에 결합할 수 있다.

[0101] 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 ILM을 가로지를 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 갖고, ILM을 가로지를 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 AAV5 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 AAV2.5T 비리온에 의한

망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 세포에 형질도입할 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 ILM을 가로지를 수 있다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 AAV5 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 특정한 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 AAV2.5T 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 유리체내 주사에 의해 투여되는 경우에 망막 세포의 증가된 감염성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 망막 세포(들)는 광수용체 세포(예를 들어, 간상세포; 원추세포), 망막 신경절 세포(RGC), 망막 색소 상피(RPE) 세포, 뮐러 세포, 무축삭 세포, 양극성 세포 및 수평 세포 중 1종 이상이다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 뮐러 세포, 원추 세포, 간상 세포, 양극성 세포 및/또는 RPE 세포이다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 뮐러 세포이다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 원추 세포이다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 양극성 세포이다. 일부 실시양태에서, 망막 세포는 RPE 세포이다.

[0102] 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온은 유리체내 주사를 통해 전달되는 경우에 유전자 산물(예컨대 치료 유전자 산물)을 망막에 전달할 수 있으며, 예를 들어 여기서 생성된 발현은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 상응하는 재조합 AAV 비리온과 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배 더 크다. 특정한 실시양태에서, 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온은 유리체내 주사를 통해 전달되는 경우에 유전자 산물을 망막에 전달할 수 있으며, 예를 들어 여기서 생성된 발현은 AAV5 및/또는 AAV2.5T 벡터와 비교하여 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 적어도 100배 더 크다.

[0103] 형질감염, 안정한 세포주 생산 및 아데노바이러스-AAV 하이브리드, 헤르페스바이러스-AAV 하이브리드(Conway, JE et al., (1997) J. Virology 71(11):8780-8789) 및 바칼로바이러스-AAV 하이브리드를 포함하는 감염성 하이브리드 바이러스 생산 시스템을 포함한, 재조합 AAV 비리온의 생산을 위한 수많은 방법이 관련 기술분야에 공지되어 있다. rAAV 바이러스 입자의 생산을 위한 rAAV 생산 배양은 모두 1) 적합한 숙주 세포, 2) 적합한 헬퍼 바이러스 기능, 3) AAV rep 및 cap 유전자; 4) 적어도 1개의 AAV ITR 서열(예를 들어, 특대형 rAAV 벡터 계놈)이 플랭킹된 핵산(예컨대 유전자 산물을 코딩하는 서열); 및 5) rAAV 생산을 지지하는 적합한 배지 및 배지 성분을 요구한다. 일부 실시양태에서, 적합한 숙주 세포는 영장류 숙주 세포이다. 일부 실시양태에서, 적합한 숙주 세포는 인간-유래 세포주, 예컨대 HeLa, A549, 293 또는 Perc.6 세포이다.

[0104] 일부 실시양태에서, 적합한 헬퍼 기능은 야생형 또는 돌연변이체 아데노바이러스(예컨대 온도 감수성 아데노바이러스), 헤르페스 바이러스(HSV), 바칼로바이러스 또는 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 구축물에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 아데노바이러스 또는 HSV에 의해 제공된다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 바칼로바이러스에 의해 제공되고, 숙주 세포는 곤충 세포(예를 들어, 스포도프테라 프루기페르다(*Spodoptera frugiperda*)(Sf9) 세포)이다.

[0105] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 비리온은 곤충 세포에서 생산되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 비리온은 스포도프테라 프루기페르다(Sf9) 세포에서 생산되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 비리온은 인간-유래 세포주에서 생산되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 비리온은 HeLa, A549, 293 또는 Perc.6 세포에서 생산되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 비리온은 HEK-293 세포에서 생산되었다.

[0106] 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자는 임의의 AAV 혈청형으로부터의 것일 수 있다. 일반적으로, 의무적이지는 않지만, rep 유전자에 의해 코딩되는 rep 단백질이 rAAV 계놈을 복제 및 패키징하는 기능을 할 수 있는 한, AAV rep 유전자는 rAAV 벡터 계놈의 ITR과 동일한 혈청형의 것이다.

[0107] 관련 기술분야에 공지된 적합한 배지가 rAAV 벡터의 생산에 사용될 수 있다. 이들 배지는, 비제한적으로, 하이클론 래보러토리즈(Hyclone Laboratories) 및 JRH에 의해 생산된 배지, 예컨대 변형 이글 배지(MEM), 돌베코 변형 이글 배지(DMEM), 맞춤 제제, 예컨대 미국 특허 번호 6,566,118에 기재된 것 및 미국 특허 번호 6,723,551에 기재된 바와 같은 Sf-900 II SFM 배지를 포함하며, 이들 각각은 특히 재조합 AAV 벡터의 생산에 사용하기 위한 맞춤 배지 제제와 관련하여 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

- [0108] rAAV 비리온을 생산하는 한 방법은 삼중 형질감염 방법이다. 간략하게, rep 유전자 및 캡시드 유전자, 예컨대 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 함유하는 플라스미드를 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드와 함께 세포주 (예를 들어, HEK-293 세포) 내로 형질감염시킬 수 있고 (예를 들어, 인산칼슘 방법을 사용함), 비리온을 수집하고, 임의로 정제할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, rAAV 비리온은 벡터 계놈, AAV rep 및 cap를 코딩하는 핵산, 예컨대 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 AAV 헬퍼 기능을 코딩하는 핵산의 숙주 세포 내로의 삼중 형질감염에 의해 생산되었으며, 여기서 핵산의 숙주 세포로의 형질감염은 rAAV 비리온을 생산할 수 있는 숙주 세포를 생성한다.
- [0109] 일부 실시양태에서, rAAV 비리온은 생산자 세포주 방법, 예컨대 문헌 [Martin et al., (2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269]; 미국 공개 번호 US2004/0224411; 및 [Liu, X.L. et al. (1999) Gene Ther. 6:293-299]에 기재된 예시적인 생산자 세포주 방법에 의해 생산될 수 있다. 간략하게, 세포주 (예를 들어, HeLa, 293, A549 또는 Perc.6 세포주)를 rep 유전자, 캡시드 유전자, 예컨대 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 벡터 계놈을 함유하는 플라스미드로 안정하게 형질감염시킬 수 있다. 세포주를 스크리닝하여 rAAV 생산을 위한 리드 클론을 선택할 수 있고, 이어서 이를 생산 생물반응기로 확장시키고, 헬퍼 바이러스 (예를 들어, 아데노바이러스 또는 HSV)로 감염시켜 rAAV 생산을 개시할 수 있다. 후속적으로 비리온을 수거할 수 있고, 아데노바이러스를 (예를 들어, 열에 의해) 불활성화시키고/거나 제거할 수 있고, rAAV 비리온을 정제할 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, rAAV 비리온은 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산, AAV rep를 코딩하는 핵산, 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 및 AAV 헬퍼 기능을 코딩하는 핵산 중 1종 이상을 포함하는 생산자 세포주에 의해 생산되었다.
- [0110] 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및/또는 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산은 생산자 세포주에서 안정하게 유지된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및/또는 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산은 1종 이상의 플라스미드 상에서 세포주 내로 도입되어 생산자 세포주를 생성한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및 rAAV 계놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 다른 실시양태에서, AAV rep, AAV cap 및 rAAV 계놈은 2종 이상의 상이한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 플라스미드로 안정하게 형질감염된 세포주는 세포주의 다중 계대 (예를 들어, 세포주의 5, 10, 20, 30, 40, 50회 또는 50회 초과) 동안 플라스미드를 유지한다. 예를 들어, 플라스미드(들)는 세포가 복제됨에 따라 복제될 수 있거나 또는 플라스미드(들)는 세포 계놈 내로 통합될 수 있다. 플라스미드가 세포 (예를 들어, 인간 세포)에서 자율적으로 복제될 수 있게 하는 다양한 서열이 확인되었다 (예를 들어, 문헌 [Krysan, P.J. et al. (1989) Mol. Cell Biol. 9:1026-1033] 참조). 일부 실시양태에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커 (예를 들어, 항생제 내성 마커)를 함유할 수 있다. 포유동물 세포에서 통상적으로 사용되는 선택 마커는 비제한적으로 블라스티시딘, G418, 히그로마이신 B, 제오신, 퓨로마이신 및 그의 유도체를 포함한다. 핵산을 세포 내로 도입하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 비제한적으로 바이러스 형질도입, 양이온성 형질감염 (예를 들어, 양이온성 중합체, 예컨대 DEAE-덱스트란 또는 양이온성 지질, 예컨대 리포펙타민을 사용함), 인산칼슘 형질감염, 미세주사, 입자 충격, 전기천공 및 나노입자 형질감염 (보다 상세한 내용에 대해서는, 예를 들어 문헌 [Kim, T.K. and Eberwine, J.H. (2010) Anal. Bioanal. Chem. 397:3173-3178] 참조)을 포함한다.
- [0111] 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및/또는 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산은 생산자 세포주의 계놈 내로 안정하게 통합된다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및/또는 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산은 1종 이상의 플라스미드 상에서 세포주 내로 도입되어 생산자 세포주를 생성한다. 일부 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및 rAAV 계놈은 동일한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 다른 실시양태에서, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및 rAAV 계놈은 2종 이상의 상이한 플라스미드 상에서 세포 내로 도입된다. 일부 실시양태에서, 플라스미드(들)는 플라스미드를 유지하는 세포의 선택을 가능하게 하는 선택 마커 (예를 들어, 항생제 내성 마커)를 함유할 수 있다. 핵산의 다양한 숙주 세포주 내로의 안정한 통합 방법은 공지되어 있다. 예를 들어, 반복된 선택 (예를 들어, 선택 마커의 사용을 포함)은 선택 마커 (및 AAV cap 유전자, AAV rep 유전자 및/또는 rAAV 계놈)를 함유하는 핵산이 통합된 세포를 선택하는데 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 핵산은 부위-특이적 방식으로 세포주 내로 통합되어 생산자 세포주를 생성할 수 있다. 여러 부위-특이적 재조합 시스템, 예컨대 FLP/FRT (예를 들어, 문헌 [O'Gorman, S. et al. (1991) Science 251:1351-1355] 참조), Cre/loxP (예를 들어, 문헌 [Sauer, B. and Henderson, N. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5166-5170] 참조) 및 phi C31-att (예를 들어, 문헌 [Groth, A.C. et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. 97:5995-6000] 참조)가 관련 기술분야에 공지되어 있다.

- [0112] 일부 실시양태에서, 생산자 세포주는 영장류 세포주 (예를 들어, 비-인간 영장류 세포주, 예컨대 Vero 또는 FRhL-2 세포주)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 세포주는 인간 세포주로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 생산자 세포주는 HeLa, 293, A549 또는 PERC.6® (크루셀) 세포로부터 유래된다. 예를 들어, AAV rep 유전자, AAV cap 유전자 및/또는 rAAV 계놈을 코딩하는 핵산을 세포주 내로 도입하고/거나 안정하게 유지/통합하여 생산자 세포주를 생성하기 전에, 세포주는 HeLa, 293, A549 또는 PERC.6® (크루셀) 세포주 또는 그의 유도체이다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 생산자 세포주는 현탁액에서의 성장을 위해 적합화된다. 공지된 바와 같이, 고정-의존성 세포는 전형적으로 마이크로캐리어 비드와 같은 기질 없이는 현탁액에서 성장할 수 없다. 세포주를 현탁액에서 성장하도록 적합화시키는 것은, 예를 들어 교반 패들이 구비된 스피너 배양에서 세포주를 성장시키는 것, 응피를 방지하기 위해 칼슘 및 마그네슘 이온이 결여된 배양 배지 (및 임의로 소포제)를 사용하는 것, 실리콘화 화합물로 코팅된 배양 용기를 사용하는 것, 및 각각의 계대의 배양물에서 (큰 응피로 또는 용기 측면에서 보다는) 세포를 선택하는 것을 포함할 수 있다. 추가의 설명을 위해, 예를 들어 ATCC에 빈번하게 요청되는 질의 문서 ([www\[dot\]atcc\[dot\]org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40\[dot\]aspx](http://www.atcc.org/Global/FAQs/9/1/Adapting%20a%20monolayer%20cell%20line%20to%20suspension-40.aspx)에서 이용가능함) 및 그에 인용된 참고문헌을 참조한다.
- [0114] 일부 측면에서, (a) 숙주 세포를 rAAV 비리온이 생산되는 조건 하에 배양하는 단계이며, 여기서 숙주 세포는 (i) 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; (ii) rep 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드; (iii) 유전자 산물, 예를 들어 적어도 1개의 AAV ITR이 플랭킹된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트; 및 (iv) AAV 헬퍼 기능을 포함하는 것인 단계; 및 (b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 비리온을 회수하는 단계를 포함하는, 본원에 개시된 바와 같은 rAAV 비리온을 생산하는 방법이 제공된다. 일부 실시양태에서, 상기 적어도 1개의 AAV ITR은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV 혈청형 ITR 등으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 방법은 rAAV 비리온을 정제하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0115] 본 발명의 적합한 rAAV 생산 배양 배지는 0.5%-20% (v/v 또는 w/v) 수준의 혈청 또는 혈청-유래 재조합 단백질로 보충될 수 있다. 대안적으로, 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, rAAV 비리온은 동물-유래 산물이 없는 배지로도 지칭될 수 있는 무혈청 조건에서 생산될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 rAAV 비리온의 생산을 지지하도록 설계된 상업용 또는 맞춤형 배지가 또한 생산 배양물에서 rAAV의 역가를 증가시키기 위해 비제한적으로 글루코스, 비타민, 아미노산 및/또는 성장 인자를 포함한 관련 기술분야에 공지된 1종 이상의 세포 배양 성분으로 보충될 수 있음을 인지할 수 있다.
- [0116] rAAV 생산 배양물은 이용될 특정한 숙주 세포에 적합한 다양한 조건 하에 (넓은 온도 범위에 걸쳐, 다양한 시간 길이 동안 등) 성장될 수 있다. 관련 기술분야에 공지된 바와 같이, rAAV 생산 배양물은 적합한 부착-의존성 용기, 예컨대, 예를 들어 롤러 병, 중공 섬유 필터, 마이크로캐리어 및 충전층 또는 유동층 생물반응기에서 배양될 수 있는 부착-의존성 배양물을 포함한다. rAAV 생산 배양물은 또한, 예를 들어 스피너 플라스크, 교반 탱크 생물반응기 및 일회용 시스템, 예컨대 웨이브 백 시스템을 포함한 다양한 방식으로 배양될 수 있는 현탁액-적합화된 숙주 세포, 예컨대 HeLa, 293 및 SF-9 세포를 포함할 수 있다.
- [0117] V. 조성물
- [0118] 또한, 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온 및 1종 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이다.
- [0119] 재조합 AAV 비리온은 일반적으로 안전하고 비-독성이며 바람직한 제제를 제조하는데 유용한 제약상 허용되는 담체, 희석제 및 시약과 조합될 수 있고, 영장류 사용에 허용되는 부형제를 포함한다. 이러한 부형제는 고체, 액체, 반고체 또는 에어로졸 조성물의 경우 기체상일 수 있다. 이러한 담체 또는 희석제의 예는 물, 염수, 링거액, 텍스트로스 용액 및 5% 인간 혈청 알부민을 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 보충 활성 화합물이 또한 제제 내로 혼입될 수 있다. 제제에 사용되는 용액 또는 현탁액은 멸균 희석제, 예컨대 주사용수, 염수 용액, 고정 오일, 폴리에틸렌 글리콜, 글리세린, 프로필렌 글리콜 또는 다른 합성 용매; 항박테리아 화합물, 예컨대 벤질 알콜 또는 메틸 파라벤; 항산화제, 예컨대 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트화 화합물, 예컨대 에틸렌디아민테트라아세트산 (EDTA); 완충제, 예컨대 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트; 응집을 방지하기 위한 세제, 예컨대 트윈 20; 및 장성의 조절을 위한 화합물, 예컨대 염화나트륨 또는 텍스트로스를 포함할

수 있다. pH는 산 또는 염기, 예컨대 염산 또는 수산화나트륨으로 조정될 수 있다. 특정한 실시양태에서, 제약 조성물은 멸균된다. 안구 세포가 생체내에서 접촉되는 경우에, 제조합 AAV 비리온은 눈으로의 전달에 적절하게 처리될 수 있다.

[0120] 제약 조성물은 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 추가로 포함할 수 있다. 정맥내 투여를 위해, 적합한 담체는 생리 염수, 정박테리아수 또는 포스페이트 완충 염수 (PBS)를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 조성물은 멸균되고, 용이한 시린지성이 존재하는 정도로 유동성이어야 한다. 특정 실시양태에서, 제약 조성물은 제조 및 저장 조건 하에 안정하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존된다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 그의 적합한 혼합물을 함유하는, 예를 들어 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 1종 이상의 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알콜, 예컨대 만니톨 또는 소르비톨, 및 염화나트륨을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함한다.

[0121] 멸균 용액은 요구되는 양의 제조합 AAV 비리온을 요구되는 경우에 상기 열거된 성분 중 하나 또는 그의 조합과 함께 적절한 용매 중에 혼입시킨 후, 여과 멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 제조 방법은 활성 성분 플러스 그의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결-건조를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0122] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 신체로부터의 신속한 제거에 대해 바이러스 벡터를 보호할 담체, 예컨대 이식물 및 마이크로캡슐화 전달 시스템을 포함한 제어 방출 제제와 함께 제조된다. 생분해성, 생체적합성 중합체, 예컨대 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리무수물, 폴리글리콜산, 콜라겐, 폴리오르토에스테르 및 폴리락트산이 사용될 수 있다. 리포솜 현탁액 (바이러스 항원에 대한 모노클로날 항체를 갖는 감염된 세포에 표적화된 리포솜 포함)이, 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이, 제약상 허용되는 담체로서 또한 사용될 수 있다.

[0123] 경구, 안구 또는 비경구 조성물을 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제제화하는 것이 유리할 수 있다. 본원에 사용된 투여 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭할 수 있으며; 각각의 단위는 목적하는 치료 효과를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다.

