



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137730
(43) 공개일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 48/0066 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7027451
(22) 출원일자(국제) 2016년03월02일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2017년09월27일
(86) 국제출원번호 PCT/US2016/020482
(87) 국제공개번호 WO 2016/141078
국제공개일자 2016년09월09일
(30) 우선권주장
62/127,194 2015년03월02일 미국(US)
62/134,466 2015년03월17일 미국(US)

(71) 출원인
애드베룸 바이오테크놀로지스, 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94025, 멘로 파크, 스위트 비,
1035 오브라이언 드라이브
유니버시티 오브 워싱턴
미국 워싱턴 시애틀 엔이 수트 500 11 애비뉴
4311 (우편번호 : 98105)
(72) 발명자
찰빅, 토마스 더블유.
미국, 캘리포니아 94028, 레드우드 시티, 2749 캐
롤라이나 애비뉴
니츠, 제이
미국, 워싱턴 98117, 시애틀, 2602 엔더블유 97
스트리트
니츠, 모린
미국, 워싱턴 98117, 시애틀, 2602 엔더블유 97
스트리트
(74) 대리인
손민

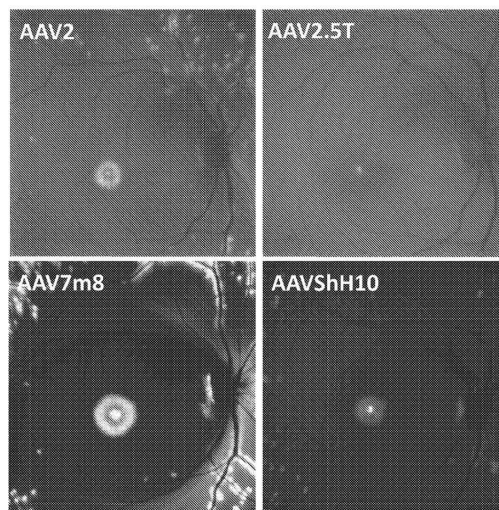
전체 청구항 수 : 총 29 항

(54) 발명의 명칭 망막 추상체에 폴리뉴클레오타이드의 유리체 내 전달을 위한 조성물 및 방법

(57) 요약

원주 광수용체에 폴리뉴클레오타이드를 유리체 내로 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 방법의 양태는 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스를 안구의 유리체 내로 주사하는 단계를 포함한다. 이러한 방법 및 조성물은 원주체 기능장애 및/또는 사망과 연관된 안구 장애를 치료함에 있어서 특히 유용하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체에서 원주 광수용체에 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 전달하는 방법으로서,

상기 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유효량의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 변이체를 안구의 유리체 내로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 rAAV 변이체는 모 AAV 캡시드 단백질의 GH 루프에서 아미노산 펩타이드의 삽입을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 3

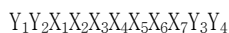
제2항에 있어서, 상기 모 캡시드 단백질의 상기 GH 루프는 AAV1 VP1의 아미노산 571 내지 612(서열번호 1), AAV2 VP1의 약 아미노산 570 내지 611(서열번호 2), AAV3 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 3), AAV4 VP1의 약 아미노산 569 내지 610(서열번호 4), AAV5 VP1의 약 아미노산 560 내지 601(서열번호 5), AAV6 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 6), AAV7 VP1의 약 아미노산 572 내지 613(서열번호 7), AAV8 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 8), AAV9 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 9), AAV10 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 10); 또는 이들의 변이체의 상응하는 아미노산 범위로 본질적으로 이루어지는, 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 모 캡시드는 AAV2 VP1이되, 상기 삽입 부위는 AAV2 VP1의 아미노산 580 내지 581, 아미노산 581 내지 582, 아미노산 582 내지 583, 아미노산 583 내지 584, 아미노산 584 내지 585, 아미노산 585 내지 586, 아미노산 586 내지 587, 아미노산 587 내지 588, 아미노산 588 내지 589, 아미노산 589 내지 590, 아미노산 590 내지 591, 아미노산 591 내지 592, 아미노산 592 내지 593, 아미노산 593 내지 594, 또는 아미노산 594 내지 595인, 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 화학식의 것인, 방법:



식 중,

Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;

X1은, 존재하는 경우, Leu, Asn 및 Lys으로부터 선택되며;

X2는 Gly, Glu, Ala 및 Asp로부터 선택되고;

X3은 Glu, Thr, Gly 및 Pro으로부터 선택되며;

X4는 Thr, Ile, Gln 및 Lys으로부터 선택되고;

X5는 Thr 및 Ala으로부터 선택되며;

X6은 Arg, Asn 및 Thr으로부터 선택되고;

X7은, 존재하는 경우, Pro 및 Asn으로부터 선택되는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 펩타이드는 아미노산 서열 LGETTRP(서열번호 11)를 포함하는, 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 원추 광수용체는 중심와 원추체(foveal cone)인, 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 대상체는 영장류인, 방법.

청구항 9

대상체에서 원추 광수용체에 유전자 산물을 발현시키는 방법으로서,

상기 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 유효량의 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 변이체를 안구의 유리체 내로 전달하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 rAAV 변이체는 모 AAV 캡시드 단백질의 GH 루프에서 아미노산 펩타이드의 삽입을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 11

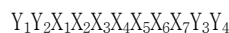
제10항에 있어서, 상기 모 캡시드 단백질의 상기 GH 루프는 AAV1 VP1의 아미노산 571 내지 612(서열번호 1), AAV2 VP1의 약 아미노산 570 내지 611(서열번호 2), AAV3 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 3), AAV4 VP1의 약 아미노산 569 내지 610(서열번호 4), AAV5 VP1의 약 아미노산 560 내지 601(서열번호 5), AAV6 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 6), AAV7 VP1의 약 아미노산 572 내지 613(서열번호 7), AAV8 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 8), AAV9 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 9), AAV10 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 10); 또는 이들의 변이체의 상응하는 아미노산 범위로 본질적으로 이루어지는, 방법.

청구항 12

제10항에 있어서, 상기 모 캡시드는 AAV2 VP1이되, 상기 삽입 부위는 AAV2 VP1의 아미노산 580 내지 581, 아미노산 581 내지 582, 아미노산 582 내지 583, 아미노산 583 내지 584, 아미노산 584 내지 585, 아미노산 585 내지 586, 아미노산 586 내지 587, 아미노산 587 내지 588, 아미노산 588 내지 589, 아미노산 589 내지 590, 아미노산 590 내지 591, 아미노산 591 내지 592, 아미노산 592 내지 593, 아미노산 593 내지 594, 또는 아미노산 594 내지 595인, 방법.

청구항 13

제2항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 화학식의 것인, 방법:



식 중,

Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;

X1은, 존재하는 경우, Leu, Asn 및 Lys으로부터 선택되며;

X2는 Gly, Glu, Ala 및 Asp로부터 선택되고;

X3은 Glu, Thr, Gly 및 Pro으로부터 선택되며;

X4는 Thr, Ile, Gln 및 Lys으로부터 선택되고;

X5는 Thr 및 Ala으로부터 선택되며;

X6은 Arg, Asn 및 Thr으로부터 선택되고;

X7은, 존재하는 경우, Pro 및 Asn으로부터 선택되는, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 펩타이드는 아미노산 서열 LGETTRP(서열번호 11)를 포함하는, 방법.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 폴리뉴클레오타이드는 MNTC 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 방법.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 방법은 상기 원추 광수용체에서 상기 폴리뉴클레오타이드의 발현을 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 17

제9항에 있어서, 상기 원추 광수용체는 중심와 원추체인, 방법.

청구항 18

제9항에 있어서, 상기 대상체는 영장류인, 방법.

청구항 19

원추체-연관 망막 장애를 가지거나 상기 망막 장애가 발생할 위험에 있는 대상체에서 원추체-연관 망막 장애를 치료 또는 예방하는 방법으로서,

상기 원추체-연관 망막 장애를 치료 또는 예방하는 데 효과적인 양으로 치료적 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 변이체를 유리체 내로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 rAAV 변이체는 모 AAV 캡시드 단백질의 GH 루프에서 아미노산 펩타이드의 삽입을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는, 방법.

청구항 21

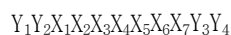
제20항에 있어서, 상기 모 캡시드 단백질의 상기 GH 루프는 AAV1 VP1의 아미노산 571 내지 612(서열번호 1), AAV2 VP1의 약 아미노산 570 내지 611(서열번호 2), AAV3 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 3), AAV4 VP1의 약 아미노산 569 내지 610(서열번호 4), AAV5 VP1의 약 아미노산 560 내지 601(서열번호 5), AAV6 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 6), AAV7 VP1의 약 아미노산 572 내지 613(서열번호 7), AAV8 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 8), AAV9 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 9), AAV10 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 10); 또는 이들의 변이체의 상응하는 아미노산 범위로 본질적으로 이루어지는, 방법.

청구항 22

제20항에 있어서, 상기 모 캡시드는 AAV2 VP1이되, 상기 삽입 부위는 AAV2 VP1의 아미노산 580 내지 581, 아미노산 581 내지 582, 아미노산 582 내지 583, 아미노산 583 내지 584, 아미노산 584 내지 585, 아미노산 585 내지 586, 아미노산 586 내지 587, 아미노산 587 내지 588, 아미노산 588 내지 589, 아미노산 589 내지 590, 아미노산 590 내지 591, 아미노산 591 내지 592, 아미노산 592 내지 593, 아미노산 593 내지 594, 또는 아미노산 594 내지 595인, 방법.

청구항 23

제20항에 있어서, 상기 펩타이드는 하기 화학식의 것인, 방법:



식 중,

Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;

X1은, 존재하는 경우, Leu, Asn 및 Lys으로부터 선택되며;

X2는 Gly, Glu, Ala 및 Asp로부터 선택되고;
 X3은 Glu, Thr, Gly 및 Pro으로부터 선택되며;
 X4는 Thr, Ile, Gln 및 Lys으로부터 선택되고;
 X5는 Thr 및 Ala으로부터 선택되며;
 X6은 Arg, Asn 및 Thr으로부터 선택되고;
 X7은, 존재하는 경우, Pro 및 Asn으로부터 선택되는, 방법.

청구항 24

제20항에 있어서, 상기 펩타이드는 아미노산 서열 LGETTRP(서열번호 11)를 포함하는, 방법.

청구항 25

제19항에 있어서, 상기 망막 장애는 원추체-연관 장애인, 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 원추체-연관 장애는 간상-원추 이영양증(rod-cone dystrophy); 원추-간상 이영양증(cone-rod dystrophy); 진행성 추상체 이영양증; 망막 색소변성증(RP); 스타가르트 질환(Stargardt Disease); 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시각 신경병증; 베스트병(Best's disease); 성인 난황형 황반 이영양증; X-연관 망막층간분리증; 색각 장애; 노인 황반변성; 습성 노인 황반변성; 지도모양위축(geographic atrophy); 당뇨 망막병증; 망막 정맥 폐쇄; 망막 허혈; 가족성 삼출 유리체망막증(Familial Exudative Vitreoretinopathy: FEVR); COATs 질환; 및 소르스비 안저 이영양증(Sorsby's fundus dystrophy)으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 방법.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 방법은 상기 대상체를 원추체-연관 장애를 가지는 것으로서 식별하는(identifying) 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 28

제19항에 있어서, 상기 방법은 상기 투여하는 단계 후에 시력의 개선을 검출하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 29

제19항에 있어서, 상기 대상체는 영장류인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

관련 출원에 대한 상호 참조

[0002]

본 출원은 2015년 3월 2일자로 출원한 미국 가출원 제62/127,194호 및 2015년 3월 17일자로 출원한 미국 가출원 제62/134,466호에 대한 우선권을 주장하며; 상기 출원 각각은 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함되어 있다.

[0003]

서열목록에 대한 진술

[0004]

본 출원과 연관된 서열목록은 종이 사본 대신에 텍스트 형식으로 제공되어 있으며, 이는 본 명세서 내에 참조로 포함되어 있다. 서열목록을 포함하는 텍스트 파일의 명칭은 AVBI_006_02WO_ST25.txt이다. 텍스트 파일은 74 KB이며, 2016년 3월 1일에 작성되었고, EFS-웹(EFS-Web)을 통해 전자적으로 제출되어 있다.

[0005]

본 발명의 분야

[0006]

본 발명은 망막 장애의 바이러스-기반 유전자 치료법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 광수용체는 빛을 감지하고 빛 신호를 전기 신호로 변환할 수 있는 망막에서 발견되는 특수한 유형의 신경이다. 망막에는 2가지 유형의 광수용체, 즉 빛에 더 민감하여 따라서 희미한 조명에서 시력을 지원하는 간상 광수용체, 및 특정 파장의 빛에 민감하여 따라서 색상의 인식을 지원하고, 간상체보다 자극에 더 빠르게 반응하여 간상체보다 이미지에서의 세부 사항을 더 잘 그리고 이미지에서의 변화를 더 신속하게 인식하고 따라서 높은 시력을 지원하는 원추 광수용체가 존재한다.
- [0008] 다수의 시력 장애는, 예를 들어 원추체(cone) 내 결함과 연관된 것, 즉 원추체-내재 결함, 예컨대 스타가르트 황반이양증(Stargardt's macular dystrophy), 원추 이영양증(cone dystrophy), 원추-간상 이영양증(cone-rod dystrophy), 척수소뇌 실조증 유형 7(Spinocerebellar ataxia type 7), 및 바뎃-비들 증후군-1(Bardet-Biedl syndrome-1)과 연관된 것뿐만 아니라, 색맹, 청색원추 단색형색각(blue cone monochromacy), 및 제1 색각 이상(protan defect), 제2 색각 이상(deutan defect), 및 제3 색각 이상(tritan defect)을 포함하는 색각 장애(color vision disorder); 및 중심 황반에 영향을 미치는 망막 장애, 예컨대 노인 황반변성(age-related macular degeneration), 황반 모세혈관확장증(macular telangiectasia), 망막 색소변성증(retinitis pigmentosa), 당뇨 망막병증(diabetic retinopathy), 망막 정맥 폐쇄(retinal vein occlusion), 녹내장, 소르스비 안저 이영양증(Sorsby's fundus dystrophy), 성인 난황형 황반 이영양증(adult vitelliform macular dystrophy), 베스트병(Best's disease), 및 X-연관 망막층간분리증(X-linked retinoschisis)과 연관되는 것들을 포함하여, 원추 광수용체의 생존력 또는 기능의 상실과 연관된다. 이들 원추 세포 장애는, 원추 광수용체에 의해 발현될 때, 결핍을 보완하고 원추 세포의 생존력 및/또는 기능을 "구하는" 치료적 유전자를 원추 광수용체에 전달함으로써 치료될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0009] 원추 광수용체의 최고 밀도는 망막의 황반 중심에 위치한 1.5mm의 오목한 곳에 존재한다. "중심오목(fovea centralis)" 또는 "핵심인(foveal pit)"으로 불리는 이 영역은 날카로운 중심 시력(또한 중심와 시각(foveal vision)이라고도 불림)을 담당하며, 이는 인간에서 시각적 세부 사항이 독서 및 운전과 같이 주된 중요성을 가지는 활동에서 필요한 것이다. 중심오목은 2개의 하위 영역, 즉 안와(pit)의 중심에서 직경 0.35mm의 간상체가 없는 망막의 영역인 중심소와(foveola); 및 중심소와를 둘러싸고 안와의 경사를 형성하는 직경 1.5mm의 원추체가 풍부한 망막의 영역인 중심와(fovea)로 이루어져 있다. 중심오목을 둘러싸는 것은 부중심와(parafovea)이며, 부중심와는 오목한 곳의 가장자리를 형성하고 망막의 모든 세포로 구성되며, 원추 광수용체는 중심오목에 비하여 감소된 수로 나타내어진다. 부중심와를 지나서, 훨씬 더 감소된 원추체 밀도를 포함하는 망막의 영역인 중심와주위(perifovea)가 있다. 중심와의 원추 세포는 망막에서 원추 광수용체의 압도적인 대부분을 구성하기 때문에, 이들 세포는 원추체-연관 장애의 치료를 위해 전달되는 치료적 유전자의 이상적인 표적 수용체이다(오스터(Oster) 1935)).
- [0010] 망막의 세포에 유전자를 전달할 때의 일부 성공은 바이러스 벡터, 예컨대 아데노-연관 바이러스(adeno-associated virus; AAV) 또는 렌티바이러스를 이용함으로써 달성되었다. 그러나, 이들 벡터는, 망막의 구조를 파괴하고 종종 치료될 장애에 의해 이미 손상된 망막 조직에 추가적인 손상을 형성할 위험을 수반하는 기술인 망막 하 주사로 투여되어야 한다. 하나의 대안은 바이러스 벡터를 망막 유리체 내로 전달하는 것, 즉 벡터를 안구의 유리체 내로 주사하고 벡터가 망막을 침투하여 망막 세포를 형질도입하는 것을 기대함에 의한 것이다. 그러나, 당업계에서 입증된 바와 같이, 중심와 원추 세포는 망막에 유리체 내로 전달되는 바이러스 벡터에 의한 형질도입에 대하여 저항성이 있는 것으로 유명하다.
- [0011] 따라서, 안구의 유리체로부터 전달될 때 고효율로 원추 세포를 형질도입하는 바이러스 벡터에 대한 당업계의 필요성이 존재한다. 본 발명은 이러한 문제점을 해결한다.

발명의 내용

- [0012] 원추 광수용체에 폴리뉴클레오타이드를 유리체 내로 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 방법의 양태는 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스를 안구의 유리체 내로 주사하는 단계를 포함한다. 이러한 방법 및 조성물은 원추체 기능장애 및/또는 사망과 연관된 안구 장애를 치료함에 있어서 특히 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0013] 본 발명은 첨부된 도면과 함께 읽힐 때 하기 상세한 설명으로부터 가장 잘 이해된다. 통상적인 실시예 따르면,

도면의 다양한 특성은 일정한 비율로 조정된 것이 아님이 강조된다. 반대로, 다양한 특성의 치수는 명확하게 하기 위하여 임의로 확장되거나 축소된다. 도면에는 하기 도면이 포함되어 있다.

도 1은 유리체 내로 전달된 AAV2 변이체 AAV2-7m8이 유리체 내로 전달된 AAV2보다 더 효율적으로 영장류의 중심 오목 및 부중심와에서 망막 세포를 어떻게 형질도입하는지의 예시. 5×10^{11} 개의 AAV2.CMV.GFP의 벡터 계능(상단 좌측); AAV-2.5T.CMV.GFP(상단 우측)(Excoffon K. J., et al. 2009. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 106:3865-3870); (하단 좌측) AAV2-7.8.CMV.GFP(Dalkara D, et al. Sci Transl Med. 2013 Jun 12;5(189):189ra76); 또는 AAV-ShH10.CMV.GFP(하단 우측)(Klimczak RR et al. PLoS One. 2009 Oct 14;4(10):e7467)를 50 μ l의 부피로 아프리카 녹색 원숭이의 유리체 내로 주사하고, 생체 내에서 OCT 형광 이미징에 의해 GFP 발현을 8주 후에 관찰하였다.

도 2는 AAV2-7m8 캡시드가 영장류의 중심와 원추체를 어떻게 견고하게 형질도입하는지의 예시. (a 내지 b) AAV2-7m8.MNTC.GFP를 개코원숭이의 중앙 유리체 내에 주사하고 안저 형광에 의해 (a) 5주 및 (b)주 후에 발현을 관찰하였다. (c 및 d) 저배율(c) 및 고배율(d)에서 AAV2-7m8.MNTC.GFP의 주사 후 대략 6개월 후에 중심와의 15 마이크로미터 구역 내 천연 GFP 형광.

도 3은 AAV-7m8 전달 MNTC.GFP의 유리체 내 주사 후 마우스 망막의 원추체에서 강력하고 원추체-특이적인 유전자 발현의 예시. (a 내지 b) 마우스가 유리체 내 주사를 통해 5.04×10^{10} 개의 벡터 계능의 유리체 내 주사를 받고 11주 후 GFP 형광의 예. (c 내지 e) 주사 14주 후에 망막을 조직학을 위해 수확하고, 원추체 외측 부분을 L/M 읍신에 대한 항체로 표지화하였다(적색). (c)에서 적색 채널은 꺼져 있으므로 단지 천연 GFP만 보이며, (d)는 원추체 외측 부분의 시각화가 가능하도록 적색 채널이 있는 동일한 이미지이다. (c) 및 (d)의 비교는, 전부는 아니지만 대부분의 원추체가 바이러스에 의해 형질도입되었음을 나타낸다. (e) 원추 광수용체의 프로파일을 나타내는 상이한 각도에서 c 및 d에서와 동일한 망막으로부터의 이미지.

도 4a 내지 도 4b는 몽고모래쥐 망막의 원추체에서 pMNTC 조절 카세트에 의해 유도된 유전자 발현의 예시. CMV, pR2.1, 또는 MNTC 프로모터의 제어 하에서 GFP를 보유하는 바이러스의 1×10^{10} 내지 2×10^{10} 개 벡터 계능을 50 μ l의 부피로 몽고모래쥐의 유리체 내에 주사하고, 안저 형광 이미징에 의해 지정된 시점에서 GFP 발현을 시각화하였다. (a) AAV2-7m8.CMV.GFP 및 AAV2-7m8.MNTC.GFP에 의해 유도된 GFP의 발현을 유리체 내 투여 4주 후에 시각화하였다. 모래쥐 12-10, 12-11, 및 12-12에는 AAV2-7m8.CMV.GFP를 주사한 반면, 모래쥐 12-13, 12-14, 및 12-15에는 AAV2-7m8.MNTC.GFP를 주사하였다. OD(oculus dexter)(우안). OS(oculus sinister)(좌안). (b) 안저 형광 이미징에 의해 검출되고 4 및 8주 후에, AAV2-7m8.pR2.1.GFP 및 AAV2-7m8.MNTC.GFP에 의해 유도된 GFP의 발현.

도 5a 내지 도 5d는 pMNTC 조절 카세트가 원추체 프로모터 pR2.1보다 영장류의 중심와 원추체에서 더 강력한 유전자 발현을 제공함을 나타냄. AAV2-7m8.MNTC.GFP 또는 AAV2-7m8.pR2.1.GFP의 5×10^{11} 개 벡터 계능을 50 μ l의 부피로 나타낸 바와 같이 아프리카 녹색 원숭이의 유리체 내에 주사하였다(동물 271 및 472 내에 AAV2-7m8.MNTC.GFP; 동물 500 및 509 내에 AAV2-7m8.pR2.1.GFP). 망막을 (a) 2주, (b) 4주, (c) 8주, 및 (d) 12주 후에 안저 형광 카메라(a, b, c, d) 또는 하이델베르크 스펙트랄리스 OCT(Heidelberg Spectralis OCT) 상에서의 자가 형광(a, b; 8 및 12주에 대한 데이터는 나타내지 않음)을 사용하여 GFP에 대하여 생체 내에서 시각화하였다. OD(oculus dexter)(우안). OS(oculus sinister)(좌안).

도 6a 내지 도 6d는 관찰된 더 강력한 발현에 대하여 최적화된 pMNTC 요소 각각의 기여를 나타냄. (a) pMNTC 및 pR2.1 발현 카세트. (b) pMNTC에서 각각의 요소가 pR2.1에서 상응하는 요소로 하나씩 대체된, 실험용 발현 카세트. (c,d) 주사 (c) 4주 및 (d) 8주 후에 이비스(IVIS) 이미징에 의해 검출되었을 때 각각의 테스트 물품(구조체 당 n=6 내지 8개 안구)으로 유리체 내로 주사된 모래쥐의 망막에서 루시페라제 이식유전자의 발현. "7m8.CMV"는 양성대조군의 역할을 하였다.

도 7은 비인간 영장류(NHP)에서 pR2.1 조절 카세트에 의해 유도된 원추체-특이적 유전자 발현의 예시. AAV2-7m8.pR2.1.GFP의 5×10^{11} 개의 벡터 계능을 50 μ l의 부피로 아프리카 녹색 원숭이의 유리체 내에 주사하였다. GFP 이식유전자 발현을 망막의 8 μ m 횡단면의 스테레오 형광 현미경검사법에 의해 관찰하였다. GFP는 항-GFP항체(녹색; 닭 다클론성; 에이비캠(Abcam) Cat #13970)로 염색하였고; 읍신 원추 세포는 읍신 원추체에 특이적인 항-L/M 읍신 항체(적색; 토끼 다클론성; 에이비캠 Cat #5405)로 염색하였으며; 간상 세포는 항-로돕신 항체(1D4 핑크; 마우스 단클론성; 에이비캠 #5417)로 염색하였고; 핵은 Dapi(청색/모든 핵; 인비트로젠(Invitrogen) REF

#D21490)로 염색하였다. GFP 염색은 L/M 읍신 염색과 함께 공유국소화하였지만(co-localized), 로돕신 염색은 그렇지 않았다. GFP 이식유전자 발현은 광수용체 층을 가로질러 L/M-읍신에 존재하였지만, GFP 이식유전자 발현은 간상체에서 관찰되지 않았다. 화살표는 GFP 및 읍신 모두에 대하여 이중 염색된 예시적인 원추 세포를 가리킨다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 원추 광수용체에 폴리뉴클레오타이드를 유리체 내로 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 방법의 양태는 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스를 안구의 유리체 내로 주사하는 단계를 포함한다. 이러한 방법 및 조성물은 원추체 기능장애 및/또는 사망과 연관된 안구 장애를 치료함에 있어서 특히 유용하다. 본 발명의 이들 및 다른 목적, 이점, 및 특성은 하기에 보다 완전하게 기재된 조성물 및 방법의 상세내용을 읽을 때 당업자에게 명백하게 될 것이다.
- [0015] 본 방법 및 조성물이 기재되기 전에, 본 발명이, 물론 다양할 수 있기 때문에, 기재된 특정 방법 또는 조성물로 제한되지 않음이 이해되어야 한다. 또한, 본 발명의 범주가 첨부된 청구항에 의해서만 제한될 것이므로, 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 기재하기 위한 목적으로 사용된 것이고, 제한적인 것으로 의도되지 않음이 이해되어야 한다.
- [0016] 값의 범위가 제공되는 경우, 문맥이 명확하게 달리 지시하지 않는 한, 범위의 상한 및 하한 사이에서 하한 단위의 10분의 1까지 각각의 개재 값이 또한 구체적으로 개시됨이 이해된다. 임의의 명시된 값 또는 명시된 범위 내 개재 값과 명시된 범위 내 임의의 다른 명시된 또는 개재 값 사이의 각각의 더 작은 범위가 본 발명에 포함된다. 이들 더 작은 범위의 상한 및 하한은 독립적으로 상기 범위에 포함되거나 배제될 수 있으며, 더 작은 범위에 어느 하나가 포함되거나 모두 포함되지 않거나 모두 포함되는 경우 각각의 범위는 또한 본 발명에 포함되며, 명시된 범위 내에서 임의의 구체적으로 배제된 한도가 적용된다. 명시된 범위가 한도의 하나 또는 모두를 포함하는 경우, 포함된 한도의 하나 또는 모두를 배제하는 범위도 또한 본 발명에 포함된다.
- [0017] 다르게 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 테스트에서 사용되지만, 일부 잠재적이고 바람직한 방법 및 재료가 이제 기재된다.
- [0018] 본 명세서에 언급된 모든 간행물은 간행물이 인용된 것과 관련하여 방법 및/또는 재료를 개시하고 기재하기 위하여 본 명세서에 참고로 포함된다. 본 개시내용은 모순이 있는 범위까지 포함된 간행물의 임의의 개시내용을 대체하는 것이 이해된다.
- [0019] 본 개시내용을 읽을 때 당업자에게 명백할 바와 같이, 본 명세서에 기재되고 설명된 각각의 개별적인 실시형태는 본 발명의 범주 또는 사상을 벗어나지 않으면서 다른 몇몇 실시형태 중 임의의 것의 특성과 용이하게 분리되거나 조합될 수 있는 별개의 구성성분 및 특성을 가진다. 임의의 나열된 방법은 나열된 사건의 순서로 또는 논리적으로 가능한 임의의 다른 순서로 수행될 수 있다.
- [0020] 청구항은 임의의 선택적인 요소를 배제하기 위해 작성될 수 있음을 추가로 주목한다. 이와 같이, 이러한 진술은 청구항 요소의 나열, 또는 "부정적" 제한의 사용과 관련하여 "단독으로", "오직" 등과 같은 배타적인 용어의 사용에 있어서 선행사(antecedent basis)의 역할을 하는 것으로 의도된다.
- [0021] 본 명세서 및 첨부된 청구범위에서 사용되는 바와 같이, 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수 대상을 포함한다는 것을 주목해야 한다. 따라서, 예를 들어, "세포"에 대한 언급은 복수의 이와 같은 세포를 포함하고, "폴리뉴클레오타이드"에 대한 언급은 하나 이상의 폴리뉴클레오타이드 및 당업자에게 알려진 이의 등가물, 예를 들어 핵산 서열에 대한 언급을 포함하는 식이다.
- [0022] 본 명세서에서 논의된 간행물은 단지 본 출원의 출원일 이전의 개시내용을 위하여 제공된다. 본 명세서의 어떤 것도 본 발명이 선행 발명에 의해 이와 같은 간행물보다 선행할 자격이 없다는 인정으로 해석되어서는 안 된다. 또한, 제공되는 공개일은 실제 공개일과 상이할 수 있으며, 실제 공개일은 독립적으로 확인되어야 할 필요가 있을 수 있다.
- [0023] 정의
- [0024] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "벡터"는 폴리뉴클레오타이드를 포함하거나 이와 회합하고 폴리뉴클레오타이드

의 세포로의 전달을 매개하는 데 사용될 수 있는 거대분자 또는 거대분자의 회합을 말한다. 예시적인 벡터는, 예를 들어 플라스미드, 바이러스 벡터(바이러스 또는 이의 바이러스 계놈), 리포솜, 및 다른 유전자 전달 비히클을 포함한다.