[0124] 포유동물 세포에 효과적으로 형질도입하는데 적합한 임의의 농도의 제조합 AAV 비리온이 제조될 수 있다. 예를 들어, 제조합 AAV 비리온은 약 10^8 개 벡터 게놈/mL 또는 그 초과, 예를 들어 약 5×10^8 개 벡터 게놈/mL; 약 10^9 개 벡터 게놈/mL; 약 5×10^9 개 벡터 게놈/mL, 약 10^{10} 개 벡터 게놈/mL, 약 5×10^{10} 개 벡터 게놈/mL; 약 10^{11} 개 벡터 게놈/mL; 약 5×10^{11} 개 벡터 게놈/mL; 약 10^{12} 개 벡터 게놈/mL; 약 5×10^{12} 개 벡터 게놈/mL; 약 10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 1.5×10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 3×10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 5×10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 7.5×10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 9×10^{13} 개 벡터 게놈/mL; 약 1×10^{14} 개 벡터 게놈/mL 또는 약 5×10^{14} 개 벡터 게놈/mL; 또는 그 초과로 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스 입자는 약 1×10^{15} 개 벡터 게놈/mL 이하의 농도로 제제화될 수 있다.

[0125] 제조합 AAV 비리온은 비제한적으로 약 1×10^8 개 벡터 게놈 또는 그 초과, 예를 들어 약 1×10^9 , 약 1×10^{10} , 약 1×10^{11} , 약 1×10^{12} 또는 약 1×10^{13} 개 벡터 게놈 또는 그 초과, 또는 특정 경우에 약 1×10^{14} 개 벡터 게놈을 포함한 임의의 적합한 단위 투여량으로 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제조합 AAV 비리온은 약 4×10^{15} 개 벡터 게놈 이하의 임의의 적합한 단위 투여량으로 제제화될 수 있다. 일부 경우에, 단위 투여량은 최대 약 5×10^{15} 개 벡터 게놈, 예를 들어 약 1×10^{14} 개 벡터 게놈 또는 그 미만, 예를 들어 약 1×10^{13} , 약 1×10^{12} , 약 1×10^{11} , 약

1×10^{10} 또는 약 1×10^9 개 벡터 게놈 또는 그 미만, 또는 특정 경우에 약 1×10^8 개 벡터 게놈 또는 그 미만이다. 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온은 약 1×10^8 개 벡터 게놈 이상의 임의의 적합한 단위 투여량으로 제제화될 수 있다. 일부 경우에, 단위 투여량은 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{11} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 단위 투여량은 약 1×10^{10} 내지 약 3×10^{12} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 단위 투여량은 약 1×10^9 내지 약 3×10^{13} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 단위 투여량은 약 1×10^8 내지 약 3×10^{14} 개 벡터 게놈이다.

[0126] 일부 경우에, 제약 조성물의 단위 투여량은 감염 다중도 (MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. MOI란 핵산이 전달될 수 있는 세포에 대한 바이러스 게놈의 비 또는 배수를 의미한다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^5 - 약 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^4 - 약 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 비리온은 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI 중 어느 것이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 AAV 비리온은 약 1×10^8 내지 약 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 AAV 비리온은 최대 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 및 1×10^{18} MOI 중 어느 것이다.

[0127] 일부 측면에서, 제약 조성물의 양은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 개 재조합 AAV 비리온, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 개 재조합 AAV 비리온, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 개 재조합 AAV 비리온, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 개 재조합 AAV 비리온을 포함한다.

[0128] 제약 조성물은 투여에 대한 지침서와 함께 용기, 팩 또는 분배기, 예를 들어 시린지, 예를 들어 사전충전 시린지에 포함될 수 있다.

[0129] 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 염을 포함한다. 다양한 제약상 허용되는 염은 관련 기술분야에 공지되어 있고, 예를 들어 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences", 17th edition, Alfonso R. Gennaro (Ed.), Mark Publishing Company, Easton, PA, USA, 1985] (및 그의 보다 최근판), ["Encyclopaedia of Pharmaceutical Technology", 3rd edition, James Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare USA (Inc.), NY, USA, 2007] 및 [J. Pharm. Sci. 66: 2 (1977)]에 기재되어 있다. 또한, 적합한 염에 대한 검토를 위해, 문헌 [Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use by Stahl and Wermuth (Wiley-VCH, 2002)]을 참조한다.

[0130] 제약상 허용되는 염기 부가염은 금속 또는 아민, 예컨대 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 또는 유기 아민을 사용하여 형성된다. 양이온으로서 사용되는 금속은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등을 포함한다. 아민은 N-N'-디벤질에틸렌디아민, 클로로프로카인, 콜린, 디에탄올아민, 디시클로헥실아민, 에틸렌디아민, N-메틸글루카민 및 프로카인을 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharma Sci., 1977, 66, 119] 참조). 상기 산성 화합물의 염기 부가염은 유리 산 형태를 충분한 양의 목적하는 염기와 접촉시켜 통상적인 방식으로 염을 생성함으로써 제조된다. 유리 산 형태는 염 형태를 산과 접촉시키고 유리 산을 통상적인 방식으로 단리함으로써 재생될 수 있다. 유리 산 형태는 극성 용매 중에서의 용해도와 같은 특정 물리적 특성에 있어서 그의 각각의 염 형태와 다소 상이하지만, 그 외에는 염은 본 발명의 목적상 그의 각각의 유리 산과 동등하다.

[0131] 제약 조성물은 포유동물, 예컨대 영장류, 예컨대 인간에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 수성 담체, 예컨대 비독성의 불활성의 제약상 허용되는 수성 담체를 포함한다. 일부 실시양태에서, 수성 담체의 pH는 약 3 내지 약 8이다. 일부 실시양태에서, 수성 담체의 pH는 약 6 내지 약 8이다.

[0132] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 치료 유효량의 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온을 제약상 허용되는 담체 및/또는 부형제, 예를 들어 염수, 포스페이트 완충 염수, 포스페이트 및 아미노산, 중합체, 폴리올, 당, 완충제, 보존제 및 다른 단백질과 혼합하여 포함한다. 예시적인 아미노산, 중합체 및 당 등은 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 화합물, 폴리에틸렌 글리콜 모노스테아레이트 화합물, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르, 수크로스, 프룩토스, 텍스트로스, 말토스, 글루코스, 만니톨, 텍스트란, 소르비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 크실리톨, 락토스, 트레할로스, 소 또는 인간 혈청 알부민, 시트레이트, 아세테이트, 링거 및 헵크

용액, 시스테인, 아르기닌, 카르니틴, 알라닌, 글리신, 리신, 발린, 류신, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 및 글리콜이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 약 4°C에서 적어도 6개월 동안 안정하다.

[0133] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 제약 조성물은 완충제, 예컨대 포스페이트 완충 염수 (PBS) 또는 인산나트륨 / 황산나트륨, 트리스 완충제, 글리신 완충제, 멸균수 및 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 다른 완충제, 예컨대 문헌 [Good et al. (1966) Biochemistry 5:467]에 기재된 것을 포함한다.

[0134] 또한, 본원에 기재된 방법에 사용하기 위한 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온을 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 재조합 AAV 비리온 및 1종 이상의 제약상 허용되는 희석제, 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이다.

[0135] 또한, 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드를 포함하는 조성물이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 본원에 개시된 방법, 예컨대 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온을 제조하는 방법에 사용된다.

[0136] VI. 방법 및 용도

[0137] 첨부된 실시예에 개시된 바와 같이, 본원에 기재된 변형된 캡시드 단백질은 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온에 증진 또는 변경된 세포 향성을 부여할 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 특정 변이체 AAV 캡시드 단백질은 망막의 증가된 감염성 또는 망막에서의 유전자 산물의 증가된 발현 수준, ILM에 대한 증가된 결합, 유리체내 주사 후 망막 세포의 증가된 감염성 및/또는 유리체내 주사 후 망막에서의 유전자 산물의 증가된 발현과 연관된다.

[0138] 본원에 기재된 비리온에 의해 형질감염될 수 있는 망막 세포 성분의 예는 정상세포, 뮐러 세포, RGC, RGC 축삭, 광수용체, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 및 그의 조합을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 경우에, 세포 마커는 유전자 산물을 코딩하는 핵산의 망막 세포 성분 내로의 형질도입을 측정하기 위해 사용된다. 세포 마커는 GFAP, 비멘틴, Fox, β-튜블린, 로돕신, PKCa, 파르브알부민, 칼빈딘 및 그의 조합을 포함할 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 하기 표 1은 예시적인 세포 마커 및 상응하는 망막 세포 성분을 도시한다.

[0139] 표 1: 세포 마커 및 세포 유형의 요약

마커	세포 유형
GFAP	정상세포
비멘틴	뮐러 세포
Fox	RGC
β-튜블린	RGC 축삭
로돕신 (Rho)	간상 광수용체
PKCa	양극성 세포
파르브알부민	무축삭 세포
칼빈딘	수평 세포

[0140]

[0141] 일부 경우에, 유전자 산물을 형질도입하는 rAAV 비리온의 능력은 리포터 단백질의 발현에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 리포터 단백질은 GFP, YFP, 레드 체리, β-갈락토시다제 또는 관련 기술분야에 공지된 다른 리포터 단백질을 포함할 수 있다.

[0142] 일부 경우에, 시간 경과에 따른 리포터 단백질의 발현은 다양한 시점에서 눈의 영상의 캡처를 통해 결정될 수 있다. 예를 들어, GFP의 발현은 형광의 증가와 상관관계가 있을 수 있다. 주어진 시점에서의 형광의 양은 유전자 산물의 발현을 정량화하는데 사용될 수 있다.

[0143] 일부 실시양태에서, 면역형광은 본원에 기재된 망막 세포 구획에서 형질도입된 유전자의 국제화를 결정하는데 사용될 수 있다. 망막 세포 구획은 본원에 개시된 세포 마커에 특이적인 항체를 사용하여 표지될 수 있다. 일부 경우에, 항체는 형광단에 커플링된다. 일부 경우에, 2차 항체는 제1 항체의 결합을 검출하는데 사용될 수 있다. 형질도입된 망막을 동결절편화한 후, 관심 세포 마커에 대한 항체와 함께 인큐베이션함으로써, 결합된 항체의 영상화를 가능하게 할 수 있다. 이어서, 동결절편을 항체를 사용하여 표지하여 트랜스진의 형질도입, 관심 세포 마커의 존재 및 둘 사이의 중첩 영역을 검출할 수 있다.

- [0144] 따라서, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 재조합 AAV 비리온 내로 혼입시키는 것을 포함하는, 재조합 AAV 비리온의 향성을 증진 또는 변경시키는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 모 AAV 캡시드의 아미노산 잔기 570-579를, HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하는 아미노산 서열로 치환하여 변이체 AAV 캡시드 단백질을 생성하는 단계 및 변이체 AAV 캡시드 단백질을 재조합 AAV 비리온 내로 혼입시키는 단계를 포함하며, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인, 재조합 AAV 비리온의 향성을 증진 또는 변경시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 아미노산 잔기 570-579를, $X_1X_2HKFKSGDX_3$ (서열식별번호: 2)를 포함하는 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함하며, 여기서 X_{1-3} 은 독립적으로 임의의 아미노산일 수 있다. 일부 실시양태에서, 각각의 X_{1-3} 은 독립적으로 A, L, G, S 및 T로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, X_1 은 L이다. 일부 실시양태에서, X_2 는 A이다. 일부 실시양태에서, X_3 은 A이다. 일부 실시양태에서, 방법은 아미노산 잔기 570-579를, LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함하거나; 서열식별번호: 3과 적어도 80% 또는 적어도 90% 상동성을 갖거나; 서열식별번호: 3과 적어도 80% 또는 적어도 90% 서열 동일성을 갖거나; 또는 서열식별번호: 3 내에 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상 또는 9개 이상의 연속 아미노산을 갖는 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함한다. 일부 실시양태에서, 아미노산 서열은 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함한다.
- [0145] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 야생형 AAV 캡시드 단백질, 예를 들어 AAV 유형 1 (AAV1), AAV 유형 2 (AAV2), AAV 유형 3 (AAV3), AAV 유형 4 (AAV4), AAV 유형 5 (AAV5), AAV 유형 6 (AAV6), AAV 유형 7 (AAV7), AAV 유형 8 (AAV8), AAV 유형 9 (AAV9), AAV 유형 10 (AAV10), 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 VP1 캡시드 단백질이다.
- [0146] 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 변이체 AAV 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV5 VP1 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 서열식별번호: 4에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 AAV5 VP1 캡시드 단백질의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 하이브리드이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2와 AAV5의 하이브리드이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV 2.5T 또는 AAV2.5T 캡시드 단백질에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV 2.5T 또는 AAV2.5T 캡시드 단백질에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV 2.5T이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 (서열식별번호: 5)에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 상동성을 갖는 그의 변이체이다. 일부 실시양태에서, 모 AAV 캡시드 단백질은 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 또는 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질 (서열식별번호: 5)에 대해 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 서열 동일성을 갖는 그의 변이체이다.
- [0147] 본원에 기재된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 본원에 기재된 재조합 AAV 비리온은 유전자 산물을 세포, 예를 들어 동물의 세포에 전달하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, 이들은, 예를 들어 유전자 산물이 세포 생존을 및/또는 기능에 미치는 효과를 결정하기 위한 연구에 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 이들은, 예를 들어 치료 유전자 산물을 세포 또는 조직에 전달함으로써, 예를 들어 장애를 치료하기 위한 의약에 사용될 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 조성물과 세포를 접촉시키는 것을 포함하는, 세포에서 유전자 산물을 발현시키는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 접촉은 시험관내에서 일어난다. 일부 실시양태에서, 접촉은 생체내에서 일어나며, 즉 조성물은 대상체에게 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 비경구로, 예를 들어 정맥내로, 경구로 또는 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 주사에 의해 눈에 투여되고, 예를 들어 망막, 망막하 또는 유리체에 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사에 의해 투여된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 유리체내 주사에 의해 투여된다.

- [0148] 포유동물 세포가 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온과 시험관내 접촉되는 특정한 실시양태에서, 세포는 임의의 포유동물 종, 예를 들어 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 저빌, 다람쥐), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소, 영장류, 인간으로부터의 것일 수 있다. 세포는 확립된 세포주, 예를 들어 WERI 세포, 661W 세포로부터의 것일 수 있거나 또는 세포는 1차 세포일 수 있다.
- [0149] 특정 실시양태에서, 유전자 산물의 발현을 촉진하기 위해, 세포는 재조합 AAV 비리온과 약 30분 내지 약 24시간 또는 그 초과, 예를 들어 약 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 12시간, 16시간, 18시간, 20시간 또는 24시간 등 중 어느 하나 동안 접촉된다. 세포는 재조합 AAV 비리온과 1회 이상, 예를 들어 1회, 2회, 3회 또는 3회 초과로 접촉될 수 있고, 세포는 각각의 접촉 사건 후 일부 양의 시간, 예를 들어 약 16-24시간 동안 재조합 AAV 비리온과 함께 인큐베이션된다. 세포의 접촉은 임의의 배양 배지에서 및 세포의 생존을 촉진하는 임의의 배양 조건 하에 일어날 수 있다. 예를 들어, 세포는 소 태아 혈청 또는 열 불활성화된 염소 혈청 (약 5-10%), L-글루타민, 티올, 특히 2-메르캅토에탄올, 및 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된 편리한 임의의 적절한 영양 배지, 예컨대 이스코브 변형 DMEM 또는 RPMI 1640 중에 현탁될 수 있다. 배양물은 세포가 반응성인 성장 인자를 함유할 수 있다. 본원에 정의된 바와 같은 성장 인자는 막획단 수용체에 대한 특이적 효과를 통해 배양물 또는 무손상 조직에서 세포의 생존, 성장 및/또는 분화를 촉진할 수 있는 분자이다. 성장 인자는 폴리펩티드 및 비-폴리펩티드 인자를 포함한다.
- [0150] 특정 실시양태에서, 세포에서 유전자 산물의 발현을 가져오는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온의 유효량이 제공된다. 특정한 실시양태에서, 유효량은 실험적으로, 예를 들어 유전자 산물의 존재 또는 수준을 검출함으로써, 세포의 생존율 또는 기능에 대한 효과를 검출함으로써 등에 의해 결정될 수 있다. 특정 실시양태에서, 재조합 AAV 비리온의 유효량은 참조 바이러스 벡터, 예컨대 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온의 동일한 양과 동일하거나 더 큰 세포 내 유전자 산물의 발현을 촉진한다. 특정 실시양태에서, 발현은 참조 바이러스 벡터로부터의 발현에 비해 약 2배 이상; 예를 들어 약 3배, 4배 또는 5배 또는 그 초과 중 어느 것, 일부 경우에 약 10배, 20배 또는 50배 또는 그 초과 중 어느 것, 예를 들어 100배 증진된다. 특정 실시양태에서, 증진된 발현은 특정한 세포 유형, 예를 들어 본원에 기재된 임의의 안구 세포에서 일어난다.
- [0151] 세포가 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 조성물과 생체내 접촉되는 경우에, 대상체는 임의의 포유동물, 예를 들어 설치류 (예를 들어, 마우스, 래트, 저빌), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소 또는 영장류 (예를 들어, 인간 또는 비-인간 영장류)일 수 있다. 본 개시내용의 방법 및 조성물은 적어도 부분적으로 세포의 유전자 요법에 의해 다루어질 수 있는 임의의 상태의 치료에 사용된다. 따라서, 본 개시내용의 조성물 및 방법은 세포 요법을 필요로 하는 개체의 치료에 사용된다. 세포는 혈액, 눈, 간, 신장, 심장, 근육, 위, 장, 췌장 및 피부를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.
- [0152] 또한, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 유전자 산물을 망막에 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 재조합 AAV 비리온을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, ILM을 가로질러 유전자 산물을 전달하는 방법이 본원에 제공된다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 대상체에게 본원에 기재된 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하며, 여기서 재조합 AAV 비리온은 본원에 제공되거나 개시된 변이체 AAV 캡시드 및 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인, 대상체의 망막에 유전자 산물을 제공하는 방법을 제공한다.
- [0153] 특정한 실시양태에서, 대상체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환 또는 장애를 갖는 것으로 진단되었거나 그를 갖는 것으로 의심된다: 급성 황반 신경망막병증; 베체트병; 맥락막 신생혈관화; 당뇨병성 포도막염; 히스토플라스마증; 황반 변성, 예컨대 급성 황반 변성, 비-삼출성 연령 관련 황반 변성 및 삼출성 연령 관련 황반 변성; 부종, 예컨대 황반 부종, 낭포양 황반 부종 및 당뇨병성 황반 부종; 다초점성 맥락막염; 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상; 안구 종양; 망막 장애, 예컨대 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증 (증식성 당뇨병성 망막병증 포함), 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환; 교감신경성 안염; 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군; 포도막 확산; 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광응고, 방사선 망막병증; 망막전막 장애; 분지 망막 정맥 폐쇄; 전안부 허혈성 시신경병증;

당뇨병성 망막 허혈; 허혈성 망막병증 비-망막병증; 당뇨병성 망막 기능장애; 망막층간분리; 색소성 망막염; 녹내장; 어서 증후군, 추체-간체 이영양증; 스타르가르트병 (노란점안저); 유전성 황반 변성; 맥락망막 변성; 레베르 선천성 흑암시; 선천성 비진행성 야맹증; 맥락막결손; 바르데-비들 증후군; 황반 모세혈관확장증; 레베르 유전성 시신경병증; 미숙아 망막병증; 및 색각 장애, 예컨대 완전색맹, 적색맹, 녹색맹 및 청색맹.