- [0025] "바이러스"란, 바이러스 캡시드 및 바이러스 계놈을 포함하는 바이러스 입자를 의미한다. 예를 들어, 아데노-연관 바이러스는 적어도 하나의 아데노-연관 바이러스 캡시드 단백질 또는 이의 변형체 및 캡시드로 싸인 아데노-연관 바이러스 벡터 계놈 또는 이의 변형체를 포함하는 바이러스 입자를 말한다.
- [0026] 바이러스 "캡시드"란, 바이러스의 단백질 쉘을 의미한다. 바이러스 캡시드는 전형적으로 프로토머로 불리는 단백질로 이루어진 몇 개의 올리고머 구조 서브유닛을 포함한다. 캡시드는 바이러스의 유전물질, 또는 "계놈"을 둘러싸거나, "단백질막으로 싸다(encapsidate)". 일부 바이러스에서, 캡시드는 감싸져 있는데, 이는 캡시드가 바이러스 외피로 알려진 지질 막으로 코팅된 것을 의미한다.
- [0027] 바이러스 "계놈"(본 명세서에서 "바이러스 계놈", "바이러스 벡터 DNA" 및 "바이러스 DNA"로 상호교환적으로 지칭됨)이란, 말단에 적어도 1개, 일반적으로 2개의 바이러스 말단 반복(예를 들어, 역위 말단 반복(inverted terminal repeat; ITR), 긴 말단 반복(long terminal repeat; LTR))을 포함하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 의미한다.
- [0028] "재조합 바이러스 계놈"이란, 이중 핵산 서열 및 말단에 적어도 1개, 일반적으로 2개의 바이러스 말단 반복을 포함하는 바이러스 계놈을 의미한다. "재조합 바이러스"란, 재조합 바이러스 계놈을 포함하는 바이러스 입자를 의미한다.
- [0029] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "이중"은 비교되는 독립체의 나머지와 유전형적으로 구별되는 독립체로부터 유래한 것을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기법에 의해 상이한 종으로부터 유래된 플라스미드 또는 벡터 내로 도입된 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 바이러스 계놈은 이중 폴리뉴클레오타이드이다. 또 다른 예로서, 천연 암호화 서열로부터 제거되고 자연적으로 연결된 것으로 발견되지 않는 암호화 서열에 작동적으로 연결된 프로모터는 이중 프로모터이다. 세 번째 예로서, 이중 유전자 산물, 예를 들어 RNA, 단백질은 발현되는 세포에 의해 정상적으로 암호화되지 않는 유전자 산물이다.
- [0030] 개시내용의 바이러스와 관련하여 본 명세서에서 사용된 바와 같이 용어 "복제 결함"은 독립적으로 계놈을 복제 및 패키징할 수 없는 바이러스를 말한다. 예를 들어, 대상체의 세포가 재조합 비리온으로 감염된 경우, 이중 유전자는 감염된 세포에서 발현되지만; 감염된 세포에는 AAV rep 및 캡 유전자 및 부속 기능 유전자가 없다는 사실로 인하여, 재조합 바이러스는 더 이상 복제할 수 없다.
- [0031] 용어 "AAV"는 아데노-연관 바이러스에 대한 약자이다. 본 명세서에서 사용될 경우, 용어 AAV는 바이러스 자체 또는 이의 유도체, 예를 들어 바이러스 캡시드, 바이러스 계놈 등을 말한다. 용어 "AAV"는 달리 요구되는 경우를 제외하고 모든 서브타입(자연적으로 발생하는 형태 및 재조합 형태 모두), 및 이들의 변형체를 포함한다.
- [0032] "자연적으로 발생하는" 또는 "야생형" AAV란, 자연에서 발생하는 바이러스 캡시드 단백질로 이루어진 바이러스 캡시드를 포함하는 임의의 아데노-연관 바이러스 또는 이의 유도체를 의미한다. 자연적으로 발생하는 AAV의 비제한적인 예는 AAV 유형 1(AAV-1), AAV 유형 2(AAV-2), AAV 유형 3(AAV-3), AAV 유형 4(AAV-4), AAV 유형 5(AAV-5), AAV 유형 6(AAV-6), AAV 유형 7(AAV-7), AAV 유형 8(AAV-8), AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, rh10, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비영장류 AAV, 및 양 AAV를 포함한다. "영장류 AAV"는 영장류를 감염시키는 AAV를 말하고, "비영장류 AAV"는 비영장류 포유동물을 감염시키는 AAV를 말하며, "소 AAV"는 소 포유동물을 감염시키는 AAV를 말하는 식이다.
- [0033] "AAV 변이체" 또는 "변이체 AAV"란, 변이체, 또는 돌연변이체인 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 바이러스 입자를 포함하는 것을 의미한다. 변이체 AAV 캡시드 단백질의 예는, 변형체 AAV 캡시드 단백질이 자연적으로 발생하는 AAV 캡시드 단백질에 존재하는 아미노산 서열로 이루어지지 않는 경우, 상응하는 모(parental) AAV 캡시드 단백질, 즉 변이체 캡시드 단백질이 유래한 AAV 캡시드 단백질, 야생형 AAV 캡시드 단백질 등에 비하여 적어도 하나의 아미노산 차이(예를 들어, 아미노산 치환, 아미노산 삽입, 아미노산 결실)를 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 구조적으로, 즉 서열 수준에서, 상응하는 모 AAV와 상이한 것에 추가적으로, AAV 변이체는 상응하는 모 AAV와 기능적으로 상이할 수 있다. 바꿔 말하면, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 적어도 하나의 아미노산 차이를 포함하는 변이체 캡시드 단백질은 상응하는 모 AAV가 소유하지 않는 기능적 특징을 AAV 변이체에 부여할 수 있다. 예를 들어, AAV 변이체는 상이한 세포 지향성, 즉 특정 유형의 세포를 감염시키기 위한 상이한 친화성 및/또는 감염시키는 능력을 가질 수 있으며, 예를 들어 AAV 변이체는 모 AAV보다 증가된(또는 감

소된) 친화성으로, 세포, 예를 들어 망막 세포에 결합할 수 있고/있거나 세포 집단의 더 많은(또는 더 적은) 세포가 동일한 역가의 바이러스 입자로 형질도입/감염되도록 모 AAV보다 증가된(또는 감소된) 효율로 세포, 예를 들어 망막 세포를 감염/형질도입할 수 있다. 두 번째 예로서, AAV 변이체는 숙주 동물에 의해 생성된 항체에 대하여 더 큰(또는 더 작은) 친화성을 가질 수 있으며, 예를 들어 AAV 변이체는 중화 항체에 더 큰(또는 더 작은) 친화성으로 결합할 수 있고, 더 큰(또는 더 작은) 정도로 숙주 조직으로부터 제거될 수 있다.

[0034] "재조합 AAV", 또는 "rAAV"란, 바이러스 게놈에 이중 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 임의의 AAV를 포함하는 것을 의미한다. 일반적으로, 이중 폴리뉴클레오타이드에는 적어도 1개, 일반적으로는 2개의 자연적으로 발생하는 또는 변이체 AAV 역위 말단 반복 서열(ITR)이 축적한다. 용어 "rAAV 벡터"는 rAAV 벡터 입자 및 rAAV 벡터 플라스미드를 모두 포함한다. 따라서, 예를 들어 이중 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 rAAV는 자연적으로 발생하는 야생형 AAV에 정상적으로 포함되지 않는 핵산 서열을 포함하는 rAAV, 예를 들어 이식유전자(예를 들어, 비-AAV RNA-암호화 폴리뉴클레오타이드 서열, 비-AAV 단백질-암호화 폴리뉴클레오타이드 서열), 비-AAV 프로모터 서열, 비-AAV 폴리아데닐화 서열 등일 것이다.

[0035] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현 벡터"는 관심 대상 유전자 산물을 암호화하는 영역을 포함하는 벡터를 말하며, 의도된 표적 세포에서 유전자 산물의 발현을 이행하는 데 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적에서 단백질의 발현을 용이하게 하기 위하여 암호화 영역에 작동적으로 연결된 제어 요소를 포함한다. 제어 요소 및 발현을 위해 작동 가능하게 연결된 유전자 또는 유전자들의 조합은 때때로 "발현 카세트"로 지칭되며, 많은 발현 카세트가 당업계에 알려져 있고 이용가능하거나 당업계에서 이용가능한 성분으로부터 용이하게 구성될 수 있다.

[0036] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "발현"은 세포에서 암호화 서열, 예를 들어 내인성 유전자, 이중 유전자의 전사 및/또는 번역을 말한다.

[0037] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자" 또는 "암호화 서열"은 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 말하며, 자연적으로 발생하는 폴리뉴클레오타이드 서열 및 cDNA를 모두 포함한다. 유전자는 암호화 영역 전후의 영역, 예를 들어 5' 비번역(5' UTR) 또는 "리더" 서열 및 3' UTR 또는 "트레일러(trailer)" 서열, 또는 개별적인 암호화 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)을 포함할 수 있거나 포함하지 않을 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 산물"은 폴리뉴클레오타이드 서열의 원하는 발현 산물, 예컨대 폴리펩타이드, 펩타이드, 단백질 또는 RNA(예를 들어, 리보자임, 짧은 간섭 RNA(siRNA), miRNA 또는 작은 헤어핀 RNA(shRNA)를 포함함)를 말한다. 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드", 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 말하기 위해 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다. 상기 용어는 또한, 예를 들어 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 인산화, 또는 표지화 성분과의 컨주게이션으로 개질된 아미노산 중합체를 포함한다.

[0039] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동적으로 결합된" 또는 "작동 가능하게 결합된"은 단일 폴리뉴클레오타이드 상에서 유전적 요소의 병렬배치를 의미하며, 여기서 상기 요소는 요소를 예상된 방식으로 작동할 수 있는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 암호화 서열의 전사 개시를 돕는 경우, 프로모터는 암호화 영역에 작동적으로 연결된다. 기능적 관계가 유지되는 한, 프로모터와 암호화 영역 사이에 개재 잔기가 있을 수 있다. 제어 요소, 예를 들어 프로모터, 인핸서(들) 등 및 발현을 위해 작동 가능하게 연결된 유전자 또는 유전자들의 조합은 때때로 "발현 카세트"로 지칭되며, 많은 발현 카세트가 당업계에 알려져 있고 이용가능하거나 당업계에서 이용가능한 성분으로부터 용이하게 구성될 수 있다.

[0040] "프로모터"란, 일반적으로 RNA 중합효소의 결합을 지시하고 이에 의해 RNA 합성을 촉진하는 DNA 서열, 즉 전사를 지시하는 데 충분한 최소한의 서열을 의미한다. 프로모터 및 상응하는 단백질 또는 폴리펩타이드 발현은 산재할 수 있으며, 이는 광범위한 세포, 조직 및 종에서 강하게 활성적이거나 또는 세포-유형 특이적, 조직-특이적, 또는 종-특이적임을 의미한다. 프로모터는, 연속적으로 활성적임을 의미하는 "구성적"이거나, 생물 또는 무생물적 인자의 존재 또는 부재에 의해 활성화 또는 불활성화될 수 있는 프로모터를 의미하는 "유도성"일 수 있다.

[0041] "인핸서"란, 일반적으로 인접한 유전자의 전사를 자극, 즉 촉진 또는 향상시키는 시스-작용 조절 요소를 의미한다. "사일렌서"는, 예를 들어 일반적인 전사 인자 집합체로 적극적으로 간섭함으로써 또는 유전자와 연관된 다른 조절 요소, 예를 들어 인핸서를 저해함으로써, 인접한 유전자의 전사를 저해, 즉 감소 또는 억제시키는 시스-작용 조절 요소를 의미한다. 인핸서는 암호화 서열로부터 그리고 전사된 영역의 하류 위치로부터 최대 수천염기쌍(kb)의 거리에 걸쳐서, 어느 한 방향으로 작용할 수 있다(즉, 암호화 서열과 연관될 수 있다). 인핸서 서열

은 프로모터-의존성 유전자 발현에 영향을 미치고, 천연 유전자의 5' 또는 3' 영역에 위치할 수 있다. 인헨서 서열은 프로모터 서열과 근접할 수 있거나 근접하지 않을 수 있다. 유사하게, 인헨서 서열은 유전자 서열과 바로 인접할 수 있거나 바로 인접하지 않을 수 있다. 예를 들어, 인헨서 서열은 프로모터 및/또는 유전자 서열로부터 수천 염기쌍 떨어져 있을 수 있다.

[0042] 본 발명의 의미 내의 "종결 신호 서열"은, 예를 들어 폴리아데닐화 신호 서열과 같은, RNA 중합효소가 전사를 종결하게 하는 임의의 유전적 요소일 수 있다. 폴리아데닐화 신호 서열은 폴리아데닐화 공통 서열 AATAAA가 뒤따르는 RNA 전사의 엔도뉴클레아제 절단에 필요한 인식 영역이다. 폴리아데닐화 신호 서열은 "폴리A 부위", 즉 아데닌 잔기가 번역후 폴리아데닐화에 의해 첨가될 RNA 전사체 상의 부위를 제공한다.

[0043] 최대 대응을 위해 비교되고 정렬될 경우 동일하거나 동일한 아미노산 잔기 또는 뉴클레오타이드의 명시된 백분율을 가지는 둘 이상의 뉴클레오타이드 서열과 관련하여 용어 "동일한" 또는 "동일성" 백분율은 본 명세서에 기재된 서열 비교 알고리즘, 예를 들어 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘 중 하나를 사용하여, 또는 육안 검사에 의해 측정된 바와 같다.

[0044] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "서열 동일성"은, 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬될 경우, 2개 이상의 정렬된 서열에서 뉴클레오타이드 사이의 동일성 정도를 말한다. 본 명세서에서 용어 "% 상동성"은 본 명세서에서 용어 "% 동일성"과 상호교환적으로 사용되며, 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬될 경우, 2개 이상의 정렬된 서열 사이의 핵산 또는 아미노산 서열 동일성의 수준을 말한다. 예를 들어, 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 80% 상동성은 정의된 알고리즘에 의해 결정된 80% 서열 동일성과 동일한 것을 의미하고, 따라서 주어진 서열의 상동성은 주어진 서열의 길이에 대하여 80% 초과와 서열 동일성을 가진다. 서열 동일성은 다수의 공중이 이용가능한 정렬 알고리즘 도구 중 임의의 것, 예를 들어 문헌[Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2: 482 (1981)]의 국부 상동성 알고리즘, 문헌[Needleman & Wunsch, J Mol. Biol. 48: 443 (1970)]의 상동성 정렬 알고리즘, 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444 (1988)]의 유사성 검색 방법을 사용하여 서열을 정렬하고, 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)(www.ncbi.nlm.nih.gov/)를 통해 공중이 이용가능한 소프트웨어와 함께, BLAST 알고리즘(Altschul et al., J Mol. Biol. 215: 403-410 (1990))에 의해 이들 알고리즘의 컴퓨터 이행(위스콘신 체네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)의 GAP, BESTFIT, FASTA, 및 TFASTA, 체네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group), 미국 위스콘신주 매디슨 사이언스 드라이브 575 소재)에 의해 결정될 수 있거나, 또는 육안검사에 의해(일반적으로 문헌[Ausubel et al., 하기]을 참조) 결정될 수 있다.

[0045] 용어 "보체" 및 "상보적인"은 역평행 뉴클레오타이드 서열에서 상보적인 염기 잔기 사이에 수소 결합의 형성시 서로 쌍을 이룰 수 있는 2개의 역평행 뉴클레오타이드 서열을 말한다.

[0046] 본 명세서에서 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드와 관련하여 사용될 경우, 용어 "천연"은 자연에서 발견되는; 즉, 야생형 바이러스, 또는 세포의 게놈에 존재하는 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열을 말한다.

[0047] 본 명세서에서 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드와 관련하여 사용될 경우, 용어 "변이체"는 천연 서열 또는 임의의 다른 천연 서열과 100% 미만의 서열 동일성을 가지는 천연 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 돌연변이체를 말한다. 이와 같은 변이체는 상응하는 천연 유전자 또는 유전자 산물 서열에 하나 이상의 치환, 결실, 또는 삽입을 포함할 수 있다. 용어 "변이체"는 또한 천연 유전자 또는 유전자 산물의 단편, 및 이의 돌연변이체, 예를 들어 상응하는 천연 유전자 또는 유전자 산물 단편에 하나 이상의 치환, 결실, 또는 삽입을 포함하는 단편을 포함한다. 일부 실시형태에서, 변이체는 당업계에서 알려진 바와 같이, 천연 유전자 산물의 기능적 활성, 예를 들어 리간드 결합, 수용체 결합, 단백질 신호전달 등을 유지한다.

[0048] 본 발명의 재조합 단백질 또는 폴리펩타이드를 말할 경우, 용어 "단편"은 상응하는 전장 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열의 일부와 동일하지만, 상기 아미노산 서열의 전부와는 동일하지 않은 아미노산 서열을 가지는 폴리펩타이드를 의미하며, 상기 단편은 상응하는 전장 단백질 또는 폴리펩타이드의 기능 또는 활성 중 적어도 하나를 유지한다. 단편은 바람직하게는 전장 단백질 또는 폴리펩타이드의 적어도 20 내지 100개의 근접 아미노산 잔기를 포함한다.

[0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "생물학적 활성" 및 "생물학적으로 활성인"은, 배양 또는 생체 내 세포주에서, 특정 유전자 산물, 예를 들어 RNA 또는 단백질에 기인한 활성을 말한다. 예를 들어, RNAi 분자의 "생물학적 활성"은 표적 폴리뉴클레오타이드 서열로부터 폴리펩타이드의 생성을 저해하는 분자의 능력을 말한다.

[0050] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "길항제"는 표적 분자의 활성을 저해하는 작용을 하는 분자를 말한다.

길항제는, 예를 들어 표적에 직접적으로 결합하거나 표적의 수용체를 불활성화시킴으로써 표적 분자의 활성을 저해하는 구조적 기항제, 및 예를 들어 생물학적 시스템에서 표적의 생성을 감소시키거나 생물학적 시스템에서 표적의 저해제의 생성을 증가시키는 기능적 길항제를 모두 포함한다.

[0051] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "투여" 또는 "도입"은 세포 또는 대상체의 세포들 및/또는 기관에 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위한 벡터와 세포, 조직, 또는 대상체를 접촉시키는 것을 말한다. 이와 같은 투여 또는 도입은 생체 내, 시험관 내 또는 생체 외에서 일어날 수 있다. 유전자 산물의 발현을 위한 벡터는 형질감염(이는 전형적으로 물리적 수단(예를 들어, 인삼칼슘 형질감염, 전기천공법, 미세주입법 또는 리포펙션)에 의해 세포 내로 이중 DNA의 삽입을 의미함); 감염(이는 전형적으로 감염원, 즉 바이러스에 의한 도입을 말함); 또는 형질도입(이는 전형적으로 바이러스를 이용한 세포의 안정적인 감염 또는 바이러스 제제(예를 들어, 박테리오파지)에 의해 하나의 미생물로부터 또 다른 미생물의 유전적 물질의 이동을 의미함)에 의해 세포 내로 도입될 수 있다.

[0052] 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "형질전환" 또는 "형질감염"은 벡터에 의해, 세포, 예를 들어 포유동물 세포, 곤충 세포, 박테리아 세포 등의 내부로 이중 DNA를 전달하는 것을 말한다. 세포를 "형질전환"하는 데 사용되는 벡터는 플라스미드, 미니서클 DNA, 또는 다른 비히클일 수 있다. 전형적으로, 세포는 세포 내로 이중 DNA의 투여, 도입 또는 삽입에 사용되는 수단(즉, 벡터)에 따라서 "형질도입된", "감염된", "형질감염된" 또는 "형질전환된"으로 지칭된다. 용어 "형질감염된" 및 "형질전환된"은 본 명세서에서, 예를 들어 주체 방법에서 사용하기 위한 주체 바이러스 벡터를 제조할 때와 같이, 비바이러스 방법, 예를 들어 전기천공, 염화칼슘 형질감염, 리포펙션 등에 의해 이중 DNA를 도입하는 것을 말하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 용어 "형질도입된" 및 "감염된"은 바이러스 입자와 관련하여 세포에 이중 DNA를 도입하는 것을 말하기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0053] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 벡터를 이용하여 형질도입, 감염, 형질감염 또는 형질전환된 세포를 말한다. 벡터는 플라스미드, 바이러스 입자, 파지 등일 수 있다. 배양 조건, 예컨대 온도, pH 등은 발현을 위해 선택되는 숙주 세포와 함께 이전에 사용된 것이며, 이는 당업자에게 명백할 것이다. 용어 "숙주 세포"는 원래의 형질도입, 감염, 형질감염 또는 형질전환된 세포 및 이의 자손을 말하는 것임을 이해할 것이다.

[0054] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "치료적" 유전자는, 발현될 때, 존재하는 세포 또는 조직에 대하여, 또는 유전자가 발현되는 포유동물에 대하여 유익한 효과를 부여하는 유전자를 말한다. 유익한 효과의 예는 병태 또는 질환의 징후 또는 증상의 개선, 병태 또는 질환의 예방 또는 저해, 또는 원하는 특징의 부여를 포함한다. 치료적 유전자는 세포 또는 포유동물에서 유전적 결함을 교정하는 유전자를 포함한다.

[0055] 용어 "치료", "치료하는" 등은 일반적으로 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 상기 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 방지하는 것, 예를 들어 질병 또는 이의 증상이 대상체에서 일어나는 가능성을 감소시키는 것의 관점에서 예방적일 수 있고/있거나, 질환 및/또는 질환에 기인한 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "치료"는 포유동물에서 질환의 임의의 치료를 포함하며, (a) 질환에 걸리기 쉬울 수 있지만 아직 질환이 있는 것으로 진단받지 않은 대상체에서 질환이 일어나는 것을 방지하는 것; (b) 질환을 저해하는 것, 즉 질환의 발전을 막는 것; 또는 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 야기하는 것을 포함한다. 치료제는, 질환 또는 상해의 개시 전, 동안 또는 후에 투여될 수 있다. 치료가 환자의 바람직하지 않은 임상적 증상을 안정화시키거나 감소시키는 경우에, 진행중인 질환의 치료는 특히 관심이 있다. 이와 같은 치료는 바람직하게는 발병한 조직에서 완전한 기능 상실 전에 실행된다. 주체 치료법은 바람직하게는 질환의 증상 단계 동안, 일부 경우에는 질환의 증상 단계 후에 투여될 것이다.

[0056] 용어 "개인", "대상체", "숙주", 및 "환자"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되며, 인간 및 비인간 영장류(유인원 및 인간을 포함함); 포유류 스포츠 동물(예를 들어, 말); 포유류 농장 동물(예를 들어, 양, 염소 등); 포유류 애완동물(개, 고양이 등); 및 설치류(예를 들어, 마우스, 래트 등)를 포함하지만 이로 제한되지 않는 임의의 포유동물 대상체; 특히 인간에 대하여 진단, 치료, 또는 치료법이 요구되는 임의의 포유동물 대상체를 말한다.

[0057] 본 명세서에서 사용된 용어는 단지 특정 실시형태를 기재하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 단수 형태("a", "an", 및 "the")는 문맥이 달리 명확하게 지시하지 않는 한, 복수 형태 또한 포함하는 것으로 의도된다. 또한 용어 "포함하는(including)", "포함한다(includes)", "가지는(having)", "가진다(has)", "함께(with)", 또는 이의 변형어가 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 한, 이와 같은 용어는 용어 "포함하는(comprising)"과 유사한 방식으로 포함하는 것으로 의

도된다.

- [0058] "포함하는(comprising)"이란, 나열된 요소가, 예를 들어 조성물, 방법, 키트 등에서 필요하지만, 다른 요소가, 예를 들어 청구범위의 범주 내에서 조성물, 방법, 키트 등을 형성하기 위해 포함될 수 있음을 의미한다. 예를 들어, 프로모터에 작동 가능하게 연결된 치료적 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자를 "포함하는" 발현 카세트는, 유전자 및 프로모터에 추가적으로 다른 요소, 예를 들어 폴리아데닐화 서열, 인핸서 요소, 다른 유전자, 링커 도메인 등을 포함할 수 있는 발현 카세트이다.
- [0059] "~로 본질적으로 이루어진"이란, 예를 들어 조성물, 방법, 키트 등의 기본적 및 신규한 특징(들)에 실질적으로 영향을 미치지 않는 명시된 물질 또는 단계에 대하여 기재된, 예를 들어 조성물, 방법, 키트 등의 범주의 제한을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 및 폴리아데닐화 서열에 작동 가능하게 연결된 치료적 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자"로 본질적으로 이루어진" 발현 카세트는, 유전자의 전사 또는 번역에 실질적으로 영향을 미치지 않는 한, 추가적인 서열, 예를 들어 링커 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예로서, 나열된 서열"로 본질적으로 이루어진" 변형체 폴리펩타이드 단편은, 상기 변형체 폴리펩타이드 단편이 유래된 전장 나이브(naive) 폴리펩타이드에 기초한 서열의 경계에서 나열된 서열에서 약 10개의 아미노산 잔기를 더하거나 뺀 아미노산 서열, 예를 들어 나열된 경계 아미노산 잔기보다 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개 잔기가 더 적거나, 나열된 경계 아미노산 잔기보다 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개 잔기가 더 많은 아미노산 서열을 가진다.
- [0060] "~로 이루어진"이란, 청구범위에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계, 또는 성분의 조성물, 방법, 또는 키트로부터 배제되는 것을 의미한다. 예를 들어, 프로모터 및 폴리아데닐화 서열에 작동 가능하게 연결된 치료적 폴리펩타이드를 암호화하는 유전자"로 이루어진" 발현 카세트는 프로모터, 치료적 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 폴리아데닐화 서열만으로 이루어진다. 또 다른 예로서, 나열된 서열"로 이루어진" 폴리펩타이드는 나열된 아미노산 서열만을 포함한다.
- [0061] 용어 "약" 또는 "대략"은 당업자에 의해 결정될 때 특정 값에 대하여 허용 가능한 오차 범위 내인 것을 의미하며, 이는 수치가 측정되거나 결정되는 방법, 즉 측정 시스템의 한계에 부분적으로 의존할 것이다. 예를 들어, "약"은 당업계에서의 관행에 따라, 1 또는 1 초과의 표준편차 이내임을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 주어진 수치의 최대 20%, 바람직하게는 최대 10%, 더 바람직하게는 최대 5%, 훨씬 더 바람직하게는 최대 1%의 범위를 의미할 수 있다. 대안적으로, 특히 생물학적 시스템 또는 공정과 관련하여, 상기 용어는 수치의 10배 이내, 바람직하게는 5배 이내, 더 바람직하게는 2배 이내임을 의미할 수 있다. 특정 수치가 출원 및 청구범위에 기재된 경우, 달리 언급되지 않는 한, 특정 수치에 대한 허용 가능한 오차 범위 내임을 의미하는 용어 "약"이 가정되어야 한다.
- [0062] 방법 및 조성물
- [0063] 본 발명의 일부 양태에서, 원추 광수용체에 폴리뉴클레오타이드를 전달하기 위한 방법 및 조성물이 제공된다. 상기 논의된 바와 같이, "원추 세포", "망막 원추체", 가장 간단하게는 "원추체"로 본 명세서에서 상호교환적으로 지칭되는 원추 광수용체는, 안구의 망막에서 광수용체 세포의 2가지 아형 중 하나이며, 다른 하나는 간상 광수용체이다. 원추 광수용체는 물리적, 생화학적, 및 기능적 특징에 의해 간상 광수용체와 용이하게 구별될 수 있다. 예를 들어, 원추 광수용체는 원뿔 형상의 외측 부분 영역을 포함하는 반면, 간상 광수용체는 막대 형상의 외측 부분을 포함한다. 원추 광수용체는, 예를 들어 L-옵신(OPN1LW, 젠뱅크(GenBank) 수탁 번호 NM_020061.5로 찾을 수 있는 핵산 및 아미노산 서열), M-옵신(OPN1MW, 젠뱅크 수탁 번호 NM_000513.2로 찾을 수 있는 핵산 및 아미노산 서열), 또는 S-옵신(OPN1SW, 젠뱅크 수탁 번호 NM_001708.2로 찾을 수 있는 핵산 및 아미노산 서열)을 포함하여, 간상 광수용체에 의해 발현되지 않는 다수의 단백질을 발현하는 반면; 간상 광수용체는 원추 광수용체에 의해 발현되지 않는 다수의 단백질, 예를 들어 로돕신(RHO, 젠뱅크 수탁 번호 NM_000539.3으로 찾을 수 있는 핵산 및 아미노산 서열) 및 간상체-유래 원추체 생존능 인자(rod-derived cone viability factor(RDCVF), 또한 NXNL1로 알려져 있음, 젠뱅크 수탁 번호 NM_138454.1로 찾을 수 있는 핵산 및 아미노산 서열)를 발현한다. 기능적으로, 원추 광수용체는 색각을 담당하고 비교적 밝은 빛에서 가장 잘 기능하는 반면, 간상 광수용체는 저조도 수준에서 시력을 지원하고 희미한 빛에서 가장 잘 기능한다는 점에서 원추 광수용체는 간상 광수용체와 상이하며; 원추체와 간상체는 망막전도(ERG) 또는 색상 ERG(cERG)를 사용하여 이러한 차이점을 기반으로 하여 구별될 수 있다. 마지막으로, 원추 광수용체는 망막에서의 위치에 의해 간상 광수용체와 구별될 수 있다. 상기에서 논의된 바와 같이, 원추 광수용체의 대부분(이들 모두 L- 및 M-원추 광수용체임)은 망막의 황반 중심에 위치한 1.5mm의 오목한 곳(중심오목으로 불림)에 밀집하여 채워져 있고, 나머지 L- 및 M-원추 광수용체 및 S-원추 광수용체는 부중심와, 중심와주위, 및 망막 주변에 산재되어 있다. 반면, 간상 광수용체는 중심소와에서 배제되

고, 중심와에서 적게 나타나며, 대신에 부중심와, 중심와주위, 및 망막 주변에서 주로 발견된다.

[0064] 상기 논의된 바와 같이, 본 개시내용에 앞서, 원추 광수용체(보다 특히, 중심와에서 L- 및 M-원추 광수용체)가 유리체로부터 전달된 AAV에 의한 형질도입에 대하여 저항성이 있음이 당업계에서의 일반적인 이해였다. 그러나, 본 명세서에서 작용예에 의해 입증된 바와 같이, 중심와 원추체는, 실제로 본 개시내용의 방법 및 조성물을 사용한 유리체 내로의 전달에 의해 형질도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 주체 방법 및 조성물에 의해 형질도입되는 원추 광수용체는 망막의 어느 곳, 즉 황반(중심오목, 부중심와, 중심와주위), 또는 주변부에 존재한다. 일부 실시형태에서, 원추 광수용체는 중심오목에 존재한다. 특정 실시형태에서, 원추 광수용체는 중심와의 원추체이며, 즉 원추 광수용체는 중심와 내에 존재하는 L- 또는 M-원추체이고, 중심와는 중심오목의 중심에서 약 0.175mm로부터 중심오목의 중심에서 약 0.75mm에 걸치는 중심오목의 영역이다.

[0065] rAAV 비리온

[0066] 주체 방법을 실시함에 있어서, 관심 대상 폴리뉴클레오타이드는 게놈 내에 이중 서열로서 관심이 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 재조합 바이러스 입자를 안구의 유리체 내에 주사함으로써 원추 광수용체로 전달된다. 일부 예에서, 재조합 바이러스 입자는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 입자이다. 일부 실시형태에서, rAAV는 야생형 혈청형을 가지며; 즉, rAAV는 자연에서 발생하는 바이러스 캡시드 단백질로 이루어진 바이러스 캡시드를 포함한다. 다른 실시형태에서, rAAV는 AAV 혈청형 변이체이며, 즉 rAAV는 변이체 AAV 캡시드 단백질, 즉 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질, 예를 들어 야생형 AAV 캡시드 단백질에 비하여 적어도 하나의 아미노산 차이를 포함하며, 자연적으로 발생하는 AAV 캡시드 단백질에 존재하는 아미노산 서열로 이루어지지 않는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다.

[0067] 본 출원의 작용예에서 입증된 바와 같이, GH 루프, 또는 보다 특히 GH루프의 서브루프 IV에서 적어도 하나의 아미노산 차이를 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온은, 유리체 내로 전달될 때 야생형 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온에 비하여 원추 광수용체의 증가된 감염성을 입증한다. "증가된 감염성"이란, 변이체 rAAV 비리온이 야생형 AAV 캡시드 단백질보다 표적 세포를 더 잘 형질도입할 수 있는 것을 의미한다. 세포를 형질도입하는 AAV의 능력에서의 개선은 더 많은 폴리뉴클레오타이드가 각각의 세포로 전달되는 것과 더 많은 세포가 조직 내에서 형질도입되고, 이에 의해 각각의 세포 및 조직으로 전달되는 폴리뉴클레오타이드의 양의 증가를 초래하는 것을 관찰함으로써 관찰될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 양태에서, 원추 광수용체로 관심 대상 폴리뉴클레오타이드의 개선된 전달을 위한 방법이 제공되며, 상기 개선은 유효량의 rAAV 변이체를 안구의 유리체로 전달하는 것을 포함하고, 상기 rAAV 변이체는 i) 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질, 예를 들어 야생형 AAV 캡시드 단백질에 비하여 적어도 하나의 아미노산 차이를 포함하고, 자연적으로 발생하는 AAV 캡시드 단백질에 존재하는 아미노산 서열로 이루어지지 않는 변이체 AAV 캡시드 단백질, 및 ii) 바이러스 게놈 내에 이중 서열로서 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0068] 주체 개시내용에서 특히 관심 대상 것은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 AAV 캡시드 단백질의 GH 루프, 또는 "루프 IV"에서 적어도 하나의 아미노산 차이를 포함하는 rAAV 변이체이다. GH 루프, 또는 루프 IV란, 예를 들어 문헌[Xie et al. (2002) PNAS 99(16):10405-10410], [van Vliet et al. (2006) Mol. Ther. 14:809]; [Padron et al. (2005) J. Virol. 79:5047]; 및 [Shen et al. (2007) Mol. Ther. 15:1955]에 기재된 바와 같이, AAV 캡시드 단백질 VP1의 젤리롤 β-배럴의 G 및 H 가닥 사이에서 형성된 루프를 의미한다. 일부 경우에서, 적어도 하나의 아미노산 차이는 GH 루프의 서브루프 4, 즉 GH 루프의 용매가 접근가능한 부분 내에 있으며, GH 루프는 AAV1 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 1), AAV2 VP1의 약 아미노산 570 내지 611(서열번호 2), AAV3 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 3), AAV4 VP1의 약 아미노산 569 내지 610(서열번호 4), AAV5 VP1의 약 아미노산 560 내지 601(서열번호 5), AAV6 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 6), AAV7 VP1의 약 아미노산 572 내지 613(서열번호 7), AAV8 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 8), AAV9 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 9), AAV10 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 10); 또는 이들의 변이체의 약 상응하는 아미노산 범위로 본질적으로 이루어진다. 특정 경우에, 적어도 하나의 아미노산 차이는 AAV1 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV2 VP1의 아미노산 580 내지 595, AAV3 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV4의 아미노산 579 내지 594, AAV5 VP1의 아미노산 570 내지 585, AAV6 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV7 VP1의 아미노산 582 내지 597, AAV8 VP1의 아미노산 583 내지 598, AAV9 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV10 VP1의 아미노산 583 내지 598로 본질적으로 이루어진 아미노산의 범위 내에, 또는 이의 변이체의 상응하는 아미노산 범위 내에 있다. 당업자는, 다양한 AAV 혈청형의 캡시드 단백질의 아미노산 서열의 비교를 기반으로 하여, 예를 들어 "AAV2 유래의 VP1의 아미노산 570 내지 611에 상응하는" 아미노산이 임의의 주어진 AAV

혈청형의 캡시드 단백질에 있을 것임을 알 것이다.