[0154] 특정한 실시양태에서, 대상체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있다: 급성 황반 신경망막병증; 베체트병; 맥락막 신생혈관화; 당뇨병성 포도막염; 히스토플라스마증; 황반 변성, 예컨대 급성 황반 변성, 비-삼출성 연령 관련 황반 변성 및 삼출성 연령 관련 황반 변성; 부종, 예컨대 황반 부종, 낭포양 황반 부종 및 당뇨병성 황반 부종; 다초점성 맥락막염; 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상; 안구 종양; 망막 장애, 예컨대 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증 (증식성 당뇨병성 망막병증 포함), 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환; 교감 신경성 안염; 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군; 포도막 확산; 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광응고, 방사선 망막병증; 망막전막 장애; 분지 망막 정맥 폐쇄; 전안부 허혈성 시신경병증; 당뇨병성 망막 허혈; 허혈성 망막병증 비-망막병증; 당뇨병성 망막 기능장애; 망막층간분리; 색소성 망막염; 녹내장; 어서 증후군, 추체-간체 이영양증; 스타르가르트병 (노란점안저); 유전성 황반 변성; 맥락망막 변성; 레베르 선천성 흑암시; 선천성 비진행성 야맹증; 맥락막결손; 바르데-비들 증후군; 황반 모세혈관확장증; 레베르 유전성 시신경병증; 미숙아 망막병증; 및 색각 장애, 예컨대 완전색맹, 적색맹, 녹색맹 및 청색맹.

[0155] 또한, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 망막 질환 또는 장애의 예방적 치료를 필요로 하는 대상체의 망막 질환 또는 장애를 예방적으로 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 또한, 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 확립 또는 진단된 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체의 확립 또는 진단된 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 본원에 제공된다. 일부 실시양태에서, 방법은 본원에 개시된 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트를 포함하는 제약 조성물을 투여하는 것을 포함한다.

[0156] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다: 급성 황반 신경망막병증; 베체트병; 맥락막 신생혈관화; 당뇨병성 포도막염; 히스토플라스마증; 황반 변성, 예컨대 급성 황반 변성, 비-삼출성 연령 관련 황반 변성 및 삼출성 연령 관련 황반 변성; 부종, 예컨대 황반 부종, 낭포양 황반 부종 및 당뇨병성 황반 부종; 다초점성 맥락막염; 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상; 안구 종양; 망막 장애, 예컨대 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증 (증식성 당뇨병성 망막병증 포함), 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환; 교감신경성 안염; 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군; 포도막 확산; 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광응고, 방사선 망막병증; 망막전막 장애; 분지 망막 정맥 폐쇄; 전안부 허혈성 시신경병증; 당뇨병성 망막 허혈; 허혈성 망막병증 비-망막병증; 당뇨병성 망막 기능장애; 망막층간분리; 색소성 망막염; 녹내장; 어서 증후군, 추체-간체 이영양증; 스타르가르트병 (노란점안저); 유전성 황반 변성; 맥락망막 변성; 레베르 선천성 흑암시; 선천성 비진행성 야맹증; 맥락막결손; 바르데-비들 증후군; 황반 모세혈관확장증; 레베르 유전성 시신경병증; 미숙아 망막병증; 및 색각 장애, 예컨대 완전색맹, 적색맹, 녹색맹 및 청색맹.

[0157] 특정한 실시양태에서, 대상체는 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 질환 또는 장애가 발생할 위험이 있다: 급성 황반 신경망막병증; 베체트병; 맥락막 신생혈관화; 당뇨병성 포도막염; 히스토플라스마증; 황반 변성, 예컨대 급성 황반 변성, 비-삼출성 연령 관련 황반 변성 및 삼출성 연령 관련 황반 변성; 부종, 예컨대 황반 부종, 낭포양 황반 부종 및 당뇨병성 황반 부종; 다초점성 맥락막염; 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상; 안구 종양; 망막 장애, 예컨대 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증 (증식성 당뇨병성 망막병증 포함), 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환; 교감 신경성 안염; 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군; 포도막 확산; 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에

의해 영향을 받는 후안구 상태; 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태; 광응고, 방사선 망막병증; 망막전막 장애; 분지 망막 정맥 폐쇄; 전안부 허혈성 시신경병증; 당뇨병성 망막 허혈; 허혈성 망막병증 비-망막병증; 당뇨병성 망막 기능장애; 망막측간분리; 색소성 망막염; 녹내장; 어서 증후군, 추체-간체 이영양증; 스타르가르트병 (노란점안저); 유전성 황반 변성; 맥락막막 변성; 레베르 선천성 흑암시; 선천성 비진행성 야맹증; 맥락막결손; 바르데-비들 증후군; 황반 모세혈관확장증; 레베르 유전성 시신경병증; 미숙아 망막병증; 및 색각 장애, 예컨대 완전색맹, 적색맹, 녹색맹 및 청색맹.

- [0158] 특정 실시양태에서, 유전자 산물은 대상체의 망막에서 신생혈관화, 예를 들어 맥락막 신생혈관화 (CNV)를 억제한다. 많은 세포 인자가 CNV 생성의 조절에서 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌으며, 이 중에는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF), VEGF 수용체 (VEGFR), 혈소판-유래 성장 인자 (PDGF), 저산소증 유도성 인자 (HIF), 안지오프이에틴 (Ang) 및 다른 시토키인 및 미토겐-활성화 단백질 키나제 (MAPK)가 포함될 수 있으나 이에 제한되지는 않는다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 VEGF, VEGFR, PDGF, HIF, Ang 및 MAPK 중 1종 이상의 억제제이다.
- [0159] 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 본원에 개시된 유전자 산물 또는 치료 유전자 산물이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물은 간섭 RNA, 압타머 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 치료 유전자 산물은 간섭 RNA, 압타머 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 siRNA, miRNA 또는 단백질이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 유전자 기능의 부위-특이적 녹다운을 제공하는 부위-특이적 뉴클레아제이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 간섭 RNA이다. 일부 실시양태에서, 유전자 산물 (또는 치료 유전자 산물)은 siRNA 또는 miRNA이다.
- [0160] 일부 실시양태에서, 방법은 치료 이익, 예를 들어 질환 또는 장애의 발생의 예방, 질환 또는 장애의 진행의 정지, 질환 또는 장애의 진행의 역전 등을 유발한다. 일부 실시양태에서, 방법은 치료 이익이 달성되었음을 검출하는 단계를 포함한다.
- [0161] 일부 경우에, 예를 들어 유전자 산물의 수준을 측정함으로써, 치료 효능을 측정함으로써 등에 의해 검출되는 바와 같은 유전자 산물의 발현은 대상 조성물의 투여 2개월 이하 후, 예를 들어 투여 약 4, 3 또는 2주 이하 후, 예를 들어 투여 1주 후에 관찰될 수 있다. 유전자 산물의 발현은 또한 시간 경과에 따라 지속될 것으로 예상된다. 따라서, 일부 경우에, 예를 들어 유전자 산물의 수준을 측정함으로써, 치료 효능을 측정함으로써 등에 의해 검출된 바와 같은 유전자 산물의 발현은 대상 조성물의 투여 약 2개월 이상 후, 예를 들어 약 4, 6, 8 또는 10개월 이상, 일부 경우에 약 1년 이상, 예를 들어 2, 3, 4 또는 5년, 특정 경우에 5년 초과 후에 관찰될 수 있다.
- [0162] 특정한 실시양태에서, 대상체는 한쪽 눈에 또는 양쪽 눈 각각에 약 1×10^8 개 벡터 게놈 또는 그 초과, 일부 경우에 약 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} 또는 1×10^{13} 개 벡터 게놈 또는 그 초과, 특정 경우에 약 1×10^{14} 개 벡터 게놈 또는 그 초과를 투여받는다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 최대 약 1×10^{15} 개 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^{14} 개 벡터 게놈 또는 그 미만, 예를 들어 약 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} 또는 1×10^9 개 벡터 게놈 또는 그 미만, 특정 경우에 1×10^8 개 벡터 게놈 및 때때로 1×10^8 개 벡터 게놈 이상이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{11} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 약 1×10^{10} 내지 약 3×10^{12} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 약 1×10^9 내지 약 3×10^{13} 개 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 약 1×10^8 내지 약 3×10^{14} 개 벡터 게놈이다.
- [0163] 일부 경우에, 투여될 제약 조성물의 양은 감염 다중도 (MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, MOI는 핵산이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 게놈의 비 또는 배수를 지칭할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^5 - 약 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 약 1×10^4 - 약 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 AAV 비리온은 적어도 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 또는 1×10^{18} MOI 중 어느 것이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 AAV 비리온은 약 1×10^8 내지 약 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 AAV 비리온은 최대 약 1×10^1 , 1×10^2 , 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 , 1×10^6 , 1×10^7 , 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} , 1×10^{15} , 1×10^{16} , 1×10^{17} 또는 1×10^{18} MOI 중 어느 것

이다.

- [0164] 일부 측면에서, 제약 조성물의 양은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 개 입자의 재조합 AAV 비리온, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 개 입자의 재조합 AAV 비리온, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 개 입자의 재조합 AAV 비리온 또는 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 개 입자의 재조합 AAV 비리온을 포함한다.
- [0165] 일부 실시양태에서, 1회 초과와 투여 (예를 들어, 2, 3, 4회 또는 그 초과와 투여)가 다양한 간격의 기간에 걸쳐, 예를 들어 매일, 매주, 매월, 매년 등으로 유전자 발현의 목적하는 수준을 달성하기 위해 사용될 수 있다.
- [0166] 일부 측면에서, 상기 제약 조성물을 투여한지 약 7, 약 14, 약 21 또는 약 30일 후에 인간 대상체의 눈물, 혈액, 타액 또는 소변 샘플에서 재조합 AAV 비리온은 검출되지 않는다. 일부 측면에서, 재조합 AAV 비리온의 존재 또는 부재는 qPCR 또는 ELBA에 의해 검출된다.
- [0167] 일부 측면에서, 대상체의 최대 교정 시력 (BCVA)은 본원에 기재된 치료 방법 후 약 1, 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과와 라인만큼 개선된다.
- [0168] 일부 측면에서, 투여 단계 후에 플루오레세인 혈관조영 (FA)에 의해 평가시 신생혈관화의 감소가 이어진다.
- [0169] 일부 경우에, 망막 두께가 치료의 효과를 검사하기 위해 측정될 수 있다. 일부 경우에, 인간 대상체의 중심 망막 두께는 본 개시내용의 제약 조성물을 사용한 치료 후 약 12개월 내에 약 50 마이크로미터, 약 100 마이크로미터 또는 약 250 마이크로미터 초과만큼 증가하지 않는다. 일부 경우에, 인간 대상체의 중심 망막 두께는 본 개시내용의 제약 조성물을 사용한 치료 후 약 3개월, 약 6개월, 약 9개월 또는 약 12개월 내에 적어도 약 50 마이크로미터, 약 100 마이크로미터, 약 200 마이크로미터, 약 250 마이크로미터, 약 300 마이크로미터, 약 400 마이크로미터, 약 500 마이크로미터 또는 약 600 마이크로미터만큼 감소한다. 인간 대상체의 중심 망막 두께의 감소는 1개 이상의 시점에서의 중심 망막 두께를 본 개시내용의 제약 조성물의 투여 약 1, 3, 7 또는 10일에 또는 그 내에 취해진 기준선 측정치와 비교하여 측정될 수 있다.
- [0170] 상기로부터, 본 발명의 구체적 실시양태가 예시의 목적으로 본원에 기재되었지만, 본 발명의 취지 및 범주로부터 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있는 것으로 인지될 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구 범위에 의한 것을 제외하고는 제한되지 않는다.
- [0171] VII. 예시적인 실시양태
- [0172] 제공된 실시양태는 하기이다:
- [0173] 1. 재조합 아테노-연관 바이러스 (AAV) 비리온이며, 이는
- [0174] (a) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질; 및
- [0175] (b) 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열
- [0176] 을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.
- [0177] 2. 실시양태 1에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.
- [0178] 3. 실시양태 1 또는 2에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.
- [0179] 4. 실시양태 1-3 중 어느 하나에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질인 재조합 AAV 비리온.
- [0180] 5. 실시양태 1-4 중 어느 하나에 있어서, 변형된 서열이 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.
- [0181] 6. 실시양태 1-5 중 어느 하나에 있어서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.
- [0182] 7. 실시양태 1-6 중 어느 하나에 있어서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7

에 제시된 캡시드 서열을 포함하는 것인 재조합 AAV 비리온.

- [0183] 8. 실시양태 1-7 중 어느 하나에 있어서, 변이체 AAV5 또는 변이체 AAV2와 AAV5 하이브리드 비리온인 재조합 AAV 비리온.
- [0184] 9. 실시양태 1-8 중 어느 하나에 있어서, 변이체 AAV2.5T 비리온인 재조합 AAV 비리온.
- [0185] 10. 실시양태 1-9 중 어느 하나에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 세포에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.
- [0186] 11. 실시양태 10에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 광수용체, 망막 신경절 세포, 밀러 세포, 양극성 세포, 무축삭 세포, 수평 세포 및 망막 색소 상피 세포 중 1종 이상에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.
- [0187] 12. 실시양태 10 또는 11에 있어서, 포유동물 내에 유리체내로 주사되는 경우에 망막 색소 상피 세포에 형질도입할 수 있는 재조합 AAV 비리온.
- [0188] 13. 실시양태 1-12 중 어느 하나에 있어서, 치료 유전자 산물이 siRNA, miRNA 또는 단백질인 재조합 AAV 비리온.
- [0189] 14. 실시양태 1-13 중 어느 하나에 있어서, 치료 유전자 산물이 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물인 재조합 AAV 비리온.
- [0190] 15. 실시양태 1-13 중 어느 하나에 있어서, 치료 유전자 산물이 옹신인 재조합 AAV 비리온.
- [0191] 16. 실시양태 1-15 중 어느 하나에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된 것인 재조합 AAV 비리온.
- [0192] 17. 실시양태 16에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체인 재조합 AAV 비리온.
- [0193] 18. 실시양태 16 또는 17에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR인 재조합 AAV 비리온.
- [0194] 19. 실시양태 1-18 중 어느 하나에 있어서, AAV2.5T와 비교하여 변경된 세포 향성을 갖는 재조합 AAV 비리온.
- [0195] 20. 실시양태 1-19 중 어느 하나의 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물.
- [0196] 21. (a) 숙주 세포를 rAAV 비리온이 생산되는 조건 하에 배양하는 단계이며, 여기서 숙주 세포는
 - [0197] (i) 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;
 - [0198] (ii) rep 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드;
 - [0199] (iii) 적어도 1개의 AAV ITR이 플랭킹된 치료 유전자 산물을 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 카세트; 및
 - [0200] (iv) AAV 헬퍼 기능을 포함하는 것인 단계; 및
- [0201] (b) 숙주 세포에 의해 생산된 rAAV 비리온을 회수하는 단계를 포함하는, rAAV 비리온을 생산하는 방법.
- [0202] 22. 대상체에게 실시양태 1-19 중 어느 하나의 재조합 AAV 비리온 또는 실시양태 20의 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 대상체의 망막에 치료 유전자 산물을 제공하는 방법.
- [0203] 23. 실시양태 22에 있어서, 대상체가 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안

구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락망막 변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 마르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 및 색각 장애로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 상태로 진단되었거나 그를 갖는 것으로 의심되는 것인 방법.

- [0206] 24. 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 실시양태 1-19 중 어느 하나의 재조합 AAV 비리온 또는 실시양태 20의 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법.
- [0207] 25. 실시양태 24에 있어서, 질환 또는 장애가 급성 황반 신경망막병증, 베체트병, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 포도막염, 히스토플라스마증, 황반 변성, 부종, 다초점성 맥락막염, 후안구 부위 또는 위치에 영향을 미치는 안구 외상, 안구 종양, 중심 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 망막병증, 증식성 유리체망막병증 (PVR), 망막 동맥 폐쇄성 질환, 망막 박리, 포도막성 망막 질환, 교감신경성 안염, 보그트 코야나기-하라다 (VKH) 증후군, 포도막 확산, 안구 레이저 치료에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광역학 요법에 의해 유발되거나 그에 의해 영향을 받는 후안구 상태, 광응고, 방사선 망막병증, 망막전막 장애, 분지 망막 정맥 폐쇄, 전안부 허혈성 시신경병증, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증, 비-망막병증 당뇨병성 망막 기능장애, 망막층간 분리, 색소성 망막염, 녹내장, 어서 증후군, 추체-간체 이영양증, 스타르가르트병, 유전성 황반 변성, 맥락망막 변성, 레베르 선천성 흑암시, 선천성 비진행성 야맹증, 맥락막결손, 마르데-비들 증후군, 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시신경병증, 미숙아 망막병증 또는 색각 장애인 방법.
- [0208] 26. 실시양태 1-19 중 어느 하나에 있어서, 망막 질환 또는 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에게 재조합 AAV 비리온을 포함하는 제약 조성물을 유리체내 주사에 의해 투여하는 것을 포함하는, 상기 대상체의 망막 질환 또는 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한 재조합 AAV 비리온.
- [0209] 27. 실시양태 1-19 중 어느 하나에 있어서, 대상체의 망막 질환 또는 장애의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 재조합 AAV 비리온.
- [0210] 28. 실시양태 26 또는 27에 있어서, 질환 또는 장애가 연령-관련 황반 변성 (AMD), 습성-AMD, 건성-AMD, 망막 신생혈관화, 맥락막 신생혈관화, 당뇨병성 망막병증, 증식성 당뇨병성 망막병증, 망막 정맥 폐쇄, 중심 망막 정맥 폐쇄, 분지 망막 정맥 폐쇄, 당뇨병성 황반 부종, 당뇨병성 망막 허혈, 허혈성 망막병증 또는 당뇨병성 망막 부종인 재조합 AAV 비리온.
- [0211] 29. 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579 내에 1개 이상의 아미노산 치환을 포함하는 변형된 서열을 포함하며, 여기서 변형된 서열은 HKFKSGD (서열식별번호: 1)를 포함하고, 여기서 아미노산 잔기 넘버링은 AAV5 VP1 캡시드 단백질에 상응하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0212] 30. 실시양태 29에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV5 캡시드 단백질 또는 AAV5와 AAV2 하이브리드 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0213] 31. 실시양태 29 또는 30에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0214] 32. 실시양태 29-31 중 어느 하나에 있어서, 모 AAV 캡시드 단백질이 AAV2.5T VP1 캡시드 단백질인 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0215] 33. 실시양태 29-32 중 어느 하나에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 잔기 570-579에 LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 포함하는 것인 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0216] 34. 실시양태 29-33 중 어느 하나에 있어서, 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5에 제시된 아미노산 서열에 대해 적어도 85% 상동성을 갖는 캡시드 서열을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0217] 35. 실시양태 29-34 중 어느 하나에 있어서, 서열식별번호: 6 또는 서열식별번호: 7에 제시된 캡시드 서열을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질.
- [0218] 36. 실시양태 29-35 중 어느 한 실시양태의 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산.