- [0069] 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 아미노산 차이는 AAV 캡시드 단백질의 GH 루프에서 2개의 아미노산 사이에서의, 예를 들어 AAV1 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 1), AAV2 VP1의 약 아미노산 570 내지 611(서열번호 2), AAV3 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 3), AAV4 VP1의 약 아미노산 569 내지 610(서열번호 4), AAV5 VP1의 약 아미노산 560 내지 601(서열번호 5), AAV6 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 6), AAV7 VP1의 약 아미노산 572 내지 613(서열번호 7), AAV8 VP1의 약 아미노산 5731 내지 614(서열번호 8), AAV9 VP1의 약 아미노산 571 내지 612(서열번호 9), AAV10 VP1의 약 아미노산 573 내지 614(서열번호 10); 또는 이들의 변이체의 약 상응하는 아미노산 범위 사이에서의; 예를 들어, AAV1 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV2 VP1의 아미노산 580 내지 595, AAV3 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV4 VP1의 아미노산 579 내지 594, AAV5 VP1의 아미노산 570 내지 585, AAV6 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV7 VP1의 아미노산 582 내지 597, AAV8 VP1의 아미노산 583 내지 598, AAV9 VP1의 아미노산 581 내지 596, AAV10 VP1의 아미노산 583 내지 598, 또는 이들의 변이체의 상응하는 아미노산 범위 내의 2개의 아미노산 사이에서의 펩타이드의 삽입부에 존재한다. 예를 들어, 삽입 부위는 AAV2 VP1의 아미노산 580과 581, 아미노산 581과 582, 아미노산 582와 583, 아미노산 583과 584, 아미노산 584와 585, 아미노산 585와 586, 아미노산 586과 587, 아미노산 587과 588, 아미노산 588과 589, 아미노산 589와 590, 아미노산 590과 591, 아미노산 591과 592, 아미노산 592와 593, 아미노산 593과 594, 또는 아미노산 594와 595, 또는 또 다른 AAV VP1 중의 상응하는 아미노산 또는 이의 변형체 사이일 수 있다.
- [0070] 본 개시내용의 일부 실시형태에서 특히 관심 대상 것은 PCT 공개 번호 WO 2012/145601에 개시된 바와 같은 펩타이드 삽입을 포함하는 rAAV 변이체이며, 상기 PCT 공개의 전체 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함되어 있다. 이러한 rAAV 변이체는 길이가 5 내지 11개의 아미노산인 펩타이드 삽입부를 포함하며, 즉 삽입된 펩타이드는 5개의 아미노산, 6개의 아미노산, 7개의 아미노산, 8개의 아미노산, 9개의 아미노산, 10개의 아미노산, 또는 11개의 아미노산을 포함한다.
- [0071] 특히 관심 대상 하나의 예시적인 펩타이드는 하기 화학식 I의 펩타이드이다:
- [0072] [화학식 I]
- [0073] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$ (서열번호 20)
- [0074] 식 중,
- [0075] Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;
- [0076] X1은, 존재하는 경우, Leu, Asn 및 Lys으로부터 선택되며;
- [0077] X2는 Gly, Glu, Ala 및 Asp로부터 선택되고;
- [0078] X3은 Glu, Thr, Gly 및 Pro으로부터 선택되며;
- [0079] X4는 Thr, Ile, Gln 및 Lys으로부터 선택되고;
- [0080] X5는 Thr 및 Ala으로부터 선택되며;
- [0081] X6은 Arg, Asn 및 Thr으로부터 선택되고;
- [0082] X7은, 존재하는 경우, Pro 및 Asn으로부터 선택된다.
- [0083] 특정 실시형태에서, X1 및/또는 X7은 부재한다.
- [0084] 특히 관심 대상 두 번째 예시적인 펩타이드는 하기 화학식 II의 펩타이드이다:
- [0085] [화학식 II]
- [0086] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$ (서열번호 21)
- [0087] 식 중,
- [0088] Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;
- [0089] X1 내지 X4의 각각은 임의의 아미노산이며;

- [0090] X5는 Thr이고;
- [0091] X6은 Arg이며;
- [0092] X7은 Pro이다.
- [0093] 특정 실시형태에서, Y1 내지 Y4 중 임의의 하나 이상은 부재한다.
- [0094] 특히 관심 대상 세 번째 예시적인 펩타이드는 하기 화학식 III의 펩타이드이다:
- [0095] [화학식 III]
- [0096] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$ (서열번호 22)
- [0097] 식 중,
- [0098] Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;
- [0099] X1은, 존재하는 경우, Leu 및 Asn으로부터 선택되며;
- [0100] X2는, 존재하는 경우, Gly 및 Glu으로부터 선택되고;
- [0101] X3은 Glu 및 Thr으로부터 선택되며;
- [0102] X4는 Thr 및 Ile으로부터 선택되고;
- [0103] X5는 Thr이며;
- [0104] X6은 Arg이고;
- [0105] X7은 Pro이다.
- [0106] 특정 실시형태에서, Y1 내지 Y4, X1 및 X2 중 임의의 하나 이상은 부재한다.
- [0107] 특히 관심 대상 네 번째 예시적인 펩타이드는 하기 화학식 IV의 펩타이드이다:
- [0108] [화학식 IV]
- [0109] $Y_1Y_2X_1X_2X_3X_4X_5X_6X_7Y_3Y_4$ (서열번호 23)
- [0110] 식 중,
- [0111] Y1 내지 Y4의 각각은, 존재하는 경우, 독립적으로 Ala, Leu, Gly, Ser 및 Thr로부터 선택되고;
- [0112] X1은, 존재하는 경우, Leu, Asn, Arg, Ala, Ser 및 Lys으로부터 선택되며;
- [0113] X2는 Gly, Glu, Ala, Val, Thr 및 Asp로부터 선택되고;
- [0114] X3은 Glu, Thr, Gly, Asp 또는 Pro으로부터 선택되며;
- [0115] X4는 Thr, Ile, Gly, Lys, Asp 및 Gln으로부터 선택되고;
- [0116] X5는 Thr, Ser, Val 및 Ala으로부터 선택되며;
- [0117] X6은 Arg, Val, Lys, Pro, Thr 및 Asn으로부터 선택되고;
- [0118] X7은 Pro, Gly, Phe, Asn 및 Arg으로부터 선택된다.
- [0119] 특정 실시형태에서, Y1 내지 Y4 및 X1 중 임의의 하나 이상은 부재한다.
- [0120] 이들 화학식을 가지는 특히 관심 대상 예시적인 삼입 펩타이드는 서열 LGETTRP(서열번호 11) 및 NETITRP(서열번호 12), 또는 이들의 변이체를 포함하는 펩타이드를 포함한다. 일부 경우에서, 삼입 펩타이드는 아미노 말단 및/또는 카복실 말단에 1 내지 4개의 스페이서 아미노산(Y1 내지 Y4)을 가진다. 적합한 스페이서 아미노산은 류신, 알라닌, 글리신 및 세린을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 예를 들어, 일부 경우에서, 삼입 펩타이드는 아미노산 서열 LALGETTRPA(서열번호 13); LANETITRPA(서열번호 14)를 가진다. 또 다른 예에서, 삼입 펩타이드는 아미노산 서열 AALGETTRPA(서열번호 15) 또는 AANETITRPA(서열번호 16)를 가진다. 또 다른 예에서, 삼입 펩타이드는 아미노산 서열 GLGETTRPA(서열번호 17) 또는 GNETITRPA(서열번호 18)

를 가진다.

- [0121] 일부 실시형태에서, 주제 rAAV 비리온 캡시드는 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 GH 루프 또는 이의 하위영역에 약 5 내지 11개의 아미노산의 삽입 이외에, 임의의 아미노산 치환, 삽입 또는 결실을 포함하지 않는다. 다른 실시형태에서, 대상 rAAV 비리온 캡시드는 상기 기재된 바와 같은 GH 루프 또는 이의 하위영역에서 5 내지 11개의 아미노산의 삽입에 추가적으로, 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 1 내지 약 25개의 아미노산 삽입, 결실, 또는 치환을 포함할 수 있다. 예를 들어, 다수의 아미노산 서열 변경은 당업계에 개시되었으며, 이중 임의의 것은 주제 rAAV에 포함될 수 있다. 일부 실시형태에서, 주제 rAAV 비리온 캡시드는 키메라 캡시드이며, 예를 들어 상기 캡시드는 제1 AAV 혈청형의 AAV 캡시드의 일부 및 제2 혈청형의 AAV 캡시드의 일부를 포함하고; 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 GH 루프 또는 이의 하위영역에서 약 5개의 아미노산 내지 약 11개의 아미노산의 삽입을 포함한다.
- [0122] 일부 실시형태에서, 주제 rAAV 비리온은 상응하는 모 캡시드 단백질의 VP1 캡시드 단백질에 대하여 80% 이상의 서열 동일성, 예를 들어 상응하는 모 캡시드 단백질에 대하여 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 97% 이상의 동일성을 가지는 아미노산 서열을 포함하는 캡시드 단백질 및 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비하여 GH 루프 또는 이의 하위영역에 약 5 내지 11개의 아미노산의 삽입을 포함한다. 예를 들어, 서열번호 19에 기재된 7m8 VP1 서열에 대하여 80% 이상의 서열 동일성, 예를 들어 7m8 VP1 서열에 대하여 85% 이상의 동일성, 90% 이상의 동일성, 또는 95% 이상의 동일성, 일부 경우에서 서열번호 19에서 제공되는 아미노산 서열에 대하여 97% 이상의 동일성, 98% 이상의 동일성, 또는 적어도 약 99% 서열 동일성.
- [0123] 주제 조성물에 포함되고 주제 방법에서 유용한 rAAV 변이체는 이들이 원추 광수용체, 예를 들어 중심와 원추 광수용체를 형질도입하는 효능을 결정함으로써 그와 같이 용이하게 입증될 수 있다. 예를 들어, 당업계에 알려진 원추체 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 주제 rAAV 내에 패키징된 GFP를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 AAV 바이러스 게놈을 포함하는 바이러스 입자가 형성될 수 있고, 상기 바이러스 입자는 포유동물 안구, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 모래쥐, 햄스터, 다람쥐, 또는 영장류, 예를 들어 비인간 영장류의 안구의 유리체 내로 주사될 수 있다. 본 개시내용에 포함되는 rAAV 비리온은 유리체 내 주사를 통하여 투여될 때 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 원추 광수용체의 감염성에 비하여 전형적으로 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 일부 경우에 50배 초과, 예를 들어 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 예를 들어 100배 이상 증가된 원추 광수용체의 감염성을 나타낼 것이다. 바꿔 말하면, 주제 방법에서 사용하기에 적합한 rAAV 비리온은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온보다 원추 광수용체를 적어도 10배 더 많이, 적어도 15배 더 많이, 적어도 20배 더 많이, 적어도 50배 더 많이, 일부 경우에 50배 더 많이, 예를 들어 원추 광수용체를 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 예를 들어 100배 더 많이 감염시킬 것이다.
- [0124] 일부 실시형태에서, 방법은 원추 광수용체에서 전달된 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 임의의 편리한 방법이 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 데 이용될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는, 예를 들어 PCR, 차세대 염기서열분석(Next Gen sequencing) 등을 사용하여 검출될 수 있거나, 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 유전자 산물의 발현은, 예를 들어 RT-PCR, 노던 블롯, RN아제(RNase) 보호, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학 등에 의해 검출될 수 있다. 이들 방법은 특히 전임상 연구에 적합하다. 임상 연구에서, 이는 기능적 유전자 산물의 존재를 검출함으로써, 즉 대상체에서 원추 광수용체의 생존력 또는 기능에 대한 유전자 산물의 영향을 검출함으로써 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 것이 바람직할 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 유전자 산물이 원추 광수용체의 생존력을 개선시키는 경우, 원추 광수용체의 생존력의 개선은, 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 방법으로서, 예를 들어 안저 촬영, 광 간섭성 단층촬영(Optical coherence tomography; OCT), 적응 광학(Adaptive Optics; AO) 등에 의해 검출될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 유전자 산물이 원추 광수용체의 활성을 변경시키는 경우, 원추 광수용체의 변형된 활성은, 전달된 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 방법으로서, 예를 들어 망막전도(ERG) 및 색상 ERG(cERG); 가성동색표(pseudoisochromatic plate)(이시하라 플레이트(Ishihara plate)), 하디-랜드-리터 다색 플레이트(Hardy-Rand-Ritter polychromatic plate), 판스위스-문셀 100 색상 테스트(Farnsworth-Munsell 100 hue test), 판스위스 패널 D-15(Farnsworth's panel D-15), 시티 유니버시티 테스트(City university test), 콜너의 규칙(Kollner's rule) 등과 같은 색각 테스트; 및 ETDRS 문자 테스트, 스넬렌 시력 테스트(Snellen visual acuity test) 등과 같은 시력 테스트에 의해 검출될 수 있다.
- [0125] 상기 논의된 바와 같이, 일부 실시형태에서, 주제 조성물 및 방법에 의해 전달된 폴리뉴클레오타이드는 이것이 전달된 원추 광수용체에 의해 발현된다. 다시 말해서, 본 발명의 일부 양태에서, 원추 광수용체에서 유전자 산

물을 발현시키기 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 관심 대상 유전자 산물을 암호화하는 폴리뉴클레오타이드를 원추 광수용체로 전달하는 단계를 포함한다. 당업자에 의해 잘 이해될 바와 같이, 관심 대상 폴리뉴클레오타이드의 원추 세포에 의한 발현은 전형적으로, 관심 대상 폴리뉴클레오타이드가 프로모터에 작동 가능하게 연결될 것을 필요로 한다. 또한 당업자에 의해 이해될 바와 같이, 이것이 달성될 수 있는 다수의 방법이 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드는, 프로모터에 작동적으로 연결된 숙주 세포, 즉 원추 광수용체로 전달될 수 있다. 다시 말해서, 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 계놈은 또한 프로모터를 포함하며, 상기 프로모터는 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하여 연결되어 발현 카세트를 형성한다. 또 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드는 숙주 계놈 내로 폴리뉴클레오타이드의 통합을 촉진시키는 서열이 측접된 숙주 세포, 즉 원추 광수용체로 전달될 수 있다. 다시 말해서, 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 계놈은 숙주 세포 프로모터의 3' 말단을 측접하는 서열과 상동성인 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 측접하는 서열을 포함하고 숙주 세포 프로모터에 작동 가능하게 연결되도록 숙주 계놈 내로 관심 대상 폴리뉴클레오타이드의 재조합을 촉진한다. 관심 대상 폴리뉴클레오타이드의 발현을 보장하기 위해 이용될 수 있는 재조합 바이러스 계놈의 다른 배열은 당업자에 의해 용이하게 구상될 것이며; 예를 들어 미국 출원 공개 번호 2013/0280222(이의 전체 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함됨)를 참조한다.

[0126] 따라서, 일부 경우에서, rAAV에 의해 포함된 바이러스 계놈은 관심 대상 폴리뉴클레오타이드에 작동 가능하게 연결된 프로모터를 포함한다. 일부 경우에서, 프로모터는 산재 프로모터, 즉 광범위한 세포, 조직 및 종에서 활성적인 프로모터이다. 다른 경우에서, 프로모터는 원추체 프로모터이다. 원추체 프로모터란, 원추 광수용체에서 활성적인 프로모터, 즉 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 원추 광수용체에서의 발현을 촉진하는 프로모터를 의미한다. 주체 조성물에서 유용한 원추체 프로모터의 비제한적인 예는 미국 가출원 제61/954,330호 및 제62/127,185호에 개시된 바와 같은 pMNTC 프로모터; 예를 들어 미국 출원 공개 제2013/0317091호에 개시된 바와 같은 pR2.1 프로모터 또는 이의 변이체(예를 들어, pR1.7, pR1.5, pR1.1 등); 또는 미국 출원 공개 제2014/0275231호에 개시된 바와 같은 합성 IRBP/GNAT2 프로모터를 포함하며; 이들 출원의 전체 개시내용은 본 명세서에 참조로 포함되어 있다. 다른 경우에서, rAAV에 의해 포함되는 바이러스 계놈은 숙주 계놈에서 표적 통합 부위에 대한 상동성을 가지는 2개의 서열, 즉 통합 부위의 5' 영역에 대해 상동성이고 바이러스 계놈 상의 폴리뉴클레오타이드에 대하여 5'에 위치하는 제1 서열, 및 통합 부위의 3' 영역에 대해 상동성이고 바이러스 계놈 상의 폴리뉴클레오타이드에 대하여 3'에 위치하는 제2 서열을 포함하되, 상기 표적 통합 부위는 숙주 프로모터, 예를 들어 원추체 프로모터, 예를 들어 L-옵신 프로모터, M-옵신 프로모터에 대하여 3'이고 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0127] 일부 실시형태에서, 형질도입은 야생형 또는 다른 모 캡시드가 이용될 때 관찰되는 발현에 비하여 향상된다. 향상이란, 야생형 또는 다른 모 캡시드 단백질을 사용하여 관찰될 수준에 비하여, 그리고 보통 원추체 생존력 및/또는 기능에 영향을 미치는, 예를 들어 대상체에 치료적 이익을 제공하는 양에 대하여 대상체의 원추 광수용체에서, 예를 들어 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 일부 경우에 50배 초과, 예를 들어 적어도 60배, 적어도 70배, 적어도 80배, 적어도 90배, 예를 들어 100배 상승, 증가, 또는 증강된 형질도입을 의미한다.

[0128] 주체 변이체 rAAV에 의한 원추 세포의 향상된 형질도입은 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 발현 카세트의 발현을 향상시켜, 변이체 rAAV에 의해 상기 세포로 전달될 것으로 예상된다. 주체 개시내용의 rAAV에 의한 폴리뉴클레오타이드의 향상된 발현은 다수의 방법으로 관찰될 수 있다. 예를 들어, 향상된 발현은 원추 세포에 대한 변이체 rAAV의 접촉 후 폴리뉴클레오타이드의 발현을, 폴리뉴클레오타이드가 모 rAAV에 의해 전달될 경우 발현이 검출될 것보다 더 일찍, 예를 들어 7일 일찍, 2주 일찍, 3주 일찍, 4주 일찍, 8주 일찍, 12주 일찍 검출함으로써 관찰될 수 있다. 향상된 발현은 또한 세포 당 유전자 산물의 양의 증가로서 관찰될 수 있다. 예를 들어, 원추 세포 당 유전자 산물의 양의 2배 이상 증가, 예를 들어 3배 이상 증가, 4배 이상 증가, 5배 이상 증가, 또는 10배 이상 증가가 있을 수 있다. 향상된 발현은 또한 변이체 rAAV에 의해 운반되는 폴리뉴클레오타이드의 검출 가능한 수준을 발현하는 원추 세포의 수의 증가로서 관찰될 수 있다. 예를 들어, 폴리뉴클레오타이드의 검출 가능한 수준을 발현하는 원추 세포의 수의 2배 이상의 증가, 예를 들어 3배 이상의 증가, 4배 이상의 증가, 5배 이상의 증가, 또는 10배 이상의 증가가 있을 수 있다. 또 다른 예로서, 본 발명의 폴리뉴클레오타이드는 모 rAAV에 비하여 세포의 더 많은 비율로 폴리뉴클레오타이드의 검출 가능한 수준을 촉진시킬 수 있으며; 예를 들어, 모 rAAV가 예를 들어 특정 영역에서 원추 세포의 5% 미만으로 폴리뉴클레오타이드 발현의 검출 가능한 수준을 촉진시킬 수 있는 경우, 본 발명의 rAAV는 상기 영역에서 원추 세포의 5% 이상으로 발현의 검출 가능한 수준을 촉진시키며; 예를 들어 접촉되는 원추 세포의 10% 이상, 15% 이상, 20% 이상, 25% 이상, 30% 이상, 35% 이상, 40% 이상, 또는 45% 이상, 일부 경우에 50% 이상, 55% 이상; 60% 이상, 65% 이상, 70% 이상, 또는 75% 이상, 예를

들어 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 또는 95% 이상이 유전자 산물의 검출 가능검출 가능 발현할 것이다. 항상 된 발현은 또한, 예를 들어 당업계에서 알려져 있고 본 명세서에 기재된 바와 같은, 안저 촬영, OCT, 적응 광학, cERG, 색각 테스트, 시력 테스트 등과 같은 평가 도구를 사용하여 측정되는, 원주 세포의 생존력 및/또는 기능에서의 변경으로서 관찰될 수 있다.

[0129] 일부 실시형태에서, 상기 방법은 원주 광수용체에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 검출하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이와 같은 실시형태에서, 당업계에 알려져 있고 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 편리한 방법, 예를 들어 RT-PCR, 노던 블롯, RN아제 보호, 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학 등에 의해 예를 들어 유전자 산물, 즉 암호화된 RNA 또는 단백질을 검출하는 것; 예를 들어 안저 촬영, 광 간섭성 단층촬영(OCT), 적응 광학(AO)에 의해 원주 광수용체의 생존력에 대한 유전자 산물의 영향을 검출하는 것; 또는 원주체 기능에 대한 유전자 산물의 영향을, 예를 들어 망막전도(ERG), 색각 테스트, 시력 테스트 등으로 검출하는 것을 포함하여, 폴리뉴클레오타이드의 발현을 검출하는 데 이용될 수 있으며, 이들 중 임의의 것이 주제 방법에서 이용될 수 있다.

[0130] 본 개시내용의 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 rAAV 비리온은 당업자에게 알려진 바와 같은 임의의 편리한 방법, AAV 패키징 세포, 및 패키징 기술을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, AAV 발현 벡터(즉, rAAV 게놈뿐만 아니라, 예를 들어 박테리아에서 게놈 요소의 클로닝에 유용한 요소, 예를 들어 복제 기원, 선택 가능한 마커 등을 포함하는 플라스미드)가 포유동물 생산자 세포 내로 형질감염될 수 있다. 또한 포유동물 생산자 세포 내로 AAV 헬퍼 구조물, 즉 AAV 발현 벡터에 없는 AAV 헬퍼 기능을 보완하는, 생산자 세포에서 발현될 수 있는 AAV REP 및 CAP 암호화 영역을 포함하는 플라스미드가 형질감염된다. 이어서 이중으로 형질감염된 생산자 세포가 헬퍼 바이러스, 예를 들어 아데노바이러스에 의해 감염되거나, AAV 벡터 복제를 촉진시키는 헬퍼 바이러스 부속 유전자, 예를 들어 VA, E2A, E4 영역을 포함하는 플라스미드로 형질감염되어 효율적인 rAAV 바이러스 생성을 촉진시킨다. 이어서 생산자 세포를 배양하여 rAAV가 생성되고, AAV 벡터는 당업계에 알려진 표준 기법을 사용하여 정제 및 제형화된다.

[0131] 또 다른 예에서, AAV 발현 벡터는 바칼로바이러스로서 패키징되어 곤충 생산자 세포, 예를 들어 Sf9 세포로 도입될 수 있다. 또한 또 다른 바칼로바이러스에 의해 곤충 세포 내로 AAV REP 및 CAP 유전자가 도입된다. 바칼로바이러스(바이러스임)는 효율적인 rAAV 바이러스 생성에 필요한 부속 기능을 암호화하는 유전자를 포함한다. 따라서, 2개의 바칼로바이러스에 의한 곤충 세포의 감염시, 생산자 세포는 배양되어 rAAV를 생성할 수 있고, AAV 벡터는 당업계에 알려진 표준 기법을 사용하여 정제 및 제형화될 수 있다.

[0132] 이들 및 다른 방법의 예는, 예를 들어 본 명세서에 그 전문이 명백하게 포함된, 미국 특허 번호 5,436,146; 5,753,500, 6,040,183, 6,093,570 및 6,548,286에서 찾을 수 있다. 패키징을 위한 추가 조성물 및 방법은, 또한 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함된, 문헌[Wang et al. (US 2002/0168342)]에 기재되어 있다.

[0133] 예를 들어 포유동물 세포, 곤충 세포, 미생물 및 효모, 예를 들어 SF-9, 293, A549, 헬라(HeLa) 세포 등을 포함하여, rAAV 비리온을 생성하기 위하여 당업계에서 사용되는 임의의 편리한 숙주 세포가 주제 벡터의 생성에서 이용될 수 있다. 일부 예에서, 숙주 세포는, AAV rep 및 cap 유전자가 숙주 세포에 안정적으로 유지되는 패키징 세포이다. 일부 경우에서, 숙주 세포는, AAV 벡터 게놈이 안정적으로 유지되고 패키징되어 있는 생산자 세포이다.

[0134] *약학 조성물 및 단위 투약량*

[0135] 일부 실시형태, 예를 들어 유전자 치료법 용도에서, 약학 조성물로서 주제 rAAV를 제형화하는 것이 바람직할 것이다. 특정 실시형태에서, 약학 조성물은 본 명세서에 기재된 벡터 또는 비리온(예를 들어, rAAV) 및 하나 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다. 사용에 적합한 약학 조성물은 멸균된 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 정맥 내 투여를 위하여, 적합한 담체는 생리식염수, 정균수, 또는 인산완충식염수(PBS)를 포함한다. 모든 경우에서, 조성물은 멸균되어야 하며, 용이한 주사가능성이 존재하는 정도로 유동적이어야 한다. 이는 제조 및 저장 조건 하에서 안정적이어야 하며, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다. 담체는, 예를 들어 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 및 이들의 적합한 혼합물을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어 코팅제, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 원하는 입자 크기의 유지에 의해, 그리고 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항세균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 조성물 중에 등장화제, 예를 들어 당, 폴리알코올, 예컨대 만니

톨, 솔비톨, 염화나트륨을 조성물 중에 포함하는 것이 바람직할 것이다. 내부 조성물의 흡수 연장은 조성물 중에 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 포함함으로써 야기될 수 있다.

[0136] 멸균 용액은 필요한 양으로 적절한 용매 중 활성 화합물을 필요에 따라 상기 열거된 성분 중 하나 또는 조합과 혼합한 다음, 여과멸균함으로써 제조될 수 있다. 일반적으로, 분산액은 활성 화합물을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것으로부터 필요한 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼입시킴으로써 제조된다. 멸균된 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 제조 방법은 활성 성분과 이의 앞서 멸균된 여과 용액으로부터 임의의 추가적인 원하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조이다.

[0137] 일 실시형태에서, 활성 화합물은 임플란트 및 마이크로캡슐화된 전달 시스템을 포함하여, 제어된 방출 제형과 같은, 신체로부터 신속한 제거로부터 화합물을 보호할 담체와 함께 제조된다. 에틸렌 비닐 아세테이트, 폴리안하이드라이드, 폴리글리콜산, 폴라젠, 폴리오쏘에스터, 및 폴리락트산과 같은 생분해성인 생체적합성 중합체가 사용될 수 있다. 이와 같은 제형의 제조 방법은 당업자에게 명백할 것이다. 재료는 또한 상업적으로 입수될 수 있다. 리포좀 현탁액(바이러스 항원에 대한 단클론성 항체로 감염된 세포를 표적으로 하는 리포좀을 포함함)은 또한 약학적으로 허용 가능한 담체로서 사용될 수 있다. 이는 예를 들어 미국 특허 번호 4,522,811에 기재된 바와 같이, 당업자에게 알려진 방법에 따라서 제조될 수 있다.

[0138] 주제 개시내용의 약학 조성물은 임의의 약학적으로 허용 가능한 염, 에스터, 또는 이와 같은 에스터의 염, 또는 인간을 포함한 동물에게 투여시 생물학적으로 활성적인 대사산물 또는 이의 잔기를 (직접적으로 또는 간접적으로) 제공할 수 있는 임의의 다른 화합물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, 개시내용은 또한 본 발명의 전구약물 및 약학적으로 허용 가능한 염, 이와 같은 전구약물의 약학적으로 허용 가능한 염, 및 다른 생물학적 등가물에 관한 것이다.

[0139] 용어 "전구약물"은 내인성 효소 또는 다른 화합물질 및/또는 조건의 작용에 의해 신체 또는 이의 세포 내에서 활성 형태(즉, 약물)로 전환되는 불활성 형태로 제조된 치료제를 나타낸다.

[0140] 용어 "약학적으로 허용 가능한 염"은 본 발명의 화합물의 생리학 및 약학적으로 허용 가능한 염, 즉 모 화합물의 원하는 생물학적 활성을 유지하면서 이에 대하여 원치않는 독성 효과를 부여하지 않는 염을 말한다.

[0141] 약학적으로 허용 가능한 염기 부가 염은 금속 또는 아민, 예컨대 알칼리 금속 및 알칼리 토금속 또는 유기 아민을 이용하여 형성된다. 양이온으로서 사용되는 금속은 나트륨, 칼륨, 마그네슘, 칼슘 등을 포함한다. 아민은 N-N'-다이벤질에틸렌다이아민, 클로로프로카인, 콜린, 다이에탄올아민, 다이사이클로헥실아민, 에틸렌다이아민, N-메틸글루카민, 및 프로카인을 포함한다(예를 들어, 문헌[Berge et al., "Pharmaceutical Salts," J. Pharma Sci., 1977, 66, 119]을 참조). 상기 산성 화합물의 염기 부가염은 유리 산 형태를 충분한 양의 원하는 염기와 접촉시켜 통상적인 방식으로 염을 생성함으로써 제조된다. 유리 산 형태는 염 형태를 산과 접촉시키고 통상적인 방식으로 유리 산을 단리함으로써 재생될 수 있다. 유리 산 형태는 극성 용매에서의 용해도와 같은 특정한 물리적 특성에서 각각의 염 형태와 다소 상이하지만, 그 외에 상기 염은 본 발명의 목적을 위해 각각의 유리 산과 등가이다.

[0142] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "약학적 부가 염"은 본 발명의 조성물의 성분 중 하나의 산 형태의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함한다. 이들은 아민의 유기 또는 무기 산 염을 포함한다. 바람직한 산 염은 하이드로클로라이드, 아세테이트, 살리실레이트, 나이트레이트 및 포스페이트이다. 다른 적합한 약학적으로 허용 가능한 염은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 다양한 무기 및 유기산의 염기성 염을 포함하며, 무기산으로는 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산 또는 인산; 유기 카복실산, 설폰산, 설포산 또는 포스포산 또는 N-치환 설파산, 예를 들어 아세트산, 프로피온산, 글리콜산, 석신산, 말레산, 하이드록시말레산, 메틸말레산, 푸마르산, 말산, 타르타르산, 락트산, 옥살산, 글루콘산, 글루카르산, 글루쿠론산, 시트르산, 벤조산, 신남산, 만델산, 살리실산, 4-아미노살리실산, 2-페녹시벤조산, 2-아세톡시벤조산, 엠본산, 니코틴산 또는 아이소니코틴산; 및 아미노산, 예컨대 자연에서 단백질의 합성에 수반되는 20가지의 알파-아미노산, 예를 들어 글루탐산 또는 아스파르트산 및 또한 페닐아세트산, 메탄설폰산, 에탄설폰산, 2-하이드록시에탄설폰산, 에탄-1,2-다이설폰산, 벤젠설폰산, 4-메틸벤젠설폰산, 나프탈렌-2-설폰산, 나프탈렌-1,5-다이설폰산, 2- 또는 3-포스포글라이세레이트, 글루코스-6-포스페이트, N-사이클로헥실설파산(사이클레메이트의 형성에 의함), 또는 다른 산 유기 화합물, 예컨대 아스코브산을 포함한다. 화합물의 약학적으로 허용 가능한 염은 또한 약학적으로 허용 가능한 양이온으로 제조될 수 있다. 적합한 약학적으로 허용 가능한 양이온은 당업자에게 잘 알려져 있으며, 알칼리, 알칼리 토, 암모늄 및 4차 암모늄 양이온을 포함한다. 탄산염 또는 탄산수소염이 또한 가능하다. 올리고뉴클레오타이드에 있어서, 약학적

으로 허용 가능한 염의 바람직한 예는, (I) 양이온, 예컨대 나트륨, 칼륨, 암모늄, 마그네슘, 칼슘, 폴리아마이드(예컨대, 스페르민 및 스페르미딘) 등으로 형성된 염; (II) 무기 산, 예를 들어 염산, 브롬화수소산, 황산, 인산, 질산 등으로 형성된 산 부가 염; (III) 예를 들어 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 석신산, 말레산, 푸마르산, 글루콘산, 시트르산, 말산, 아스코브산, 벤조산, 탄닌산, 팔미트산, 알긴산, 폴리글루탐산, 나프탈렌설폰산, 메탄설폰산, p-톨루엔설폰산, 나프탈렌다이설폰산, 폴리갈락투론산 등과 같은 유기산으로 형성된 염; 및 (IV) 원소 음이온, 예컨대 염소, 브롬 및 요오드로부터 형성된 염을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0143] 본 발명의 약학 조성물은 용액, 에멀전, 및 리포솜-함유 제형을 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 이들 조성물은, 예비 형성된 액체, 자기 유화 고체 및 자기 유화 반고체(이로 제한되지 않음)를 포함하는 다양한 성분으로부터 생성될 수 있다.

[0144] 본 발명의 특정 조성물은 또한 제형 중 담체 화합물을 포함한다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "담체 화합물" 또는 "담체"는 핵산 또는 이의 유사체를 말하며, 상기 유사체는 불활성적이지만(즉, 그 자체로 생물학적 활성을 보유하지 않지만), 예를 들어 생물학적으로 활성적인 핵산을 분해 또는 순환으로부터 이의 제거를 촉진시킴으로써 생물학적 활성을 가지는 핵산의 생물학적 이용가능성을 감소시키는 생체 내 공정에 의해 핵산으로 인식된다. 핵산과 담체 화합물의, 전형적으로, 후자 물질의 과량으로, 공동 투여는 간, 신장 또는 다른 추가의 순환 저장소에서 회수되는 핵산의 양을 실질적으로 감소시킬 수 있는데, 이는 아마도 공통의 수용체에 대한 담체 화합물과 핵산 사이의 경쟁에 기인할 수 있다. 예를 들어, 간 조직에서 부분적으로 포스포로싸이오에이트 올리고뉴클레오타이드의 회수는, 이것이 폴리이노신산, 텍스트란 설페이트, 폴리스티드산 또는 4-아세트아미도-4'아이소싸이오시아노-스틸벤-2,2'다이설폰산과 공동 투여될 때 감소될 수 있다(Miyao et al., Antisense Res. Dev., 1995, 5, 115-121; Takakura et al., Antisense & Nucl. Acid Drug Dev., 1996, 6, 177-183).

[0145] 주제 재조합 AAV는 포유동물 환자, 특히 인간에게 투여하기 위한 약학 조성물에 혼입될 수 있다. 비리온은, 바람직하게 3 내지 8의 범위, 더 바람직하게는 6 내지 8의 범위로 비독성이고 불활성적인 약학적으로 허용 가능한 수성 담체 중에 제형화될 수 있다. 이와 같은 멸균 조성물은 재조합 시 허용 가능한 pH를 가지는 수성 완충액에 용해되는 치료적 분자를 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터 또는 비리온을 포함할 것이다.

[0146] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체 및/또는 부형제, 예를 들어 식염수, 인산완충식염수, 포스페이트 및 아미노산, 중합체, 폴리올, 당, 완충액, 보존제 및 다른 단백질과의 혼합물로 벡터 또는 비리온의 치료학적 유효량을 포함한다. 예시적인 아미노산, 중합체 및 당 등은 옥틸페녹시 폴리에톡시 에탄올 화합물, 폴리에틸렌 글리콜 모노스테아레이트 화합물, 폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터, 수크로스, 프럭토스, 텍스트로스, 말토스, 글루코스, 만니톨, 텍스트란, 솔비톨, 이노시톨, 갈락티톨, 자일리톨, 락토스, 트레할로스, 소 또는 인간 혈청 알부민, 시트레이트, 아세테이트, 링거액 및 행크액, 시스테인, 아르기닌, 카르니틴, 알라닌, 글리신, 리신, 발린, 류신, 폴리비닐피롤리돈, 폴리에틸렌 및 글리콜이다. 바람직하게, 이 제형은 4°C에서 적어도 6개월 동안 안정적이다.

[0147] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 약학 조성물은 완충액, 예컨대 인산완충식염수(PBS) 또는 인산나트륨/황산나트륨, 트리스 완충액, 글리신 완충액, 멸균수 및 당업자에게 알려진 다른 완충액, 예컨대 문헌[Good et al. (1966) Biochemistry 5:467]에 기재된 것을 포함한다. 아데노바이러스에 종양 억제 유전자를 포함하는 약학 조성물이 벡터 전달 시스템에 함유된 완충액의 pH는 6.5 내지 7.75, 바람직하게는 7 내지 7.5, 가장 바람직하게는 7.2 내지 7.4의 범위일 수 있다.

[0148] 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 약학 조성물은 현탁액의 점도를 증가시키는 물질, 예컨대 소듐 카복시메틸 셀룰로스, 솔비톨, 또는 텍스트란을 약 1 내지 10%, 예컨대 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10%의 양으로 포함한다.

[0149] 약학 조성물은 투여를 위한 지침과 함께 용기, 팩, 또는 디스펜서에 포함될 수 있다.

[0150] 예를 들어 안구 내, 경구, 또는 비경구 투여를 위한 일부 경우에서, 투여의 용이성 및 투약량의 균일성을 위해 투약량 단위 형태로 약학 조성물을 제형화하는 것이 특히 유리할 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같은 투약량 단위 형태는 치료될 대상체에 대한 단일 투약량으로 적합한 물리적으로 분리된 단위를 말하며; 각각의 단위는 필요한 약학 담체와 관련하여 원하는 치료적 효과를 생성하도록 계산된 소정량의 활성 화합물을 함유한다. 본 발명의 투약량 단위 형태에 대한 사양은 달성되어야 할 활성 화합물의 독특한 특징 및 특정 치료적 효과, 및 개인의 치료를 위한 활성 화합물의 배합 분야에 내재된 제한에 의해 지시되고 이에 따라서 직접적으로 의존한다.

- [0151] 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 pfu(plaque forming unit; 플라크 형성 단위)로서 측정될 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량의 pfu는 약 1×10^8 내지 약 5×10^{10} pfu일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량의 pfu는 적어도 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 및 5×10^{10} pfu이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량의 pfu는 최대 약 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 9×10^8 , 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 9×10^9 , 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 및 5×10^{10} pfu이다.
- [0152] 일부 경우에, 본 개시내용의 바이러스 벡터는 벡터 계놈으로서 측정될 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 1×10^8 이상의 벡터 계놈, 예를 들어 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 또는 1×10^{13} 이상의 벡터 계놈, 특정 예에서, 1×10^{14} 이상의 벡터 계놈, 그리고 보통 1×10^{15} 이하의 벡터 계놈이다. 일부 실시형태에서, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 최대 약 1×10^{15} 의 벡터 계놈, 예를 들어 1×10^{14} 이하의 벡터 계놈, 예를 들어 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 또는 1×10^9 이하의 벡터 계놈, 특정 경우에 1×10^8 벡터 계놈, 그리고 전형적으로 1×10^8 이상의 벡터 계놈이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 1×10^{10} 내지 1×10^{11} 벡터 계놈이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 1×10^{10} 내지 3×10^{12} 벡터 계놈이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 1×10^9 내지 3×10^{13} 벡터 계놈이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 계놈이다.
- [0153] 일부 경우에, 본 개시내용의 약학 조성물의 단위 용량은 감염 다중도(multiplicity of infection; MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, MOI는 핵이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 계놈의 비율, 또는 배수를 말할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 내지 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 내지 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} 의 MOI이다.
- [0154] 일부 양태에서, 약학 조성물은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 재조합 바이러스, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 재조합 바이러스, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 재조합 바이러스, 약 1×10^{109} 내지 약 3×10^{12} 재조합 바이러스, 또는 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 재조합 바이러스를 포함한다.
- [0155] 투여 방법
- [0156] 본 발명의 약학 조성물은 임의의 편리한 방법, 예를 들어 안구 내, 정맥 내, 복강 내 등으로 대상체의 안구에 투여될 수 있다. 일부 경우에서, 투여는, 예를 들어 유리체 내 주사 또는 망막 하 주사에 의한 안구 내 투여이다. 유리체 내 주사를 통하여 또는 망막 하 주사를 통하여 벡터를 전달하기 위한 일반적인 방법은 다음의 간단한 개요로 설명될 수 있다. 이러한 예는 단지 본 방법의 특정 특성을 설명하는 것을 의미하며, 결코 제한적인 것을 의미하지 않는다.
- [0157] 바람직한 실시형태에서, 주제 rAAV는 유리체 내로 전달된다. 유리체 내 투여를 위하여, 벡터는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 처음에, 국소 마취제를 안구 표면에 적용한 다음, 국소 소독액을 적용한다. 장비를 이용하여 또는 이용하지 않고 안구를 개방 상태로 유지하고, 벡터를 짧고 좁은, 예를 들어 30 게이지 바늘을 이용하여 공막을 통해 직접 관찰 하에 대상체의 안구의 유리체동공(vitreous cavity) 내로 주사한다. 유리체 내 투여는 일

반적으로 내약성이 매우 좋다. 시술의 종료시, 때때로 주사 부위에 경미한 발적이 있다. 때때로 압통이 있지만, 대부분의 환자는 어떠한 통증도 보고하지 않는다. 이 시술 후 어떠한 안구 패치 또는 보안경이 필요하지 않으며, 활동이 제한되지 않는다. 때때로 감염 방지를 돕기 위하여 며칠 동안 항생제 점안액이 처방된다.

[0158] 일부 실시형태에서, 주제 rAAV는 망막 하로 전달된다. 망막 하 투여의 경우, 벡터는 수술 현미경을 사용하여 직접 관찰 하에 망막 하로 주입되는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 이 시술은 유리체 절제술을 수반한 다음, 하나 이상의 작은 망막절개술을 통해 망막 하 공간으로 미세 캐놀라를 사용하여 벡터 현탁액을 주입할 수 있다.

[0159] 간략히 하면, 주입 캐놀라는 수술 전반에 걸쳐 (예를 들어, 식염수의) 주입에 의한 정상 구체 부피를 유지하기 위해 제자리에 봉합될 수 있다. 유리체 절제술은 적절한 구멍 크기(예를 들어, 20 내지 27 게이지)의 캐놀라를 사용하여 실행되며, 여기서 제거되는 유리체 겔의 부피는 주입 캐놀라로부터의 식염수 또는 다른 등장액의 주입으로 대체된다. 유리체 절제술은 유리하게 실행되는데, 그 이유는 (1) 피질(후방 유리체막)의 제거가 캐놀라에 의한 망막의 침투를 용이하게 하고; (2) 이의 제거 및 유체(예를 들어, 식염수)로의 대체가 벡터의 안구 내 주사를 위한 공간을 형성하며, (3) 이의 제어된 제거는 망막 열공 및 계획되지 않은 망막 박리의 가능성을 감소시키기 때문이다.

[0160] 주제 방법을 실시함에 있어서, 주제 rAAV 비리온은 관심 대상 폴리뉴클레오타이드를 대상체의 원추 광수용체의 5% 이상까지, 예를 들어 대상체의 원추 광수용체의 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 또는 50% 이상, 예를 들어 대상체의 원추 광수용체의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 또는 90% 이상, 일부 경우에 대상체의 원추 광수용체의 95% 이상, 98% 이상, 또는 100%까지 전달하는 데 효과적인 양으로 안구로 전달되어 대상 개인으로 치료적 이익을 제공한다. 바꿔 말하면, 투여 후, 대상체의 원추 광수용체의 5% 이상, 예를 들어 10% 이상, 20% 이상, 30% 이상, 40% 이상, 또는 50% 이상, 일부 경우에 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 예를 들어 원추체의 95%, 98%, 또는 100%가 관심 대상 충분한 양의 폴리뉴클레오타이드를 포함하여, 예를 들어 장애를 치료 또는 예방하기 위하여, 원추체 생존력 및/또는 기능에 영향을 미칠 것이다. 일부 실시형태에서, 형질도입된 원추 광수용체는 망막 전반에 걸쳐 위치할 것이다. 일부 실시형태에서, 형질도입된 원추 광수용체는 중심와 및 중심소와 내 원추체일 것이다. 일부 실시형태에서, 형질도입된 원추 광수용체는 중심와 원추체, 즉 중심와에 위치한 L- 또는 M-원추체일 것이다.

[0161] 전형적으로, 유효량은 주제 rAAV의 약 1×10^8 이상의 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 또는 1×10^{13} 벡터 게놈, 특정 경우에 1×10^{14} 이상의 벡터 게놈, 그리고 보통 1×10^{15} 이하의 벡터 게놈일 것이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 최대 약 1×10^{15} 의 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^{14} 이하의 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 또는 1×10^9 이하의 벡터 게놈, 특정 경우에 1×10^8 벡터 게놈, 그리고 전형적으로 1×10^8 이상의 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 내지 1×10^{11} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 내지 3×10^{12} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^9 내지 3×10^{13} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 게놈이다.

[0162] 일부 경우에, 투여될 약학 조성물의 양은 감염 다중도(MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, 핵이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 게놈의 비율, 또는 배수를 말할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 내지 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 내지 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} 의 MOI이다.

[0163] 일부 양태에서, 약학 조성물의 양은 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 재조합 바이러스, 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 재조합 바이러스, 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 재조합 바이러스, 약 1×10^{10} 내지 약 3×10^{12} 재조합 바이러스, 또는

약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 재조합 바이러스를 포함한다.

[0164] 유용성

[0165] 폴리뉴클레오타이드의 원추 광수용체, 보다 특히 중심체 원추체로의 유리체 내 전달을 위한 방법 및 조성물은 연구 및 의학에서 다수의 용도가 있다.

[0166] 예를 들어, 이와 같은 방법 및 조성물은 생체 내 폴리뉴클레오타이드에 의해 암호화되는 유전자 산물의 기능을 테스트하기 위해, 예를 들어 원추 광수용체의 기능 및/또는 유전자 산물이 원추 광수용체의 생존력 및/또는 기능에 영향을 미칠지 여부를 더 잘 이해하기 위한 연구에 사용될 수 있다.

[0167] 상기에서 시사된 바와 같이, 본 명세서에서 "주제 조성물"로 총칭적으로 지칭되는 주제 rAAV는 동물의 원추 세포에서, 예를 들어 동물의 중심체 원추체에서 이식 유전자를 발현하는 데 있어서 유용하다. 예를 들어, 주제 조성물은, 예를 들어 원추 세포 생존력 및/또는 기능에 대하여 유전자가 미치는 영향을 결정하기 위해, 연구에서 사용될 수 있다. 또 다른 예로서, 주제 조성물은, 예를 들어 원추 세포 장애를 치료하기 위하여, 의학에서 사용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 일부 양태에서, 원추 세포에서 유전자의 발현을 위한 방법이 제공되며, 상기 방법은 본 개시내용의 조성물과 원추 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 접촉이 시험관 내에서 일어난다. 일부 실시형태에서, 접촉이 생체 내에서 일어나며, 즉 주제 조성물은 대상체에게 투여된다.

[0168] 원추 세포가 주제 rAAV와 시험관 내에서 접촉되어야 하는 경우, 세포는 임의의 포유동물 중, 예를 들어 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 모래쥐, 다람쥐), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소, 영장류, 인간 유래일 수 있다. 세포는 확립된 세포주, 예를 들어 WERI 세포, 661W 세포 유래일 수 있거나, 세포는 대상체로부터 유래되고 시험관 내에서 배양물의 제한된 수의 계대, 즉 분열(splitting)로 성장할 수 있게 하는 세포 및 세포 배양물을 말하기 위해 "일차 세포", "일차 세포주", 및 "일차 배양물"이 본 명세서에서 상호교환적으로 사용되는 일차 세포일 수 있다. 예를 들어, 일차 배양물은 0회, 1회, 2회, 4회, 5회, 10회, 또는 15회, 그러나 최대 고비를 겪기에 충분하지 않은 시간으로 계대 배양될 수 있는 배양물이다. 전형적으로, 본 발명의 일차 세포주는 시험관 내에서 10회 미만의 계대 동안 유지된다.

[0169] 세포가 일차 세포인 경우, 이들은 임의의 편리한 방법, 예를 들어 전체 외식편, 생검 등에 의해 포유동물로부터 수확될 수 있다. 적절한 용액이 수확된 세포의 분산 또는 현탁에 사용될 수 있다. 이와 같은 용액은 일반적으로, 저 농도, 일반적으로 5 내지 25mM에서 허용 가능한 완충액과 함께 소 태아 혈청 또는 다른 자연적으로 발생하는 인자로 편리하게 보충된, 평형 염 용액, 예를 들어 생리식염수, PBS, 헵크 평형 염 용액 등일 수 있다. 편리한 완충액은 HEPES, 포스페이트 완충액, 락테이트 완충액 등을 포함한다. 세포는 즉시 사용될 수 있거나, 장기간 동안 저장, 냉동될 수 있고 해동되어 재사용될 수 있다. 이와 같은 경우에, 세포는 이와 같은 냉동 온도에서 세포를 보존하기 위해 당업계에서 일반적으로 사용되는 보통 10% DMSO, 50% 혈청, 40% 완충 매질, 또는 일부 다른 이와 같은 용액 중에서 냉동될 것이며, 냉동된 배양 세포를 해동하기 위하여 당업계에서 일반적으로 알려져 있는 것과 같은 방식으로 해동될 것이다.

[0170] 이식유전자의 발현을 촉진시키기 위해, 주제 rAAV는 약 30분 내지 24시간 이상, 예를 들어 1시간, 1.5시간, 2시간, 2.5시간, 3시간, 3.5시간, 4시간, 5시간, 6시간, 7시간, 8시간, 12시간, 16시간, 18시간, 20시간, 24시간 등 동안 세포와 접촉될 것이다. 주제 rAAV는 대상체 세포에 1회 이상, 예를 들어 1회, 2회, 3회, 또는 3회 초과로 제공될 수 있으며, 세포는 각각의 접촉 사건 후 일정 시간 동안 작용제(들)와 함께 배양되도록 할 수 있고, 그 후 배지가 새로운 배지로 대체되고 세포가 추가로 배양된다. 세포를 접촉시키는 것은 임의의 배양 배지에서 그리고 세포의 생존을 촉진시키는 임의의 배양 조건 하에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 세포는 소 태아 혈청 또는 열 불활성화 염소 혈청(약 5 내지 10%), L-글루타민, 싸이올, 특히 2-머캅토에탄올, 및 항생제, 예를 들어 페니실린 및 스트렙토마이신이 보충된, 편리한 임의의 적절한 영양 배지, 예컨대 이스코브 변형(Iscove's modified) DMEM 또는 RPMI 1640 중에 현탁될 수 있다. 배양물은 세포가 반응하는 성장 인자를 함유할 수 있다. 본 명세서에서 정의된 바와 같은 성장 인자는, 막관통 수용체에 대한 특이적 효과를 통해, 배양물 또는 손상되지 않은 조직 중에서 세포의 생존, 성장 및/또는 분화를 촉진시킬 수 있는 분자이다. 성장 인자는 폴리펩타이드 및 비폴리펩타이드 인자를 포함한다.

[0171] 전형적으로, 유효량의 주제 rAAV가 제공되어 세포에서 이식유전자의 발현을 가져온다. 본 명세서의 다른 곳에서 논의된 바와 같이, 유효량은, 예를 들어 이식유전자 유전자 산물의 존재 또는 수준을 검출함으로써, 원추 세포의 생존력 또는 기능에 대한 영향을 검출함으로써 등에 의해 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다. 전형적으로, 유효량의 주제 rAAV는 캡시드가 유래된 동일한 양의 모 rAAV보다 원추 세포에서 이식유전자의 더 많은 발현을

촉진할 것이다. 전형적으로, 발현은 모 rAAV로부터의 발현에 비해 2배 이상, 예를 들어 3배, 4배, 또는 5배 이상, 일부 경우에 10배, 20배 또는 50배 이상, 예를 들어 100배 향상될 것이다.

[0172] 일부 실시형태에서, 이식유전자가 선택 가능한 마커인 경우와 같이, 세포의 집단은 나머지 집단으로부터 변형된 세포를 분리함으로써 이식유전자를 포함하는 것에 대하여 풍부화될 수 있다. 분리는 사용되는 선택 가능한 마커에 적절한 임의의 편리한 분리 기법에 의한 것일 수 있다. 예를 들어, 이식유전자가 형광성 마커인 경우, 세포는 형광 활성화 세포 분류에 의해 분리될 수 있는 반면, 이식유전자가 세포 표면 마커인 경우, 세포는 친화성 분리 기법, 예를 들어 자력 분리, 친화 크로마토그래피, 고체 매트릭스에 부착된 친화성 시약을 이용한 "패닝(panning)", 또는 다른 편리한 기법에 의해 이중 집단으로부터 분리될 수 있다. 정확한 분리를 제공하는 기법은 형광 활성화 세포 분류기를 포함하며, 이는 다양한 정도의 정교함(sophistication), 예컨대 다수의 색상 채널, 낮은 각도 및 둔한 빛 산란 검출 채널(obtuse light scattering detecting channel), 임피던스 채널 등을 가질 수 있다. 세포는 죽은 세포와 연관된 염료(예를 들어, 프로피듐 아이오다이드)를 이용함으로써 죽은 세포에 대하여 선택될 수 있다. 세포의 생존력에 과도하게 해를 끼치지 않는 임의의 기법이 이용될 수 있다. 이식유전자를 포함하는 세포에 대해 고도로 풍부화된 세포 조성물은 이러한 방식으로 달성된다. "고도로 풍부한"이란, 유전적으로 변형된 세포가 세포 조성물의 70% 이상, 75% 이상, 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 예를 들어 세포 조성물의 약 95% 이상, 또는 98% 이상일 것임을 의미한다. 다시 말하면, 상기 조성물은 유전적으로 변형된 세포의 실질적으로 순수한 조성물일 수 있다.

[0173] 원주 세포가 주제 rAAV와 생체 내에서 접촉되어야 하는 경우에 있어서, 대상체는 임의의 포유동물, 예를 들어 설치류(예를 들어, 마우스, 래트, 모래쥐), 토끼, 고양이, 개, 염소, 양, 돼지, 말, 소, 또는 영장류일 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 파르보더 카타리니(Parvorder Catarrhini)의 영장류이다. 당업계에 알려진 바와 같이, 카타리니는 고등 영장류의 2개의 하위구분 중 하나이며(다른 하나는 신세계 원숭이(New World monkey)임), 구세계 원숭이(Old World monkey) 및 유인원을 포함하고, 이들은 결국 더 작은 유인원 또는 긴팔원숭이 및 큰 유인원으로 추가로 나누어지며, 상기 큰 유인원은 오랑우탄, 고릴라, 침팬지, 난쟁이 침팬지(bonobos), 및 인간으로 이루어진다. 추가로 바람직한 실시형태에서, 영장류는 인간이다.

[0174] 주제 rAAV는 임의의 적합한 방법에 의해 대상체의 망막에 투여될 수 있다. 예를 들어, 주제 조성물은 유리체 내 주사 또는 망막 하 주사를 통해 안구 내로 투여될 수 있다. 유리체 내 주사를 통하여 또는 망막 하 주사를 통하여 백터를 전달하기 위한 일반적인 방법은 다음의 간략한 개요로 설명될 수 있다. 이러한 예는 단지 본 방법의 특정 특성을 설명하는 것을 의미하며, 결코 제한적인 것을 의미하지 않는다.

[0175] 망막 하 투여의 경우, 주제 rAAV는 수술 현미경을 사용하여 직접 관찰 하에 망막 하로 주사되는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 전형적으로, 주제 조성물의 1 내지 200 μ l, 예를 들어 50 μ l, 100 μ l, 150 μ l, 또는 200 μ l, 그러나 보통 200 μ l 이하의 부피는 이와 같은 방법에 의해 투여될 것이다. 이 기술은 유리체 절제술을 수반한 다음, 하나 이상의 작은 망막절개술을 통해 망막 하 공간으로 미세 캐놀라를 사용하여 백터 현탁액을 주입할 수 있다. 간략히 하면, 주입 캐놀라는 수술 전반에 걸쳐 (예를 들어, 식염수의) 주입에 의한 정상 구체 부피를 유지하기 위해 제자리에 봉합될 수 있다. 유리체 절제술은 적절한 구멍 크기(예를 들어, 20 내지 27 게이지)의 캐놀라를 사용하여 실행되되, 여기서 제거되는 유리체 겔의 부피는 주입 캐놀라로부터의 식염수 또는 다른 등장액의 주입으로 대체된다. 유리체 절제술은 유리하게 실행되는데, 그 이유는 (1) 피질(후방 유리체막)의 제거가 캐놀라에 의한 망막의 침투를 용이하게 하고; (2) 이의 제거 및 유체(예를 들어, 식염수)로의 대체가 백터의 안구 내 주사를 위한 공간을 형성하며, (3) 이의 제어된 제거는 망막 열공 및 계획되지 않은 망막 박리의 가능성을 감소시키기 때문이다.

[0176] 유리체 내 투여의 경우, 주제 rAAV는 현탁액의 형태로 전달될 수 있다. 처음에, 국소 마취제를 안구 표면에 적용한 다음, 국소 소독액을 적용한다. 장비를 이용하여 또는 이용하지 않고 안구를 개방 상태로 유지하고, rAAV를 짧고 좁은, 예를 들어 30 게이지 바늘을 이용하여 공막을 통해 직접 관찰 하에 대상체의 안구의 유리체동공 내로 주사한다. 전형적으로, 주제 조성물의 1 내지 100 μ l, 예를 들어 25 μ l, 50 μ l, 또는 100 μ l, 그리고 보통 100 μ l 이하의 부피가 유리체를 제거하지 않고 유리체 내 주사에 의해 안구로 전달될 수 있다. 대안적으로, 유리체 절제술이 실행될 수 있으며, 유리체 겔의 전체 부피는 주제 조성물의 주입에 의해 대체된다. 이와 같은 경우에, 최대 약 4 ml의 주제 조성물이, 예를 들어 인간의 안구에 전달될 수 있다. 유리체 내 투여는 일반적으로 내약성이 매우 좋다. 기술의 종료시, 때때로 주사 부위에 경미한 발적이 있다. 때때로 압통이 있지만, 대부분의 환자는 어떠한 통증도 보고하지 않는다. 이 기술 후 어떠한 안구 패치 또는 보안경이 필요하지 않으며, 활동이 제한되지 않는다. 때때로 감염 방지를 돕기 위하여 며칠 동안 항생제 점안액이 처방된다.

[0177] 주제 방법 및/또는 조성물이 망막 장애를 치료 또는 예방하기 위한 치료법으로서 원추 광수용체에 치료적 폴리뉴클레오타이드를 발현시키는 약제에 사용될 수 있다. 용어 "치료", "치료하는" 등은 본 명세서에서 일반적으로 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미하는 데 사용된다. 효과는 질환 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방하는, 예를 들어 질환 또는 이의 증상이 대상체에서 일어날 가능성을 감소시키는 관점에서 예방적일 수 있고/있거나, 질환 및/또는 질환에 기인한 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이 "치료"는 포유동물에서 질환의 임의의 치료를 포괄하며, (a) 질환에 걸리기 쉽지만 아직 질환이 있는 것으로 진단받지 않은 대상체에서 질환이 일어나는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 저해하는 것, 즉 질환의 발진을 막는 것; 또는 (c) 질환을 완화시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 야기하는 것을 포함한다. 치료제는 질환 또는 상해의 개시 전, 동안 또는 후에 투여될 수 있다. 환자의 바람직하지 않은 임상 증상을 안정화시키거나 감소시키는 진행중인 질환의 치료가 특히 관심이 있다. 이와 같은 치료는 바람직하게는 발병된 조직에서 기능이 완전히 손실되기 전에 실행된다. 주제 치료법은 바람직하게는 질환의 증상 단계에서, 일부 경우에는 질환의 증상 단계 후에 투여될 것이다.

[0178] 주제 방법 및/또는 조성물을 사용하여 치료 또는 예방될 수 있는 다수의 망막 장애가 있다. 특히 관심 대상 것은 원추체-연관 장애; 즉, 원추체 생존력의 상실 및/또는 원추체 기능의 감소와 연관된 장애이다. 상기에서 논의된 바와 같이, 원추 광수용체는 색각 및 높은 시력 중심과 시각을 담당하고, 중심오목이라 불리는 망막의 황반 중심에 위치한 1.5mm의 오목한 곳에 밀집하여 채워져 있다. 이와 일관되게, 원추체 기능장애 및 생존력과 연관된 장애는 전형적으로 황반에서 나타나고 색각 및 높은 시력에 영향을 미친다. 원추체-연관 장애의 비제한적인 예는 간상-원추 이영양증; 원추-간상 이영양증; 진행성 원추 이영양증(progressive cone dystrophy); 망막 색소변성증(RP); 스타가르트 질환(Stargardt Disease); 황반 모세혈관확장증, 레베르 유전성 시각 신경병증(Leber hereditary optic neuropathy), 베스트병; 성인 난황형 황반 이영양증; X-연관 망막충간분리증; 색각 장애, 예컨대 청색원추 단색형색각, 색맹, 불완전 색맹, 제1 색각 이상, 제2 색각 이상, 및 제3 색각 이상; 및 중심 황반에 영향을 미치는 망막 장애, 예컨대 노인 황반변성, 습성 노인 황반변성(wet age-related macular degeneration), 지도모양위축(geographic atrophy), 황반 모세혈관확장증, 망막 색소변성증, 당뇨 망막병증, 망막 정맥 폐쇄, 녹내장, 소르스비 안저 이영양증, 성인 난황형 황반 이영양증, 베스트병, 및 X-연관 망막충간분리증을 포함한다.

[0179] *스타가르트 황반이영증*. 스타가르트 황반이영증(또한 스타가르트 질환 및 황반 안저로도 알려져 있음)은, 보통 장애 진단의 시점까지 점진적인 시력의 상실을 야기하는 청소년 황반 변성의 유전적 형태이다. 증상의 발병은 보통 6 내지 30세(평균 약 16 내지 18세)의 연령 사이에 나타난다. ABCA4, CNGB3, ELOVL4, PROM1을 포함하여 여러 유전자에서의 돌연변이가 이 장애와 연관되어 있다. 증상은 전형적으로 20세까지 발생하며, 파도형태의 시야, 맹점, 흐릿함, 손상된 색각, 및 흐린 조명에의 적응의 어려움을 포함한다. 스타가르트 질환의 주요 증상은 20/50 내지 20/200의 범위에 이르는 시력 상실이다. 추가적으로, 스타가르트 질환이 있는 자는 눈부심에 민감하고; 흐린 날은 약간의 경감을 제공한다. 황반이 손상되었을 때 시력은 가장 두드러지게 손상되며, 이는 안저 검사에 의해 관찰될 수 있다.