- [0219] 37. 실시양태 36의 핵산을 포함하며, 여기서 변이체 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 프로모터 서열에 작동가능하게 연결된 것인 발현 벡터.
- [0220] 38. 실시양태 37에 있어서, rep 단백질을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 발현 벡터.
- [0221] 39. 실시양태 37 또는 38의 발현 벡터를 포함하는 세포.
- [0222] 40. 실시양태 39에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 핵산을 추가로 포함하는 세포.
- [0223] 41. 실시양태 40에 있어서, 치료 유전자 산물이 siRNA, miRNA 또는 단백질인 세포.
- [0224] 42. 실시양태 40 또는 41에 있어서, 치료 유전자 산물이 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 유전자 산물인 세포.
- [0225] 43. 실시양태 40 또는 41에 있어서, 치료제가 옹신인 세포.
- [0226] 44. 실시양태 40-43 중 어느 하나에 있어서, 치료 유전자 산물을 코딩하는 폴리뉴클레오티드에 1개 이상의 AAV ITR이 플랭킹된 것인 세포.
- [0227] 45. 실시양태 44에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV 또는 양 AAV ITR 또는 그의 변이체인 세포.
- [0228] 46. 실시양태 44 또는 45에 있어서, 1개 이상의 AAV ITR이 AAV2 ITR 또는 AAV5 ITR인 세포.
- [0229] 실시예
- [0230] 실시예 1: AAV2.5T 돌연변이체 라이브러리의 구축
- [0231] AAV2.5T는 미국 특허 번호 9,441,244 (이의 개시내용은 그 전문이 포함됨)에 기재된 AAV2 및 AAV5로부터의 영역을 함유하는 하이브리드 캡시드이다. AAV2.5T는 망막하로 전달되는 경우에는 망막에 형질도입할 수 있지만, 유리체내로 주사되는 경우에는 그렇지 않다. AAV2.5T 형질도입은 헤파란 술페이트 프로테오글리칸 (HSPG)이 풍부한 내부 제한 막 (ILM)에 의해 차단될 수 있다.
- [0232] AAV2.5T의 표면-노출된 도메인은 AAV2.5T의 aa582 (AAV5의 aa581)에서 A의 T로의 단일 치환 (AAV5의 전형적 시알산 수용체 결합에 영향을 미치지 않으면서 포유동물 세포에서 감염성을 증가시키는 것으로 보이는 돌연변이)을 제외하고는 AAV5의 것과 동일하다. AAV5 및 AAV2.5T는 무시할만한 헤파란 술페이트 결합을 갖는 반면, AAV2는 헤파란 술페이트에 대해 높은 친화도를 갖는다.
- [0233] 유리체내 주사에 의한 전달시 ILM을 가로질러 망막 세포에 형질도입하는 증진된 능력을 갖는 신규 AAV 변이체를 개발하기 위해, 아미노산 정렬에 의해 결정시, AAV2의 HSPG 결합 영역과 유사한 영역에서 AAV2.5T 캡시드로부터 루프 치환 및 삽입을 갖는 AAV 돌연변이체 라이브러리를 생성하였다.
- [0234] 무작위 7개 아미노산 루프를 갖는 DNA 단편의 합성에 의해 2개의 돌연변이체 라이브러리를 생성하였다. 7개의 아미노산 위치 각각에 대해 20개의 가능한 아미노산이 존재하였기 때문에, 이들 단편 라이브러리의 이론적 다양성은 대략 1×10^9 종의 고유한 변이체였다. 이들 돌연변이체 루프에는 5' 말단에서 아미노산 LA 및 3' 말단에서 A가 플랭킹되었다.
- [0235] 이들 단편 라이브러리를 사용하여, 수용체 결합 영역에서 AAV2.5T 캡시드 서열의 위치 577에 10개 아미노산 루프를 삽입함으로써 루프 삽입 라이브러리 (LIL)를 생성하였다.
- [0236] 캡시드의 표면 노출된 영역 내의 서열을 아미노산 571과 580 사이의 루프 변이체 서열 (VP1의 제1 아미노산으로부터의 넘버링)로 치환함으로써 제2 라이브러리를 생성하였다. 이러한 라이브러리를 루프 치환 라이브러리 (LSL)로 명명하였다.
- [0237] 이들 AAV 변이체 캡시드를 플라스미드 내로 클로닝하여 개별 바이러스 패키징 세포 라이브러리를 제조하였다 (W02017112868A1에 기재된 바와 같이, phiC31 인테그라제를 1:50 비 (플라스미드:phiC31)로 사용한 일시적 형질감염에 의해). 생성된 패키징 세포 라이브러리는 돌연변이체 Cap 유전자를 함유하는 벡터 게놈으로 구성된 돌연변이체 AAV 비리온 (상기 유전자는 그 게놈에 의해 코딩되는 캡시드 단백질 내에 패키징됨)을 낮은 수준의 교차 패키징으로 생산한다. 세포 라이브러리의 다양성을 확인하기 위해, gDNA를 각각의 라이브러리로부터 단리하고, NGS를 수행하였다. 다양성은 LIL에서 대략 ~725,000종의 고유한 변이체 및 LSL에서 ~558,000종의 고유한

변이체였다.

- [0238] 실시예 2: NHP 눈에서의 AAV 라이브러리 스크린
- [0239] ILM을 가로지르는 돌연변이체 AAV 캡시드의 능력을 조사하기 위해, 변이체 AAV 비리온의 라이브러리를, 내부 제한 막 (ILM)을 통과하고 비-인간 영장류 (NHP) 눈에서 망막 세포를 감염시키는 능력에 대해 생체내 스크리닝하였다.
- [0240] LIL 및 LSL 돌연변이체 AAV 캡시드 라이브러리를 3마리의 아프리카 녹색 원숭이 (*Chlorocebus sabaeus*)의 눈에 각각 6×10^9 내지 9×10^9 vg/눈의 용량으로 유리체내로 주사하였다. 주사 4 내지 6주 후에, 동물을 희생시키고, 각각의 동물로부터의 망막 조직 체외이식편을 단리하였다. 맥락막 하위-조직을 갖는 유리체 및 망막을 단리하고, 안구를 윤부를 따라 절단하고, 눈의 전방 부분을 폐기하였다. 이어서, 망막을 안배에 부착되게 남기면서 유리체를 제거하였다. 안배를 CO₂-비의존성 배지로 옮겼다. 망막 및 RPE/맥락막을 절단하여 망막 편평-탑재물을 만들었다. 전체 편평-탑재물을 광수용체 층을 아래로 향하게 하여 10 mL의 CO₂-비의존성 배지를 함유하는 10 cm 트랜스-웰 플레이트의 폴리카르보네이트 삽입 막 상에 놓았다. 망막이 삽입물 상에 편평하게 침강되었을 때, 망막이 대기에 노출되도록 배지를 제거하였다.
- [0241] 망막에 인간 Ad5 바이러스 (항생제 또는 항진균제가 없는 뉴로베이슬-A 배지 중에 희석됨)를 1000의 감염 다중도 (MOI)로, 2시간 동안 조직의 상단에 Ad5 용액을 첨가함으로써 형질도입하였다. Ad5 바이러스로의 동시감염을 사용하여 망막 조직에 존재하는 돌연변이체 AAV 비리온으로부터 Cap RNA의 발현을 증가시켜, 후속 검출을 위해 감염된 세포에서 돌연변이체 캡시드 RNA의 양을 증가시켰다.
- [0242] 초기 인큐베이션 후에, 뉴로베이슬-A+ (B27 보충물, 1X 글루타맥스, 1X 항생제-항진균제) 배지를 삽입물의 바닥과 접촉하지만 조직을 덮지 않도록 웰의 바닥에 첨가하고 (~10 ml), 조직 체외이식편을 CO₂ 하에 37°C에서 2일 동안 인큐베이션하였다. 인큐베이션 후, 삽입물을 플레이트로부터 제거하고, 깨끗한 편평 표면 상에 놓고, 도 1a에 제시된 바와 같이 3개의 펀치를 만들었다. 간략하게, RPE/맥락막을 갖는 신경 망막의 5 mm 펀치를 황반으로부터 취하였다. 이어서, 제2 동심 펀치를 10 mm 펀치를 사용하여 만들어 혈관궁 내의 황반 주위의 망막 및 RPE/맥락막의 영역을 단리하였으며, 이를 중심와부근으로 명명하였다. 이어서, 나머지 주변 망막 및 RPE/맥락막을 수집하였다.
- [0243] 이어서, RNA를 각각의 조직 펀치로부터 추출하고, RT-PCR에 이어서 1 라운드의 PCR에 의해 cDNA로 전환시켰다. 이어서, 생성된 PCR 산물을 플라스미드 내로 다시 클로닝하고, 서열분석하여, 원숭이 눈에서 ILM을 성공적으로 가로지를 수 있고 망막 세포를 감염시킬 수 있는 돌연변이체 AAV 캡시드의 서열을 결정하였다.
- [0244] 제2 및 제3 라운드의 스크리닝을 위해, 각각의 개별 망막 위치 (펀치)로부터 추출된 LIL 및 LSL 변이체를 혼합하여 각각의 위치에 대한 변이체의 1개의 라이브러리를 생성하였다. 이어서, 이들 라이브러리 풀을 사용하여 세포 및 AAV 캡시드 라이브러리를 생성하고, 이를 아프리카 녹색 원숭이 (AGM) 눈에 개별적으로 주사하고, 상기와 동일한 망막-펀치 전략을 사용하여 수집하였다. 추가적으로, 한 경우에, 망막 색소 상피를 단리하고, 변이체를 그 조직으로부터 회수하였다.
- [0245] NGS 분석을 사용하여, AAV2.5T.LSV1을 확인하였다. AAV2.5T.LSV1은 하기 아미노산 루프 서열: LAHKFKSGDA (서열식별번호: 3)를 갖는 LSL 라이브러리로부터 기원하는 루프 치환 변이체이다. AAV2.5T.LSV1은 스크리닝 라운드 2에서 황반 영역으로부터 48번째로 가장 풍부한 변이체였다. 스크리닝 라운드 3에서, AAV2.5T.LSV1은 중심와부근에서 발견된 2번째로 가장 풍부한 변이체였고, RPE 영역에서 발견된 가장 풍부한 변이체였다. 각각의 스크리닝 라운드에서 상위 변이체의 상대 존재비가 도 1b-1e에 제시된다.
- [0246] 실시예 3: HEK293 세포에서의 AAV2.5T.LSV1의 생산
- [0247] AAV2.5T.LSV1을 HEK293 세포에서 삼중 형질감염 방법을 사용하여 추가로 특징화하기 위해 제조하였다. 생성된 AAV2.5T.LSV1 역가는 1×10^{13} vg/ml 초과였으며, 이는 AAV2.5T.LSV1이 우수한 패키징 능력을 갖는다는 것을 입증한다.
- [0248] 실시예 4: AAV2.5T.LSV1의 헤파린 결합 친화도
- [0249] 사전-패킹된 GE 헤파린 칼럼을 사용하여 헤파린 결합 검정을 수행함으로써 HSPG에 결합하는 AAV2.5T.LSV1의 능력을 평가하였다. AAV2.5T.LSV1의 헤파린 결합을 AAV2.5T 및 상기 기재된 스크린에서 생산된 2종의 다른 변이

체와 비교하였다. 벡터를 칼럼 상에 로딩하고, 이어서 이를 세척하고, 최종적으로 증가하는 농도의 NaCl (100 mM - 1 M)로 용리시켰다. 로드, 관통, 세척 및 용리의 분획을 수집하고, B1 항체를 사용하여 도트-블롯에 의해 분석하였다.

[0250] 도 2에 제시된 바와 같이, AAV2.5T는 헤파린에 결합하지 않는다. 대조적으로, AAV2.5T.LSV1은 헤파린에 결합하는 능력을 갖는다.

[0251] 실시예 5: 돼지 망막 체외이식편에서의 발현 및 형성

[0252] 생체의 돼지 망막 체외이식편을 PCT/US2017/030636 (이의 개시내용은 그 전문이 포함됨)에 기재된 바와 같이 트랜스-웰 상에서 유지하고, 2×10^{10} vg 또는 4×10^{10} vg로 AAV2.5T.LSV1 캡시드 내로 패키징된 GFP 리porter 유전자를 형질도입하였다. 라이브 형광 영상을 형질도입 1 및 2주 후에 캡처하였다. 도 3은 돼지 망막 체외이식편의 라이브 영상화를 보여준다. 이들 영상은 AAV2.5T.LSV1이 배양물 내의 돼지 망막의 적어도 일부 세포에 효율적으로 형질도입할 수 있다는 것을 시사한다.

[0253] 실시예 6: 비-인간 영장류 망막에 대한 유리체내 투여 후 발현

[0254] 편재성 프로모터의 제어 하에 GFP 발현 카세트를 보유하는 AAV2.5T.LSV1 5×10^{11} vg/눈이 유리체내로 주사된 아프리카 녹색 원숭이 (클로로세부스 사바에우스)에서 생체내 연구를 수행하였다. 눈에서의 발현을 안저 형광 및 하이텔베르크 스펙트랄리스 영상화에 의해 매주 모니터링하였으며, 이는 도 4a-4e에 제시된다. AAV2.5T.LSV1-GFP의 유리체내 전달은 황반 및 혈관궁 내에서 GFP 발현을 가져왔다. 망막의 혈관궁 영역은 가장 두꺼운 ILM을 가지며, 이는 유리체내로 주사되는 경우에 대부분의 AAV에 의한 망막 세포의 형질도입을 차단하는 것으로 생각된다.

[0255] 실시예 7: 유리체내 투여 후 발현의 평가

[0256] IVT 주사 후 비-인간 영장류에서 AAV2.5T.LSV1의 망막 형성을 평가하였다.

[0257] AAV2.5T.LSV1의 형성을 평가하기 위해, 아프리카 녹색 원숭이 (클로로세부스 사바에우스)에게 편재성 프로모터의 제어 하에 GFP 발현 카세트를 보유하는 AAV2.5T.LSV1 5×10^{11} vg/눈을 유리체내로 (IVT) 주사하였다.

[0258] 원숭이를 IVT 주사 후 제35일에 희생시키고, 눈을 적출하였다. 눈을 적출시 24시간 동안 4% 파라포름알데히드 중에 고정시킨 다음, 30% 수크로스/소렌슨 포스페이트 완충제로 밤새 동결보호하였다. 눈을 4분면으로 절개하고, RPE 및 맥락막을 포함한 망막을 공막으로부터 제거하였다. 망막 4분면을 슬라이드 상에 편평-탑재하고, 30% 수크로스/소렌슨 포스페이트 완충제 하에 커버 슬립을 덮었다. 자이스 악시오.Z1을 사용하여 천연 GFP의 5X 타일 스캔을 획득하고, 자이스 젠 블루 소프트웨어를 사용하여 스티칭하였다. AAV2.5T.LSV1-GFP에 대한 생성된 라이브 형광 영상이 도 5a-5d에 제시된다.

[0259] 도 5c-5d에 제시된 편평-탑재된 망막의 부분의 5X 스캔으로부터 GFP 강도 프로파일을 획득하였다. 시신경에 가장 가까운 황반의 가장자리로부터 모양체까지 측정을 수행하였다. 길이가 총 20 mm에 걸친 약 20,000개의 측정 점을 황반으로부터 모양체까지의 거리에 걸쳐 플롯팅하였다 (도 5e).

[0260] 망막 편평-탑재물을 OCT 마운팅 배지에 포매하고, 이소펜탄 상에서 동결시켰다. 동결-절편을 중심와, 중간주변부 및 주변부를 통해 10 μ m 두께로 수집하고, 면역형광 표지 (IFL)를 위해 슬라이드를 염색하였다. 편평-탑재된 망막의 절편에서 맥락막으로부터 RPE를 벗겨내고, 절편을 뒤집어 RPE가 슬라이드 상에 아래를 향하도록 놓은 후, 이를 IFL를 위해 염색함으로써 RPE의 평면 영상을 만들었다. 30분 동안 0.1% 트리톤-x 투과화, 이어서 1시간 동안 소렌슨 포스페이트 완충제 중 5% 정상 당나귀 혈청/6% 소 혈청 알부민에 의한 혈청 단백질 차단 후 IFL을 수행하였다. 표 2에 제시된 염색제 및 항체를 사용하여 4°C에서 밤새 IFL을 수행하였다.