[0180] *원추 이영양증*. 원추 이영양증(COD)은 원추 세포의 상실을 특징으로 하는 유전성 안구 장애이다. 원추 이영양증의 가장 흔한 증상은 시력 상실(발병 연령이 십대 후반부터 60대까지의 범위에 있음), 밝은 빛에 대한 감수성, 및 불량한 색각이다. 시력은 보통 점진적으로 악화되지만, 20/200까지 급속하게 악화될 수 있으며; 이후, 더 심한 경우에는, "손가락 개수를 셀 수 있는(counting fingers)" 시력까지 떨어진다. 색상 테스트 플레이트(HRR 시리즈)를 사용하는 색각 테스트로는, 적녹 및 청황 플레이트 둘 다에 대하여 많은 오류가 나타난다. 검안경 변화가 보일 수 있기 전에 원추체 기능의 주관적 및 객관적 이상이 발견되므로, 상기 이영양증은 일차적인 것으로 여겨진다. 그러나, 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium; RPE)는 빠르게 연루되어, 주로 황반이 수반된 망막 이영양증을 초래한다. 검안경을 통한 안저 검사는 본질적으로 원추 이영양증에서 초기에 정상이며, 보통 시력 상실 후 분명한 황반 변화가 잘 일어난다. 검안경 검사 동안 보이는 황반 병변의 가장 흔한 유형은 황소 눈(bull's eye) 외관을 가지고 중심부의 더 어두운 영역을 둘러싸는 위축성 색소 상피의 도넛형 영역으로 이루어진다. 원추 이영양증의 또 다른 덜 빈번한 형태에서, 황반 영역에 불규칙적인 색소 군집이 있는 후두극의 상당한 미만성 위축이 있다. 드물게, 맥락막모세혈관증과 더 큰 맥락막 혈관의 위축은 초기 단계의 환자에서 나타난다. 형광 안저 혈관조영술(Fluorescein angiography; FA)은, 검안경으로 보기에 너무 미세한 망막의 초기 변화를 검출할 수 있기 때문에, 원추 이영양증이 있는 것으로 의심되는 사람의 정밀검사에서 유용한 보조술이다. 광범위한 안저 변화와 초기 단계에서의 진단의 어려움 때문에, 망막전위도검사(ERG)는 진단을 위한 최상의 테스트이다. ERG 상에서 비정상적인 원추체 기능은, 테스트가 조명이 밝은 방(명순응 ERG)에서 수행될 때 감소된 단

일 섬광 및 깜박임(flicker) 반응으로 나타난다. GUCA1A, PDE6C, PDE6H, 및 RPGR를 포함하여, 여러 유전자의 돌연변이는 상기 장애와 연관되어 있다.

[0181] 원추-간상 이영양증. 원추-간상 이영양증(CRD, 또는 CORD)은 색소성 망막병증의 그룹에 속하는 유전성 망막 이영양증이다. CRD는, 주로 황반 영역에 국소화되어 있는, 안저 검사 상에서 볼 수 있는 망막 색소 침착, 및 원추 세포 및 간상 세포 둘 다의 손실을 특징으로 한다. 간상 광수용체에서의 일차 손실 및 이후 원추 광수용체에서의 이차 손실로 인한 간상-원추 이영양증(rod-cone dystrophy; RCD)과 대조적으로, CRD는, 일차 원추체 관여, 또는 때때로 원추체 및 간상체 둘 다의 동시 손실에 의한, 사건의 반대 순서를 반영한다. 증상은 시력 감소, 색각 결함, 광선공포증(photoaversion) 및 중심 시야에서 감소된 감수성을 포함하고, 이후에 주변 시력에서의 점진적인 상실 및 야맹증을 포함한다. ADAM9, PCDH21, CRX, GUCY2D, PITPNM3, PROM1, PRPH2, RAX2, RIMS1, RPGR, 및 RPGRIP1을 포함한 여러 유전자에서의 돌연변이는 상기 장애와 연관되어 있다.

[0182] 척수소뇌 실조증 유형 7. 척수소뇌 실조증은 걸음걸이의 더딘 진행성의 운동 실조증을 특징으로 하는 진행성이면서 퇴행성인 유전성 질환이며, 종종 손, 말하기, 및 안구 운동의 협동 저하와 연관되어 있다. 다양한 유형의 SCA가 존재하는데, 척수소뇌 실조증 유형 7(SCA-7)은 협동 저하에 추가적으로 시각적인 문제가 일어날 수 있다는 점에서, 대부분의 다른 SCA와 상이하다. SCA-7은 ATXN7/SCA7 유전자에서 상염색체 우성 돌연변이와 연관되어 있다. 질환이 40세 이전에 나타날 때, 협동 저하보다는 시각적인 문제가 전형적으로 질환의 최초 징후이다. 초기 증상은 색상을 구별함에 있어서의 어려움과 감소된 중심 시력을 포함한다. 추가적으로, 운동실조의 증상(운동 실조증, 느린 안구 운동, 및 감각 또는 반사에서의 경미한 변화)이 검출될 수 있다. 상기 질환이 진행함에 따라 운동 제어의 상실, 불명확한 말하기, 및 연하곤란이 현저하게 된다.

[0183] 바넷-비들 증후군-1. 바넷-비들 증후군-1(BBS-1)은 패밀리 내 및 패밀리간 모두에서 관찰되는 가변적인 발현도 및 광범위한 임상적 가변성을 갖는 다면발현성 장애이다. 주된 임상 특징은 야맹증이 선행된 소아기-발병 시력 상실; 척추 다지증; 유아기 동안에 나타나고 성인기 전반에 걸쳐 문제가 되는 몸통 비만; 모든 개인이 아닌 일부 개인에서 특이적 학습 장애; 남성 생식기발육저하증 및 복합 여성 비뇨생식기 기형; 및 이환율 및 사망률의 주요 원인인 신장 기능장애를 갖는, 간상-원추 이영양증이다. 시력 상실은 바넷-비들 증후군의 주요 특성 중 하나이다. 야간 시력의 문제가 유년기 중반에서 명백해지고, 이후 주변 시력에서 발생하는 맹점이 나타난다. 시간 경과에 따라서, 이러한 맹점은 확대되고 병합되어 터널 시야를 만든다. 바넷-비들 증후군이 있는 대부분의 사람들은 또한 흐려진 중심 시력(불량한 시력)이 발생하고, 청소년기 또는 초기 성인기에 법적으로 실명된다. 바넷-비들 증후군은 섬모 기능에 결정적인 역할을 하는 것으로 알려지거나 의심이 되는 적어도 14개의 상이한 유전자(종종 BBS 유전자로 불림)에서의 돌연변이에서 기인할 수 있으며, BBS1 및 BBS10에서의 돌연변이가 가장 일반적이다.

[0184] 색맹. 색맹, 또는 간체 단색형색각(Rod monochromatism)은 대상체가 색상 인식의 완전한 결여를 경험하고, 이에 의하여 대상체가 흑색, 백색, 및 회색의 음영만을 보게 되는 장애이다. 다른 증상은 감소된 시력, 광선공포증(photophobia), 안구진탕, 작은 중심 암점, 및 중심외주시를 포함한다. 상기 장애는 처음에 협광성 활성 및/또는 안구진탕에 의해 6개월 정도의 어린이에서 빈번하게 나타난다. 시력 및 안구 움직임의 안정성은 일반적으로 생애의 처음 6 내지 7년 동안 개선된다(그러나, 여전히 20/200 근처의 상태임). CNGB3, CNGA3, GNAT2, PDE6C, 및 PDE6H에서의 돌연변이는 상기 장애와 연관되어 있었다.

[0185] 불완전 색맹. 불완전 색맹은 색맹과 유사하지만, 더 낮은 침투도를 가진다. 불완전 색맹에서, 증상은 감소된 형태를 제외하고, 완전 색맹의 증상과 유사하다. 불완전 색맹이 있는 개인은 안구진탕 또는 광선공포증이 있거나 없는 감소된 시력을 가진다. 또한, 이들 개인은 원추 세포 기능의 단지 부분적인 손상을 나타내지만, 여전히 간상 세포 기능을 보유하고 있다.

[0186] 청색원추 단색형색각. 청색 원추(S 원추체) 단색형색각(BCM)은 대략 100,000명의 개인에서 1명이 발병하는, 드문 X-연관 선천적 정지상 원추체 기능장애 증상이다. BCM이 발병한 남성은 L 및 M-옵신 유전자에 대한 유전적 유전자좌에서의 돌연변이로 인하여, 망막에서 기능적 장파장 감수성(L) 또는 중파장 감수성(M) 원추체를 갖지 않는다. 색상 식별은 출생시부터 심각하게 손상되고, 시력은 잔존하는 보존된 S 원추체 및 간상 광수용체로부터 유래된다. BCM은 전형적으로 감소된 시력(6/24 내지 6/60), 진자 안구진탕, 광선공포증을 나타내며, 환자는 종종 근시를 가진다. 간상체-특이적 및 최대 망막전도(ERG)는 보통 어떠한 명백한 이상도 나타내지 않는 반면, 30 Hz 원추체 ERG는 검출될 수 없다. 단일 섬광 명순응 ERG는 작고 늦더라도 종종 판독가능하며, S 원추체 ERG는 잘 보존된다.

[0187] 색각 결함. 색각 결함(CVD), 또는 색각 이상(color blindness)은 정상적인 조명 조건 하에서 색상을 보거나, 색

상 차이를 인지하는 데 있어서의 무능력 또는 감소된 능력이다. 색각 이상을 앓고 있는 개인은 다수의 색각 테스트, 예를 들어 색상 ERG(cERG), 가성동색표(이시하라 플레이트, 하디-랜드-리터 다색 플레이트), 판스위스-문셀 100 색상 테스트, 판스위스 파넬 D-15, 시티 유니버시티 테스트, 콜너의 규칙 등 중 임의의 것을 사용한 것과 같이 식별될 수 있다. 색각 결함의 예는 제1 색각 이상, 제2 색각 이상, 및 제3 색각 이상을 포함한다. 제1 색각 이상은 적색맹(적색광에 무감각) 및 적색약(적색광에 감소된 감수성)을 포함하고, L-옵신 유전자(OPN1LW)에서의 돌연변이와 연관되어 있다. 제2 색각 이상은 녹색맹(녹색광에 무감각) 및 녹색약(녹색광에 감소된 감수성)을 포함하고, M-옵신 유전자(OPN1MW)에서의 돌연변이와 연관되어 있다. 제3 색각 이상은 청색맹(청색광에 무감각) 및 청색약(청색광에 감소된 감수성)을 포함하고, S-옵신 유전자(OPN1SW)에서의 돌연변이와 연관되어 있다.

[0188] 노인 황반변성. 노인 황반변성(AMD)은 50세 이상의 사람들에서 시력 상실을 야기하는 주요 요인 중 하나이다. AMD는 주로 독서, 운전, 및 안면 인식과 같은 섬세한 작업에 요구되는 중심 시력에 영향을 미친다. 이 병태에서의 시력 상실은 황반 내 광수용체의 악화로부터 기인한다. 측면(주변) 시력 및 야간 시력은 일반적으로 영향을 받지 않는다.

[0189] 연구자들은 건식 또는 "비삼출" 형태, 및 습식 또는 "삼출" 또는 "신생혈관" 형태로 알려진 2가지 주요 유형의 노인 황반변성을 기재하였으며, 이들 2가지 유형 모두 주체 rAAV에 패키징된 이식유전자를 전달함으로써 치료될 수 있다.

[0190] 건식 AMD는 망막 색소 상피와 황반의 기저 맥락막 사이에 두루젠(drusen)이라 불리는 황색 침착물의 증가를 특징으로 하는데, 이는 안저 촬영에 의해 관찰될 수 있다. 이는 서서히 진행되는 시력의 상실을 초래한다. 종종 시력 상실이 한쪽 안구에서 일어난 다음 다른 쪽 안구에서 일어나지만, 이 병태는 전형적으로 양쪽 안구 모두에서의 시력에 영향을 미친다. 다른 변화는 색소 변화 및 RPE 위축을 포함할 수 있다. 예를 들어, 중심 지도모양 위축, 또는 "GA"라 불리는 특정 경우에, 안구의 중심부에서 망막 색소 상피의 위축 및 광수용체의 후속 상실이 관찰된다. 건식 AMD는 보체 캐스케이드에서 CD59 및 유전자에서의 돌연변이와 연관되어 있었다.

[0191] 습식 AMD는 건식 AMD의 진행된 상태로서, 건식 AMD 환자의 약 10%에서 일어난다. 병리학적 변화는 망막 색소 상피 세포(RPE) 기능장애, RPE 하 유체 집합, 및 황반 영역 내 맥락막 혈관신행(CNV)을 포함한다. 심각한 경우에는 유체 누출, RPE 또는 신경 망막 박리 및 파열된 혈관으로부터의 출혈이 일어날 수 있다. 습식 AMD의 증상은, 직선이 물결 모양으로 또는 구부러져 보이거나, 출입구 또는 도로 표지판이 편향적으로 보이거나, 사물이 원래 보다 더 작거나 더 멀리 보이는 것과 같은 시력 왜곡; 감소된 중심 시력; 색상의 감소된 강도 또는 광도; 및 시야에서 윤곽이 분명한 흐릿한 점 또는 맹점을 포함할 수 있다. 갑작스럽게 발병하여 급격히 악화될 수 있다. 진단은 대상체의 중심 시력에서의 결함을 테스트하기 위한 암슬러 격자(Amsler grid)(황반 변성은 격자 내의 직선이 색이 바래거나, 부러지거나 왜곡되게 보이게 할 수 있음), 혈관 또는 망막 이상을 관찰하기 위한 형광 안저 촬영, 및 망막 종창 또는 누수 혈관을 검출하기 위한 광 간섭성 단층촬영의 사용을 포함할 수 있다. 다수의 세포 인자가 CNV의 생성에 연루되어 있는데, 이들 중에는 혈관 표피 성장 인자(vascular endothelial growth factor; VEGF), 혈소판 유래 성장 인자(platelet-derived growth factor; PDGF), 색소 상피성 인자(pigment epithelium-derived factor; PEDF), 저산소증 유도 인자(hypoxia inducible factor; HIF), 안지오펙티오텐(angiotensin; Ang), 및 다른 사이토카인, 미토겐-활성화 단백질 키나제(mitogen-activated protein kinase; MAPK) 등이 있다.

[0192] 황반 모세혈관확장증. 황반 모세혈관확장증(MacTel)은 황반의 부중심와 영역 내 병적으로 확장된 혈관의 형태(모세혈관확장증)이다. 액체-충진 낭종의 발생으로 인해 조직이 악화되고, 망막 구조는 상처를 입게 되며, 이는 광수용체 세포의 영양을 손상시키고 시력을 영구적으로 파괴한다. MacTel의 2가지 유형, 즉 유형 1 및 유형 2가 있다. 황반 모세혈관확장증 유형 2는 양측성 질환으로, 최근에 40세 이상의 사람들에게서 0.1%의 높은 유병률을 갖는 것으로 나타났다. 생체현미경검사는 감소된 망막 투명도, 결정 침착, 중등의 확장성 모세혈관, 둔화된 세정맥, 망막 색소 플라크, 중심와 위축, 및 신생혈관 복합체를 나타낼 수 있다. 형광 안저 혈관조영술은 초기에는 중심소와에 주로 일시적인 혈관확장성 모세혈관을, 후기에는 미만성 파다형광을 나타낸다. 고해상 광 간섭성 단층촬영(OCT)은 광수용체 내측 부분-외측 부분 경계의 파열, 내부 또는 외부 망막의 수준에서 저반사 강, 및 후기에서 망막의 위축을 나타낼 수 있다. 유형 1 황반 모세혈관확장증에서, 이 질환은 거의 항상 한쪽 안구에서 일어나며, 이는 유형 2와 구별된다. MacTel이 보통 완전 실명을 야기하지 않는 반면, 이는 보통 10 내지 20년이 기간에 걸쳐 독서 및 운전 시력에 필요한, 중심 시력의 상실을 초래한다.

[0193] 망막 색소변성증. 망막 색소변성증(RP)은 중심 시력 상실을 초래할 수 있는 점진적인 주변 시력 상실 및 야간

시력 장애(야맹증)를 특징으로 하는 일 그룹의 유전성 장애이다. RP의 제시되는 징후 및 증상은 다양하지만, 전형적인 것들은 야맹증(야간 실명, RP에서 가장 일반적인 가장 초기의 증상); 시력 상실(보통 주변, 그러나 진행된 경우에는 중심 시력 상실); 및 광시증(photopsia)(빛의 번쩍임 보기)을 포함한다. RP가 다수의 유전성 질환의 집합이기 때문에, 상당한 다양성이 건강진단 결과에 존재한다. 안구 검사는 시력 및 동공 반응의 평가뿐만 아니라, 안구 앞부분, 망막, 및 안저검사 평가를 포함한다. 일부 경우에서, RP는 증후군의 일 양태, 예를 들어 또한 청력 상실과 연관된 증후군(어서 증후군(Usher syndrome), 바르텐부르크 증후군(Waardenburg syndrome), 알포트 증후군(Alport syndrome), 레프숨병(Refsum disease)); 킨스-세르 증후군(Kearns-Sayre syndrome)(외안근 마비, 안검하수, 심장 차단, 및 색소성 망막병증); 무베타 지질단백혈증(Abetalipoproteinemia)(지방 흡수 불량, 지용성 비타민 결핍, 척수소뇌변성증, 및 색소성 망막 병성); 점액 다당류증(예를 들어, 후틀러 증후군(Hurler syndrome), 샤이 증후군(Scheie syndrome), 산필리포 증후군(Sanfilippo syndrome)); 바멧-비들 증후군(다지증, 몸통 비만, 신장 기능장애, 저신장, 및 색소성 망막병증); 및 신경 세로이드 리포푸신증(치매, 발작, 및 색소성 망막병증; 유아기 형태는 얀스키-벨쇼스키병(Jansky-Bielschowsky diseases)으로 알려지고; 청소년기 형태는 보그트-스필마이어-바튼병(Vogt-Spielmeyer-Batten disease)이며, 성인 형태는 쿠프스 증후군임)과 연관되어 있다. 망막 색소변성증은 가장 일반적으로 RHO, RP2, RPGR, RPGRIP1, PDE6A, PDE6B, MERTK, PRPH2, CNGB1, USH2A, ABCA4, BBS 유전자에서의 돌연변이와 연관되어 있다.

[0194] **당뇨 망막병증.** 당뇨 망막병증(DR)은 당뇨병의 합병증에 의해 야기되는 망막에의 손상으로서, 이는 결국 실명을 초래할 수 있다. 이론에 의해 구속되고자 하지 않지만, 고혈당증-유도 교내 혈관주위세포 사멸 및 기저막의 비후가 혈관벽의 부전(incompetence)을 초래하는 것으로 여겨진다. 이러한 손상은 혈액-망막 장벽의 형성을 변화시키고 또한 망막 혈관이 보다 투과성이 되게 만든다.

[0195] 당뇨 망막병증의 2단계, 즉 비증식성 당뇨 망막병증(NPDR), 및 증식성 당뇨 망막병증(PDR)이 있다. 비증식성 당뇨 망막병증은 당뇨 망막병증의 제1 단계이며, 안저검사 및 공존하는 당뇨병에 의해 진단된다. 감소된 시력의 경우, 안구 후면의 혈관 및 존재할 수 있는 망막 허혈을 가시화하기 위해 형광 안저 혈관조영술이 수행될 수 있다. 당뇨병이 있는 모든 사람은 NPDR이 발생할 위험이 있으며, 따라서 주체 백터를 이용한 예방적 치료에 대한 후보자일 것이다. 증식성 당뇨 망막병증은 당뇨 망막병증의 제2 단계이며, 망막의 혈관신생, 유리체 출혈, 및 시야 흐려짐을 특징으로 한다. 일부 경우에서, 섬유혈관 증식은 견인성 망막 박리를 야기한다. 일부 경우에서, 혈관은 또한 안구의 전방각 내로 성장할 수 있고 신생혈관 녹내장을 야기할 수 있다. NPDR이 있는 개인은 PDR이 발생할 위험이 증가되며, 따라서 주체 백터를 이용한 예방적 치료에 대한 후보자일 것이다.

[0196] **당뇨병성 황반 부종.** 당뇨병성 황반 부종(DME)은 적어도 20년 동안 당뇨병을 앓고 있는 환자의 거의 30%에 영향을 미치는 당뇨 망막병증의 진행성인 시력-제한 합병증이며, DR로 인한 대부분의 시력 상실에 대한 원인이 된다. 이는 혈액-망막 장벽을 손상시키는 망막 미세혈관 변화로부터 기인하여, 주변 망막 내로 혈장 구성물의 누출, 및 결과적으로 망막 부종을 야기한다. 이론에 의해 구속되고자 하지 않지만, 고혈당증, 세포 신호전달 경로에서 지속적인 변경, 및 백혈구-매개 손상을 수반하는 만성적 미세혈관 염증이 만성적 망막 미세혈관 손상을 초래하고, 이는 VEGF의 안구 내 수준의 증가를 촉발하고, 이는 결국 혈관구조의 투과성을 증가시키는 것으로 여겨진다.

[0197] DME가 발생할 위험이 있는 환자는 긴 시간 동안 당뇨병을 앓고 있고 중증의 고혈압(높은 혈액 압력), 체액저류, 저알부민혈증, 또는 고지혈증 중 하나 이상을 경험하는 환자를 포함한다. DME의 일반적인 증상은 시야 흐려짐, 비문증, 복시, 및 병태가 치료되지 않고 진행되도록 하는 경우에 결국 실명이다. DME는 황반 중심의 2 디스크 직경 내에서 망막 비후화와 같은 안저 검사에 의해 진단된다. 이용될 수 있는 다른 방법은, 망막 종창, 낭포 부종, 및 장액 망막 박리를 검출하기 위한 광 간섭성 단층촬영(OCT); 중심 대 미만성 누출의 영역을 구별하고 위치를 파악하여, 레이저 광응고화가 부종을 치료하는 데 사용되는 경우 레이저 광응고의 배치를 인도하는, 형광 안저 혈관조영술; 및 망막에서 장기간의 변화를 평가하는 데 사용될 수 있는 색상 입체 안저 촬영을 포함한다. 특히 주체 약학 조성물의 투여 후 황반 부종의 진행을 추적하고 이의 치료를 관찰하기 위하여 시력이 또한 측정될 수 있다.

[0198] **망막 정맥 폐쇄.** 망막 정맥 폐쇄(RVO)는 망막의 혈액을 배출시키는 순환의 일부의 차단이다. 이러한 차단은 모세혈관에서 백업(back-up) 압력을 야기할 수 있고, 이는 출혈, 및 또한 체액과 다른 구성물의 누출을 초래할 수 있다.

[0199] **녹내장.** 녹내장은 종종 안구 내 증가된 유체 압력(안구 내 압력)(IOP)과 연관된 시신경 손상을 초래하는 일 그룹의 안구(눈) 장애를 설명하는 용어이다. 상기 장애는 대략 2개의 주요 카테고리, 즉 "개방각" 및 "폐쇄각"(또

는 "우각폐색") 녹내장으로 나뉠 수 있다. 개방각 녹내장은 미국에서 녹내장 사례의 90%를 차지한다. 이는 통증이 없고 급작스럽게 발병하지 않는다. 유일한 징후는 서서히 진행되는 시력 상실, 및 시신경 변화(안저 검사 상에서 증가된 함몰-대비-시신경유두 비율(cup-to-disc ratio))이다. 폐쇄각 녹내장은 미국에서 녹내장 사례의 10% 미만을 차지하지만, 다른 나라(특히, 아시아 국가)에서는 녹내장 사례의 절반 정도로 많다. 폐쇄각을 갖는 환자의 약 10%는 갑작스런 안구 통증, 빛 주변의 후광 보기, 붉은 눈, 매우 높은 안구 내 압력(30 mmHg 초과), 구역질 및 구토, 갑작스럽게 감소된 시력, 및 고정된 중간-확장된 동공을 특징으로 하는 급성 각 폐쇄 위기를 나타낸다. 이는 또한 일부 경우에 타원 동공과 연관이 있다. DLK, NMDA, INOS, CASP-3, Bcl-2, 또는 Bcl-x1에 의해 암호화된 단백질의 활성을 조절하는 것이 상기 병태를 치료할 수 있다.

[0200] 소르스비 안저 이영양증. 소르스비 안저 이영양증은 TIMP3 유전자에서의 돌연변이와 연관된 상염색체 우성의 망막 질환이다. 임상적으로, 조기의 중간-주변 드루젠 및 색각 결손이 발견된다. 일부 환자는 야맹증을 호소한다. 가장 일반적으로, 나타나는 증상은 갑작스런 시력 상실이고, 치료불가능한 황반 하 혈관신생으로 인해, 인생의 30 내지 40대에 나타낸다. 병리학적으로, 부르크막(Bruch's membrane)의 수준에서 30 μ m 두께로 재료를 함유하는 융합성 지질의 축적이 존재한다.

[0201] 난황형 황반 이영양증. 난황형 황반 이영양증은 진행성 시력 상실을 야기할 수 있는 유전적 안구 장애이다. 난황형 황반 이영양증은 황반 아래에 있는 세포에서 지방 황색 색소(리포푸신)의 증가와 연관이 있다. 시간 경과에 따라서, 이러한 물질의 비정상적인 축적이 명확한 중심 시력에 결정적인 세포를 손상시킬 수 있다. 그 결과, 이 장애를 가진 사람들은 종종 중심 시력을 상실하고, 이들의 시야는 흐릿해지거나 왜곡될 수 있다. 난황형 황반 이영양증은 전형적으로 측면(주변) 시력 또는 야간에 볼 수 있는 능력에 영향을 미치지 않는다.

[0202] 연구자들은 유사한 특성을 가지는 2가지 형태의 난황형 황반 이영양증을 설명하였다. 초기-발병 형태(베스트병으로 알려져 있음)는 보통 유년기에 나타나고; 증상의 개시 및 시력 상실의 중증도는 크게 다르다. 이는 VMD2/BEST1 유전자에서의 돌연변이와 연관이 있다. 성인-발병 형태(성인 난황형 황반 이영양증)은 이후에, 보통 중기-성인기에서 시작하고, 시간 경과에 따라서 서서히 악화되는 시력 상실을 야기하는 경향이 있다. 이는 PRPH2 유전자에서의 돌연변이와 연관이 있다. 2가지 형태의 난황형 황반 이영양증은 각각 안구 검사 동안 검출될 수 있는 황반에서의 특징적 변화를 가진다.

[0203] 간상-원추 이영양증. 간상-원추 이영양증은, 야맹증 및 주변 시야 확대의 상실을 초래하는 간상체 기능장애가 지배적인 문제이거나 적어도 원추체 기능장애만큼 심각하게 발생하는, 일군의 진행성 질환이다. 물결 모양으로 경계를 이룬(scallop-bordered) 열공성(lacunar) 위축이 망막의 망막중심부에서 보여질 수 있다. 모든 사례에서 중심 망막 세절화(thinning)가 보이지만, 황반은 단지 임상적 검사에 의해 약간만 관련된다. 색각이상(dyschromatopsia)은 초기에는 약한 정도이고, 보통 점점 중증으로 된다. 더 어린 개인에서 전형적인 고리 압점이 존재하지만, 시야는 중등에서 중증으로 위축된다. 주변 망막은 '백점(white dots)'을 포함하고, 종종 망막염 반점 알베센스(retinitis punctate albescens)에서 보이는 망막 변화와 비슷하다. 망막 색소변성증(retinitis pigmentosa)은 이 정의 하에 포함되는 질환의 주요 그룹이고, 전체적으로 대략 3,500명당 1명씩 영향을 미치는 것으로 추산된다. 사용된 분류 기준에 따라서, 모든 망막 색소변성증 환자의 약 60 내지 80%는 망막 질환의 명백한 간상-원추 이영양증 양상을 가지며, 다른 증후군 형태를 고려하면, 모든 망막 색소변성증의 50 내지 60%가 간상-원추 이영양증 비증후군 카테고리 속한다.

[0204] 레베르 선천성 흑암시(Leber's congenital amaurosis). 레베르 선천성 흑암시(LCA)는 전형적으로 생애 첫 해에 분명해지는 망막의 심각한 이영양증이다. 시각적 기능은 보통 불량하고, 종종 안구진탕, 부진하거나 거의 부재인 동공 반응, 광선공포증, 고도 원시, 및 원추각막을 동반한다. 시력은 드물게 20/400보다 좋다. 특징적 소견은 눈 찌르기, 누르기, 및 비비기를 포함하는 프란체스케티의 안구-디지털 신호(Franceschetti's oculo-digital sign)이다. 안저의 외관은 극히 가변적이다. 망막이 초기에 정상적으로 보일 수 있지만, 망막 색소변성증을 연상시키는 색소성 망막병증이 유년기 후반에 빈번하게 관찰된다. 망막전도(ERG)는 특징적으로 "검출할 수 없는" 또는 심하게 정상 이하이다. 17개 유전자에서의 돌연변이가 LCA를 야기하는 것으로 알려져 있다: GUCY2D(유전자좌명: LCA1), RPE65(LCA2), SPATA7(LCA3), AIPL1(LCA4), LCA5(LCA5), RPGRIP1(LCA6), CRX(LCA7), CRB1(LCA8), NMNAT1(LCA9), CEP290(LCA10), IMPDH1(LCA11), RD3(LCA12), RDH12(LCA13), LRAT(LCA14), TULP1(LCA15), KCNJ13(LCA16), 및 IQCB1. 이와 함께, 이들 유전자에서의 돌연변이는 모든 LCA 진단의 절반 이상을 차지하는 것으로 추산된다. LCA에 대하여 적어도 하나의 다른 질환 유전자좌가 보고되었으나, 그 유전자는 알려지지 않았다.

[0205] X-연관 망막충간분리증. X-연관 망막충간분리증(XLRS)은 생애의 처음 10년 내에, 일부 경우에는 빠르면 3개월

째에 발병하는 전신적 양측성 황반 병발을 특징으로 한다. 안저 검사는 황반에서 분리(schisis)(망막의 신경 섬유층의 분열(splitting)) 영역을 나타내며, 이는 때때로 스포크 휠 패턴(spoke wheel pattern)의 인상을 남긴다. 주변 망막의 분리는, 주로 측두하에서(inferotemporally), 대략 개인의 50%에서 일어난다. 발병한 남성은 전형적으로 20/60 내지 20/120의 시력을 가진다. 시력은 종종 생애의 10대 및 20대 동안에 악화되지만, 그 후에는 50대 또는 60대까지 비교적 안정적으로 유지된다. X-연관 청소년 망막층간분리증의 진단은 안저 소견, 전기생리학적 테스트의 결과, 및 분자유전학적 테스트를 기반으로 한다. RS1은 X-연관 청소년 망막층간분리증과 연관된 것으로 알려진 유일한 유전자이다.

[0206]

원추 세포 장애에 걸렸거나 원추 세포 장애가 발생할 위험에 있는 개인은, 안저 촬영, 광 간섭성 단층촬영(OCT), 적응 광학(AO); 망막전위도검사, 예를 들어 ERG, 색상 ERG(cERG); 색각 테스트, 예컨대 가성동색표(이시하라 플레이트, 하디-랜드-리터 다색 플레이트), 판스위스-문셀 100 색상 테스트, 판스위스 파넬 D-15, 시티 유니버시티 테스트, 콜너의 규칙 등; 및 시력 테스트, 예컨대 ETDRS 문자 테스트, 스넬렌 시력 테스트, 시야 테스트, 대비 감수성 테스트(contrast sensitivity test) 등(이로 제한되지 않음)을 포함한, 당업계에 알려진 바와 같고; 당업자에게 알려질 바와 같은 상기 장애의 증상을 검출하는 기법을 사용하여 용이하게 식별될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 원추 세포 장애에 걸렸거나 원추 세포 장애가 발생할 위험에 있는 개인은 PCR, DNA 서열 분석, 제한 소화, 서던 블롯 혼성화, 질량 분석법 등(이로 제한되지 않음)을 포함한, 당업계에 알려진 바와 같은 원추 세포 장애와 연관된 유전자 돌연변이를 검출하는 기법을 사용하여 용이하게 식별될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 원추 세포 치료법을 필요로 하는 개인을 식별하는(identifying) 단계를 포함한다. 이와 같은 경우에, 예를 들어 본 명세서에 기재되거나 당업계에 알려진 증상의 검출, 본 명세서와 같거나 당업계에 알려진 바와 같은 유전자에서의 돌연변이의 검출 등에 의해, 개인이 원추 세포 장애의 증상을 가지고 있는지 또는 원추 세포 장애가 발생할 위험에 있는지 여부를 결정하기 위한 임의의 편리한 방법이 원추 세포 치료법을 필요로 하는 개인을 식별하기 위해 이용될 수 있다.

[0207]

주제 방법을 실시함에 있어서, 주제 조성물은 전형적으로 원추 세포에서 이식유전자의 발현을 초래하기에 효과적인 양으로 대상체의 망막에 전달된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 원추 세포에서 이식유전자의 발현을 검출하는 단계를 포함한다.