[0261] 표 2: 염색제 및 항체

마커 유형	1차 항체 또는 염색제	1차 항체 또는 염색제의 판매업체	1차 항체 또는 염색제의 농도	2차 항체	2차 항체의 판매업체	2차 항체의 농도
유전자 산물 발현	GFP	압캠 cat# ab13970	1:1000	당나귀-항 닭 488	잭슨 이뮤노리서치 Cat# 703-545-155	5µg/ml
간상 광수용체 세포	로돕신	밀리포어 시그마 Cat# MABN15	1:2500	당나귀 항-마우스 알렉사 플루오르 555	써모 사이언티픽 Cat# A-31570	5µg/ml
뮐러 세포	글루타민 신테타제	시그마 Cat# G2781	1:20000	당나귀 항-토끼 알렉사 플루오르 647	써모 사이언티픽 Cat# A-31573	5µg/ml
양극성 세포	PKC-알파	인비트로젠 Cat# MA1-157	1:50	당나귀 항-마우스 알렉사 플루오르 555	써모 사이언티픽 Cat# A-31570	5µg/ml
망막 신경절 세포체	감마 시뉴클레인	압캠 Cat#	1:100	당나귀 항-토끼 알렉사 플루오르 647	써모 사이언티픽 Cat# A-31573	5µg/ml
원추 광수용체 세포	원추 아레스틴	밀리포어 시그마 Cat# AB15282	1:500	당나귀 항-토끼 알렉사 플루오르 647	써모 사이언티픽 Cat# A-31573	5µg/ml
망막 신경절 축삭 말단 경로	항-베타 III 튜블린 (Tuj-1)	압캠 Cat# ab7751	1:500	당나귀 항-마우스 알렉사 플루오르 555	써모 사이언티픽 Cat# A-31570	5µg/ml
망막 색소성 상피 (RPE)	RPE-65	압캠 cat# ab78036	1:200	당나귀 항-마우스 알렉사 플루오르 555	써모 사이언티픽 Cat# A-31570	5µg/ml
핵	DAPI	인비트로젠 Cat# D21490	5µg/ml			

[0262]

[0263] 조직 절편을 영상화하였으며, 생성된 영상은 도 6a-25e에 제시된다. 향성을 입증한 세포 유형 AAV2.5T.LSV1 비리온의 요약은 표 3에 제시된다.

[0264] 표 3: 비리온의 향성

	중심와	망막
뮐러 세포	예	예
광수용체	원추	원추 > 간상
양극성 세포	예	예
내부 총상층 내의 축삭 말단	양극성 세포	양극성 세포
망막 색소성 상피		예

[0265]

[0266] 세포-특이적 마커와의 공동국재화의 수동 세포 카운팅에 의해 GFP 양성 세포의 백분율을 정량화하였다. 망막 내의 다양한 영역에서의 GFP 양성 양극성 세포, 원추 세포 및 RPE 세포의 수가 각각 도 26a-26c에 제시되고, 표 4에 요약된다. GFP 양성 세포의 수는 망막에서의 위치에 따라 달랐다.

[0267] 표 4: GFP 양성 세포의 백분율

세포 유형 (위치)	총 대비 %
원주 (중심와)	14-16%
광수용체 (중간 및 주변 망막)	25-55%
양극성 세포 (중간 및 주변 망막)	25-50%
RPE 세포 (중간 및 주변 망막)	2.5-4%

[0268]

[0269] 실시예 8: 중화 항체 프로파일의 결정

[0270] 시험관내 검정에 의해 AAV2.5T.LSV1 및 AAV2.5T 바이러스에 대해 중화 항체 (nAB) 프로파일을 결정하였다. 간략하게, 폴링된 인간 IgG 항체 (감마가드 IVIG)의 연속 희석물을 GFP를 발현하는 AAV2.5T.LSV1 또는 AAV2.5T 벡터와 합하고, 이를 사용하여 293T 세포에 형질도입하였다. GFP 발현을 후속적으로 측정하고, GFP 발현의 억제제를 사용하여 IC₅₀을 계산하였다.

[0271] 실시예 9: AAV2.5T.LSV1 및 AAV2의 중화 항체 프로파일의 비교

[0272] 시험관내 검정에 의해 AAV2.5T.LSV1 및 AAV2 바이러스에 대해 중화 항체 (nAB) 프로파일을 결정하였다. 간략하게, 폴링된 인간 IgG 항체 (감마가드 IVIG)의 3배 연속 희석물을 제조하고, GFP를 발현하는 AAV2.5T.LSV1 또는 AAV2 벡터 (각각 AAV2.5T.LSV1-CMV-GFP 또는 AAV2-CMV-GFP)와 합하였다. 이어서, 혼합물을 사용하여 293T 세포에 형질도입하였다. 세포를 3일 동안 인큐베이션하고, GFP 발현을 후속적으로 측정하였다. GFP 발현의 억제제를 사용하여 IC₅₀을 계산하였다. IC₅₀은 GFP 발현이 50%만큼 감소되는 폴링된 인간 IgG 항체 샘플의 역 희석으로서 보고된다 (예로서, IC₅₀ 100은 1:100 희석된 IVIG가 GFP 발현을 50%만큼 감소시켰음을 나타냄). 보다 큰 IC₅₀ 값은 폴링된 인간 IgG 항체에 존재하는 항체에 의한 AAV 형질도입의 증가된 억제를 나타낸다.

[0273] AAV2.5T.LSV1 및 AAV2에 대한 억제 곡선이 도 27a-27b에 제시된다. AAV2는 계산된 IC₅₀이 103.8이고, AAV2.5T.LSV1은 계산된 IC₅₀이 9.3이었다.

[0274] 서열

#	서열	주석
1	HKFKSGD	LSV1 삽입물 1
2	X ₁ X ₂ HKFKSGDX ₃	LSV1 삽입물 2
3	LAHKFKSGDA	LSV1 삽입물 3
4	MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLAEGPPKPKPNQQHQDQA RGLVLPGYNYLGPNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQL EAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKK RVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTS SDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQ GADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNNH QYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYDFNRFHSHWSPRD WQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLTS TVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYAT LNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVVF HSSFAPSQNLFLKANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLA GRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNR MELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPAN PGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQSS TTAPATGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGAHF HPSPAMGGFGLKHPPMMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQ YSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPFIQYTNNYNDPQFVDF APDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL	AAV5 VP1
5	MAADGYLPDWLEEDTLSEGRQWVKLKPGRPPPKPAERHKDD SRGLVLPGYKYLGPNGLDRGEPVNEADAAALEHDKAYDR QLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAK KRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPS TSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNN QGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNN HQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYDFNRFHSHWSPRD DWQRLINNYWGFRRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANL TSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGY ATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEV PFHSSFAPSQNLFLKANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNL AGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTN RMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPA NPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMATNNQS STTAPTGTYNLQEI VPGSVWMERDVYLGPIWAKIPETGAH FHPSPAMGGFGLKHPPMMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQ YSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPFIQYTNNYNDPQFVDF APDSTGEYRTRTRPIGTRYLTRPL	AAV2.5T VP1
6	MSFVDHPPDWLEEVGEGLREFLGLAEGPPKPKPNQQHQDQA RGLVLPGYNYLGPNGLDRGEPVNRADDEVAREHDISYNEQL EAGDNPYLKYNHADADEFQEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKK	AAV5.LSV1 VP1

[0275]

	RVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTS SDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNNQ GADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNH QYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRD WQRLINNYWGFPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNLTS TVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPPQYGYAT LNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNEFTYNFEEVFPF HSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLA GRYANTYKNWFPMPMGRTOGWNLGSGVNRASVSASFATTNR MELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPAN PGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFKS GDAPATGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAH FHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQ YSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDF APDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL	
7	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPGPPPKPAERHKDD SRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEPVNEADAALEHDKAYDR QLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAK KRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPS TSSDAEAGPSGSQQLQIPAPASSLGADTMSAGGGGGLGDNN QGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNN HQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRD DWQRLINNYWGFPRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANNL TSTVQVFTDDDDYQLPYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPPQYGY ATLNRDNTENPTERSFFCLEYFPSKMLRTGNNEFTYNFEEV PFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNL AGRYANTYKNWFPMPMGRTOGWNLGSGVNRASVSASFATTNR RMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPA NPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFK SGDAPTTGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAH FHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQ YSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDF APDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL	AAV2.5T.LSV 1 VPI
8	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQA PGKGLEWVGVWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWFYFDVWGQGT	베바시주맵 중쇄 가변 도메인
9	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGK APKVLIIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTV	베바시주맵 경쇄 가변 도메인
10	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYDFTHYGMNWVRQA PGKGLEWVGVWINTYTGEPTYAADFRRFTFSLDTSKSTAYLQ MNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWFYFDVWGQGT	라니비주맵 중쇄 가변 도메인
11	DIQLTQSPSSLSASVGRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKA PKVLIYFTSSLHSGVPSRFSGSGGTDFTLTISLQPEDFATYY CQQYSTVPWTFGQGTKEIKRTV	라니비주맵 경쇄 가변 도메인

[0276]

12	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSDTGRPFVEMYSEIPEI IHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLKKFPLDTLIPDGKRIIWSR KGFIIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQNTIIDV VLSPSHGIELSVGEKLVNCTARTELVNGIDFNWEYPSSKHQ HKKLVNRDLKTQSGSEMKKFSLTLTIDGVTRSDQGLYTCAAS SGLMTKKNSTFVRVHEKDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEVESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNYHTQKSLSLSPGK	아플리베르셉 트
13	MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGSKLDPELSLKGTOHI AGQTLHLQCRGEAAMQHKWLSPEMVSKESELSITKSACGR NGKQFCSTLTLNNTAQANHTGFYSCKYLAVPTSKKKETESAIY IFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSNITVTLK KFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGH LYKTNYLTHRQNTIIDVQISTPRPVKLLRGHTLVNCTATTP LNTRVQMTWSYPDEKNKRASVRRRIDQSNSHANIFYSLTID KMQNKDKGLYTCRVRSGPSFKSVNTSVHIYDKAFITVKHRK QQVLETVAGKRSYRLSMKVKAFPSPEVVWLKDGLPATEKSA RYLTRGYSLIIDVTEEDAGNYTILLSIKQSNVFNLTATLIVN VKPQIYEKAVSSFPDPALYPLGSRQ	sFlt-1
14	IYIFISDTGRPFVEMYSEIPEIHMTEGRELVIPCRVTSNITVTL KKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNG HLYKTNYLTHRQNTI	sFlt-1 단편
15	EIVMTQSPSTLSASVGDVRIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKA PKLLIYLASTLASGVPSRFGSGSGAEFTLTISSLPDDFATYY CQNVYLASTNGANFGQGTCLTVLGGGGSGGGGGSGGGGGSG GGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYMTW VRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGGQGLVTV SS	브롤루시주맵
16	TAPTGKRIDDHFPKRKKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGSQQL QIPAQPASSLGADTMSAGGGGLGDNNQGADGVGNASGDW HCDSTWMGDRVVTKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDG NANAYFGYSTPWGYYFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGR PRSLRVKIFNIQVKEVTVQDSTTTIANLNTSTVQVFTDDDYQL PYVVGNGTEGCLPAFPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERS SFFCLEYFPSKMLRTGNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKL ANPLVDQYLRFVSTNNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFP GPMGRTQGWNLGSGVNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPP QPNGMTNNLQGSNTYALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNM LITSESETQPVNRVAYNVGGQMLAHKFKSGDAPTTGTYNLQ EIVPGSVWMERDVYLQGPWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLK HPPPMMLIKNTPVPGNITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEW ELKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPI GTRYLTRPL	AAV5.LSV1 VP2

17	MSAGGGGLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVV TKSTRTWLPSYNNHQYREIKSGSVDGSNANAYFGYSTPWG YFDFNRFHSHWSPRDWQRLINNYWGRPRSLRVKIFNIQVKE VTVQDSTTTIANLNTSTVQVFTDDDYQLPYVVGNGTEGCLPA FPPQVFTLPQYGYATLNRDNTENPTERSSFFCLEYFPSKMLRT GNNFEFTYNFEEVPFHSSFAPSQNLFKLANPLVDQYLRFVST NNTGGVQFNKNLAGRYANTYKNWFPMPGRTQGWNLGSG VNRASVSFAFATTNRMELEGASYQVPPQPNGMTNNLQGSNTY ALENTMIFNSQPANPGTTATYLEGNMLITSESETQPVNRVAY NVGGQMLAHKFKSGDAPTTGTYNLQEIIVPGSVWMERDVYL QGPWAKIPETGAHFHSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPG NITSFSDVPVSSFITQYSTGQVTVEMEWELKKENSKRWNPEIQ YTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTRPIGTRYLTRPL*	AAV5.LSV1 VP3
----	---	------------------

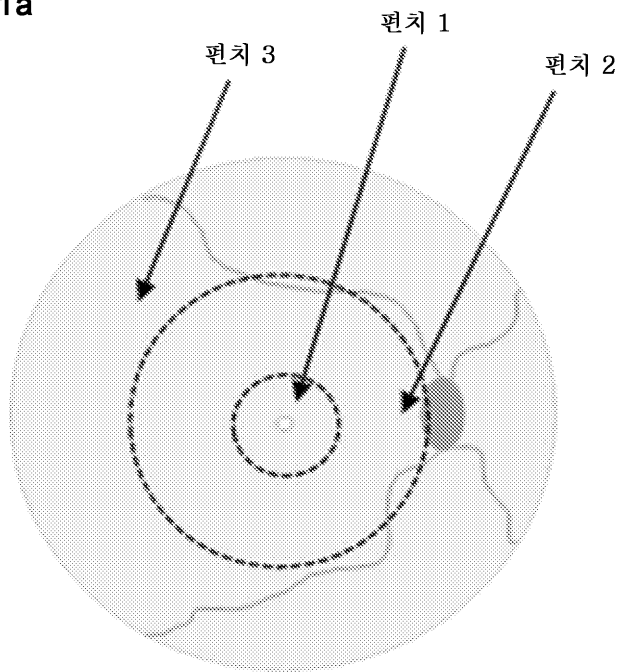
[0277]

[0278]

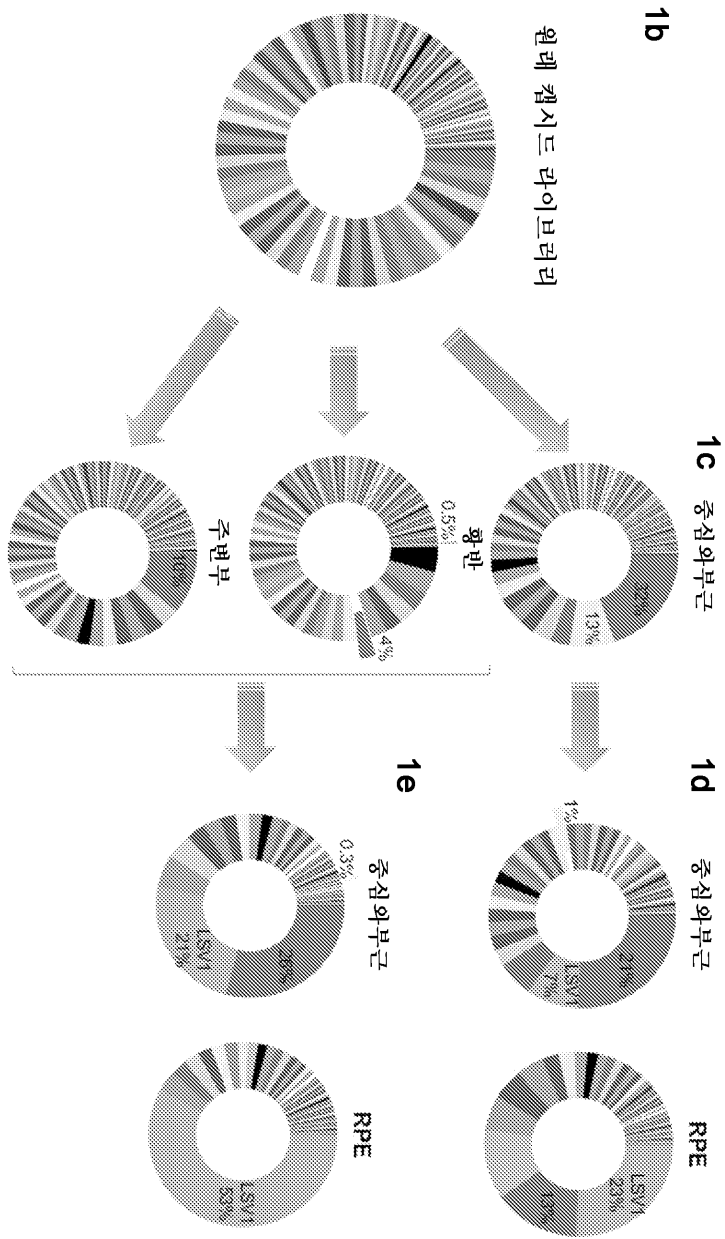
도면

도면1i

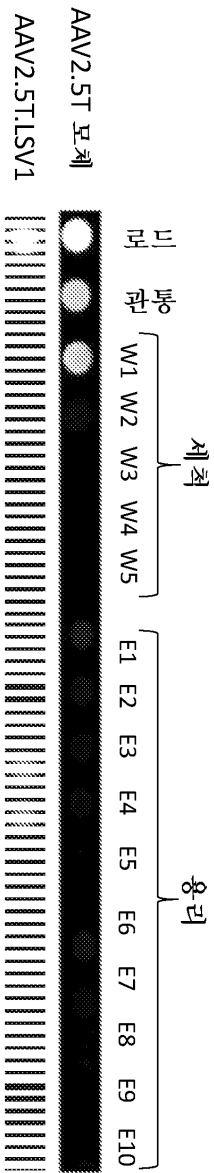
1a



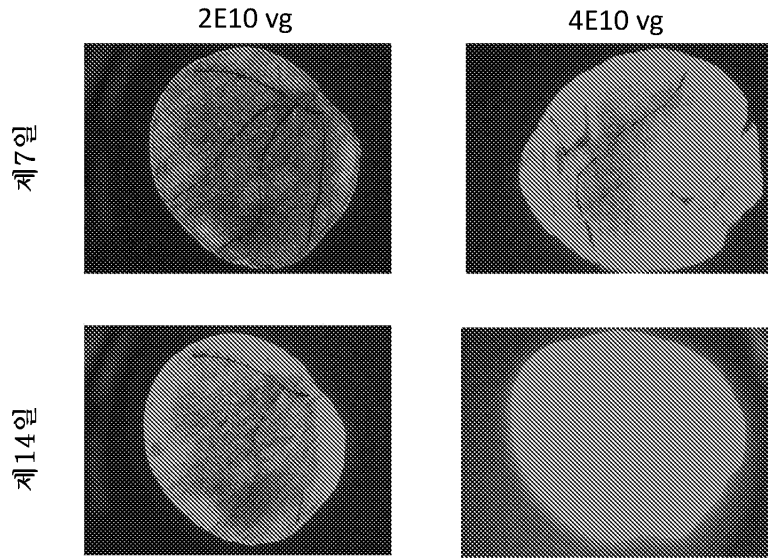
도면1ii



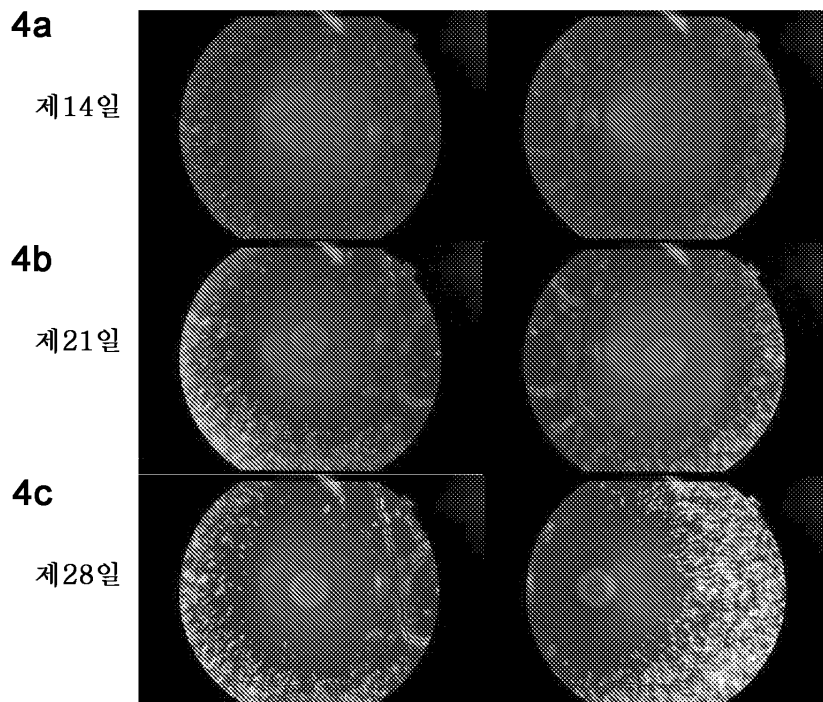
도면2



도면3

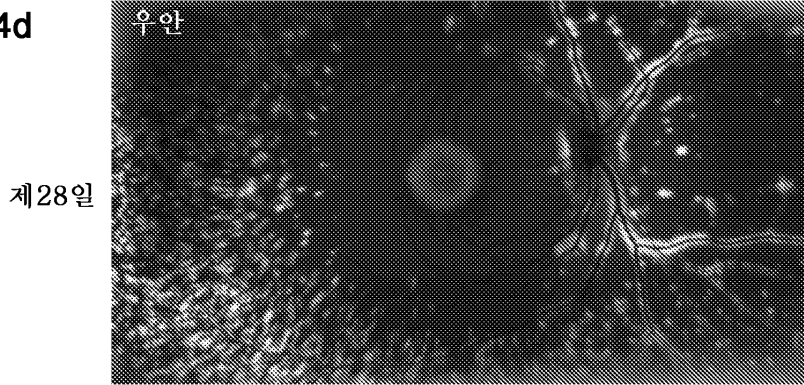


도면4i

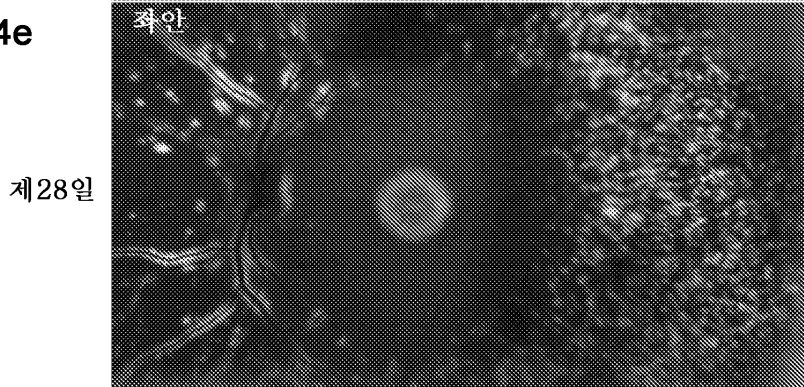


도면4ii

4d

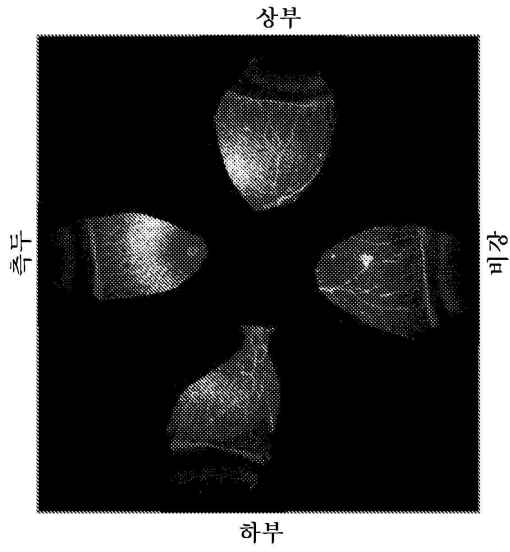


4e

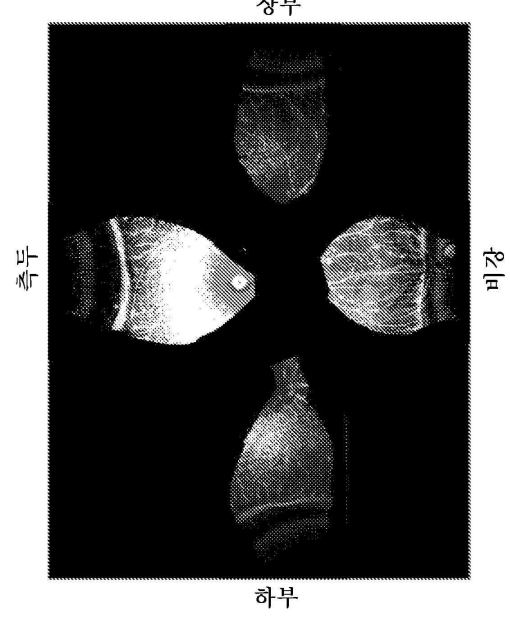


도면5i

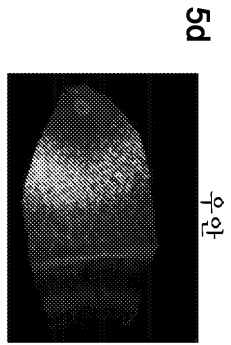
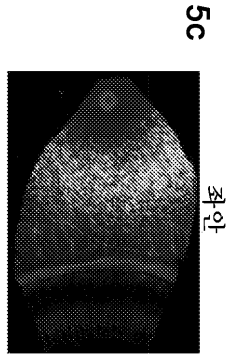
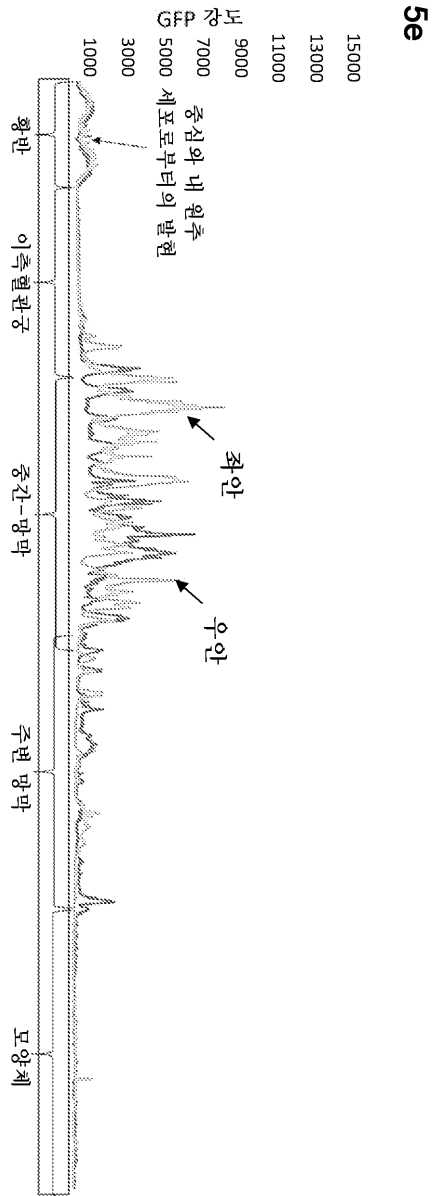
5a