[0208]

이식유전자의 발현을 검출하기 위한 다수의 방법이 존재하는데, 이들 중 임의의 것이 주제 실시형태에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 발현은 직접적으로, 즉 예를 들어 RNA 수준에서, 예를 들어 RT-PCR, 노던 블롯, RN아제 보호에 의해; 또는 단백질 수준에서, 예를 들어 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학 등에 의해 유전자 산물의 양을 측정함으로써 검출될 수 있다. 또 다른 예로서, 발현은 간접적으로, 즉 대상체에서 원추 광수용체의 생존력 또는 기능에 대한 유전자 산물의 영향을 검출함으로써 검출될 수 있다. 예를 들어, 이식유전자에 의해 암호화된 유전자 산물이 원추 세포의 생존력을 개선시키는 경우, 이식유전자의 발현은, 예를 들어 안저 촬영, 광 간섭성 단층촬영(OCT), 적응 광학(AO) 등에 의해, 원추 세포의 생존력에서의 개선을 검출함으로써 검출될 수 있다. 이식유전자에 의해 암호화된 유전자 산물이 원추 세포의 활성을 변경시킨다면, 이식유전자의 발현은, 전달된 폴리뉴클레오타이드의 존재를 검출하는 방법으로서, 예를 들어 망막전도(ERG) 및 색상 ERG(cERG); 기능성 적응 광학; 색각 테스트, 예컨대 가성동색표(이시하라 플레이트, 하디-랜드-리터 다색 플레이트), 판스위스-문셀 100 색상 테스트, 판스위스 파넬 D-15, 시티 유니버시티 테스트, 콜너의 규칙 등; 및 시력 테스트, 예컨대 ETDRS 문자 테스트, 스넬렌 시력 테스트, 시야 테스트, 대비 감수성 테스트 등에 의해, 원추 세포의 활성에서의 변화를 검출함으로써 검출될 수 있다. 일부 경우에, 생존력의 개선 및 원추 세포 기능의 변형 둘 다 검출될 수 있다.

[0209]

일부 실시형태에서, 주제 방법은, 예를 들어 장애의 발생을 예방하고, 장애의 진행을 정지시키며, 장애의 진행을 역전시키는 등의 치료적 이익을 초래한다. 일부 실시형태에서, 주제 방법은 치료적 이익이 달성되었음을 검출하는 단계를 포함한다. 당업자는 치료적 효능의 이와 같은 측정이 변형되는 특정 질환에 적용가능할 것임을 인식할 것이며, 치료적 효능을 측정하기 위해 사용되는 적절한 검출 방법을 인식할 것이다. 예를 들어, 황반 변성을 치료함에 있어서 치료적 효능은 황반 변성 속도의 감소 또는 황반 변성 진행의 중단으로 관찰될 수 있고, 이의 효과는, 예를 들어 안저 촬영, OCT, 또는 AO에 의해, 주제 조성물의 투여 후 테스트 결과를 주제 조성물의 투여 전 테스트 결과와 비교함으로써 관찰될 수 있다. 또 다른 예로서, 진행성 원추체 기능장애의 치료에 있어서 치료적 효능은 원추체 기능장애의 진행 속도의 감소로서, 원추체 기능장애 진행 중단, 또는 원추체 기능에서의 개선으로서, 관찰될 수 있으며, 이의 효과는, 예를 들어 ERG 및/또는 cERG; 색각 테스트; 기능성 적응 광학; 및/또는 시력 테스트에 의해, 예를 들어 대상 조성물의 투여 후 테스트 결과를 대상 조성물의 투여 전 테스트 결과와 비교하고 원추체 생존력 및/또는 기능에서의 변화를 검출함으로써 관찰될 수 있다. 세번째 예로서, 색각 결함을 치료함에 있어서 치료적 효능은, 예를 들어 적색 파장의 인지, 녹색 파장의 인지, 청색 파장의

인지에서, 개인의 색상 인지에서의 변경으로서 관찰될 수 있으며, 이의 효과는, 예를 들어 대상 조성물의 투여 후 테스트 결과를 대상 조성물의 투여 전 테스트 결과와 비교하고 원추체 생존력 및/또는 기능에서의 변화를 검출함으로써, 예를 들어 cERG 및 색각 테스트에 의해 관찰될 수 있다.

[0210] 주제 rAAV에 의해 전달되는 이식유전자의 발현은 견고할 것으로 예상된다. 따라서, 일부 경우에서, 예를 들어 유전자 산물의 수준의 측정, 치료적 효능의 측정 등에 의해 검출되는 바와 같이, 이식유전자의 발현은 투여 후 2개월 이하에, 예를 들어 투여 후 4, 3 또는 2주 이하에, 예를 들어 주제 조성물의 투여 1주일 후에 관찰될 수 있다. 이식유전자의 발현은 또한 시간 경과에 따라 지속될 것으로 예상된다. 따라서, 일부 경우에, 예를 들어 유전자 산물의 수준의 측정, 치료적 효능의 측정 등에 의해 검출되는 바와 같이, 이식유전자의 발현은 주제 조성물의 투여 후 2개월 이상, 예를 들어 4, 6, 8, 또는 10개월 이상, 일부 경우에 1년 이상, 예를 들어 2, 3, 4, 또는 5년, 특정 경우에 5년을 초과하여 관찰될 수 있다.

[0211] 특정 실시형태에서, 상기 방법은 원추 세포에서 대상 rAAV에 의해 전달된 폴리뉴클레오타이드의 발현을 검출하는 단계를 포함하되, 발현은 GH 루프에 7 내지 10개의 아미노산 삽입물을 포함하지 않는 AAV, 즉 참조 대조군, 예를 들어 켈타이드가 삽입된 모 rAAV로부터의 발현에 비하여 향상된다. 전형적으로, 발현은, 예를 들어 조기 검출, 더 높은 수준의 유전자산물, 세포에 대한 더 강력한 기능적 영향 등에 의해 입증되는 바와 같이, 참조, 예를 들어 모 rAAV로부터의 발현에 비하여 2배 이상, 예를 들어 3배, 4배, 또는 5배 이상, 일부 경우에 10배, 20배 또는 50배 이상, 예를 들어 100배 이상 향상될 것이다.

[0212] 전형적으로, 변화를 달성하기에 효과적인 양은 약 1×10^8 이상의 벡터 게놈, 일부 경우에 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 또는 1×10^{13} 이상의 벡터 게놈, 특정 경우에 1×10^{14} 이상의 벡터 게놈, 그리고 보통 1×10^{15} 이하의 벡터 게놈일 것이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 최대 약 1×10^{15} 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^{14} 이하의 벡터 게놈, 예를 들어 1×10^{13} , 1×10^{12} , 1×10^{11} , 1×10^{10} , 또는 1×10^9 이하의 벡터 게놈, 특정 경우에 1×10^8 벡터 게놈, 그리고 전형적으로 1×10^8 이상의 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 내지 1×10^{11} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^{10} 내지 3×10^{12} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^9 내지 3×10^{13} 벡터 게놈이다. 일부 경우에, 전달되는 벡터 게놈의 양은 1×10^8 내지 3×10^{14} 벡터 게놈이다.

[0213] 일부 경우에, 투여될 약학 조성물의 양은 감염 다중도(MOI)를 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, MOI는 핵이 전달될 수 있는 세포에 대한 벡터 또는 바이러스 게놈의 비율, 또는 배수를 말할 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^6 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^5 내지 1×10^7 일 수 있다. 일부 경우에, MOI는 1×10^4 내지 1×10^8 일 수 있다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 1×10^8 내지 3×10^{14} MOI이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 재조합 바이러스는 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} MOI이다.

[0214] 일부 양태에서, 약학 조성물의 양은 재조합 바이러스의 약 1×10^8 내지 약 1×10^{15} 입자, 재조합 바이러스의 약 1×10^9 내지 약 1×10^{14} 입자, 재조합 바이러스의 약 1×10^{10} 내지 약 1×10^{13} 입자, 또는 재조합 바이러스의 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{12} 입자를 포함한다.

[0215] 개별 용량은 전형적으로 대상체에서 측정 가능한 효과를 생성하는 데 필요한 양 이상이며, 주제 조성물 또는 이의 부산물의 흡수, 분포, 대사, 및 배설("ADME")에 대한 약동학 및 약리학을 기반으로, 따라서 대상체 내 조성물의 소인을 기반으로 결정될 수 있다. 이는 투여 경로뿐만 아니라, 망막 하(작용이 주로 국소적 효과에 대하여 요구되는 곳에 직접적으로 적용됨), 유리체 내(범-망막 효과를 위해 유리체에 적용됨), 또는 비경구(전신적 경로, 예를 들어 정맥 내, 근육내 등에 의해 적용됨) 적용에 적합할 수 있는 투약량의 고려를 포함한다. 용량 및/또는 용량 요법의 유효량은 전임상 분석, 안전성 및 단계적 확대 및 용량 범위 시험, 개별적 임상의-환자 관계뿐만 아니라, 본 명세서에 기재되고 하기 실험 섹션에서 설명되는 것과 같은 시험관 내 및 생체 내 분석으로부

터 경험적으로 용이하게 결정될 수 있다.

[0216] 본 명세서에서 언급되고/언급되거나, 출원 데이터 시트에 열거된 상기 미국 특허, 미국 특허출원 공개, 미국 특허 출원, 외국 출원, 외국 특허출원 및 비특허 간행물 모두는 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함되어 있다.

[0217] 상기한 바로부터, 본 발명의 특정 실시형태가 예시의 목적으로 본 명세서에 기재되었지만, 본 발명의 사상 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 따라서, 본 발명은 첨부된 청구항에 의하는 경우를 제외하고 제한되지 않는다.

[0218] 실시예

[0219] 하기 실시예는 본 발명을 만들고 사용하는 방법의 완전한 개시 및 기재를 당업자에게 제공하기 위하여 제시되고, 발명자가 발명으로서 고려하는 범주를 제한하는 것으로 의도되지 않으며, 또한 하기 실험이 전부이거나 단지 실행된 실험만인 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 사용된 수(예를 들어, 양, 온도 등)와 관련하여 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험적 오차 및 편차가 이에 대해 고려되어야 한다. 달리 지시되지 않는다면, 부(part)는 중량부이고, 분자량은 중량 평균 분자량이며, 온도는 단위가 °C이고, 압력은 대기압 또는 대기압 근처이다.

[0220] 분자 및 세포 생화학의 일반적 방법은 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd Ed. (Sambrook et al., HarBor Laboratory Press 2001)]; [Short Protocols in Molecular Biology, 4th Ed. (Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons 1999)]; [Protein Methods (Bollag et al., John Wiley & Sons 1996)]; [Nonviral Vectors for Gene Therapy (Wagner et al. eds., Academic Press 1999)]; [Viral Vectors (Kaplift & Loewy eds., Academic Press 1995)]; [Immunology Methods Manual (I. Lefkovits ed., Academic Press 1997)]; 및 [Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures in Biotechnology (Doyle & Griffiths, John Wiley & Sons 1998)]과 같은 표준 교과서에서 확인할 수 있으며, 이들의 개시내용은 참조로서 본 명세서에 포함된다. 본 개시 내용에 언급된 유전자 조작을 위한 시약, 클로닝 벡터, 및 키트는 상업적 판매자, 예컨대 바이오라드(BioRad), 스트라타진(Stratagene), 인비트로젠, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich), 및 클론테크(ClonTech)으로부터 입수할 수 있다.

[0221] 실시예 1

[0222] 배경

[0223] 황반 이영양증, 예컨대 원추-간상 이영양증, 원추 이영양증, 스타가르트 황반이영양증, 및 색맹; 색각 장애, 예컨대 제1 색각 이상, 제2 색각 이상, 및 제3 색각 이상; 및 중심 황반의 시각 장애, 예컨대 노인 황반변성, 황반 모세혈관확장증, 망막 색소변성증, 당뇨 망막병증, 망막 정맥 폐쇄, 녹내장, 소르스비 안저 이영양증, 성인 난황형 황반 이영양증, 베스트병, 및 X-연관 망막중간분리증을 포함하여, 다수의 원추 광수용체 연관 장애의 치료를 위한 신규 치료법이 요구된다. 이들 시각 장애는 원추 광수용체의 기능 및/또는 생존력의 상실과 연관되어 있으므로, 이들 장애가 원추체 생존력 및 기능을 구제하기 위하여 원추 광수용체에 치료적 유전자를 전달함으로써 치료될 수 있을 것으로 가정된다.

[0224] 이를 위해서, 인헨서, 프로모터, 5'UTR, 인트론, 코작(Kozak), 및 폴리아데닐화 서열이 원추체-특이적 발현용으로 설계된 폴리뉴클레오타이드 카세트 "pMNTC"를 설계하였다(도 6a). 이 카세트는 전사 개시 부위의 상류에 약 140개의 뉴클레오타이드를 포함하는, L- 및 M-오피신 게놈 유전자와 유래의 LCR 인헨서 서열 및 M-오피신 유전자 유래의 절두된 프로모터 서열을 포함하였다. 추가적으로, 이 카세트는 M-오피신 5' 비번역 영역(5' UTR)을 기반으로 하지만 최소한의 이차 구조를 가지고 인트론이 삽입된 3' 말단에 추가적인 서열을 포함하도록 변형된 5' UTR을 포함하였다. 사용된 인트론 서열은 인간 β -글로빈 유전자의 제1 인트론 유래의 5'-공여체 부위 및 면역글로불린 유전자 중쇄 가변 영역의 리더 및 주요부 사이에 존재하는 인트론 유래의 분지 및 3-수용체 부위를 가지는 pSI 키메라 인트론이었다(Bothwell, A.L. et al. (1981) Heavy chain variable region contribution to the NPb family of antibodies: Somatic mutation evident in a gamma 2a variable region. Cell 24, 625-37). 분기점 부위와 함께, 공여체 및 수용체 부위의 서열을 스플라이싱을 위한 공통 서열을 매치하기 위해 변화시켰다(Senapathy, P., Shapiro, M.B. and Harris, N.L. (1990) Meth. Enzymol. 183, 252-78). 또한, pMNTC 폴리뉴클레오타이드 카세트에 강력한 코작 서열 및 SV40 폴리아데닐화 서열을 포함하였다.

[0225] 또한, 원추 세포에 이식유전자를 전달하기 위한 최선의 AAR를 식별하기 위해 실험을 실행하였다. 유전자 치료법을 위해 망막의 세포에 폴리뉴클레오타이드의 성공적인 전달이 AAV 및 렌티바이러스와 같은 바이러스 벡터를 사용하여 달성되었다. 그러나, 이들 바이러스는 비인간 영장류(NHP) 망막의 세포에 도달하기 위하여 망막 하로 주

사되어야 하고, 이 기술은 망막 손상의 위험을 가지고 있다. 덜 파괴적인 접근법은 유리체 내 주사에 의한 투여이다. 그러나, AAV 또는 렌티바이러스의 유리체 내 전달 후 원추 광수용체의 효율적인 형질도입은 전혀 입증된 바 없으며; 고효율로 망막 원추 세포를 형질도입하는 능력을 가지는 AAV의 존재가 보고되었으나(Merigan et al. IOVS 2008, 49 E-abstract 4514), 이후 보고는 이들 벡터의 효능에 의문을 제시하였다(Yin et al. IOVS 2011, 52(5):2775-2783).

[0226] 결과

[0227] AAV2의 유도된 진화는 야생형 AAV2보다 우수하게 광수용체를 형질도입할 수 있는 바이러스 변이체 "7m8"의 식별을 초래하였다(Dalkara et al. Sci Transl Med 2013). 그러나, 망막은 2가지 유형의 광수용체, 즉 간상체 및 원추체를 함유하고, AAV2-7m8이 그 자체로 원추 광수용체를, 보다 구체적으로는 중심와의 원추체가 고도로 풍부한 영역에서 원추 광수용체를 형질도입할 수 있는지 여부를 입증한 보고는 존재하지 않는다. 이러한 가능성을 테스트하기 위하여, 본 발명자들은 GFP에 작동 가능하게 연결된 편재성 프로모터 CMV의 발현 카세트를 보유하는 AAV2-7m8을 유리체 내 주사에 의해 아프리카 녹색 원숭이의 망막에 전달하였다. 유리체 내로 전달된 AAV2-7m8.CMV.GFP는 망막 세포를 형질도입하는 것으로 당업계에서 이전에 나타난 유리체 내로 전달된 AAV2 또는 다른 AAV 변이체보다 더 효율적으로 영장류의 중심오목(핵심인의 중심에서 직경 0.35mm의 간상체가 없는 망막의 영역) 및 부중심와(오목한 곳의 가장자리)에서 망막 세포를 형질도입하는 것으로 나타났다. 테스트된 AAV2-7m8 또는 다른 AAV 어느 것도 중심소와를 둘러싸고 안와의 경사를 형성하는 직경 1.5mm의 원추체가 풍부한 망막의 영역인 영장류 중심와의 원추체를 형질도입할 수 없는 것으로 나타났다(도 1).

[0228] 이어서 본 발명자들은 GFP에 작동 가능하게 연결된 pMNTC를 포함하는 게놈을 AAV2-7m8 캡시드 내에 패키징하고, 유리체 내로 주사되는 경우 생체 내에서 GFP 이식유전자를 원추 세포에서 발현하는 이러한 벡터 조성물의 능력을 평가하였다. 발현을 마우스(3% 원추체), 래트(1% 원추체), 모래쥐(13% 원추체), 및 비인간 영장류(5% 원추체)를 포함하여, 전체 광수용체 중에 망막 추상체의 수를 달리하면서 다수의 종에서 평가하였다. 도 1에서의 본 발명자들의 결과와 대조적으로, 강력한 유전자 발현이 비인간 영장류 중심와 전반에 걸쳐서 검출될 수 있었다(도 2). 이러한 데이터는 유리체 내로 전달된 AAV2-7m8이, 실제로 망막 추상체를 형질도입할 수 있고, pMNTC가 원추 세포에서 강력한 발현 카세트로서 작용함을 나타낸다. 강력한 리포터 유전자의 발현은 또한 래트(데이터를 나타내지 않음) 및 모래쥐(도 4a)의 유리체 내로 주사된 망막에서 나타났는데, 발현 수준 및 해부학적 위치는 모든 종에서 원추체의 풍부함 및 위치와 연관성이 있었다.

[0229] pMNTC-유도 발현의 세포-특이성을 결정하기 위하여, 형질도입된 마우스 망막의 온조직 표본(whole mount)을 원추 L 및 M 읍신에 특이적인 항체를 사용한 면역조직화학으로 분석하였다. 원추 광수용체의 외측 부분만을 표지화하는 L/M 읍신의 발현이, AAV2-7m8.MNTC.GFP 벡터로부터 GFP를 발현한 마우스 망막의 원추체 모두에서 시각적으로 관찰되었는데(도 3), 이는 이식유전자의 MNTC-유도된 발현이 매우 원추체-특이적임을 나타낸다. 게다가, L/M 읍신-특이적 항체에 의해 표지화된 원추체 외측 부분의 80% 이상은 또한 GFP 이식유전자를 발현하였는데, 이는 AAV2-7m8이 매우 효율적으로 원추체를 형질도입한다는 것을 나타낸다(도 3).

[0230] 본 발명자들은 또한 AAV2-7m8 캡시드(AAV2-7m8pR2.1.GFP 벡터) 내에서 GFP에 작동 가능하게 연결된 pR2.1을 포함하는 게놈을 패키징함으로써 pR2.1-유도 발현의 세포-특이성을 결정하였다. pR2.1은 인간 L/M 읍신 인핸서("LCR") 및 인간 L-읍신 유전자 유래의 프로모터 영역을 포함한다. 추가적으로, pR2.1은 변형된 SV40 후기 16s 인트론 서열이 삽입된, 이의 3' 말단에서 추가적인 5'UTR 서열에 융합된 L-읍신 5'UTR을 포함한다. 그 다음 L-읍신 코작 서열이 이어지며, 그 다음, 상기 서열은 전형적으로 이식유전자에 인-프레임(in-frame) 연결된다. 카세트의 말단에 SV40 폴리A 꼬리가 있다. 생체 내 원추 세포에서 GFP 이식유전자를 발현하는 이러한 벡터 조성물의 능력을 아프리카 녹색 원숭이(비인간 영장류; NHP)에서 유리체 내 주사 12주 후에 평가하였다. 간략하게, NHP는 50 μ L의 1.0 \times 10¹³ vg/mL AAV2-7m8pR2.1.GFP를 양쪽 유리체 내 투여를 받아 안구 당 5 \times 10¹¹ vg의 최종 용량을 산출하였다. 캐논(Canon) 6D 디지털 이미징 하드웨어 및 스펙트랄리스 OCT 플러스(Spectralis OCT Plus)가 구비된 탑콘(Topcon) TRC-50EX 망막 카메라를 사용하여 기준선 및 유리체 내 벡터 주사 후 4, 8, 및 12주째에, 안저 색상 및 형광 촬영을 포함하여 망막 검사를 실행하였다. 12주째에 동물을 종결하고 안구를 처리하였다. NHP 유래의 처리된 망막의 단면을 닭 다클론성 항-GFP 항체(에이비캠(Abcam) Cat # 13970; 영국 케임브리지 소재); 읍신 원추체에 특이적인 토끼 다클론성 항-L/M 읍신 항체(에이비캠 Cat #5405); 1D4 마우스 단클론성 항-로돕신 항체(에이비캠 Cat #5417); 및 Dapi로 염색하여 모든 핵을 염색하였다(인비트로젠 # D21490). 항체 프로브 및 DIC(differential interference contract for topology; 위상을 위한 차등 간섭 약정)와 함께 다중 스펙트럼 분석에 의해 전체 섹션을 통해 광학 평면의 편향한 스택으로서 GFP-표지 이식유전자 함유 세포를 이미지화

하였다. 형태 및 공유국소화(colocalization)를 사용하여 이식유전자에 대한 세포 분석을 최적화하였다. GFP(이식유전자) 염색은 로돕신 염색으로는 아니지만 L/M 옵신 염색으로 공유국소화되었으며, 이는 pR2.1이 원추 세포에서 특이적으로 발현을 촉진시킨다는 것을 나타낸다(도 7). GFP 이식유전자 신호는 중심와, 망막중심부(mid periphery) 및 원 주변부(far periphery)에서 관찰되었고; GFP 이식유전자 신호가 L/M-옵신, 칼빈딘 및 PNA 프로브를 이용하여 공유국소화되었으며; 중심와에서 1D4-함유 세포의 명확한 배제가 관찰되었고; 간상체 또는 다른 프로브-함유 세포와 GFP 이식유전자 양성 세포 결합성이 없었다. (도 7). 요약하면, GFP(이식유전자 발현) 및 L/M 옵신에 대해 이중 염색된 세포를 관찰하였지만, GFP 및 로돕신 둘 다에 대하여 이중 염색 세포가 없었으며, 이는 AAV2-7m8pR2.1.GFP 벡토가 원추 세포에서 특이적으로 발현을 유도하였지만, 간상 세포에서는 그렇지 않다는 것을 나타낸다.

[0231] 이어서 본 발명자들은 원추 세포에서 발현을 촉진시키는 pMNTC의 능력을 pR2.1의 능력과 비교하였다. AAV2-7m8.MNTC.GFP 및 AAV2-7m8.pR2.1.GFP의 바이러스 제조물을 생체 내에서 모래쥐 및 비인간 영장류의 망막에 유리체 내로 전달하고, 생체 내에서 안저 자가형광 및 OCT에 의해 2주, 4주 8주, 및 12주 후에 망막을 이미지화하였다. GFP 리포터 발현은 pR2.1.GFP 발현 카세트를 보유하는 모래쥐 망막보다 pMNTC.GFP 발현 카세트를 보유하는 rAAV로 형질도입된 모래쥐 망막에서 더 빨리, 더 강력하게, 그리고 더 많은 원추체에서 검출되었다(도 4b). 유사하게, GFP 리포터 발현은 pR2.1 발현 카세트로 형질도입된 NHP 망막에 비하여 pMNTC.GFP 발현 카세트를 보유하는 rAAV로 형질도입된 비인간 영장류 망막에서 더 빨리 그리고 더 많은 원추체에서 검출되었다(도 5, n = 4개 안구). 모래쥐 및 NHP 둘 다에서, GFP는 연구 기간 전반에 걸쳐 pR2.1로부터보다 pMNTC로부터 더 강력한 것으로 일관되게 관찰되었다.

[0232] 발현에 있어서 전반적인 개선에 대한 pMNTC 발현 카세트 내 각각의 요소의 기여를 결정하기 위하여, pMNTC 내 각각의 요소가 하나씩 pR2.1 발현 카세트로부터 상응하는 요소로 대체된 일련의 발현 구조물을 클로닝하였다. 이후에, 이들 구조물을 AAV2-7m8 내로 패키징하고, 모래쥐 망막에 유리체 내 주사에 의해 전달하였다. 모래쥐 망막을 생체 내에서 생체발광(이비스 이미징 시스템, 퍼킨엘머(PerkinElmer))에 의해 4 및 8주 후에 평가하였으며, 이는 전체 안구에 걸쳐서 리포터 발현의 정량적 관독을 제공한다.

[0233] 예상되는 바와 같이, pMNTC의 제어 하에서 루시페라제 리포터의 발현이 pR2.1의 제어 하의 루시페라제 리포터의 발현보다 더 높았다(도 6). pR2.1의 5'UTR에 대하여 더 멀리 존재하는 pR2.1 프로모터 서열을 포함하였으므로 (구조물 pMNTC_pR2.1-L5'P), 최대 서열 상동성을 가지는 pR2.1 프로모터 서열로의 pMNTC 프로모터 서열의 대체는 발현을 감소시켰다(구조물 pMNTC_pR2.1 L3'P). pR2.1 5'UTR에서 관찰되었던 2개의 위(false) 개시 서열("AUG1" 및 "AUG2")의 pMNTC 5'UTR 내로의 도입에 의해 발현이 또한 감소되었다(구조물 pMNTC_2.1-AUG1/2). 흥미롭게도, pMNTC 5'UTR이 이들 위 개시 서열이 제거된 변형된 pR2.1 5'UTR 서열로 대체되었을 경우(뉴클레오타이드 17이 C로 변경되고, 뉴클레오타이드 61 및 62가 CA로 변경됨)(pMNTC_pR2.1-5'UTR)에 발현이 감소하지 않았는데, 이는 pR2.1 5'UTR이 pR2.1 5'UTR 요소에서 위 AUG가 없다면 원추 세포에서 강력한 발현을 촉진시킬 것임을 시사한다. 또한 흥미롭게도, pR2.1 인트론은 pMNTC의 pSI 키메라 인트론보다 더 강력한 발현을 제공하는 것으로 나타났는데, 이는 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 카세트의 pR2.1 인트론의 포함이 원추 세포에서 발현을 추가로 개선시키기 위해 사용될 수 있음을 시사한다. 마지막으로, L/M 인헨서(pR2.1 및 pMNTC 둘 다에서 발견됨)의 제거는 또한 발현을 감소시켰다. 폴리A 꼬리가 처음에는 또한 발현에 대하여 상당한 영향을 미치는 것으로 보였지만, 이러한 pR2.1 요소를 포함하는 pMNTC 구조물의 재서열분석이 폴리A 꼬리가 이식유전자에 작동 가능하게 연결되지 않았음을 드러내고, 이에 의해 단지 배경 수준의 발현만이 이 구조물로부터 관찰되었는지 여부를 설명하였다. 따라서, L/M 옵신 LCR, L 옵신 프로모터보다 M 옵신 코어 프로모터의 포함, 및 5'UTR에서 위 개시 서열의 배제 모두가 pMNTC 프로모터를 사용하여 달성되는 유전자 발현에서의 향상에 기여한다.

[0234] 결론적으로, 본 발명자들은 AAV 변이체를 확인하였으며, 상기 AAV 변이체는 망막 원추체에 폴리뉴클레오타이드의 유리체 내 전달을 위하여 사용될 수 있는, GH 루프 내에 7m8 펩타이드를 포함한다. 유사하게, 본 발명자들은 원추 광수용체에서 강력한 발현을 촉진시키기 위해 사용될 수 있는 다수의 폴리뉴클레오타이드 카세트 요소를 식별하였다. 종합하면, 이들 발견은 원추-연관 장애에 대한 치료제의 개발을 용이하게 할 수 있는 개선을 나타낸다.

[0235] 재료 및 방법

[0236] *WERI-RB-1 세포에서 시험관 내 이식유전자의 발현.* 원추 광수용체 색소 세포를 발현하는 WERI-Rb-1 망막모세포종 세포를 문헌[Shaaban and Deeb, 1998; IOVS 39(6)885-896]에 의해 기재된 방법에 따라서 본 개시내용의 폴리뉴클레오타이드 카세트에 형질감염시킨다. 폴리뉴클레오타이드 카세트를, 클로닝(Maniatis et al.)과 같은 분

자 생물학의 잘 확립된 기법을 사용하거나 신규(de novo) DNA 합성을 통하여 플라스미드 DNA로서 형질감염시킨다. 모든 조절성 요소는 카세트 내에 배치되고, 향상된 GFP 단백질을 유도하기 위해 사용된다. 그 다음, 비바이러스 형질감염에 대하여 확립된 기법을 사용하여, 예를 들어 지질-기반 형질감염 시약(알토젠 바이오시스템즈(Altogen Biosystems), NV) 또는 리포펙타민 LTX(Lipofectamine LTX)(라이프 테크놀로지스(Life Technologies))를 사용하여 플라스미드 DNA를 세포 내로 도입한다. 그 다음, 세포를 72시간 동안 배양하고, 유세포 분석 및 형광 현미경 검사를 사용하여 eGFP 발현을 측정한다. 본 발명의 폴리뉴클레오타이드 카세트(즉, 원추 광수용체 발현을 위해 설계된 구조물)로 형질감염된 세포에서의 이식유전자 발현을 비최적화 대응물(즉, pR2.1에 기반한 것)과 비교하고, 개선된 요소를 보유하는 카세트로부터 더 강력한 것을 확인하였다.

[0237] 661W 세포와 같이, 원추체 흡신을 발현하는 다른 포유동물 세포주를 사용하여 시험관 내 발현을 또한 평가하였다(Tan et al., IOVS 2004; 45(3) 764-768).

[0238] 유사하게, 원추 광수용체-특이적 단백질을 발현하도록 조작된 비-광수용체 세포주를 사용하여 시험관 내 발현을 평가한다. 이와 같은 시스템은 CRX/Sp1을 발현하도록 유전적으로 조작된 HEK293 세포를 이용하여 기재되었다(Khani et al., IOVS 2007; 48: 3954). 마커 유전자(eGFP, dsRed, mCherry, 루시페라제)뿐만 아니라, 생리학적 유전자(흡신, ACHR 유전자)를 또한 사용한다. 생리학적 유전자는 mRNA 수준(예컨대, RT-PCR에 의함) 또는 단백질 수준(예를 들어, ELISA 또는 웨스턴 블롯에 의함)을 검사함으로써 테스트된다.

[0239] 동물 관리. 모든 실험은 미국생리학회(American Physiological Society) 및 신경학회(Society for Neuroscience)에 의해 채택된 동물 관리 및 사용에 관한 원칙에 따랐으며, 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee; IACUC)에 의해 승인받았다.

[0240] 소동물 연구. 발현 카세트의 암호화 서열에 의해 암호화되는 유전자 산물의 발현을 마우스, 래트, 및 모래쥐에서 생체 내에서 평가하였다. 이는 발현 카세트를 포함하는 rAAV 제조물의 생체 내로의 유리체 내 주사에 의해 달성되었다(Li et al., 2008; Mol Vis 48: 332-338). 플라스미드 DNA의 전기천공이 대신 실행될 수 있음에 주목한다(Matsuda/Cepko).

[0241] 마우스 연구. 본 실험에 사용된 마우스는 C57BL/6이었다. 동물을 케타민/자일라진(110 mg/kg 복강 내)으로 안락사시켰다. 테스트 물품이 로딩된 경사진(beveled) 34 게이지 일회용 바늘을 안구의 유리체 내로 주사하고, 1.5 μ l 부피의 5.04×10^{10} 벡터 게놈을 유리체 내로 주사하였다.

[0242] 모래쥐 및 래트 연구. 몽고모래쥐(메리오네스 웅귀쿨라투스(Meriones unguiculatus)) 및 갈색 노르웨이 래트를 이 연구에서 사용하였다. 10% 페닐에프린 및 0.5% 트로피카마이드를 이용하여 동공을 팽창시켰다. 0.1 내지 0.2 ml의 케타민/자일라진 용액(래트의 경우 70 mg/kg의 케타민 및 10 mg/kg의 자일라진; 모래쥐의 경우 25 mg/kg의 케타민 및 0.3 mg/kg의 자일라진)의 복강 내 또는 근육 내 주사로 안락사시켰다. 100 μ l 해밀턴(Hamilton) 주사기 내에 테스트 물품이 로딩된 경사진 34 게이지 일회용 바늘을 각막윤부로부터 약 1mm 떨어진 최적화된 상측 측두엽 지점에서 공막을 통해 안구의 유리체 내로 주사하였다. 5 μ l 부피로 1×10^{10} 내지 2×10^{10} 벡터 게놈의 테스트 물품(2×10^{10} vg의 rAAV.GFP, 또는 1.15×10^{10} vg의 rAAV.루시페라제)를 유리체 내로 미세-주입 펌프를 이용하여 서서히 주입하고, 그 후에 테스트 물품의 적절한 분배를 보장하기 위해서 바늘 팁을 10 초 동안 주사된 위치에서 안구에 주사된 상태로 유지하였다. 그 다음에, 바늘을 제거하였다.

[0243] 비인간 영장류(NHP) 연구. 폴리뉴클레오타이드 카세트 및 발현 벡터를 또한 대동물에서 테스트하였다. 이는 AAV를 사용함으로써, 예를 들어 만쿠소(Mancuso)의 다수의 기법을 사용함으로써 수행하였다. 간략하게, AAV 카세트를 만들고, 발현 카세트를 캡시드로 싸 AAV를 제조한 다음, 바이러스 제조물을 미인간 영장류에서 유리체 내로(유리체에서 최대 170 μ l) 또는 망막 하로(상이한 위치에서 최대 3회, 100 μ l 주사; 유리체 절제술이 주사 전에 실행될 수 있음) 주사한다. 발현을 리포터(GFP), 색상 ERG, 및/또는 케임브리지 색상 테스트(Cambridge Color Test)를 사용한 행동 테스트에 의해 또는 표적이 관측 시야 내로 들어갈 때 단속성 운동(saccade)(안구 운동)을 하도록 훈련된 동물에 대해 평가하였다. 단속성 운동을 안구 추적기를 사용하여 모니터링하였다. 처리 전에, 채색된 표적을 볼 때 색상 테스트를 실행하거나 단속성 운동을 하도록 동물을 훈련시킨다. 존재하는 원추체의 분광 감수성을 평가하기 위해 ERG를 실행한다. 색상 테스트 실행 및 ERG로부터의 데이터는 동물이 이색성(색맹)이라는 증거를 제공한다. GFP 유전자를 보유하는 벡터를 투여받은 동물의 경우, GFP의 여기를 가져오는 빛 하에서 레트캠 II(RetCam II) 또는 유사한 장치를 이용한 안저 이미지화를 사용하여 발현을 모니터링한다. 동물의 내인성 색소에비하여 분광 감수성이 상이한 광색소 유전자를 투여받은 동물의 경우, 최대 106개의 상이한 망막 위치

에서 분광 감수성을 측정하기 위해 다초점 색상 ERG를 사용하고, 행동 테스트에 의해 발현을 모니터링한다.

- [0244] 개코원숭이를 10 내지 15 mg/kg 케타민에 이어 세보플루오란으로 진정시켰다. 아프리카 녹색 원숭이를 5:1 케타민:자일라진 혼합물(100 mg/ml 케타민 및 20 mg/ml 자일라진의 0.2 ml/kg)의 근육 내 주사로 진정시켰다. 국소 10% 페닐에프린으로 산동을 달성하였다. 주사를 용이하게 하기 위하여 안구 스페큘럼(eye speculum)을 안구에 설치하였다. 한 방울의 프로파라카인 염산염 0.5%, 및 이어서 5% 베타딘 용액을 적용한 다음, 멸균 식염수로 행구었다. 개코원숭이(도 2)는 안구 당 2.02×10^{12} vg의 최종 용량을 산출하기 위해 유리체 내(ITV) 주사에 의해 rAAV의 3.4×10^{13} vg 제조물 $60 \mu\text{l}$ 를 투여받았다. 아프리카 녹색 원숭이는 안구 당 5×10^{11} vg의 최종 용량을 산출하기 위해 ITV 주사에 의해 rAAV의 1×10^{13} 제조물 $50 \mu\text{l}$ 를 투여받았다. 안구 외 및 안구 내 바늘 배치의 완전한 가시화를 가능하게 하는 수술적 배울 하에서 각막윤부에서 약 2.5mm 떨어진 거상연(ora serrata)의 수준에서 측두 하로 삽입된 31 게이지 0.375 인치 바늘(테루모(Terumo))을 사용하여 중심 유리체로의 ITV 주사를 투여하였다. 주사 시점에 바늘 팁의 직접적인 관찰에 의해 중심 유리체 배치를 확인하였다. ITV 주사 후, 국소 삼중항생제 연고를 투여하였다.
- [0245] 세극등(Slit-lamp) 현미경검사. 염증을 모니터링하기 위하여 기준선 스크리닝 동안 및 주사 후 4주째(28일째), 8주째(56일째) 및 12주째(84일째) 세극등 현미경검사에 의해 각각의 원숭이 안구의 앞부분을 검사하였다. 어떠한 비정상도 관찰되지 않았다.
- [0246] NHP 부검 및 안구 처리. 유리체 내 주사 12주 후 펜토바비탈을 이용하여 동물을 안락사시켰다. 안구 외 조직의 적출 및 트리밍 전에 12시 위치에 안구를 봉합하여 표시하였다. 각막윤부 앞쪽의 조직을 제거함으로써 후부 컵을 분리하고, 4% 파라폼알데하이드에 담그어서 이를 고정시킨 다음 70% 에탄올에 저장하였다.
- [0247] 면역표지. 안구를 물, 그 다음 PBS 완충액으로 재수화한 다음, 온조직 표본으로서 망막을 편평화하고 박리하였다. GFP에 대한 스테레오 형광 현미경(디스커버리(Discovery) F1 V20, 칼 자이스 마이크로스코피(Carl Zeiss Microscopy), LLC, 미국 뉴욕주 쏘우드(Thornwood) 소재)에 의해 제조물을 이미지화하였다. 중심와가 있는 사분면을 평면 마운트에서 분리하고, 커버슬립 하에 고정시킨 다음, 전체 몽타주로서 이미지화하였다(5x 타일링 및 스티칭, 악시오 옵저버 Z1(Axio Observer Z1), 자이스(Zeiss)). 망막의 스트립을 중심와의 중심부에서 주변으로 분리하였으며, 수크로스 중에 냉동보관하여 OCT 중에서 동결하였다. L/M- 및 S-옵신을 포함하여 특정 망막 세포 집단에 풍부화된 단백질, 글루타민 합성효소(GS), 칼빈딘, 로돕신(1D4), β -III 튜불린, 라미닌, 망콩 응집소(PNA) 및/또는 기타에 대한 항체로 8 μm 절편을 면역염색하였다. 항체 프로브 및 DIC(differential interference contract for topology; 위상을 위한 차등 간섭 약정)와 함께 다중 스펙트럼 분석에 의해 전체 섹션을 통해 광학 평면의 편형한 스택으로서 GFP-표지 이식유전자 함유 세포를 이미지화하였다(악시오 옵저버 Z1, 아포톰(Apoptome) 구비, 자이스). 형태 및 프로브를 이용한 공유국소화를 사용하여 이식유전자에 대한 세포 분석을 최적화하였다.
- [0248] 안저 검사 및 촬영술. 래트 및 모래쥐 망막의 안구 검사 및 안저 촬영을 피닉스 마이크론(Phoenix Micron) IV 안저 현미경을 사용하여 실행하였다. 모든 동물에 대하여 안구 건강 상태를 확인하기 위해 기준선 스크리닝/촬영을 하였고, 그 다음 GFP 이식유전자의 발현을 모니터링하기 위해 지정된 시점에서 촬영하였다. 시신경 및 망막의 임의의 변화 또는 총 병소의 출현을 색상 안저 촬영에 의해 기록하였고, GFP의 발현을 플루오레세인 필터를 이용한 형광 안저 이미지를 사용하여 가시화하였다. 모든 동물에 대하여 기준선 이미지화를 하였다. GFP 발현을 또한 유리체 내 벡터 주사 후 2, 4, 8, 및 12주째에 기록하였다.
- [0249] 이비스 이미징 시스템. rAAV.루시페라제의 전달 후 망막에서 루시페라제의 발현을 유리체 내 주사 후 2, 4 및 8 주째에 생체 내에서 이비스 이미징 시스템을 사용하여 정량화하였다. 모래쥐에 150 mg/kg 루시페린(퍼킨엘머)(15 ml/kg의 용량으로 15 mg/ml의 루시페린)을 피하로 주사하였다. 대략 22분 후에, 동물을 3 내지 5분 동안 4% 아이소플루란을 흡입시켜 진정시켰다. 그 후에 즉시, 동물을 쌍으로 이미징 플랫폼 위에 놓아두고, 각각의 동물의 한쪽 안구의 발광을 정량화한 다음, 즉시 반대쪽 안구의 이미지화를 하였다. 전형적으로 1×10^4 광자/초의 발광을 기록하는 발광 배경 수준을 갖는 나이트 모래쥐를 음성 대조군으로서 사용하였다. 이미징 시스템의 보정을 보장하기 위하여 유령 마우스(생체발광 이미지화용 XPM-2 퍼킨 엘머 유령 마우스)를 사용한 생체발광 확인을 이미지화 전에 실행하였다.
- [0250] 면역조직화학. 마우스를 치사량의 소듐 펜토바비탈을 이용하여 안락사시키고, 먼저 ml 당 2유닛의 헤파린을 함유하는 0.13 M 인산완충식염수(PBS)(pH 7.2 내지 7.4)로, 그 다음 PBS 중 4% 파라폼알데하이드(PFA)로, 그 다음

음 PBS 중 4% 파라폼알데하이드 및 1% 글루타르알데하이드를 이용한 심장 관류를 통해 조직을 고정시켰다. 글루타르알데하이드는 원추체 외측 부분이 온전한 상태로 남을 수 있도록 신경 망막을 RPE에 부착된 상태로 유지하기 위해 제공된다. 각각의 용액을 투여 직전에 약 37℃까지 가온시키고, 약 35 내지 40 ml의 관류액을 각각의 단계에서 전달하였다. 일단 관류가 중단되면, 마우스를 축축한 종이 수건으로 감싸고, 안구 적출 및 절개 전에 2 내지 3시간 동안 추가로 고정되게 두었다.

[0251] 영구적인 잉크를 사용하여 안구의 방향을 표시하고, 안구 앞부분을 제거하였으며, 아이-컵(eye-cup)을 4℃에서 밤새 4% PFA 중에서 고정한 다음, 4℃에서 PBS 중에 보관하였다. 2시간 동안 4% PFA 중에 함침된 조직들 사이에서 절개된 망막을 편평화함으로써 망막 온조직 표본을 만든 다음, 이들을 6시간 이상의 고정화를 위해 배양 플레이트로 옮겼다. 그 후에, PFA를 0.03% 아지드화나트륨 함유 PBS(시그마)로 대체하였다.

[0252] 회전 테이블 진탕기 상에서 항체 표지를 수행하였다. 비특이적 표지를 차단하기 위하여, 온조직 표본을 PBS(pH 7.4) 중에 5% 당나귀 혈청(잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch), Cat #004-000-120), 1 mg/ml BSA(잭슨 이뮤노리서치, Cat #001-000-161), 및 0.03% 트리톤 X-100을 함유하는 용액과 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 이 연구에서 사용된 일차 항체는 1:200으로 희석된 토끼 항 적-녹색 (L/M) 읍신(밀리포어(Millipore), Cat # AB5405)이었다. 표본을 각각 30분 동안 3회 PBS 중에서 세척한 다음, DAPI(4',6-다이아미디노-2-페닐인돌, 다이하이드로클로라이드 1:10,000; 인비트로젠, Cat # D-21490) 및 이차 항체와 함께 4℃에서 밤새 인큐베이션하였다. L/M-읍신 항체에 대한 이차 항체는 항체 희석 완충액(인비트로젠, Cat # A21206) 중에 1:200으로 희석된 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 표지된 당나귀 항-토끼 IgG(H+L)이었다. 이차 항체와 인큐베이션에 이어 30분간 PBS로 3회 세척하고, 4% 파라폼알데하이드로 30분간 후-고정하였으며, 30분간 PBS로 3회 더 세척하였다. 마지막으로, 망막 절편을 글리세롤 중 2% DABCO와 함께 슬라이드 위에 놓아두고, 커버 슬립으로 덮었다.

[0253] 현미경관찰법. 20× (오픈-에어(open-air)) 대물렌즈를 구비한 니콘 이클립스(Nikon Eclipse) E1000 및 1.5× 광학 줌을 구비한 카메라 세트를 사용하여 마우스 망막 온조직 표본의 광각 이미지를 획득하였다. 각각의 표본에 대하여, 50개의 광학 절편을 0.5 μm 사이를 두고 취하고, M-읍신 Z-스택(stack)을 이미지제이(ImageJ)로 재구성하였다. Z-스택을 외분적의 길이가 먼 내에 있도록 배향하였고, 항체 염색이 시작되고 끝난 사이의 거리를 외측 부분의 길이의 척도로서 측정하였다. 또한, Z-스택의 3D 프로젝션을 생성하였고, 외측 부분에서 시각적 M-읍신을 가지는 원추체의 개수를 정량화할 수 있었다.

[0254] 올림푸스 플루오부(상표명) FV1000을 사용하여 공초점 이미지 슬라이스를 획득하였다. 절편을 20× 유침 렌즈(0.5 μm 간격으로 40개 이미지를 취함)를 사용하여 이미지화하였고, Z-스택을 이미지제이로 재구성하였다. 채널 노출 수준을 어도피 포토샵(Adobe Photoshop)을 사용하여 이미지 내 및 이미지 간에 평형화하였다. 망막 온조직 표본의 경우, 10× 오픈-에어 렌즈를 사용하여 이미지를 취하였고, 어도비 포토샵 고유의 모자이크 구성 소프트웨어를 사용하여 모자이크를 구성하였다.

[0255] 폴리뉴클레오타이드의 조직 특이성을 테스트하는 실험. 이 경우에, GFP를 암호화하는 구조물을 유리체 내, 망막 하, 또는 정맥 내와 같은 하나 이상의 투여 경로를 통해 주사한다. 그 다음, 동물을 희생시키고, (구조물의 존재를 나타내는 DNA 서열을 검출하기 위해) 조직을 qPCR, 및 (구조물이 활발히 발현되는 영역을 검출하기 위해) GFP 발현에 의해 분석하였다. DNA 서열의 부재는 주어진 조직에 대한 생체분포의 결여를 나타내는 반면, 이식유전자 발현(mRNA 또는 단백질 수준)의 결여와 함께 DNA 서열의 존재는 그 조직에서 벡터가 존재하지만 발현이 없음을 나타낸다. 이러한 방법으로, 원추 광수용체에 대한 특이성의 수준을 확립할 수 있으며, 시신경, 간, 비장, 또는 뇌 조직과 같은 비표적 조직에서 발현 없이 표적 원추 광수용체 세포로의 발현을 제한하는 관점에서 본 발명의 유용성을 결정하기 위해 사용될 수 있다. 유리체 내 AAV는 뇌에 생체분포하는 것으로 알려져 있고(프로보스트(Provost) 외 다수), 따라서 원추 광수용체를 표적화하기 위해 고도로 발현된, 개선된 구조물은 망막의 표적 세포로의 발현을 제한하고 비표적 이식유전자 발현과 연관된 잠재적인 부작용을 제한하는 데 유용할 것이다.

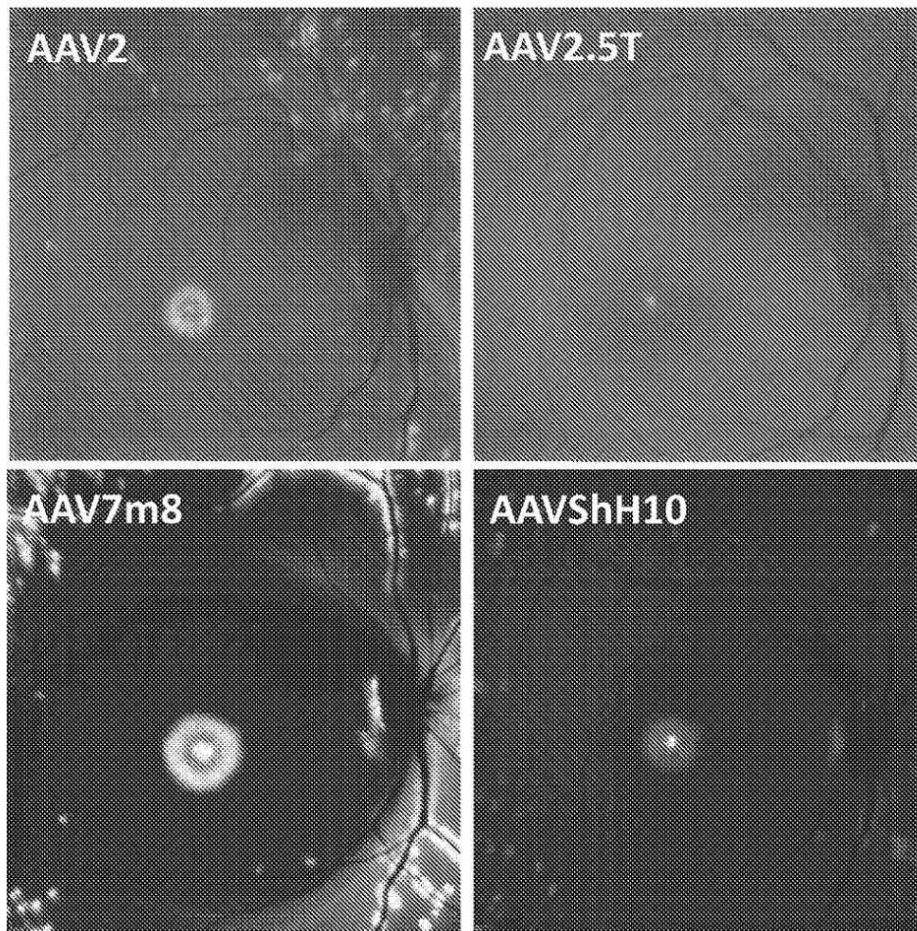
[0256] 전술한 바는 단지 본 발명의 원리를 설명한다. 당업자는 본 명세서에 명백히 기재되거나 나타내지 않더라도, 발명의 원리를 구현하고 이의 사상 및 범주 내에 포함되는 다양한 배열을 고안할 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 본 명세서에 언급된 모든 실시예 및 조건부 용어는 주로 독자가 본 발명의 원리 및 발명자들에 의해 당업계를 발전시키는 데 기여한 개념을 이해하는 것을 보조하기 위한 것으로 의도되고, 이와 같이 특별히 언급된 실시예 및 조건으로 제한되지 않는 것으로 해석되어야 한다. 더욱이, 본 발명의 원리, 양태, 및 실시형태뿐만 아니라, 이의 특정 실시예를 언급하는 본 명세서의 모든 진술은 이들의 구조적 및 기능적 등가물 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 추가적으로, 이와 같은 등가물은 현재 알려진 등가물과 장래에 개발될 등가물, 즉 구조와 무관하

게, 동일한 기능을 실행하는 개발된 임의의 요소들 모두를 포함하는 것으로 의도된다. 그러므로, 본 발명의 범주는 본 명세서에 나타나고 기재된 예시적인 실시형태로 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 그보다, 본 발명의 범주 및 사상은 첨부된 청구항에 의해 구현된다.

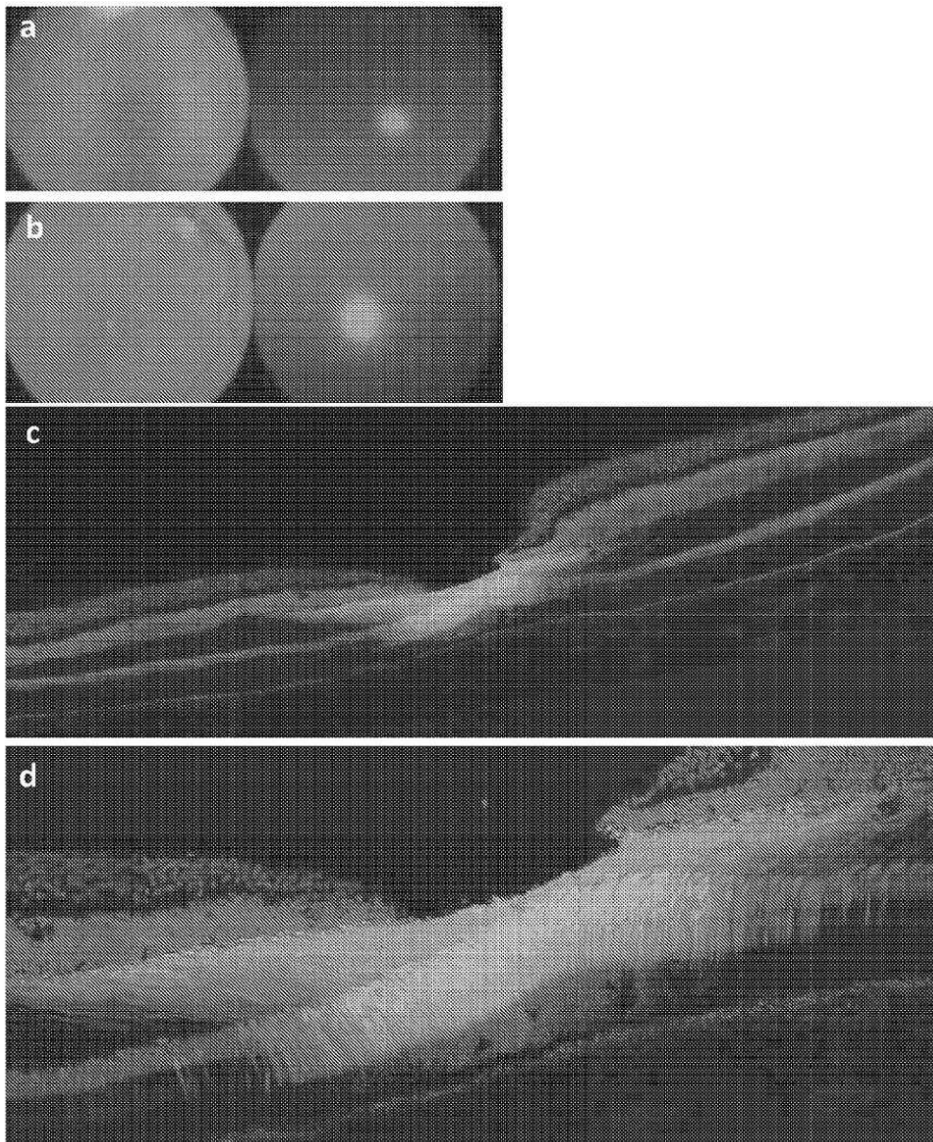
[0257] 본 명세서에 기재된 모든 간행물 및 특허 출원은 본 명세서에 그 전문이 참조로 포함되어 있다.

도면

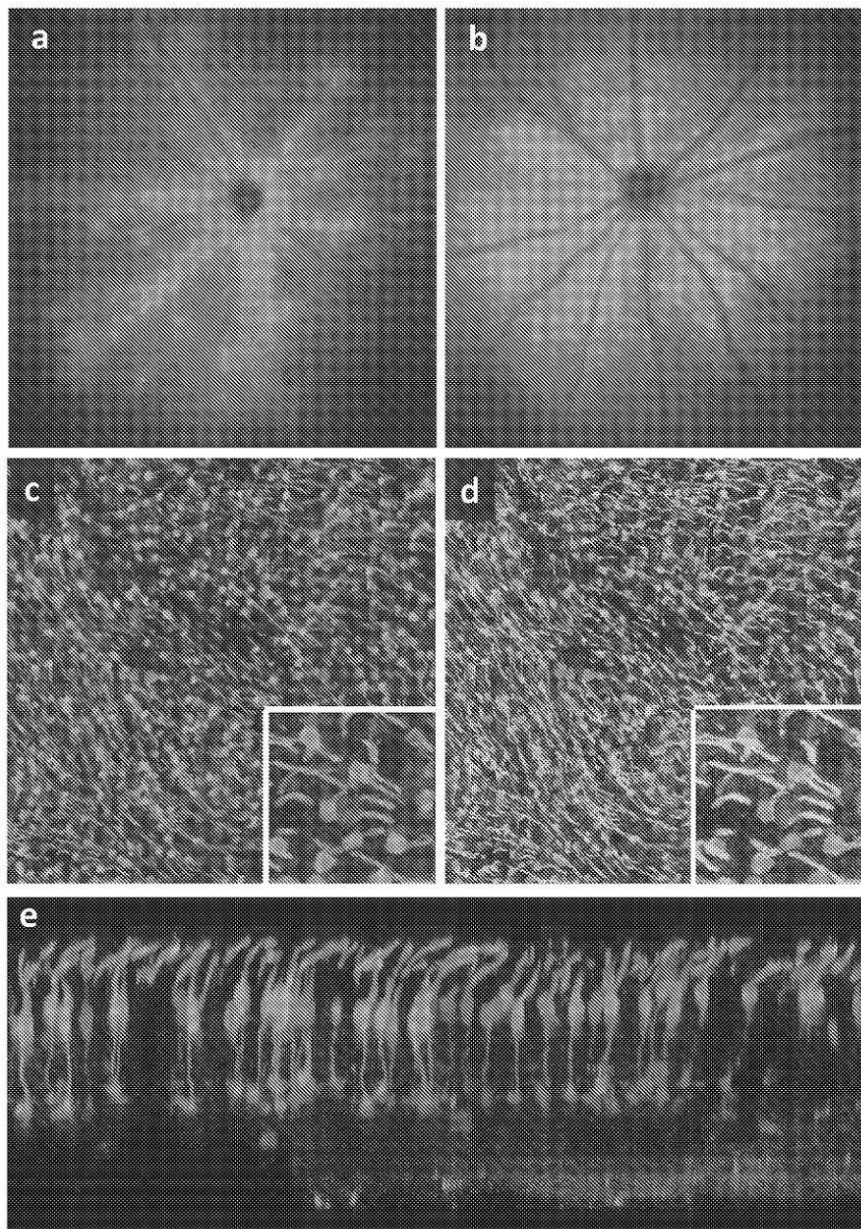
도면1



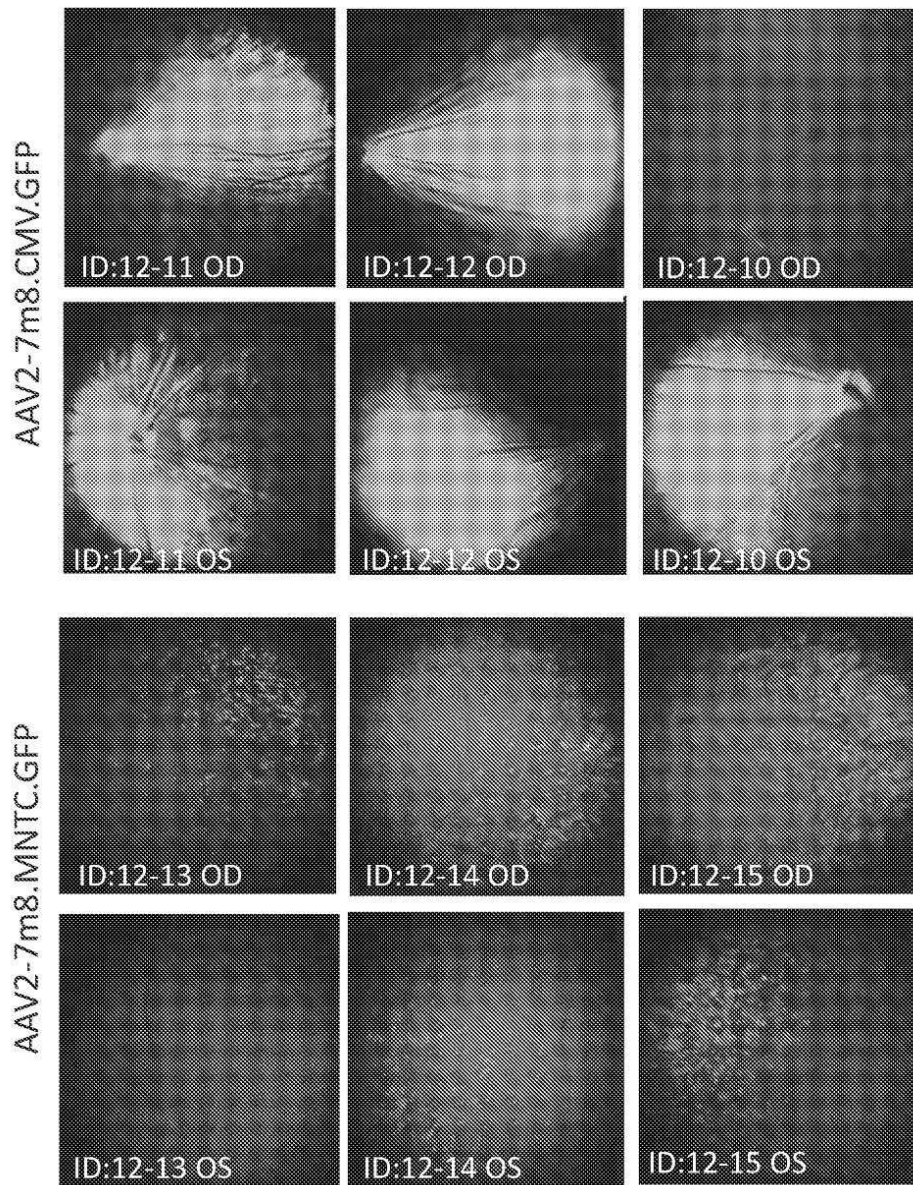
도면2



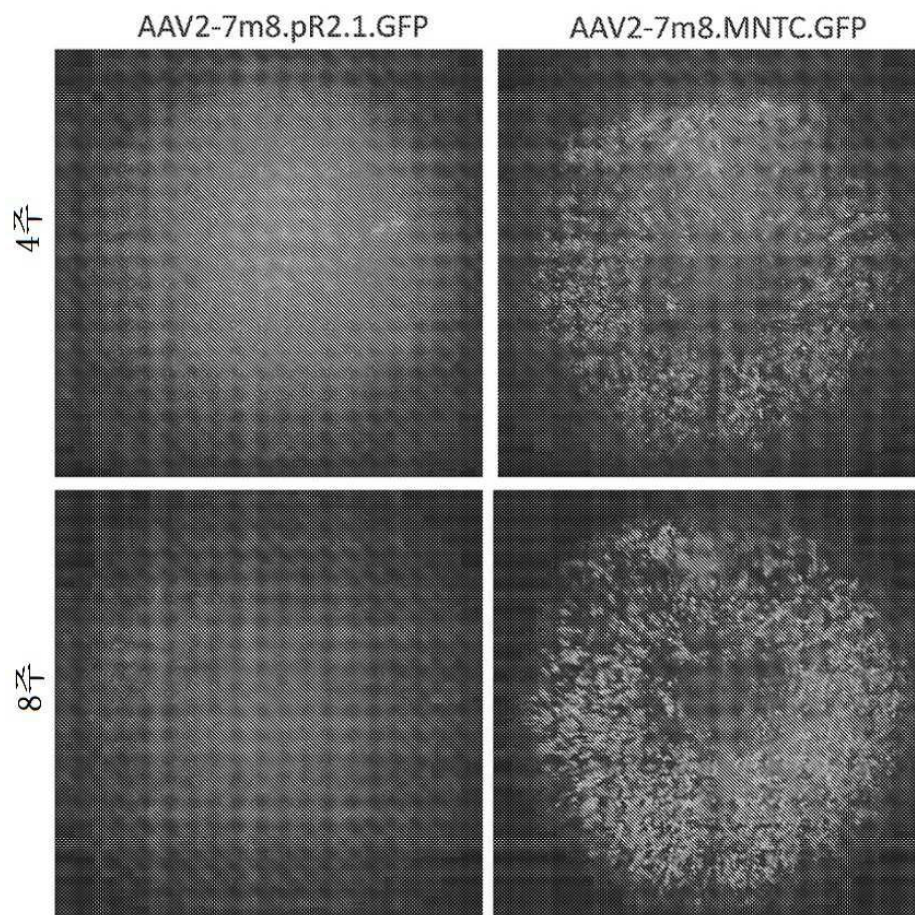
도면3



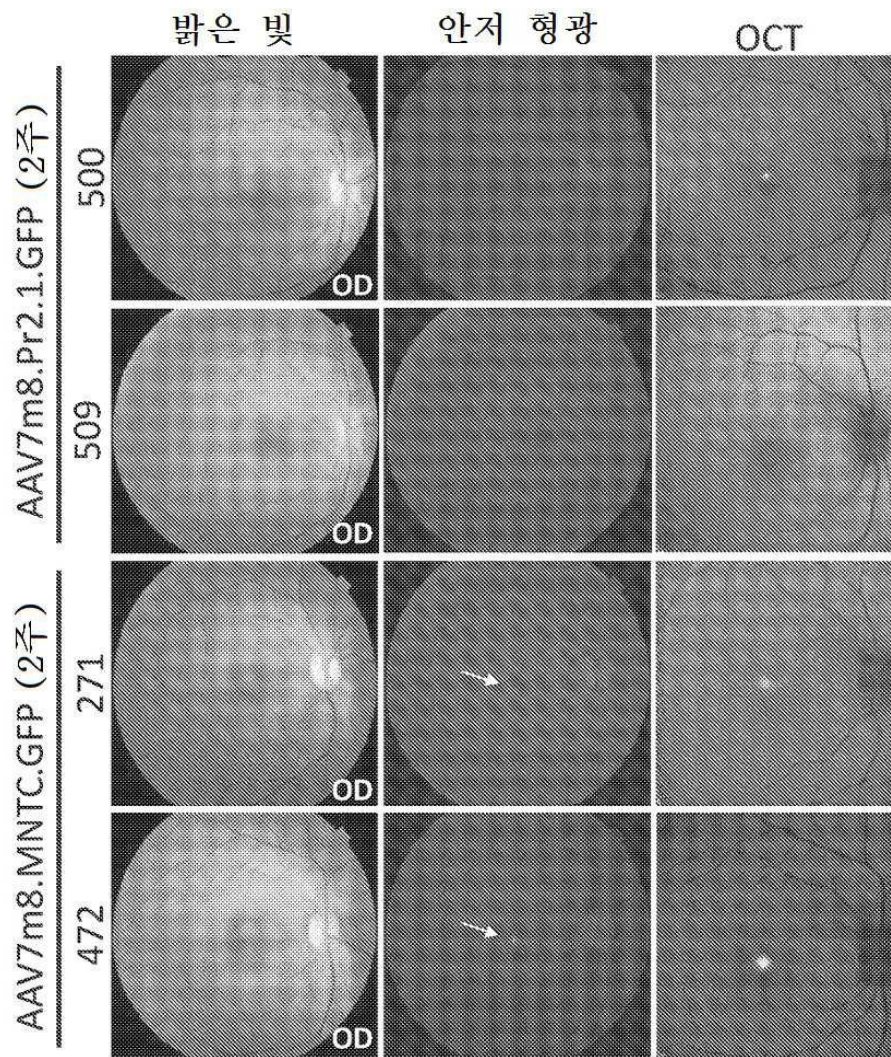
도면4a



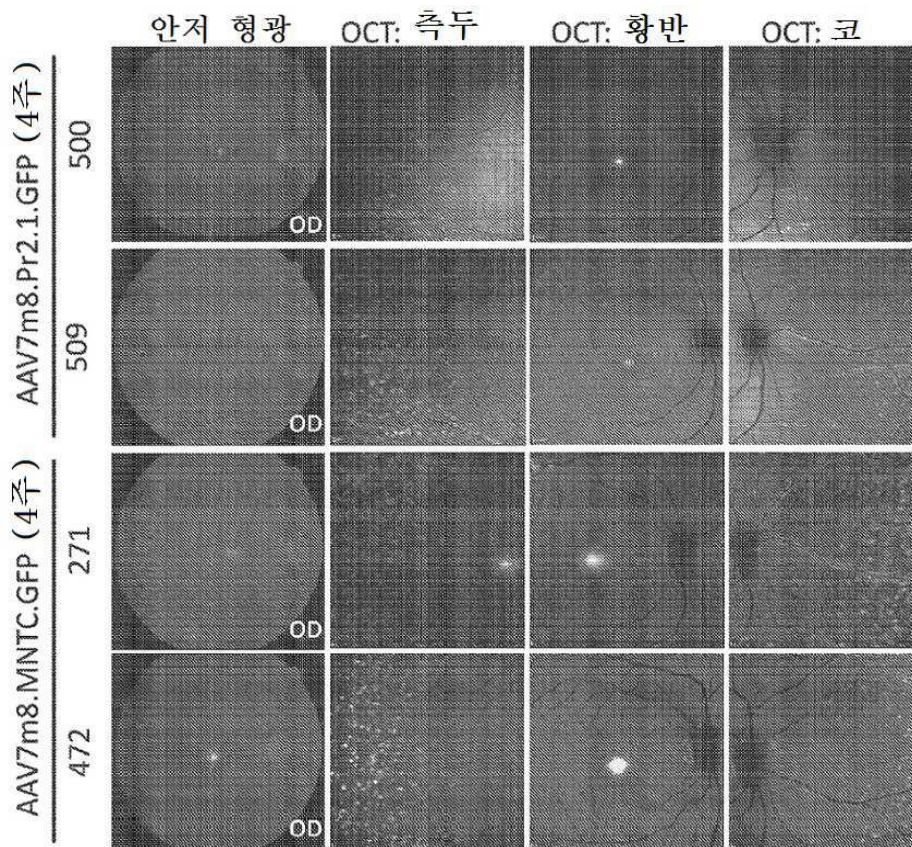
도면4b



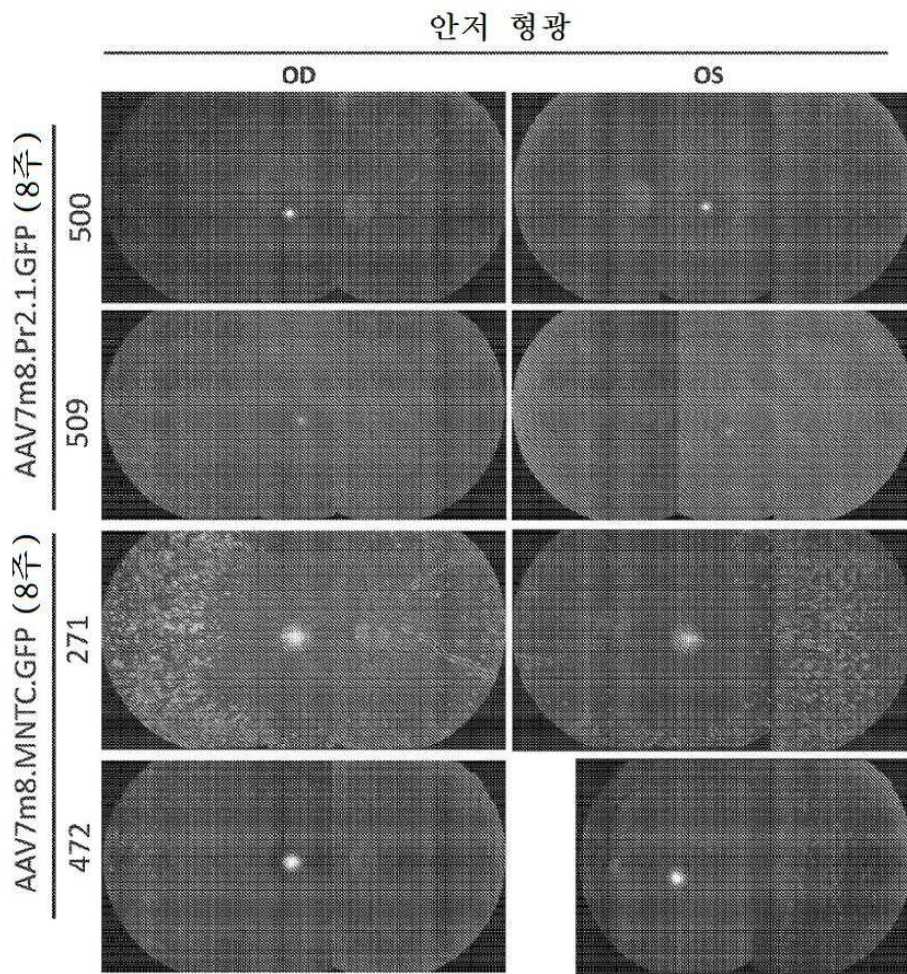
도면5a



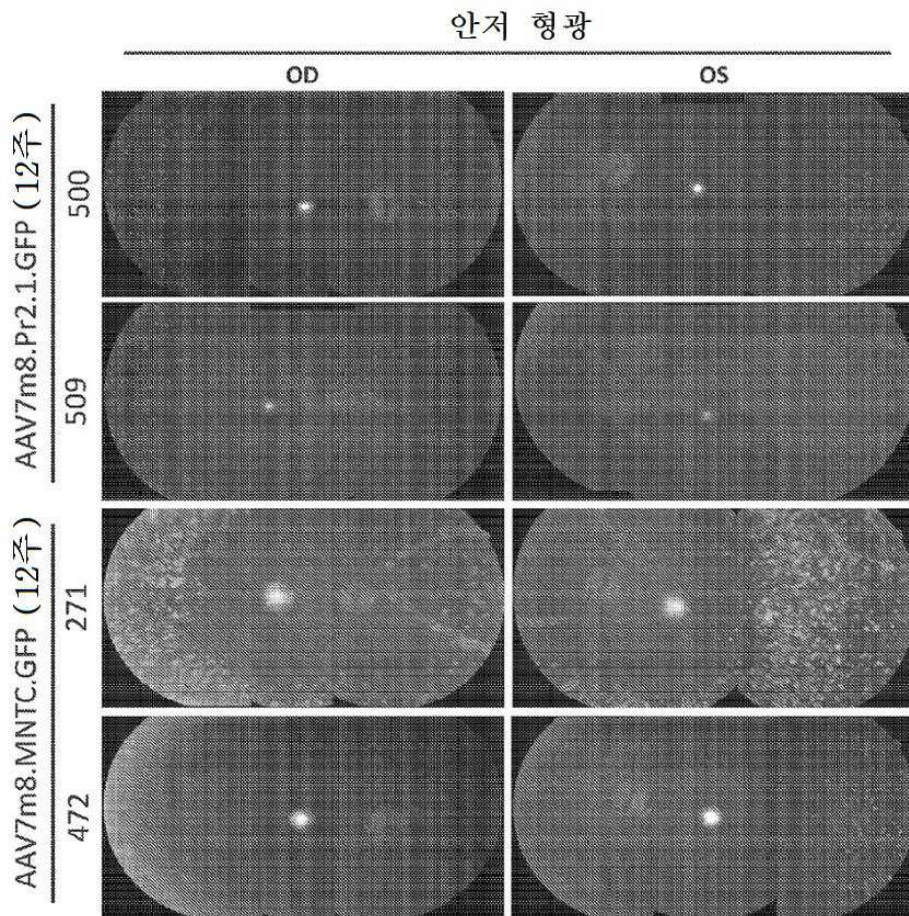
도면5b



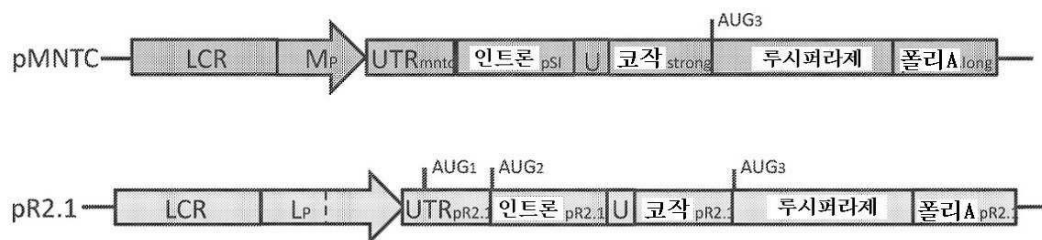
도면5c



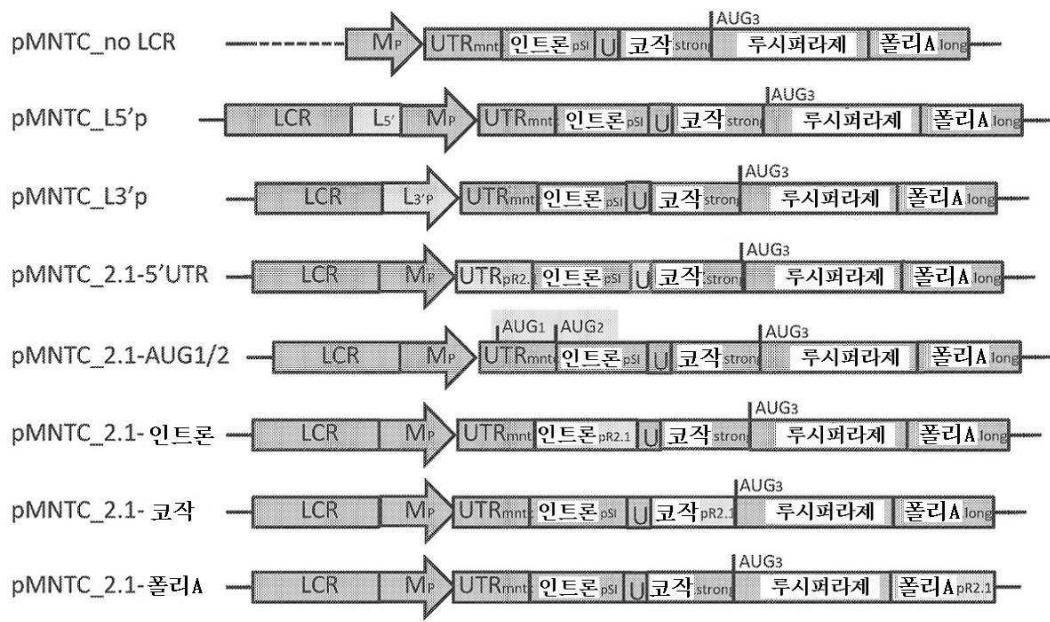
도면5d



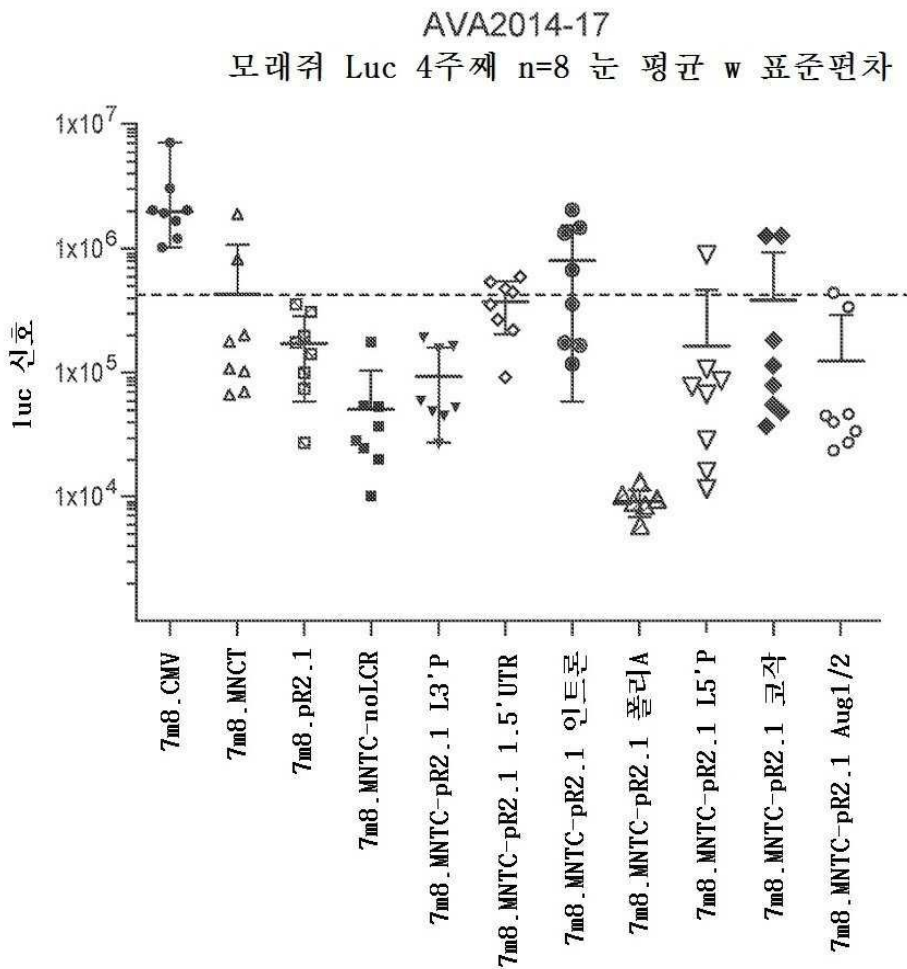
도면6a



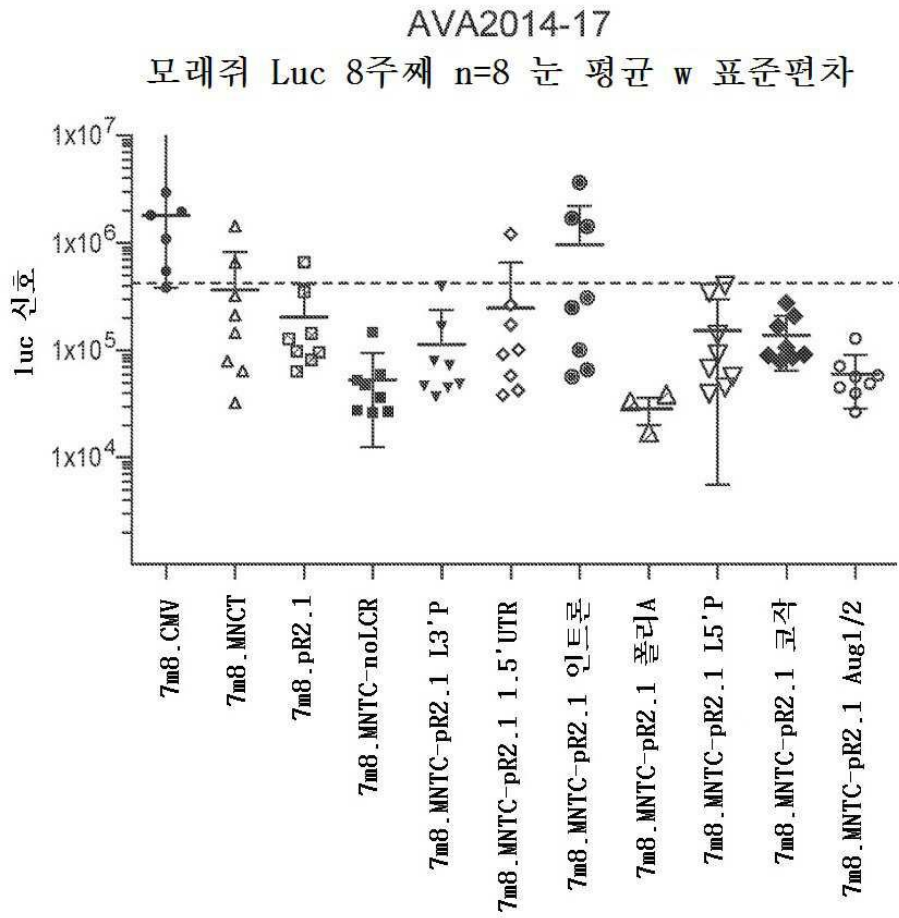
도면6b



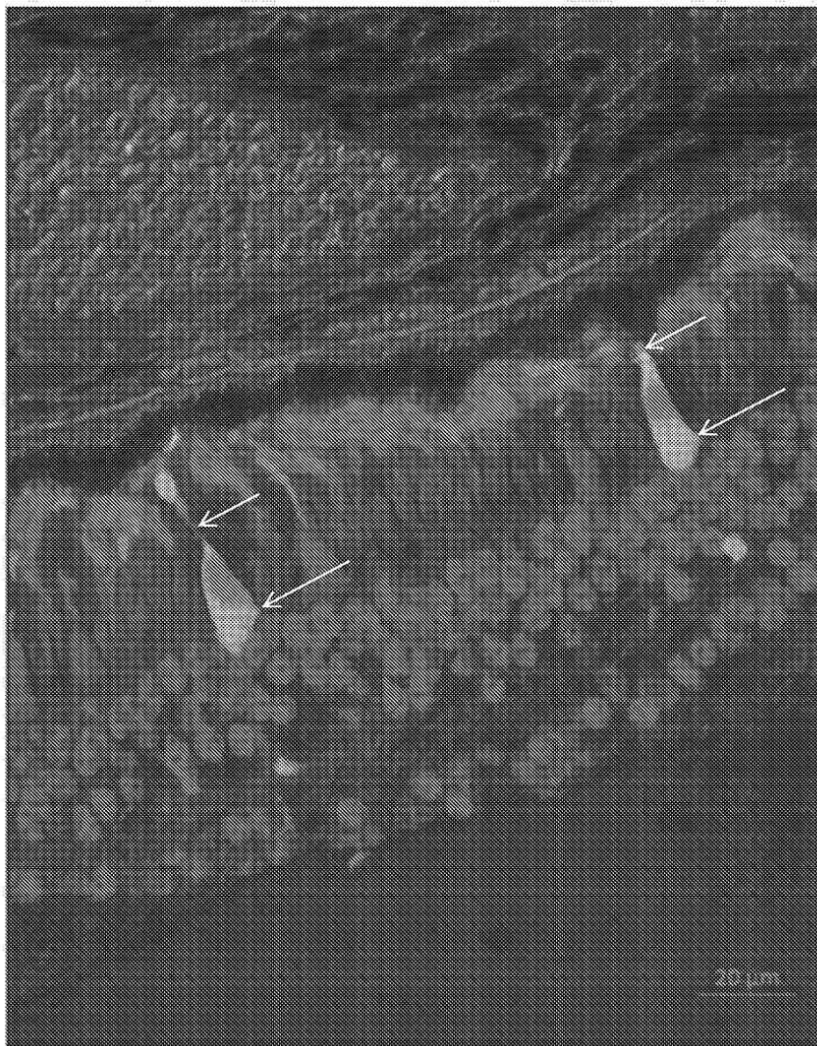
도면6c



도면6d



도면7



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> ADVERUM BIOTECHNOLOGIES, INC.
UNIVERSITY OF WASHINGTON THROUGH ITS CENTER
FOR COMMERCIALIZATION
- <120> COMPOSITIONS AND METHODS FOR INTRAVITREAL DELIVERY OF
POLYNUCLEOTIDES TO RETINAL CONES
- <130> IPA170959-US
- <150> 62/127,194
- <151> 2015-03-02
- <150> 62/134,466
- <151> 2015-03-17
- <160> 23
- <170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 1

<400> 1

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

1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro

115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Ile Gly

145 150 155 160
Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

180 185 190
Ala Thr Pro Ala Ala Val Gly Pro Thr Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His
260 265 270
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe
275 280 285
His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn
290 295 300
Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln
305 310 315 320
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn
325 330 335
Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro
340 345 350
Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala
355 360 365
Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly
370 375 380
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385 390 395 400
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415
Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser

450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys

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

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

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

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 2

<211> 735

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 2

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly

145 150 155 160

Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

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

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

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
260 265 270

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

Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
290 295 300

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
305 310 315 320

Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
325 330 335

Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
355 360 365

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
370 375 380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg

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

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

 Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
 545 550 555 560
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
 565 570 575
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr
 580 585 590
 Ala Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp
 595 600 605

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

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

<210> 3

<211> 736

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 3

<400> 3

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Gly
130 135 140
Ala Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly

145 150 155 160
 Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
 165 170 175
 Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

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

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

 305 310 315 320
 Arg Gly Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser

 370 375 380
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 390 395 400

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

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

690 695 700
 Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val
 705 710 715 720
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

<210> 4

<211> 734

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 4

<400> 4

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

Gly Val Arg Glu Trp Trp Ala Leu Gln Pro Gly Ala Pro Lys Pro Lys
 20 25 30
 Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro Gly
 35 40 45
 Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro Val
 50 55 60
 Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp Gln
 65 70 75 80

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

Gly Leu Val Glu Gln Ala Gly Glu Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro
130 135 140

Leu Ile Glu Ser Pro Gln Gln Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys
145 150 155 160

Lys Gly Lys Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Val Phe Glu Asp Glu Thr
165 170 175

Gly Ala Gly Asp Gly Pro Pro Glu Gly Ser Thr Ser Gly Ala Met Ser
180 185 190

Asp Asp Ser Glu Met Arg Ala Ala Ala Gly Gly Ala Ala Val Glu Gly
195 200 205

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

Asp Ser Thr Trp Ser Glu Gly His Val Thr Thr Thr Ser Thr Arg Thr
225 230 235 240

Trp Val Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Arg Leu Gly Glu
245 250 255

Ser Leu Gln Ser Asn Thr Tyr Asn Gly Phe Ser Thr Pro Trp Gly Tyr
260 265 270

Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln
275 280 285

Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Met Arg Pro Lys Ala Met Arg Val
290 295 300

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

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

Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser
340 345 350

Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr
355 360 365

Cys Gly Leu Val Thr Gly Asn Thr Ser Gln Gln Gln Thr Asp Arg Asn

370 375 380
 Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
 385 390 395 400

 Asn Asn Phe Glu Ile Thr Tyr Ser Phe Glu Lys Val Pro Phe His Ser
 405 410 415
 Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
 420 425 430
 Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu
 435 440 445
 Asn Ala Gly Thr Ala Thr Thr Asn Phe Thr Lys Leu Arg Pro Thr Asn
 450 455 460

 Phe Ser Asn Phe Lys Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Ser Ile Lys Gln
 465 470 475 480
 Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr
 485 490 495
 Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly
 500 505 510
 Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro
 515 520 525

 Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys
 530 535 540
 Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser
 545 550 555 560
 Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly
 565 570 575
 Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp
 580 585 590

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

Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His
625 630 635 640
Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro
645 650 655

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

Glu Pro Arg Ala Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr His His Leu
725 730

<210> 5
<211> 724
<212> PRT
<213> Adeno-associated virus - 5
<400> 5

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

385 390 395 400
Asn Phe Glu Phe Thr Tyr Asn Phe Glu Glu Val Pro Phe His Ser Ser

405 410 415
Phe Ala Pro Ser Gln Asn Leu Phe Lys Leu Ala Asn Pro Leu Val Asp

420 425 430
Gln Tyr Leu Tyr Arg Phe Val Ser Thr Asn Asn Thr Gly Gly Val Gln

435 440 445
Phe Asn Lys Asn Leu Ala Gly Arg Tyr Ala Asn Thr Tyr Lys Asn Trp

450 455 460
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
705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 6

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Thr Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ala

210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His

260 265 270

Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe

275 280 285

His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn

290 295 300

Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln

305 310 315 320
 Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn

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

 385 390 395 400
 Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
 405 410 415
 Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
 420 425 430
 Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
 435 440 445
 Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser

 450 455 460
 Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys

 515 520 525
 Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg
565 570 575
Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Leu Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala
580 585 590
Thr Gly Asp Val His Val Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735
<210> 7
<211> 737
<212> PRT
<213> Adeno-associated virus - 7
<400> 7
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

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

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

 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Ala Pro Ser Ser Val Gly Ser Gly Thr Val Ala Ala Gly Gly
 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn
 210 215 220

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

275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300
 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Arg Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu
 340 345 350

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

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

 Leu Pro Gly Pro Cys Phe Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Leu Asp
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile
530 535 540

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu
545 550 555 560

Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu
565 570 575

Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala
580 585 590

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

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

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

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

Ala Asn Pro Pro Glu Val Phe Thr Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile
660 665 670

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

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

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

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

Leu

<210> 8

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus - 8

<400> 8

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro
180 185 190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly
195 200 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
210 215 220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
225 230 235 240

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His

245 250 255

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp

260 265 270

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

275 280 285

Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn

290 295 300

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn

305 310 315 320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala

325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln

340 345 350

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

355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr

385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr

405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Thr Thr Gly Gly Thr Ala Asn Thr Gln Thr Leu Gly

450 455 460

Phe Ser Gln Gly Gly Pro Asn Thr Met Ala Asn Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

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

485 490 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His

500 505 510
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr

515 520 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile

530 535 540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val

545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565 570 575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala

580 585 590
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile

610 615 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe

625 630 635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val

645 650 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ser Lys Leu Asn Ser Phe

660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

675 680 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr

690 695 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Ser Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu

705 710 715 720
Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735

Asn Leu

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus 9

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175

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

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270

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

 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365
 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400

 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

690 695 700
 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720

 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735
 <210> 10
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Adeno-associated virus 10
 <400> 10
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15
 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

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

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

165	170	175	
Thr Gly Glu Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro			
180	185	190	
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly			
195	200	205	
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser			
210	215	220	
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val			
225	230	235	240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His			
245	250	255	
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp			
260	265	270	
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn			
275	280	285	
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn			
290	295	300	
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn			
305	310	315	320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala			
325	330	335	
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln			
340	345	350	
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe			
355	360	365	
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn			
370	375	380	
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr			
385	390	395	400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr			
405	410	415	

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

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

485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Ala Asn Thr Gly

580 585 590

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

675 680 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr

690 695 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu

705 710 715 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735
Asn Leu

<210> 11

<211> 7

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 11

Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro

1 5

<210> 12

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 12

Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro

1 5

<210> 13

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 13

Leu Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> LANETITRPA

<400> 14

Leu Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 15

Ala Ala Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 16

Ala Ala Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5 10

<210> 17

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 17

Gly Leu Gly Glu Thr Thr Arg Pro Ala

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> rAAV peptide insert

<400> 18

Gly Asn Glu Thr Ile Thr Arg Pro Ala

1 5

<210> 19

<211> 745

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Variant VP1 capsid protein with peptide insertion

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140	
Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly			
145	150	155	160
Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
	165	170	175
Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro			
	180	185	190
Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly			
	195	200	205
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser			
	210	215	220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
	245	250	255
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr			
	260	265	270
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His			
	275	280	285
Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp			
	290	295	300
Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val			
305	310	315	320
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu			
	325	330	335
Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr			
	340	345	350
Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp			
	355	360	365
Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser			
	370	375	380

Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
385 390 395 400

Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
420 425 430

Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr
435 440 445

Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln
450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly
465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn
485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly
500 505 510

Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp
515 520 525

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys
530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr
545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr
565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Leu Ala Leu Gly Glu
580 585 590

Thr Thr Arg Pro Ala Arg Gln Ala Ala Thr Ala Asp Val Asn Thr Gln
595 600 605

Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln
610 615 620

Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly His Phe His Pro

[illegible]

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn Lys Ser Val Asn Val
705 710 715 720
Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile
725 730 735
Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740 745

<210> 20

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Insertion Formula I

<220><221> MISC_FEATURE

 $\langle 222 \rangle \quad (1) \dots (2)$

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (3) \dots (3)$$

<223> Xaa = Leu, Asn and Lys

<220><221> MISC_FEATURE

$$\langle 222 \rangle \quad (4) \dots (4)$$

<223> Xaa = Gly, Glu, Ala and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Glu, Thr, Gly and Pro

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Thr, Ile, Gln, and Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Thr and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa = Arg, Asn and Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = Pro and Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(11)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<400> 20

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1 5 10

<210> 21

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Insertion Formula II

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(6)

<223> Xaa = any amino acid

<

220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = any amino acid

<220><221> misc_feature

<222> (10)..(11)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<400> 21

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Pro Xaa Xaa

1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Insertion Formula III

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Leu and Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa = Gly and Glu

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Glu and Thr

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Thr and Ile

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(11)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<400> 22

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Thr Arg Pro Xaa Xaa

1 5 10

<210> 23

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Peptide Insertion Formula IV

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(2)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (3)..(3)

<223> Xaa = Leu, Asn, Arg, Ala, Ser and Lys

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(4)

<223> Xaa =Gly, Glu, Ala, Val, Thr and Asp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Glu, Thr, Gly, Asp and Pro

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (6)..(6)

<223> Xaa = Thr, Ile, Gly, Lys, Asp and Gln

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Thr, Ser, Val and Ala

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (8)..(8)

<223> Xaa = Arg, Val, Lys, Pro, Thr and Asn

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(9)

<223> Xaa = Pro, Gly, Phe, Asn and Arg

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (10)..(11)

<223> Xaa = Ala, Leu, Gly, Ser, Thr or is absent

<400> 23

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa

1

5

10