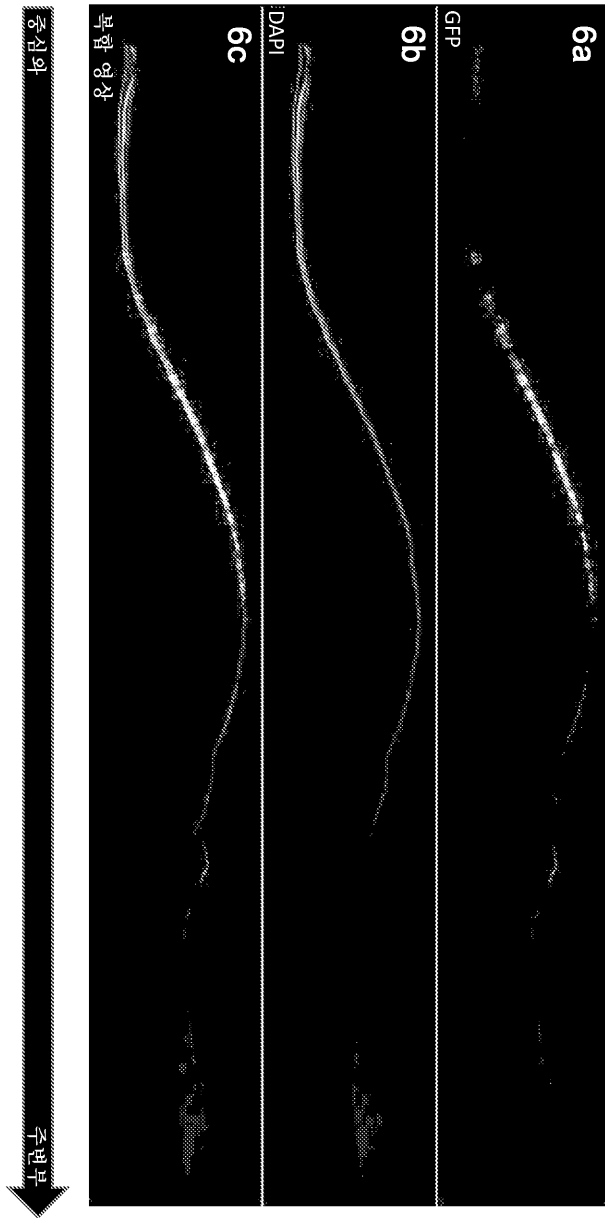
5b



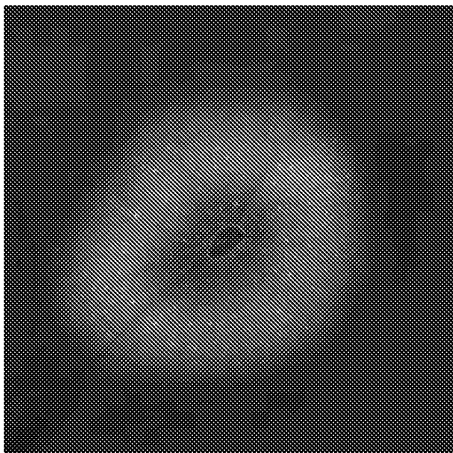
도면5i



도면6



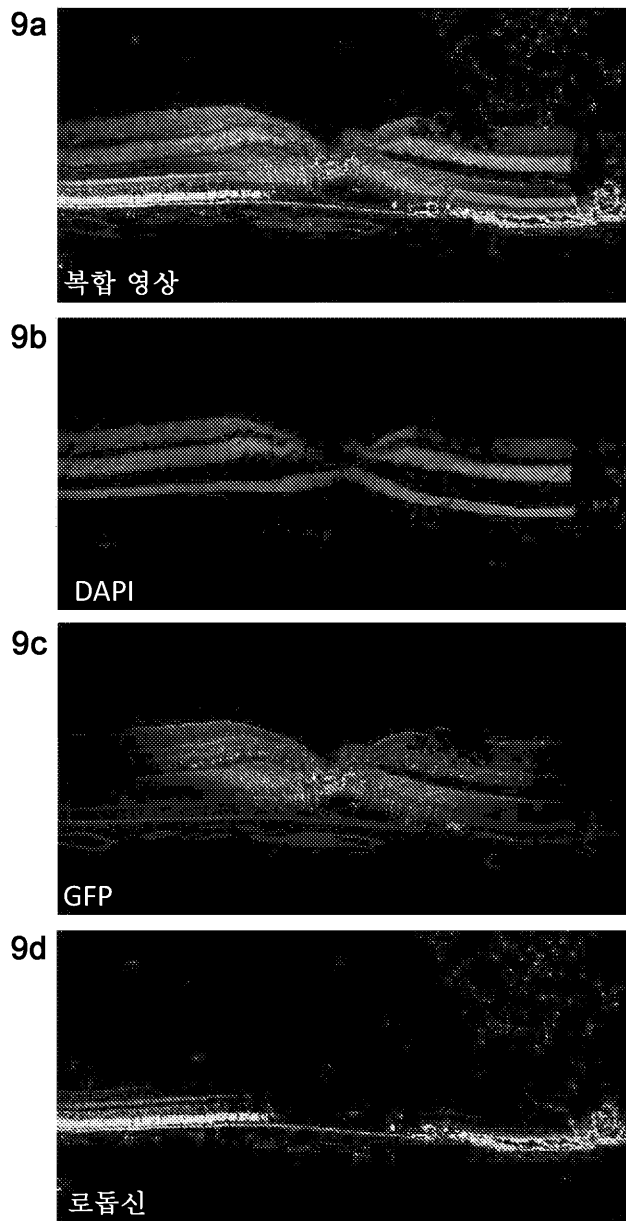
도면7



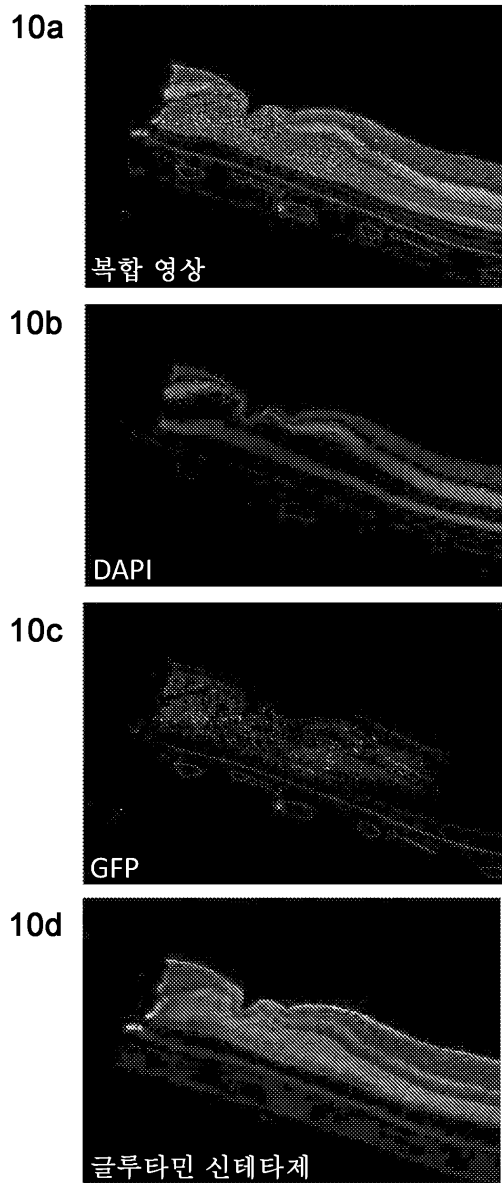
도면8



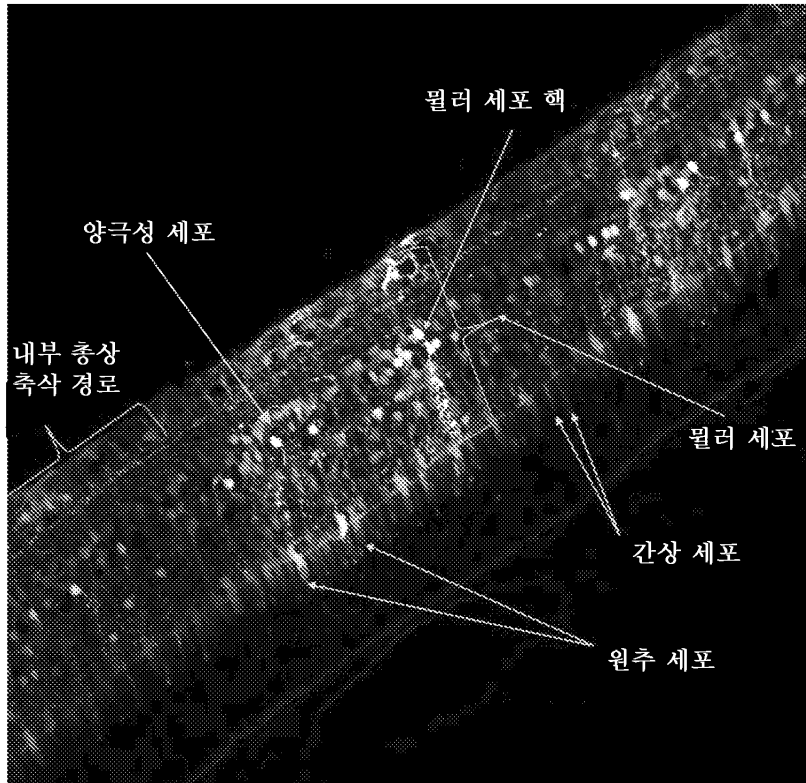
도면9



도면10

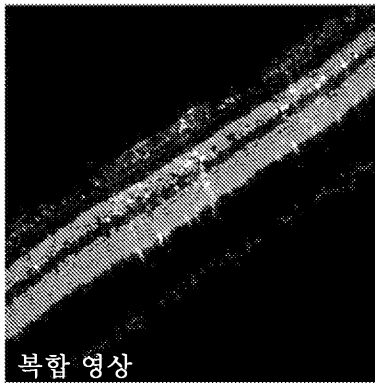


도면11

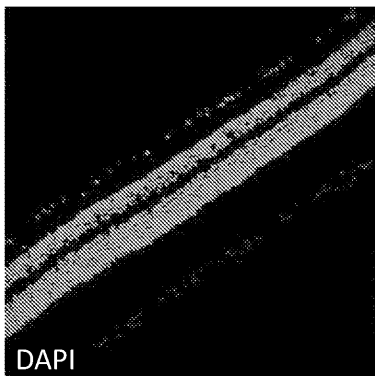


도면12

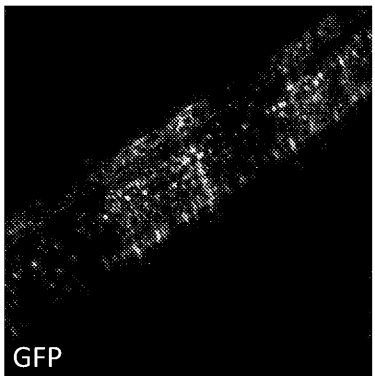
12a



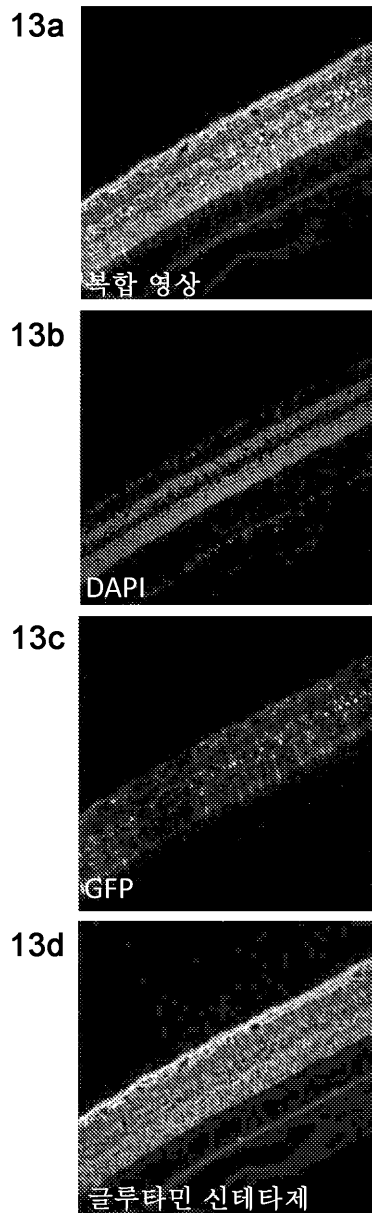
12b



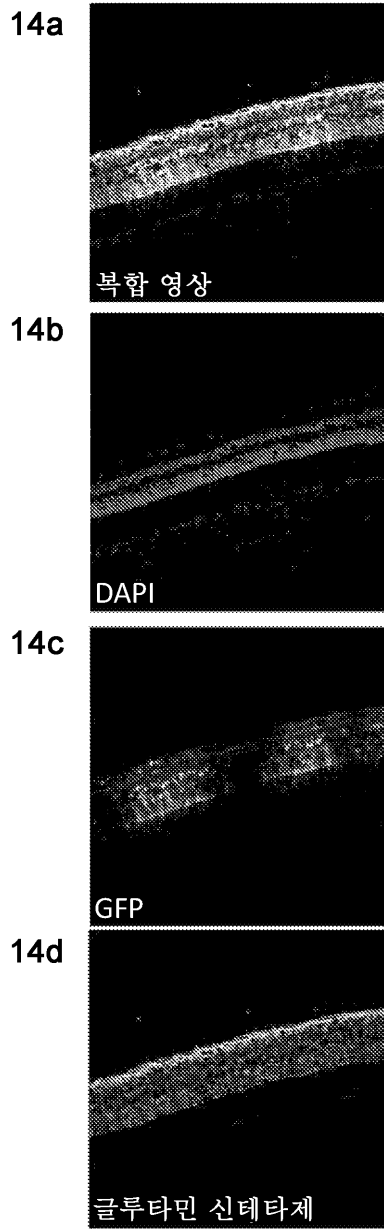
12c



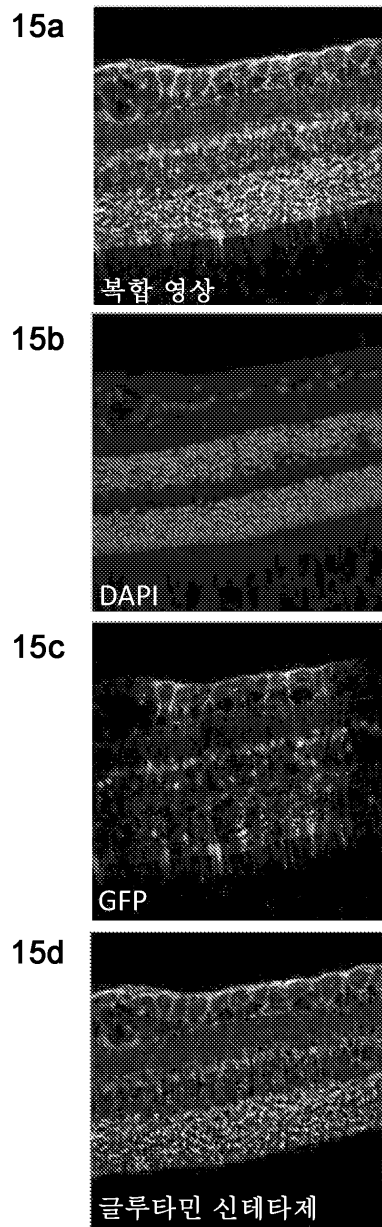
도면13



도면14

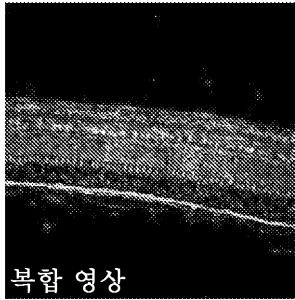


도면15

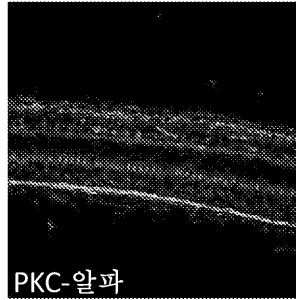


도면16

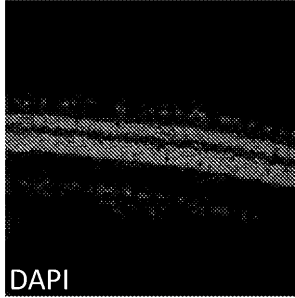
16a



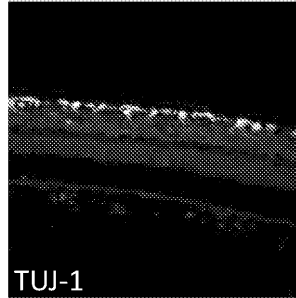
16d



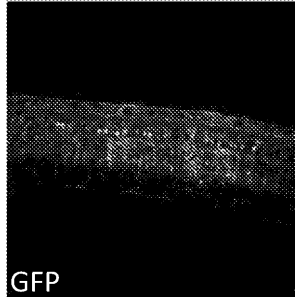
16b



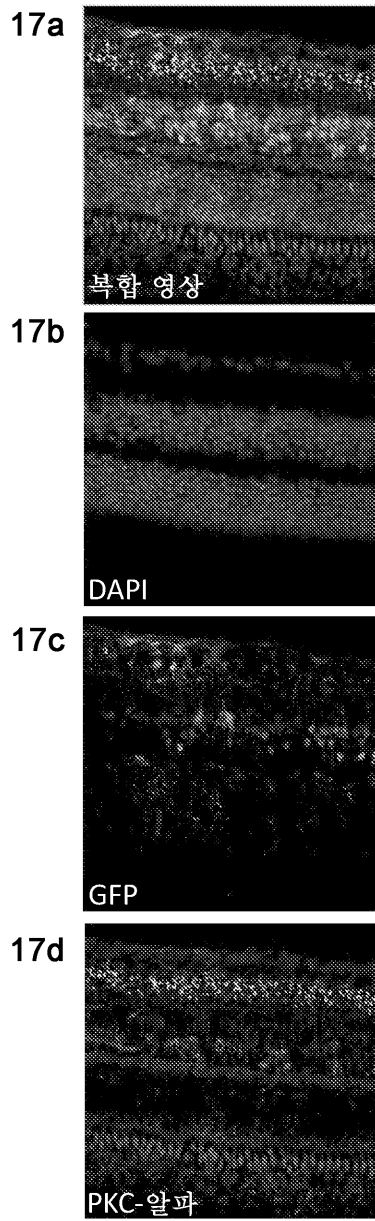
16e



16c

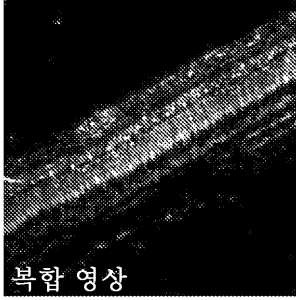


도면17

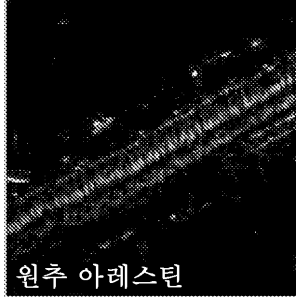


도면18

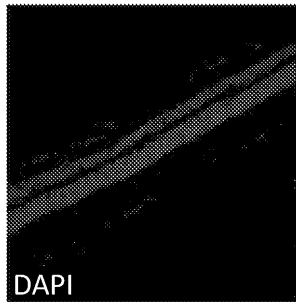
18a



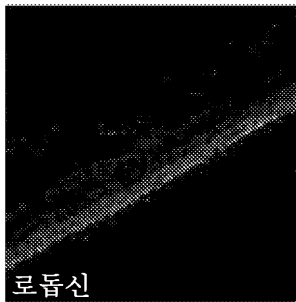
18d



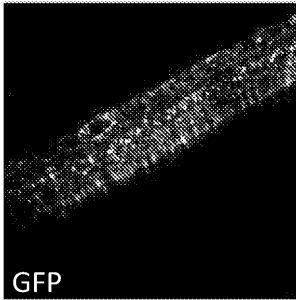
18b



18e

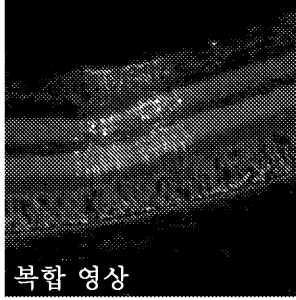


18c



도면19

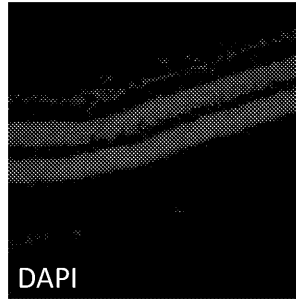
19a



19d



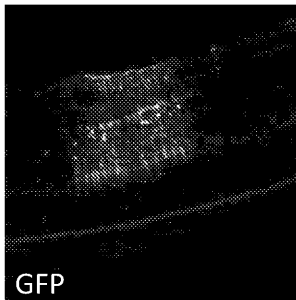
19b



19e

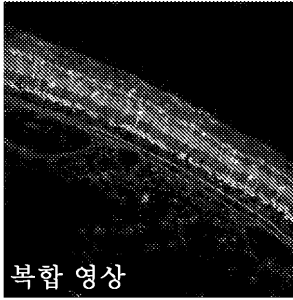


19c



도면20

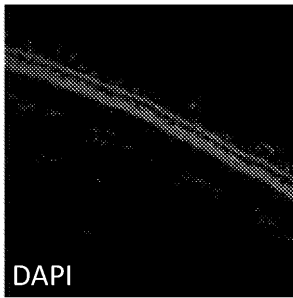
20a



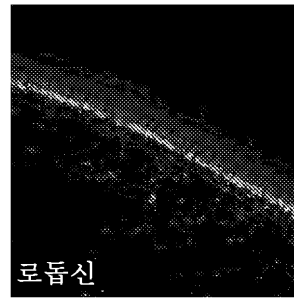
20d



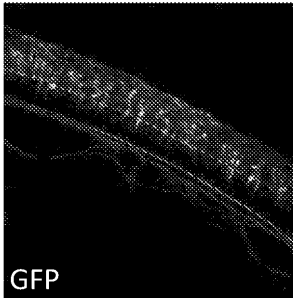
20b



20e

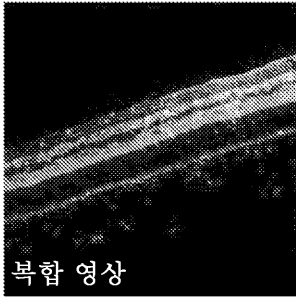


20c

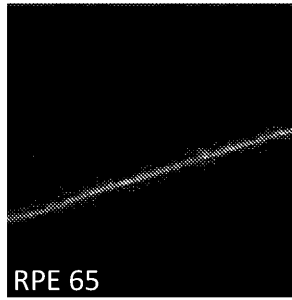


도면21

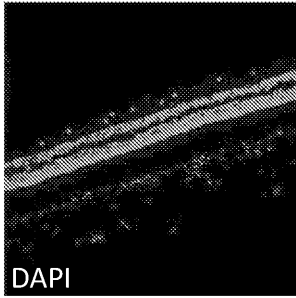
21a



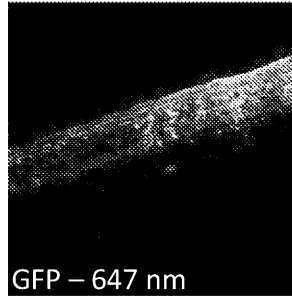
21d



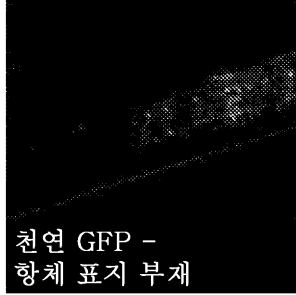
21b



21e

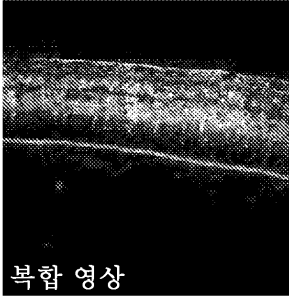


21c

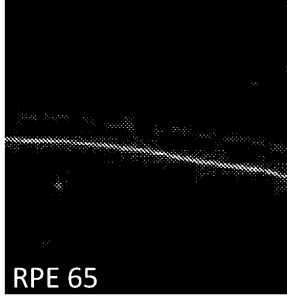


도면22

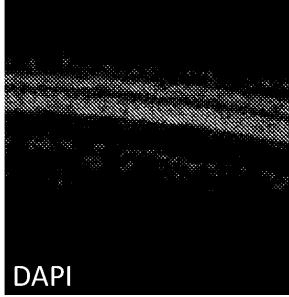
22a



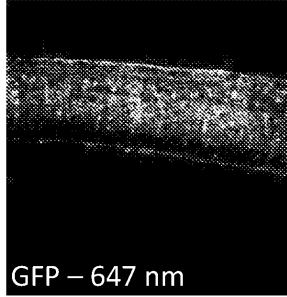
22d



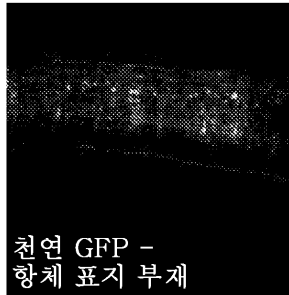
22b



22e

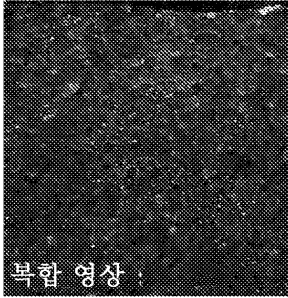


22c

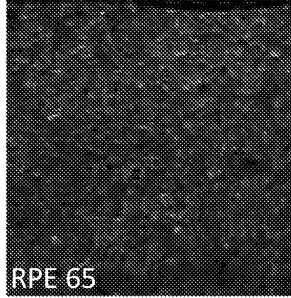


도면23

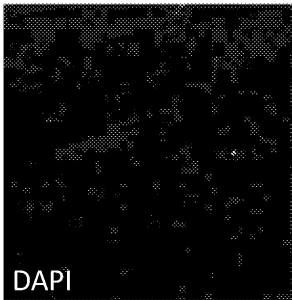
23a



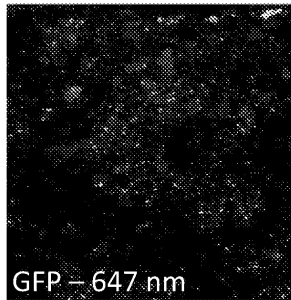
23d



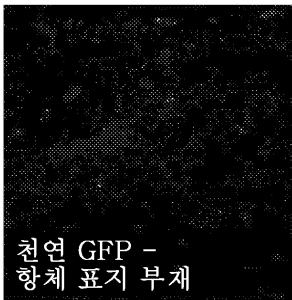
23b



23e

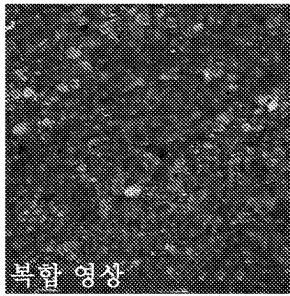


23c

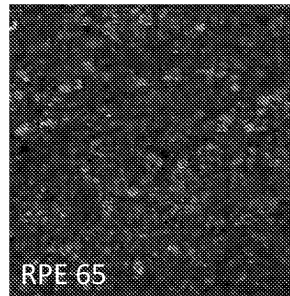


도면24

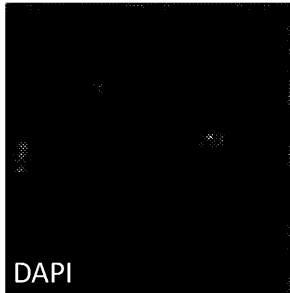
24a



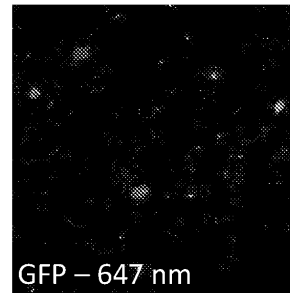
24d



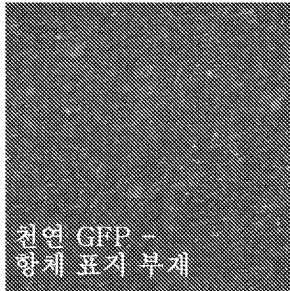
24b



24e

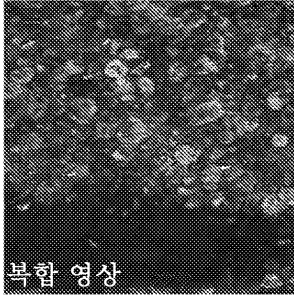


24c

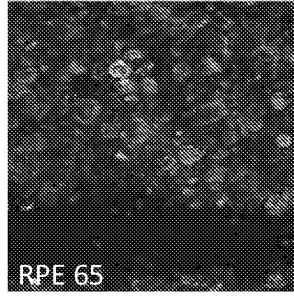


도면25

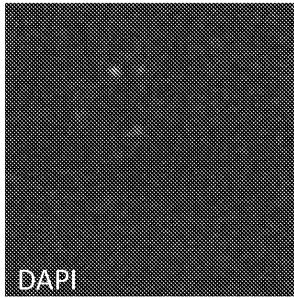
25a



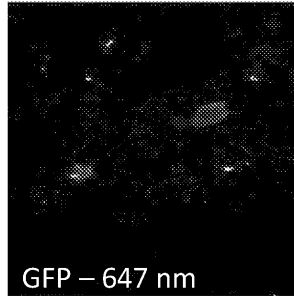
25d



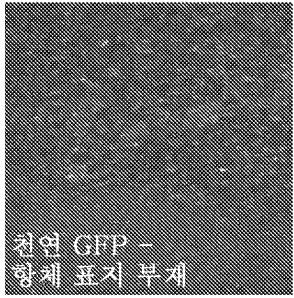
25b



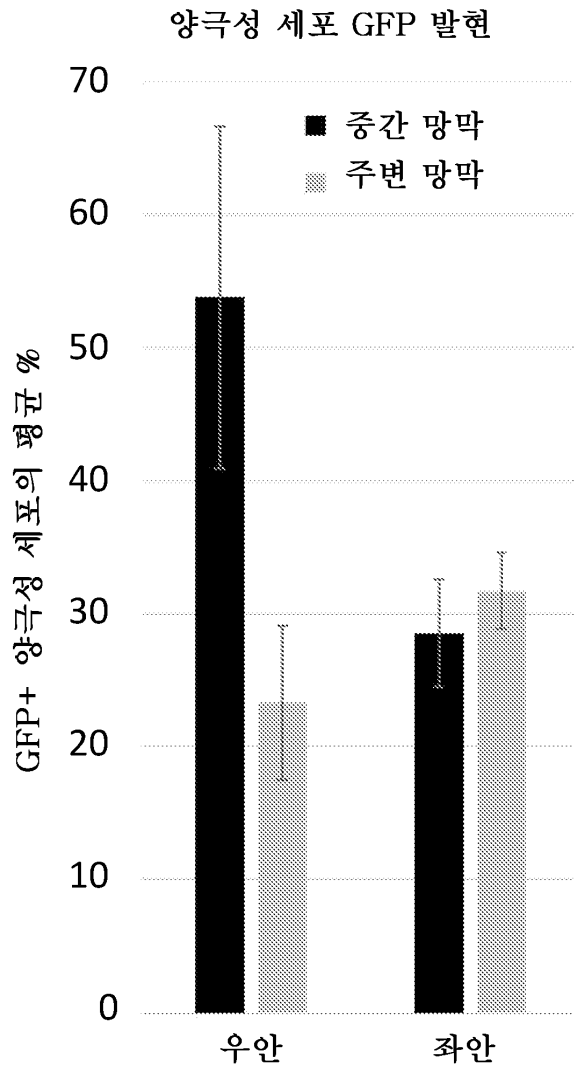
25e



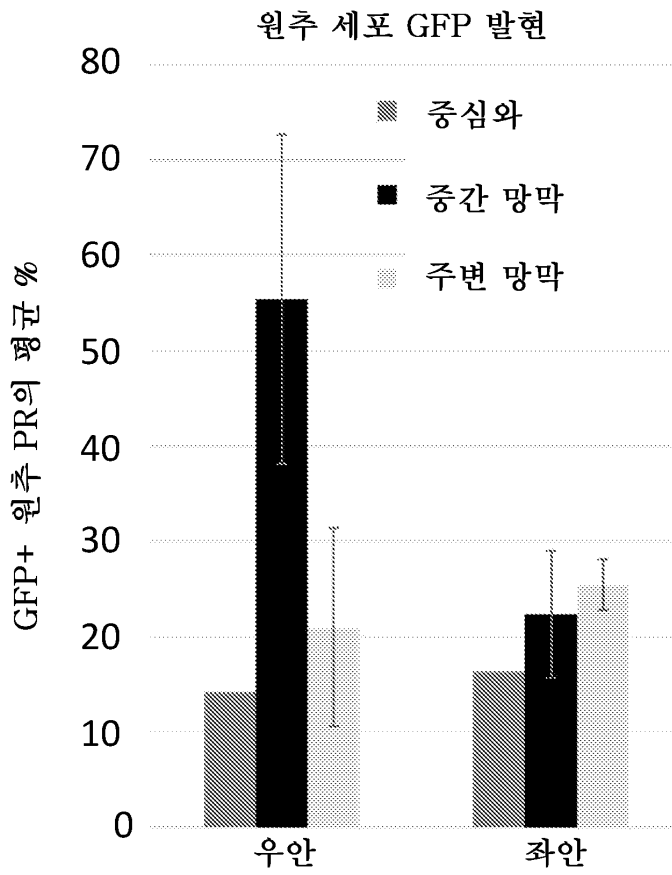
25c



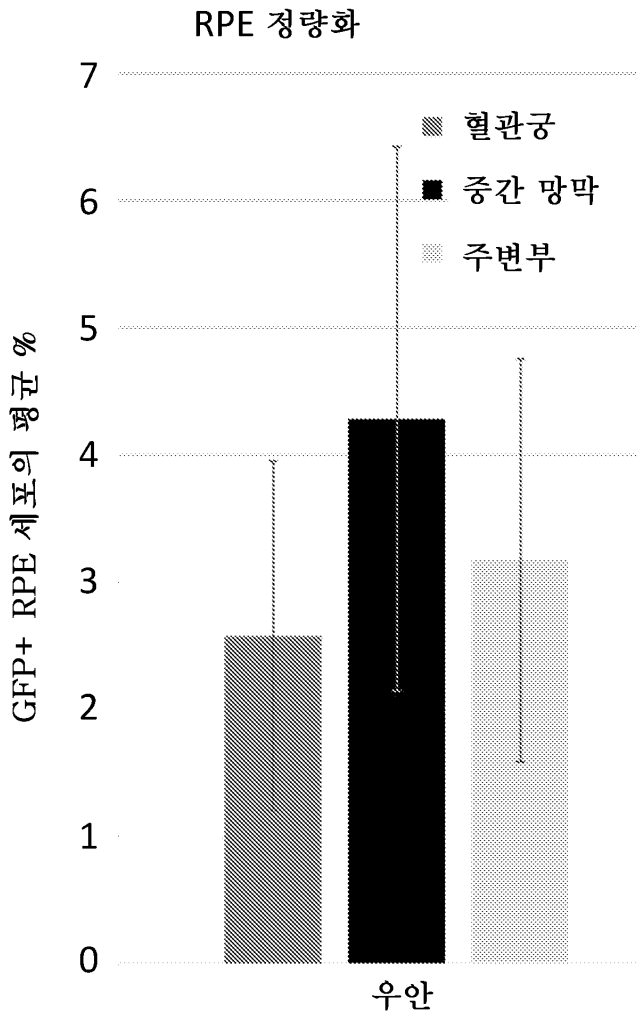
도면26a



도면26b

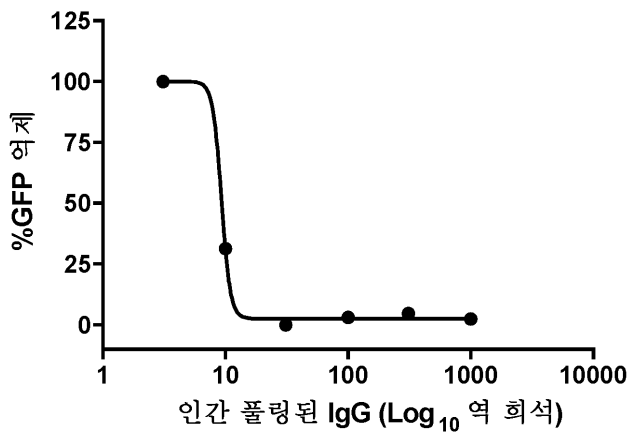


도면26c

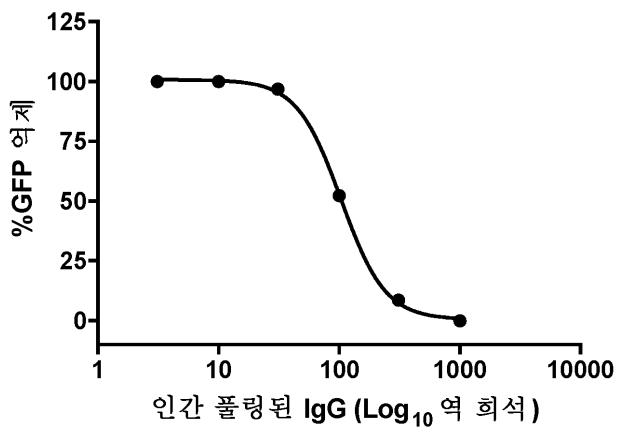


도면27

27a



27b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> ADVERUM BIOTECHNOLOGIES, INC

<120> VARIANT AAV CAPSIDS FOR INTRAVITREAL DELIVERY

<130> 62700-20011.40

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith

<150> US 62/923,924

<151> 2019-10-21

<150> US 62/839,548

<151> 2019-04-26

<160> 17

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 1

His Lys Phe Lys Ser Gly Asp

1 5

<210> 2

<211> 10

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<220>

<221> VARIANT

<222> 1, 2, 10

<223> Xaa = Any Amino Acid

<400> 2

Xaa Xaa His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Xaa

1 5 10

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 3

Leu Ala His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Ala

1 5 10

<210> 4

<211> 724

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223

> Synthetic Construct

<400> 4

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu

1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val

50 55 60

Asn Arg Ala Asp Glu Val Ala Arg Glu His Asp Ile Ser Tyr Asn Glu

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala

195 200 205

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly
 465 470 475 480
 Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu
 485 490 495
 Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr
 500 505 510

 Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile
 515 520 525
 Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu
 530 535 540
 Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg
 545 550 555 560
 Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser
 565 570 575

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

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

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

Gln Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp
 180 185 190

Thr Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly
 195 200 205

Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr
 210 215 220

Trp Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu
 225 230 235 240

Pro Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val
 245 250 255

Asp Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly
 260 265 270

Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp
 275 280 285

Gln Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg
 290 295 300

Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Val Gln Asp Ser
 305 310 315 320

Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr
 325 330 335

Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly
 340 345 350

Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly
 355 360 365

Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser
 370 375 380

Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400

Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser
 405 410 415

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

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

<210> 6

<211> 724

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 6

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

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

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

130 135 140
 Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser
 145 150 155 160
 Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln
 165 170 175
 Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr
 180 185 190

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

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

 Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
 325 330 335
 Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
 340 345 350
 Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr
 355 360 365
 Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser
 370 375 380

Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly
 340 345 350

 Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly
 355 360 365
 Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser
 370 375 380
 Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400
 Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser
 405 410 415

 Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val
 420 425 430
 Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val
 435 440 445
 Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn
 450 455 460
 Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser
 465 470 475 480

 Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met
 485 490 495
 Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met
 500 505 510
 Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met
 515 520 525
 Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu
 530 535 540

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

580 585 590
 Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile
 595 600 605

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

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

<210> 8

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 8

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

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60

Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Lys Tyr Pro His Tyr Tyr Gly Ser Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115

<210> 9

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
 20 25 30

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

Tyr Phe Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Thr Val Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
 100 105 110

<210> 10

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 10

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

1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Asp Phe Thr His Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Ala Asp Phe
 50 55 60
 Lys Arg Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Lys Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Lys Tyr Pro Tyr Tyr Tyr Gly Thr Ser His Trp Tyr Phe Asp Val
 100 105 110
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu
 115

<210> 11

<211> 110

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 11

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

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

Leu Tyr Lys Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile
 115 120 125
 Asp Val Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu
 130 135 140

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

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

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

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

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

340 345 350
 Tyr Arg Leu Ser Met Lys Val Lys Ala Phe Pro Ser Pro Glu Val Val

355 360 365
 Trp Leu Lys Asp Gly Leu Pro Ala Thr Glu Lys Ser Ala Arg Tyr Leu

370 375 380
 Thr Arg Gly Tyr Ser Leu Ile Ile Lys Asp Val Thr Glu Glu Asp Ala
 385 390 395 400

Gly Asn Tyr Thr Ile Leu Leu Ser Ile Lys Gln Ser Asn Val Phe Lys
 405 410 415

Asn Leu Thr Ala Thr Leu Ile Val Asn Val Lys Pro Gln Ile Tyr Glu
 420 425 430

Lys Ala Val Ser Ser Phe Pro Asp Pro Ala Leu Tyr Pro Leu Gly Ser

435 440 445

Arg Gln

450

<210> 14

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 14

Ile Tyr Ile Phe Ile Ser Asp Thr Gly Arg Pro Phe Val Glu Met Tyr

1 5 10 15

Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu Leu Val

20 25 30

Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys

35 40 45

Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile Trp Asp

50 55 60

Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu Ile Gly

65 70 75 80

Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys Thr Asn
 85 90 95

Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile
 100 105

<210> 15

<211> 251

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 15

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

Asp Arg Val Ile Ile Thr Cys Gln Ala Ser Glu Ile Ile His Ser Trp
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ala Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Asn Val Tyr Leu Ala Ser Thr
 85 90 95

Asn Gly Ala Asn Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly
 100 105 110

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 115 120 125

Gly Gly Ser Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 130 135 140

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu
 145 150 155 160

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

165 170 175
 Leu Glu Trp Val Gly Phe Ile Asp Pro Asp Asp Asp Pro Tyr Tyr Ala

180 185 190
 Thr Trp Ala Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn

195 200 205
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val

210 215 220
 Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Asp His Asn Ser Gly Trp Gly Leu Asp Ile

225 230 235 240
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

245 250

<210> 16

<211> 588

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 16

Thr Ala Pro Thr Gly Lys Arg Ile Asp Asp His Phe Pro Lys Arg Lys
 1 5 10 15

Lys Ala Arg Thr Glu Glu Asp Ser Lys Pro Ser Thr Ser Ser Asp Ala
 20 25 30

Glu Ala Gly Pro Ser Gly Ser Gln Gln Leu Gln Ile Pro Ala Gln Pro
 35 40 45

Ala Ser Ser Leu Gly Ala Asp Thr Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro

50 55 60

Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly
 65 70 75 80

Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys
 85 90 95

Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg
 100 105 110

Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe
 115 120 125
 Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser
 130 135 140
 His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly
 145 150 155 160
 Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val Lys Ile Phe Asn Ile Gln Val Lys
 165 170 175
 Glu Val Thr Val Gln Asp Ser Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr
 180 185 190
 Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val
 195 200 205
 Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val
 210 215 220
 Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr
 225 230 235 240
 Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
 245 250 255
 Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe
 260 265 270
 Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe
 275 280 285
 Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser
 290 295 300
 Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg
 305 310 315 320
 Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp Phe Pro Gly Pro Met Gly Arg Thr
 325 330 335
 Gln Gly Trp Asn Leu Gly Ser Gly Val Asn Arg Ala Ser Val Ser Ala
 340 345 350
 Phe Ala Thr Thr Asn Arg Met Glu Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Gln Val

355 360 365
 Pro Pro Gln Pro Asn Gly Met Thr Asn Asn Leu Gln Gly Ser Asn Thr

370 375 380
 Tyr Ala Leu Glu Asn Thr Met Ile Phe Asn Ser Gln Pro Ala Asn Pro
 385 390 395 400

Gly Thr Thr Ala Thr Tyr Leu Glu Gly Asn Met Leu Ile Thr Ser Glu
 405 410 415

Ser Glu Thr Gln Pro Val Asn Arg Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln
 420 425 430

Met Leu Ala His Lys Phe Lys Ser Gly Asp Ala Pro Thr Thr Gly Thr

435 440 445
 Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp
 450 455 460

Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala
 465 470 475 480

His Phe His Pro Ser Pro Ala Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro
 485 490 495

Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr

500 505 510
 Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr
 515 520 525

Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser
 530 535 540

Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro
 545 550 555 560

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

565 570 575
 Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu

580 585

<210> 17

<211> 532

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic Construct

<400> 17

Met Ser Ala Gly Gly Gly Gly Pro Leu Gly Asp Asn Asn Gln Gly Ala

1 5 10 15

Asp Gly Val Gly Asn Ala Ser Gly Asp Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

20 25 30

Met Gly Asp Arg Val Val Thr Lys Ser Thr Arg Thr Trp Val Leu Pro

35 40 45

Ser Tyr Asn Asn His Gln Tyr Arg Glu Ile Lys Ser Gly Ser Val Asp

50 55 60

Gly Ser Asn Ala Asn Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr

65 70 75 80

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Ser His Trp Ser Pro Arg Asp Trp Gln

85 90 95

Arg Leu Ile Asn Asn Tyr Trp Gly Phe Arg Pro Arg Ser Leu Arg Val

100 105 110

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

115 120 125

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

Ala Thr Leu Asn Arg Asp Asn Thr Glu Asn Pro Thr Glu Arg Ser Ser

180 185 190

Phe Phe Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Lys Met Leu Arg Thr Gly Asn

195 200 205

Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser

