(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0039592
(43) 공개일자 2023년03월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 7/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7004928
(22) 출원일자(국제) 2020년08월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/045906
(87) 국제공개번호 WO 2021/011941
국제공개일자 2021년01월21일

(71) 출원인
찰스리버레보레토리스,인코포레이티드
미합중국마사추셋츠01887윌밍톤발라드베일스트리트251
(72) 발명자
왕, 퀴즈하오
미국, 20850 엠디, 5 리서치 코트 록빌, 씨/오 바이진 바이오사이언스즈 아이엔씨.
(74) 대리인
황이남

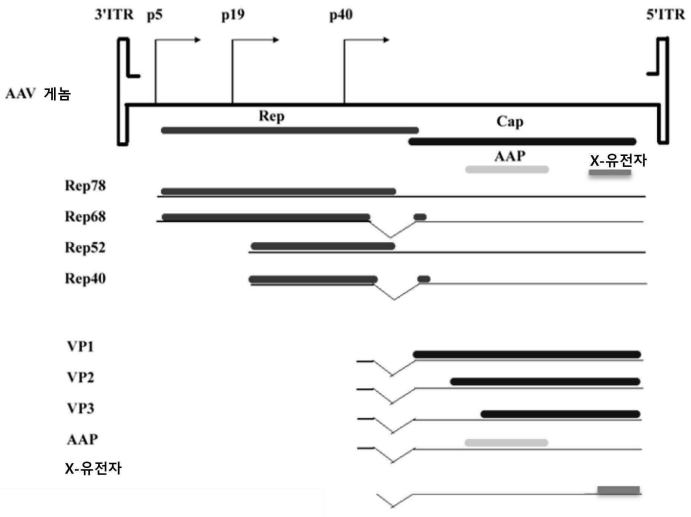
전체 청구항 수 : 총 19 항

(54) 발명의 명칭 **재조합 아데노 연관 바이러스의 패키징 효율을 증가시키기 위한 이온 농도의 사용**

(57) 요 약

본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키기 위해 패키징되는 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 추가 이온의 투여를 통해 세포 배양 배지의 이온 강도를 증가시킴으로써 형질감염된 세포에 의한 rAAV의 생산 역가를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 2500/14 (2013.01)
C12N 2500/16 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14152 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는, 방법:

(A) rAAV의 생산을 허용하기에 충분한 조건 하에 초기 기간 동안 초기 배양 배지에서 상기 rAAV로 형질감염된 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드 및 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드를 추가로 함유하는 단계;

(B) 상기 배양 배지에 Na^{+} 이외의 하나 이상의 이온을 첨가함으로써 상기 초기 기간 후 상기 배양 배지의 이온 강도를 변화시키는 단계; 및

(C) 상기 세포의 상기 배양을 계속하여 단계 (B)의 부재 하에 수득된 역가보다 더 큰 상기 rAAV의 생산 역가를 생성하는 단계.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 첨가된 이온(들) 각각은 상기 초기 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 약 10 mM 내지 약 80 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 제공되는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 생산 역가는 상기 단계 (B)의 부재 하에 유사하게 수행된 세포 배양으로부터 수득된 역가보다 50% 이상 더 큰 것인, 방법.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태에 대한 치료 제인, 전사된 핵산을 포함하거나, 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는, 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9 또는 rAAV10 혈청형, 또는 상기 혈청형의 하이브리드에 속하는, 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV2, rAAV5, 또는 rAAV9 혈청형, 또는 상기 혈청형의 하이브리드에 속하는, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첨가된 이온은 K^{+}, Ca^{++}, 또는 Mg^{++} 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첨가된 이온은 $CO_3^{=}$, HCO_3^{-}, HPO_4^{-}, $PO_4^{=}$, SCN^{-}, $SO_4^{=}$, HSO_4^{-}, 및 Cl^{-} 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첨가된 이온은 아세테이트, 아스파르테이트, 비프탈레이트, 바

이타르트레이트, 부톡시에톡시 아세테이트, 카프릴레이트, 시트레이트, 데하이드로아세테이트, 디아세테이트, 디하이드록시 글리시네이트, d-사카레이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리시네이트, 글리코설페이트, 하이드록시메탄 설포네이트, 락테이트, 메티오네이트, 옥살레이트, 페네이트, 페노설포네이트, 프로피오네이트, 프로피오네이트, 사카린, 살리실레이트, 사르코시네이트, 소르베이트, 티오글라이콜레이트, 및 톨루엔 설포네이트 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 첨가된 이온은 K^{+} 및 $CO_3^{=}$를 포함하는, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 인간 배아 신장 세포인, 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 세포는 HEK293 세포인, 방법.

청구항 13

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 어린 햄스터 신장 세포인, 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 세포는 BHK21 세포인, 방법.

청구항 15

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 sf9 곤충 세포인, 방법.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 초기 배양 배지는 둘베코 변형 이글 배지인, 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 초기 배양 배지는 혈청이 보충되는, 방법.

청구항 18

다음을 포함하는 약제학적 조성물:

(A) 제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, 상기 rAAV는 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태에 대한 치료제인, 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하고, 그리고 상기 약제학적 조성물은 유효량의 상기 rAAV 제제를 함유하는 제제; 및

(B) 약제학적으로 허용 가능한 담체.

청구항 19

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항의 방법에 의해 생산된 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, 상기 rAAV는 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하고, 또는 제18항의 약제학적 조성물로서, 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태의 치료에 사용하기 위한 제제 또는 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원의 교차 참조

[0002] 이 출원은 2019년 7월 15일에 출원된 미국 특허 출원 일련번호 16/511,612(계류 중)의 계속이며 우선권을 주장이며, 이 출원은 전체가 참고로 본 명세서에 포함된다.

[0003] 발명의 분야

[0004] 본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키기 위해 패키징되는 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 추가 이온의 투여를 통해 세포 배양 배지의 이온 강도를 증가시킴으로써 형질감염된 세포에 의한 rAAV의 생산 역가를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0005] 서열 목록에 대한 참조

[0006] 이 출원은 37 C.F.R.1.821 et seq.,에 따라 하나 이상의 서열 목록을 포함하며, 이는 컴퓨터 판독 가능 매체(파일 이름: 2650-0002US_ST25.txt, 2019년 7월 15일 생성, 38,334 바이트 크기)에 개시되며, 이 파일은 전체가 참조로 본 명세서에 포함된다.

배 경 기 술

[0007] **I. 아데노 연관 바이러스(AAV)**

[0008] 아데노 연관 바이러스 (**AAV**)는 *파보비리다에의 데펜도바이러스* 속에 속하는 작은 자연 발생 비병원성 바이러스이다(Balakrishnan, B. 등 (2014) "*Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy*," Curr. Gene Ther. 14(2):86-100; Zinn, E. 등 (2014) "*Adeno-Associated Virus: Fit To Serve*," Curr. Opin. Virol. 0:90-97). 질환을 일으키지 않음에도 불구하고, AAV는 인간과 다른 영장류를 감염시킬 수 있는 것으로 알려져 있으며 인간 집단에서 만연한다((Johnson, F.B. 등 (1972) "*Immunological Reactivity of Antisera Prepared Against the Sodium Dodecyl Sulfate-Treated Structural Polypeptides of Adenovirus-Associated Virus*," J. Virol. 9(6):1017-1026). AAV는 범위의 상이한 세포 유형(예를 들어, 중추신경계, 심장, 신장, 간, 폐, 췌장의 세포, 망막 색소 상피 또는 광수용체 세포, 또는 골격근 세포)을 감염시킨다. 상이한 조직 감염 능력("**굴성**")을 나타내는 바이러스의 12가지 혈청형(예를 들어, AAV2, AAV5, AAV6 등)이 확인되었다(Colella, P. 등 (2018) "*Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:87-104; Hocquemiller, M. 등 (2016) "*Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases*," Hum. Gene Ther. 27(7):478-496; Lisowski, L. 등 (2015) "*Adeno-Associated Virus Serotypes For Gene Therapeutics*," 24:59-67).

[0009] AAV는 약 4,700개의 뉴클레오티드로 구성된 단일 가닥 DNA 바이러스이다. 바이러스 게놈은 바이러스의 단백질을 인코딩하는 유전자를 함께 포함하는 5' 절반과 3' 절반이 있는 것으로 설명될 수 있다(**도 1**). AAV 게놈의 5' 절반은 AAV rep 유전자를 포함하며, 이는 다중 해독틀, 시차를 둔 개시 프로모터(**p5**, **p19** 및 **p40**) 및 교대 스플라이싱을 통해 바이러스 전사 조절 및 복제 및 바이러스 캡슐로의 바이러스 게놈 패키징에 필요한 4개의 비구조적 ***Rep*** 단백질(**Rep40**, **Rep52**, **Rep68** 및 **Rep78**)을 인코딩한다 (Lackner, D.F. 등 (2002) "*Studies of the Mechanism of Transactivation of the Adeno-Associated Virus p19 Promoter by Rep Protein*," J. Virol. 76(16):8225-8235). AAV 게놈의 3' 절반은 **VP1**, **VP2** 및 **VP3**의 세 가지 캡시드 단백질(**VP**)을 인코딩하는 AAV 캡시드 유전자(***cap***)를 포함한다. 3개의 캡시드 단백질은 단일 프로모터(AAV2의 경우 p40)에 의해 제어되는 단일 mRNA 전사체로부터 번역된다. AAV 게놈의 3' 절반은 또한 AAV 어셈블리 활성화 단백질(**AAP**)을 인코딩하는 **AAP** 유전자를 포함한다. 60개의 VP 단량체(VP1의 대략 5개 카피, VP2의 5개 카피 및 VP3의 50개 카피 포함)가 AAV 게놈 주위에 자가 조립되어 성숙한 바이러스 입자의 이십면체 단백질 쉘(**캡시드**)을 형성한다(Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265; Van Vliet K.M. 등 (2008) *The Role of the Adeno-Associated Virus Capsid in Gene Transfer*. In: Drug Delivery Systems, Jain, K.K. (eds.), Meth. Molec. Biol. 437:51-91). AAV **AAP** 단백질은 새로 생성된 VP 단백질을 안정화시키고 세포질에서 세포 핵으로 수송하는 데 필요한 것으로 여겨진다. AAV 게놈의 3' 절반은 또한 게놈 복제를 지원하는 단백질을 인코딩하는 것으로 여겨지는 AAV ***X*** 유전자를 포함한다(Colella, P. 등 (2018) "*Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:87-104; Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265; Cao, M. 등 (2014) "*The X Gene Of Adeno-Associated Virus 2 (AAV2) Is Involved In Viral DNA Replication*," PLoS ONE 9, e104596:1-10).

[0010] 전술한 AAV 유전자-코딩 서열은 145개 뉴클레오티드의 2개의 AAV-특이적 회문형 역전 말단 반복 서열(**ITR**)에 의해 측접된다(Balakrishnan, B. 등 (2014) "*Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy*," Curr. Gene Ther. 14(2):86-100; Colella, P. 등 (2018) "*Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:87-104).

[0011] AAV는 본질적으로 결함이 있는 바이러스로, 최소한 두 가지 중요한 기능, 즉 바이러스 특이적 산물의 합성을 시작하는 능력 및 그러한 산물을 조립하여 성숙한 감염성 바이러스 입자의 이십면체 단백질 쉘(**캡시드**)을 형성하는 능력이 부족한 바이러스이다. 따라서 AAV 게놈의 유전자에 의해 인코딩되지 않은 바이러스 연관(**VA**) RNA를 제공하기 위해 아데노바이러스(**Ad**), 단순 포진 바이러스(**HSV**), 사이토메갈로바이러스(**CMV**), 백시니아 바이러스 또는 인간 파필로마바이러스와 같은 공동 감염 "헬퍼" 바이러스가 필요하다. 이러한 VA RNA는 번역되지 않지만 다른 바이러스 유전자의 번역을 조절하는 역할을 한다. 유사하게, AAV 게놈은 Ad의 바이러스 단백질 E1a, E1b, E2a 및 E4를 인코딩하는 유전자를 포함하지 않으며; 따라서 이러한 단백질은 공동 감염 "헬퍼" 바이러스에 의해 제공되어야 한다. E1a 단백질은 생산적인 감염 동안 바이러스 유전자 전사를 크게 자극한다. E1b 단백질은 아데노바이러스에 감염된 세포의 세포자멸사를 차단하여 생산적인 감염이 진행되도록 한다. E2a 단백질은 주형을 풀고 전사 개시를 향상시킴으로써 바이러스 가닥 변위 복제의 연장 단계에서 역할을 한다. E4 단백질은 이식유전자 지속성, 벡터 독성 및 면역원성에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다(문헌[Grieger, J.C. 등 (2012) "*Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications*," Meth. Enzymol. 507:229-254; Dyson, N. 등 (1992) "*Adenovirus E1A Targets Key Regulators Of Cell Proliferation*," Canc. Surv. 12:161-195; Jones N.C. (1990) "*Transformation By The Human Adenoviruses*," Semin. Cancer Biol. 1(6):425-435; Ben-Israel, H. 등 (2002) "*Adenovirus and Cell Cycle Control*," Front. Biosci. 7:d1369-d1395; Hoeben, R.C. 등 (2013) "*Adenovirus DNA Replication*," Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 5:a013003 (pages 1-11); Berk, A.J. (2013) "*Adenoviridae: The Viruses And Their Replication*, In: Fields Virology, 6th Edition (Knipe, D.M. 등, Eds.), Vol. 2., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pages 1704-1731; Weitzman, M.D. (2005) "*Functions Of The Adenovirus E4 Proteins And Their Impact On Viral Vectors*," Front. Biosci. 10:1106-1117] 참조).

[0012] AAV 바이러스는 분열 세포와 비분열 세포를 모두 감염시키고 원형 에피솜 분자로 지속하거나 특정 염색체 유전자좌(**아데노 연관 바이러스 통합 부위** 또는 **AAVS**)에서 숙주 세포의 DNA에 통합될 수 있다 (Duan, D. (2016) "*Systemic Delivery Of Adeno-Associated Viral Vectors*," Curr. Opin. Virol. 21:16-25; Grieger, J.C. 등 (2012) "*Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing,* and Clinical *Applications*," Meth. Enzymol. 507:229-254). AAV 복제 및 성숙에 필요한 기능을 제공하기 위해 헬퍼 바이러스가 존재하지 않는 한 AAV는 이러한 감염된 세포에 잠복 상태로 남아 있다.

[0013] **II. rAAV 및 유전자 요법에서의 그의 용도**

[0014] AAV의 특성에 비추어 볼 때, AAV(rAAV)의 재조합 변형 버전은 유전자 요법을 위한 벡터로서 상당한 유용성을 발견하였다(문헌[Naso, M.F. 등 (2017) "*Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy*," BioDrugs 31:317-334; Berns, K. I. 등 (2017) "*AAV: An Overview of Unanswered Questions*," Human Gene Ther. 28(4):308-313; Berry, G.E. 등 (2016) "*Cellular Transduction Mechanisms Of Adeno-Associated Viral Vectors*," Curr. Opin. Virol. 21:54-60; Blessing, D. 등 (2016) "*Adeno-Associated Virus And Lentivirus Vectors: A Refined Toolkit For The Central Nervous System*," 21:61-66; Santiago-Ortiz, J.L. (2016) "*Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in Cancer Gene Therapy*," J. Control Release 240:287-301; Salganik, M. 등 (2015) "*Adeno-Associated Virus As A Mammalian DNA Vector*," Microbiol. Spectr. 3(4):1-32; Hocquemiller, M. 등 (2016) "*Adeno-Associated Virus-Based Gene Therapy for CNS Diseases*," Hum. Gene Ther. 27(7):478-496; Lykken, E.A. 등 (2018) "*Recent Progress And Considerations For AAV Gene Therapies Targeting The Central Nervous System*," J. Neurodevelop. Dis. 10:16:1-10; Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265; During, M.J. 등 (1998) "*In Vivo Expression Of Therapeutic Human Genes For Dopamine Production In The Caudates Of MPTP-Treated Monkeys Using An AAV Vector*," Gene Ther. 5:820-827; Grieger, J.C. 등 (2012) "*Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications*," Meth. Enzymol. 507:229-254; Kotterman, M.A. 등 (2014) "*Engineering Adeno-Associated Viruses For Clinical Gene Therapy*," Nat. Rev. Genet. 15(7):445-451; Kwon, I. 등 (2007) "*Designer Gene*

Delivery Vectors: Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer," Pharm. Res. 25(3):489-499] 참조).

[0015] rAAV는 일반적으로 원형 플라스미드("**rAAV 플라스미드 벡터**")를 사용하여 생성된다. AAV ***rep*** 및 ***cap*** 유전자는 일반적으로 이러한 작제물로부터 결실되고 프로모터, β-글로빈 인트론, 선택된 치료 유전자(**이식유전자**)가 삽입된 클로닝 부위 및 폴리-아데닐화 ("**polyA**") 부위로 대체된다. 그러나, rAAV의 역전 말단 반복 서열(ITR)은 유지되어 rAAV 플라스미드 벡터의 **이식유전자 발현 카세트**가 AAV ITR 서열에 측접한다(Colella, P. 등 (2018) "*Emerging Issues in AAV-Mediated In Vivo Gene Therapy*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:87-104; Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265). 따라서, 5'에서 3' 방향으로, rAAV는 5' ITR, rAAV의 이식유전자 발현 카세트, 및 3' ITR을 포함한다.

[0016] rAAV는 다수의 유전적 질환 중 임의의 것 (예를 들어, 선천성 지질단백질 리파제 결핍 (**LPLD**), 레버 선천성 흑내장 (**LCA**), 방향족 L-아미노산 탈탄산효소 결핍 (**AADC**), 맥락막결손 및 혈우병)로 고통 받고 있는 환자에게 이식 유전자를 전달하기 위해 사용되어 왔고, 새로운 임상 양식, 예컨대 간섭 RNA (**RNAi**) 요법 및 유전자-변형시키는 전략 예컨대 **Crispr/Cas9**에 유용하다(US 특허 제8,697,359호, 제10,000,772호, 제10,113,167호, 제10,227,611호; Lino, C.A. 등 (2018) "*Delivering CRISPR: A Review Of The Challenges And Approaches*," Drug Deliv. 25(1):1234-1237; Ferreira, V. 등 (2014) "*Immune Responses To AAV-Vectors, The Glybera Example From Bench To Bedside*" Front. Immunol. 5(82):1-15), Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265; Rastall, D.P.W. (2017) "*Current and Future Treatments for Lysosomal Storage Disorders*," Curr. Treat Options Neurol. 19(12):45; Kay, M. 등 (2017) "*Future Of rAAV Gene Therapy: Platform For RNAi, Gene Editing And Beyond*," Human Gene Ther. 28:361-372); Berns, K. I. 등 (2017) "*AAV: An Overview of Unanswered Questions*," Human Gene Ther. 28(4):308-313). rAAV를 수반하는 150개 초과의 임상 시험이 실시되었다 (Büning, H. 등 (2019) "*Capsid Modifications for Targeting and Improving the Efficacy of AAV Vectors*," Mol. Ther. Meth. Clin. Devel. 12:P248-P265; Clιment, N. 등 (2016) "*Manufacturing Of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors For Clinical Trials*," Meth. Clin. Develop. 3:16002:1-7). 이러한 재조합으로 변형된 AAV에 대해 가장 일반적으로 사용되는 AAV 혈청형은 중추신경계, 신장, 망막 색소 상피의 세포 및 광수용체 세포를 감염시킬 수 있는 **AAV2**이다. 또 다른 AAV 혈청형은 근육 세포를 감염시키는 **AAV9**이며, 또한 널리 사용되어 왔다(Duan, D. (2016) "Systemic Delivery Of Adeno-Associated Viral Vector," Curr. Opin. Virol. 21:16-25). AAV 혈청형은 미국 특허 번호 10,301,650; 10,266,846; 10,265,417; 10,214,785; 10,214,566; 10,202,657; 10,046,016; 9,884,071; 9,856,539; 9,737,618; 9,677,089; 9,458,517; 9,457,103; 9,441,244; 9,193,956; 8,846,389; 8,507,267; 7,906,111; 7,479,554; 7,186,552; 7,105,345; 6,984,517; 6,962,815; 및 6,733,757에 기재되어 있다.

[0017] **III. rAAV 생산 방법**

[0018] 원하는 이식유전자 발현 카세트를 함유하는 rAAV는 전형적으로 부착 또는 현탁액에서 성장한 인간 세포(예를 들어, **HEK293**)에 의해 생성된다. 상술한 바와 같이 rAAV는 결함이 있는 바이러스이므로 rAAV를 복제하여 패키징하기 위해서는 추가적인 기능이 제공되어야 한다.

[0019] 전형적으로, rAAV는 세포를 rAAV 플라스미드 벡터, 및 벡터 전사 조절 및 복제에 필요한 **Rep52** 및 **Rep78** 유전자를 제공하는 AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드를 포함하는 제2 플라스미드 벡터로 일시적으로 형질감염시키고, 바이러스 캡슐로의 바이러스 게놈의 패키징(**Rep40** 및 **Rep68**은 rAAV 생산에 필요하지 않음) 및 rAAV를 생산하기 위해 AAV로부터 절제된 ***cap*** 유전자에 의해 생산된다. 제2 플라스미드 벡터는 AAV 증식에 필요한 바이러스 전사 및 번역 인자(E1a, E1b, E2a, VA 및 E4)를 인코딩하는 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하여, rAAV와 협력하여 **이중 플라스미드 형질감염 시스템**을 포함할 수 있다 (Grimm, D. 등 (1998) "*Novel Tools For Production And Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors*," Hum. Gene Ther. 9:2745-2760; Penaud-Budloo, M. 등 (2018) *"Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:166-180).

[0020] 그러나 AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드(필요한 ***rep*** 및 ***cap*** 유전자를 제공함)를 "**AAV 헬퍼 플라스미드**"로 복제하고 다른 플라스미드(즉, "**Ad 헬퍼 플라스미드**") 상의 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드(이는 바이

러스 전사 및 번역 인자를 인코딩하는 유전자를 제공함)로 복제하여, 이러한 플라스미드는 rAAV 플라스미드 벡터와 협력하여 **삼중 플라스미드 형질감염 시스템**을 포함한다(**도 2**). 삼중 플라스미드 형질감염 시스템의 사용은 하나의 ***cap*** 유전자를 다른 캡 유전자로 쉽게 전환할 수 있도록 하여 rAAV의 혈청형 변화를 촉진하는 이점이 있다. 헬퍼 바이러스보다 헬퍼 플라스미드를 사용하면 헬퍼 바이러스 입자를 추가로 생성하지 않고 rAAV를 생성할 수 있다 (Franҫois, A. 등 (2018) "*Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 10:223-236; Matsushita, T. 등 (1998) "*Adeno-Associated Virus Vectors Can Be Efficiently Produced Without Helper Virus*," Gene Ther. 5:938-945).

[0021] rAAV 플라스미드 벡터, AAV 헬퍼 기능 rep 및 cap 유전자를 제공하는 플라스미드 벡터, 및 인산칼슘 공동침전에 의해 HEK293 세포에 비-AAV 헬퍼 기능을 제공하는 플라스미드 벡터를 포함하는 플라스미드 DNA의 일시적 형질감염은 연구 실험실에서 rAAV를 생산하는 표준 방법이 되었다 (Grimm, D. 등 (1998) "*Novel Tools For Production And Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors*," Hum. Gene Ther. 9:2745-2760). 그러나 현탁 배양된 형질감염된 포유동물 세포를 사용한 인산칼슘 매개 형질감염 과정의 사용은 배지 교환을 필요로 하므로 치료 용량의 rAAV를 생산하기 위해 필요한 대규모 rAAV 생산에 이상적인 것으로 간주되지 않다 (Lock, M. 등 (2010) "*Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale*," Hum. Gene Ther. 21:1259-1271). 이러한 이유로 폴리에틸렌이민(**PEI**)은 형질감염 시약으로 사용되었으며 인산칼슘 매개 형질감염을 사용하여 얻은 것과 유사한 바이러스 수율을 제공하는 것으로 밝혀졌다 (Durocher, Y. 등 (2007) "*Scalable Serum-Free Production Of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 2 By Transfection Of 293 Suspension Cells*," J. Virol. Meth. 144:32-40).

[0022] rAAV는 대안적으로 배큘로바이러스 벡터를 사용하여 곤충 세포(예를 들어, sf9 세포)에서 또는 (예를 들어, 미국 특허 제9,879,282호; 제9,879,279호; 제8,945,918호; 제8,163,543호; 제7,271,002호 및 제6,723,551호)에서, 또는 HSV-감염된 어린 햄스터 신장(**BHK**) 세포(예를 들어, BHK21) (Franҫois, A. 등 (2018) "*Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 10:223-236). Methods of rAAV production are reviewed in Grieger, J.C. 등 (2012) "*Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing, and Clinical Applications*," Meth. Enzymol. 507:229-254, and in Penaud-Budloo, M. 등 (2018) "*Pharmacology of Recombinant Adeno-associated Virus Production*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 8:166-180)에서 생성될 수 있다.

[0023] **IV. rAAV 정제 및 회수 방법**

[0024] 생산 후, rAAV는 전형적으로 하나 이상의 밤새 CsCl 구배 원심분리에 의해 수집되고 정제되고(Zolotukhin, S. 등 (1999) "*Recombinant Adeno-Associated Virus Purification Using Novel Methods Improves Infectious Titer And Yield*," Gene Ther. 6:973-985)), 이어서 탈염하여 정제된 rAAV 생산 스톡을 형성한다. 10^{12} 내지 10^{13} 감염성 rAAV 캡시드/mL의 역가를 얻을 수 있다.

[0025] rAAV 감염은 세포변성 효과를 일으키지 않기 때문에 플라크 검정을 사용하여 rAAV 제제의 감염 역가를 결정할 수 없다. 따라서 감염 역가는 일반적으로 중앙 조직 배양 감염 용량(**TCID50**)으로 측정된다. 이 방법에서, HeLa 유래 AAV2 ***rep-*** 및 ***cap***-발현 세포주는 96-웰 플레이트에서 성장하고 혈청형 5의 아데노바이러스의 존재하에 rAAV 제제의 복제 10배 연속 희석액으로 감염된다. 감염 후, 벡터 게놈 복제는 정량적 PCR(qPCR)에 의해 결정된다 (Zen, Z. 등 (2004) "*Infectious Titer Assay For Adeno-Associated Virus Vectors With Sensitivity Sufficient To Detect Single Infectious Events*," Hum. Gene Ther. 15:709-715). 대안적으로, rAAV 제제의 감염 역가는 감염 센터 검정(**ICA**)을 사용하여 측정할 수 있다. 이 검정은 HeLa ***rep-cap*** 세포와 Ad를 사용하지만 인큐베이션 후 세포를 막으로 옮기는 것을 포함한다. 사용된 이식유전자의 일부에 상보적인 표지된 프로브는 혼성화를 통해 감염 센터(개별 감염된 세포를 나타냄)를 검출하는 데 사용된다. 더 널리 사용되지만 TCID50 검정은 ICA보다 배경이 더 높고 ICA에 비해 벡터 감염성을 과대평가하는 것으로 보고되었다 (Franҫois, A. 등 (2018) "*Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 10:223-236). rAAV의 생산 및 정제 방법은 특히 미국 특허 번호 10,294,452; 10,161,011; 10,017,746; 9,598,703; 7,625,570; 7,439,065; 7,419,817; 7,208,315; 6,995,006; 6,989,264; 6,846,665 및 6,841,357에 기재되어 있다.

[0026] 위에서 논의한 바와 같이, 연구 실험실에서 rAAV를 생성하기 위해 밤새 염화세슘 구배 원심분리의 여러 라운드

가 일반적으로 사용된다. 그러나 CsCl에 장기간 노출되면 rAAV 플라스미드 벡터의 효능이 손상되는 것으로 보고되었다 (Zolotukhin, S. 등 (1999) "*Recombinant Adeno-Associated Virus Purification Using Novel Methods Improves Infectious Titer And Yield*," Gene Ther. 6:973-985). 또한, 이러한 구배는 세포 용해물에 대한 부하 용량이 제한되어 있으므로 정제될 수 있는 rAAV의 양을 제한한다. 등장성 대체 구배 배지인 아이오딕사놀을 사용하여 rAAV 플라스미드 벡터를 정제했지만, 아이오딕사놀은 rAAV 생산을 위한 CsCl과 동일한 부하 용량 단점을 공유한다.

[0027] 이러한 구배 특정 제약조건을 극복하기 위해 연구자들은 rAAV 정제의 이온 교환 크로마토그래피 방법, 친화도 정제 방법 및 항체 친화도 기반 방법을 개발하였다 (Auricchio, A. 등 (2001) "*Isolation Of Highly Infectious And Pure Adeno-Associated Virus Type 2 Vectors With A Single-Step Gravity-Flow Column*," Hum. Gene Ther. 12:71-76; Brument, N. 등 (2002) "*A Versatile And Scalable Two-Step Ion-Exchange Chromatography Process For The Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Serotypes-2 And -5*," Mol. Ther. 6:678-686; Zolotukhin, S. 등 (2002) "*Production And Purification Of Serotype 1, 2, And 5 Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors*," Methods 28:158-167; Davidoff, A.M. 등 (2004) "*Purification Of Recombinant Adeno-Associated Virus Type 8 Vectors By Ion Exchange Chromatography Generates Clinical Grade Vector Stock*," J. Virol. Methods 121:209-215; Smith, R.H. 등 (2009) "*A Simplified Baculovirus-AAV Expression Vector System Coupled With One-Step Affinity Purification Yields High-Titer rAAV Stocks From Insect Cells*," Mol. Ther. 17:1888-1896; Lock, M. 등 (2010) "*Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale*," Hum. Gene Ther. 21:1259-1271). 그러나 불행하게도 이러한 크로마토그래피 기반 정제 방법은 일반적으로 완전히 기능하는 벡터 입자로부터 빈 캡시드와 같은 벡터 관련 불순물을 분리할 수 없다. 따라서, 단점에도 불구하고 CsCl 구배 원심분리는 rAAV 벡터 제제로부터 빈 입자를 제거하기 위한 가장 특성화된 방법으로 남아 있다.

[0028] 다양한 혈청형의 rAAV는 인산칼슘- 및 PEI-형질감염 배양물 둘 다에서 상청액으로 방출되는 것으로 관찰되었다 (Lock, M. 등 (2010) "*Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale*," Hum. Gene Ther. 21:1259-1271;; 미국 특허 제6,566,118호 및 제6,989,264호, 및 미국 특허 공개 US 2005/0266567). 미국 특허 제6,566,118호 및 제6,989,264호, 및 미국 특허 공개 US 2005/0266567은, 배양 배지가 NaCl(즉, 50-325 mM NaCl) 및 다른 특정되지 않은 염, 만니톨 또는 글루코스를 사용하여, 또는 Na+ 또는 K+와 같은 이온성 용질을 사용하여 배양 배지의 전도도를 적어도 약 5 mS가 되도록 조작함으로써, 약 100 mOsM 내지 약 650 mOsM의 삼투질농도를 초기에 포함하도록 제형화된 경우, 높은 역가의 재조합 AAV 벡터가 세포 현탁액의 상청액 내로 방출되는 것을 개시한다. 300 mOsM(150 mM) NaCl의 초기 삼투질농도가 최적인 것으로 밝혀졌다. 문헌[Adamson-Small, L. 등 (2017)]은 유사하게, 생산 배지 중 60-90 mM 염화나트륨이 형질도입 후 4-6시간에 증가된 염화나트륨이 존재하는 감염 조건 하에 rAAV9 형질도입 단위 및 캡시드 단백질의 상당한 증가를 초래함을 입증하였다(WO 2017/112948; Adamson-Small, L. 등 (2017) "*Sodium Chloride Enhances Recombinant Adeno-Associated Virus Production in a Serum-Free Suspension Manufacturing Platform Using the Herpes Simplex Virus System*," Hum. Gene Ther. Meth. 28(1):1-14). Lock, M. 등 (2010)은 rAAV 입자의 회수를 촉진하기 위한 PEI 형질감염 기반 및 상청액 수확 기반 기술을 개시한다(Lock, M. 등 (2010) "Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vector 규모로", Hum. Gene Ther. 21:1259-1271).

[0029] 이 방법은 AAV2 이외의 AAV 혈청형에 속하는 rAAV가 인산칼슘 형질감염된 세포의 배양 배지로 주로 방출되고 세포 용해물에 보유되지 않는다는 관찰에 기초한다. 이와 같이 문헌[Lock, M. 등 (2010)]은, 이러한 rAAV 혈청형에 대해, 생산 배양 배지가 더 낮은 수준의 세포 오염물을 보유하는 rAAV 플라스미드 벡터의 비교적 순수한 공급원을 나타내고 이러한 인자가 정제 구배의 부하 용량 및 분해능을 개선함을 개시한다. 개시된 방법에서, AAV2 혈청형에 속하는 rAAV를 포함하는 rAAV를 인산칼슘을 사용하여 HEK293 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 후 72시간(또는 120시간)에 무혈청 배지를 첨가하고 인큐베이션을 추가로 28시간 동안 계속하였다. DNA 및 RNA의 모든 형태를 분해하는 유전자 조작 엔도뉴클레아제인 Benzonase®를 배양 상청액에 첨가하였다. 2시간 후, NaCl을 500 mM에 첨가하고 배양 배지를 수확하기 전에 추가로 2시간 동안 인큐베이션을 재개하였다. 그 다음 정화된 배지를 접선 유동 여과(TFF)에 의해 125배 농축하고, rAAV를 아이오딕사놀 단계 구배를 사용하여 정제하였다. 이 방법은 혈청형 AAV1, AAV6, AAV7, AAV8 및 AAV9의 AAV와 함께 사용될 수 있다. 문헌 [Lock 등 (2010)]의 고염 인큐베이션의 사용은 (미국 특허 제6,566,118호 및 제6,989,264호 및 미국 특허 공개 US 2005/0266567의 방법에 비해) 배양 배지에 대한 rAAV6 및 rAAV9 플라스미드 벡터의 추가 20% 방출을 유도하는 것으로 개시되

어 있지만, 다른 혈청형에 대해 거의 변화가 없는 것으로 나타났다. rAAV8 및 rAAV9의 평균 전체 수율은 높았지만(2.2×10^{14} 게놈 카피), 다른 rAAV 혈청형의 수율은 상당히 낮았다(예를 들어, rAAV6에 대한 6.7×10^{13} 게놈 카피). 생성된 rAAV의 추정된 순도가 90%를 초과했지만, 생성된 rAAV8 및 rAAV9의 35% 내지 50%가 가공 단계에서 손실되었고, 생성된 rAAV6의 80-85%가 프로세싱에서 손실되었고, rAAV2는 대부분 세포 내에서 유지되었고 배양 배지로 방출되지 않는다.

[0030] 또한 염의 제공은 이식유전자 연련 유전자 발현을 보다 쉽게 측정하기 위해 세포를 투과화하는 데 사용되어 왔다. 따라서, 예를 들어, 문헌[During, M.J. 등 (1998)]은 인간 티로신 히드록실라제(TH) 및 방향족 아미노 데카르복실라제(AADC)를 발현하는 rAAV로 형질감염된 HEK 293 세포로부터 도파민의 방출을 촉진하기 위해 pH 7.4로 완충된 135 mm의 NaCl, 3 mm의 KCl, 1.2 mm의 $CaCl_2$, 1.0 mm의 $MgCl_2$, 10 mm의 글루코스, 200 mm의 아스코르베이트 및 2 mm의 나트륨 모노- 및 이염기성 인산염을 함유하는 "방출 완충액"을 사용하였다 (During, M.J. 등 (1998) "*In Vivo Expression Of Therapeutic Human Genes For Dopamine Production In The Caudates Of MPTP-Treated Monkeys Using An AAV Vector*," Gene Ther. 5:820-827).

[0031] 그러나, 이러한 모든 이전의 성공에도 불구하고, 현재 rAAV를 유전자 요법에 적용하는 것을 제한하는 문제를 해결할 수 있는 방법을 개발할 필요가 남아 있다 (Grieger, J.C. 등 (2012) "*Adeno-Associated Virus Vectorology, Manufacturing,* and Clinical *Applications*," Meth. Enzymol. 507:229-254; Kotterman, M.A. 등 (2014) "*Engineering Adeno-Associated Viruses For Clinical Gene Therapy*," Nat. Rev. Genet. 15(7):445-451; Kwon, I. 등 (2007) "*Designer Gene Delivery Vectors: Molecular Engineering and Evolution of Adeno-Associated Viral Vectors for Enhanced Gene Transfer*," Pharm. Res. 25(3):489-499; Naso, M.F. 등 (2017) "*Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy*," BioDrugs 31:317-334). 이러한 문제는 다음과 같다:

[0032] **(1) rAAV의 제한된 조직 특이적 굴성(tropism)**: 이러한 문제 중 하나는 AAV 및 rAAV의 제한된 조직 특이적 굴성을 반영한다. 다양한 혈청형의 캡시드 단백질(즉, "모자이크" 캡시드)을 인코딩하는 다중 헬퍼 플라스미드의 사용은 rAAV에 의해 감염될 수 있는 조직 유형의 범위를 증가시키는 방법으로 활용되었다 (Hauck, B. 등 (2003) "*Generation And Characterization Of Chimeric Recombinant AAV Vectors*," Mol. Ther. 7:419-425; Rabinowitz, J.E. 등 (2004) "*Crossdressing The Virion: The Transcapsidation Of Adeno-Associated Virus Serotypes Functionally Defines Subgroups*," J. Virol. 78:4421-4432; Lisowski, L. 등 (2015) "*Adeno-Associated Virus Serotypes For Gene Therapeutics*," 24:59-67).

[0033] **(2) 항-rAAV 면역 반응의 우세:** 두 번째 그러한 문제는, 인간의 30-80%가 AAV 감염(주로 AAV2)에 자연적으로 노출되었고 인간의 20-67%가 혈액 및 기타 체액에서 항-AAV 캡시드 항체를 중화하는 역가를 보유한다는 사실을 반영한다 (Liu, Q. 등 (2014) "*Neutralizing Antibodies Against AAV2, AAV5 And AAV8 In Healthy And HIV-1-Infected Subjects In China: Implications For Gene Therapy Using AAV Vectors*," Gene Ther. 21:732-738; Vandamme, C. 등 (2017) "*Unraveling the Complex Story of Immune Responses to AAV Vectors Trial After Trial*," Hum. Gene. Ther. 28(11):1061-1074). 이들 항체의 존재는 이식유전자 발현을 방지함으로써 rAAV 요법의 효과를 약화시킨다. 합성 중합체 접합체(예를 들어, 폴리에틸렌 글리콜(PEG))는 중화 항체로부터 rAAV를 보호하기 위한 수단으로 사용되었다 (Le, H.T. 등 (2005) "*Utility Of Pegylated Recombinant Adeno-Associated Viruses For Gene Transfer*," J. Control. Release 108:161-177; Lee, G.K. 등 (2005) "*PEG Conjugation Moderately Protects Adeno-Associated Viral Vectors Against Antibody Neutralization*," Biotechnol. Bioeng. 92:24-34). 대체 혈청형 또는 돌연변이된 비-면역원성 캡시드를 갖는 rAAV의 사용도 추구되어 왔다 (Smith, J.K. 등 (2018) "*Creating An Arsenal Of Adeno-Associated Virus (AAV) Gene Delivery Stealth Vehicles*," PLoS Pathog. 14(5):1-6).

[0034] **(3) rAAV 패키징 용량의 제한:** rAAV의 패키징 효율은 5kb 이상으로 상당히 감소하는 것으로 밝혀졌으며, 라거(lager) 게놈은 5' 말단절단으로 캡시드화되었다 (Wu, Z. 등 (2010) "*Effect Of Genome Size On AAV Vector Packaging*," Molec. Ther. 18:80-86; Ghosh, A. 등 (2007) "*Expanding Adeno-Associated Viral Vector Capacity: A Tale Of Two Vectors*," Biotechnol. Genet. Eng. Rev. 24:165-177; McClements, M.E. et a. (2017) "*Adeno-associated Virus (AAV) Dual Vector Strategies for Gene Therapy Encoding Large Transgenes*," Yale J. Biol. Med. 90:611-623).

[0035] **(4) 대규모 제조 기술의 제한:** 대규모 요법에 사용하기에 충분한 양으로 rAAV를 제조하는 능력은 공정 수율이 5% 미만에서 30% 미만인 기술의 성공적인 적용에 장벽이 되어 왔다 (Lock, M. 등 (2010) "*Rapid, Simple, and*

Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale," Hum. Gene Ther. 21:1259-1271). 이러한 문제는 경우에 따라 상호 관련되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0036] 예를 들어, 최종 생성물에 빈 입자가 존재하면 벡터의 수령체가 원치 않는 면역 반응과 독성을 유발할 수 있는 AAV 항원의 큰 공급원에 노출된다. 따라서 패키징 효율을 높이고 높은 생산 역가를 얻기 위한 개선된 방법이 매우 중요하다.

[0037] 본 발명은 rAAV의 생산 동안 배양 배지 내의 이온 농도를 변경함으로써 rAAV 패키징의 효율을 증가시키는 개선된 방법에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0038] 본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키기 위해 패키징되는 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 추가 이온의 투여를 통해 세포 배양 배지의 이온 강도를 증가시킴으로써 형질감염된 세포에 의한 rAAV의 생산 역가를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0039] 상세하게는, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키는 방법을 제공한다:

[0040] (A) rAAV의 생산을 허용하기에 충분한 조건 하에 초기 기간 동안 초기 배양 배지에서 상기 rAAV로 형질감염된 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드 및 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드를 추가로 함유하는 단계;

[0041] (B) 상기 배양 배지에 Na^{+} 이외의 하나 이상의 이온을 첨가함으로써 상기 초기 기간 후 상기 배양 배지의 이온 강도를 변화시키는 단계; 및

[0042] (C) 상기 세포의 상기 배양을 계속하여 단계 (B)의 부재 하에 수득된 역가보다 더 큰 상기 rAAV의 생산 역가를 생성하는 단계.

[0043] 본 발명은 각각의 첨가된 이온(들)이 초기 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 약 10 mM 내지 약 80 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 제공되는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0044] 본 발명은 생산 역가가 상기 단계 (B)의 부재 하에 유사하게 수행된 세포 배양으로부터 수득된 역가보다 50% 이상 더 큰 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0045] 본 발명은 rAAV가 유전적(genetic) 또는 유전 가능한(heritable) 질환 또는 병태(condition)에 대한 치료제(therapeutic)인, 전사된 핵산을 포함하거나 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0046] 본 발명은 rAAV가 rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9 또는 rAAV10 혈청형, 또는 상기 혈청형의 하이브리드(hybrid)에 속하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0047] 본 발명은 rAAV가 rAAV2, rAAV5, 또는 rAAV9 혈청형, 또는 혈청형의 하이브리드에 속하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0048] 본 발명은 첨가된 이온이 K^{+}, Ca^{++}, 또는 Mg^{++} 중 하나 이상을 포함하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0049] 본 발명은 첨가된 이온이 $CO_3^{=}$, HCO_3^{-}, HPO_4^{-}, $PO_4^{=}$, SCN^{-}, $SO_4^{=}$, HSO_4^{-}, 및 Cl^{-} 중 하나 이상을 포함하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0050] 본 발명은 첨가된 이온이 아세테이트, 아스파르테이트, 비프탈레이트, 바이타르트레이트, 부톡시에톡시 아세테이트, 카프릴레이트, 시트레이트, 데하이드로아세테이트, 디아세테이트, 디하이드록시 글리시네이트, d-사카레이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리시네이트, 글리코설페이트, 하이드록시메탄 설포네이트, 락테이트, 메티오네이트, 옥살레이트, 페네이트, 페노설포네이트, 프로피오네이트, 프로피오네이트, 사카린, 살리실레이트,

사르코시네이트, 소르베이트, 티오글라이콜레이트, 및 톨루엔 설포네이트 중 하나 이상을 포함하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0051] 본 발명은 첨가된 이온이 K^+ 및 $CO_3^=$를 포함하는 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0052] 본 발명은 세포가 인간 배아 신장 세포, 어린 햄스터 신장 세포 또는 sf9 곤충 세포인 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0053] 본 발명은 세포가 HEK293 인간 배아 신장 세포인 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0054] 본 발명은 세포는 BHK21 어린 햄스터 신장 세포인 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0055] 본 발명은 초기 배양 배지가 둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 또는 혈청이 보충된 둘베코 변형 이글 배지인 그와 같은 방법의 구현예를 추가로 제공한다.

[0056] 본 발명은 추가로 다음를 포함하는 약제학적 조성물을 제공한다:

[0057] (A) 전술한 방법 중 어느 하나에 의해 생산된 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, 상기 rAAV는 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태에 대한 치료제인 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식 유전자 카세트를 포함하고, 그리고 상기 약제학적 조성물은 유효량의 상기 rAAV 제제를 함유하는 제제; 및

[0058] (B) 약제학적으로 허용 가능한 담체.

[0059] 본 발명은 전술한 방법 중 임의의 것에 의해 생산된 재조합적으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, rAAV는 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 제제, 또는 전술한 약제학적 조성물로서, 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태의 치료에 사용하기 위한 제제 또는 약제학적 조성물을 추가로 제공한다.

도면의 간단한 설명

[0060] **도 1**은 야생형(**Wt**) AAV 게놈의 도식적인 유전자 지도를 제공한다.

도 2는 야생형 AAV2 게놈 **(1)**, 재조합 AAV (rAAV) **(2)**, 보완 "AAV 헬퍼 플라스미드" **(3)** 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드 ("Ad 헬퍼 플라스미드") **(4)**의 구조적 도메인의 개략도를 제공한다. 야생형(Wt) AAV2**(1)**는 AAV 특이적 회문형 역전 말단 반복 서열(**ITR**), **Rep** 단백질을 인코딩하는 유전자를 함유하는 5' 절반 및 **Cap** 단백질을 인코딩하는 유전자를 포함하는 3' 절반으로 구성된다. rAAV**(2)**는 야생형(Wt) AAV2**(1)**의 **Rep** 및 **Cap** 인코딩 유전자를 프로모터(**Pro**), 관심 있는 외인성 이식유전자 및 폴리아데닐화 부위(**pA**)를 포함하는 이식유전자 카세트로 대체하여 형성된다. rAAV**(2)**를 생산하기 위해, 보완 "AAV 헬퍼" 플라스미드 벡터**(3)** 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드 벡터(Ad 헬퍼 플라스미드)**(4)**가 제공된다. 보완 AAV 헬퍼 플라스미드(3)는 **Rep** 및 **Cap** 단백질을 제공한다. Ad 헬퍼 플라스미드**(4)**는 아데노바이러스 단백질 E1a, E1b, E2a, VA 및 E4를 제공한다.

도 3은 AAV 헬퍼 플라스미드 벡터 **pAAV-RC2**의 지도를 보여준다.

도 4는 비-AAV 헬퍼 플라스미드 벡터 **pHelper-Kan**의 지도를 보여준다.

도 5는 rAAV 플라스미드 벡터 **pAV-CMV-EGFP**의 지도를 보여준다.

도 6은 rAAV 플라스미드 벡터 **pAV-TBG-EGFP**의 지도를 보여준다.

도 7a 내지 7c는 형질감염된 세포에 의한 rAAV의 생산에 대한 양이온 및 양이온 농도의 효과를 보여준다. **도 7a**는 형질감염된 세포에서 향상된 녹색 형광 단백질(**EGFP**)의 발현 정도 및 감염 센터 검정을 사용한 rAAV 스톡의 역가를 보여준다. 추가로 첨가된 NaCl, KCl, $CaCl_2$ 또는 $MgCl_2$의 존재하에 둘베코 변형 이글 배지에서 형질감염된 HEK293 세포를 성장시켜 스톡을 생산하였다. 이러한 제공된 염의 추가 농도는 0, 20, 40, 60, 80 또는 100 mM이다. **도 7a**는 감염 센터 검정을 보여준다. **도 7b**는 AAV 벡터의 역가 및 염 농도의 배수 변화 그래프이다. **도 7c**는 양이온 및 양이온 농도의 함수로서 AAV의 전체 게놈(TG)의 배수 변화 그래프이다. 도면에 보여진 농도는 이러한 염의 첨가에 의해 제공된 배양 배지에서의 농도 증가이다.

도 8a-8b는 rAAV 스톡의 생산에 대한 양이온 및 양이온 농도의 효과를 보여준다. **도 8a**는 형질감염된 세포에서 향상된 녹색 형광 단백질(**EGFP**)의 발현 정도 및 감염 센터 검정을 사용한 rAAV 스톡의 역가를 보여준다. 추가로 첨가된 12종의 염의 존재하에 둘베코 변형 이글 배지에서 형질감염된 HEK293 세포를 성장시켜 스톡을 생산하였

다. 이러한 제공된 염의 추가 농도는 40, 50, 60 또는 70 mM이다. **도 8a**는 감염 센터 검정을 보여준다. **도 8b**는 AAV 벡터의 역가 및 염 농도의 배수 변화 그래프이다. 도면은 상이한 음이온의 존재 및 상이한 추가로 제공된 이러한 음이온의 농도에서 생성된 rAAV에 대한 rAAV 역가의 배수 변화를 보여준다. 도면에 보여진 농도는 이러한 음이온의 첨가에 의해 제공된 배양 배지에서의 농도 증가이다.

도 9a-9b는 $KHCO_3$의 제공이 다른 이온에 비해 예기치 않게 더 높은 rAAV 역가를 야기함을 입증한다(**도 9a**: 배양 배지에서 AAV 역가의 배수 변화; **도 9b**: 전체 게놈의 배수 변화). 도에 나타난 농도(40, 50, 60 또는 70 mM)는 이러한 $KHCO_3$의 첨가에 의해 제공된 배양 배지의 농도 증가이다.

도 10은 생산된 rAAV의 총량 및 AAV ***rep*** 및 ***cap*** 유전자 기능을 제공하기 위해 Ad 헬퍼 플라스미드, AAV ITR을 제공하는 플라스미드, 향상된 녹색 형광 단백질 인코딩 이식유전자 카세트 및 AAV2 헬퍼 플라스미드 또는 AAV8 헬퍼 플라스미드로 공동-형질감염된 세포에 의해 배지 내로 방출된 rAAV의 양의 배수 변화를 나타낸다. 형질감염 후 2, 4, 6, 8 및 10시간에, KHCO3를 첨가하여 배양 배지에서 30 mM의 추가 농도 및 배지(AAV2-배지 및 AAV8-배지) 내로 방출된 rAAV의 배수 변화를 생성하였고 세포 용해의 전체 게놈(AAV2-전체 및 AAV8-전체)을 형질감염 후 72시간에 평가하였다.

도 11a-11b는 상이한 혈청형의 rAAV 생산의 향상에 대한 $KHCO_3$ 제공의 효과를 보여준다. **도 11a**: 24시간 후 배지 내로 방출된 rAAV의 배수 변화를 나타내고; **도 11b**는 rAAV의 전체 게놈의 배수 변화를 보여주고; $KHCO_3$-30은 배양 배지에서 30 mM의 추가 농도를 생성하기 위해 $KHCO_3$가 첨가되었음을 나타내고; $KHCO_3$-55는 배양 배지에서 55 mM의 추가 농도를 생성하기 위해 $KHCO_3$가 첨가되었음을 나타낸다.

도 12는 $KHCO_3$의 제공에 대한 반응으로 향상된 수준의 rAAV를 생성하는 현탁액에서 배양된 세포의 능력을 보여준다. 배양 배지에서 KHCO3의 농도를 약 20 mM 초과로 증가시키기에 충분한 $KHCO_3$의 제공은 20시간 후 rAAV5 및 rAAV6의 생산을 향상시켰다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] **I. 본 발명의 방법**

[0062] 본 발명은 재조합 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키기 위해 패키징되는 효율을 증가시키는 방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 추가 이온의 투여를 통해 세포 배양 배지의 이온 강도를 증가시킴으로써 형질감염된 세포에 의한 rAAV의 생산 역가를 증가시키는 방법에 관한 것이다.

[0063] 본 명세서에 사용된 용어 "AAV"는 아데노 연관 바이러스를 나타내기 위한 것이고, 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 이 용어는 모든 하위 유형과 자연 발생 및 재조합 형태를 모두 포함한다. 본 명세서에 사용된 용어 "**rAAV**"는 AAV 기원이 아닌 폴리뉴클레오티드 서열(즉, AAV에 이종성인 폴리뉴클레오티드)을 포함하는 AAV의 재조합으로 변형된 버전을 나타내기 위한 것이다. rAAV는 단일 가닥 또는 이중 가닥일 수 있고, 데옥시리보뉴클레오티드 또는 리보뉴클레오티드로 구성될 수 있다.

[0064] 본 명세서에 사용된 용어 "**AAV 헬퍼 기능**"은 rAAV의 복제 및 패키징에 필요한 AAV 단백질(예를 들어, **Rep** 및 **Cap**) 및/또는 AAV의 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 이러한 AAV 헬퍼 기능은 "**AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드**"에 의해 제공되며, 이러한 용어는 본 명세서에 사용되는 바와 같이 바이러스, 플라스미드 벡터, 비-플라스미드 벡터, 또는 세포 염색체 내로 통합된 폴리뉴클레오티드이며, AAV 헬퍼 기능을 제공한다. pAAV-RC(Agilent; Addgene; Cell Biolabs), pAAV-RC2(Cell Biolabs) 등과 같은 **AAV 헬퍼 기능**을 제공하기 위해 본 발명에 따라 사용될 수 있는 AAV 헬퍼 플라스미드는 상업적으로 입수가능하다. 플라스미드 **pAAV-RC2**(**서열번호 1; 도 3**)는 **AAV 헬퍼 기능**을 제공하기 위해 본 발명에 따라 사용될 수 있는 AAV 헬퍼 플라스미드이다.

[0065] 플라스미드 pAAV-RC2의 코딩 가닥(서열번호:1):

ccgggccccc cctcgaggtc gacggtatcg ggggagctcg cagggtctcc
attttgaagc gggaggtttg aacgcgcagc cgccatgccg gggttttacg
agattgtgat taaggtcccc agcgaccttg acgagcatct gcccggcatt
tctgacagct ttgtgaactg ggtggccgag aaggaatggg agttgccgcc
agattctgac atggatctga atctgattga gcaggcaccc ctgaccgtgg
ccgagaagct gcagcgcgac tttctgacgg aatggcgccg tgtgagtaag
gccccggagg ctcttttctt tgtgcaattt gagaagggag agagctactt
ccacatgcac gtgctcgtgg aaaccaccgg ggtgaaatcc atggttttgg
gacgtttcct gagtcagatt cgcgaaaaac tgattcagag aatttaccgc
gggatcgagc cgactttgcc aaactggttc gcggtcacaa agaccagaaa
tggcgccgga ggcgggaaca aggtggtgga tgagtgctac atccccaatt
acttgctccc caaaacccag cctgagctcc agtgggcgtg gactaatatg
gaacagtatt taagcgcctg tttgaatctc acggagcgta aacggttggt
ggcgcagcat ctgacgcacg tgtcgcagac gcaggagcag aacaaagaga
atcagaatcc caattctgat gcgccggtga tcagatcaaa aacttcagcc
aggtacatgg agctggtcgg gtggctcgtg gacaagggga ttacctcgga
gaagcagtgg atccaggagg accaggcctc atacatctcc ttcaatgcgg
cctccaactc gcggtcccaa atcaaggctg ccttggacaa tgcgggaaag
attatgagcc tgactaaaac cgcccccgac tacctggtgg gccagcagcc
cgtggaggac atttccagca atcggattta taaaattttg gaactaaacg
ggtacgatcc ccaatatgcg gcttccgtct ttctgggatg ggccacgaaa
aagttcggca agaggaacac catctggctg tttgggcctg caactaccgg
gaagaccaac atcgcggagg ccatagccca cactgtgccc ttctacgggt
gcgtaaactg gaccaatgag aactttccct tcaacgactg tgtcgacaag
atggtgatct ggtgggagga ggggaagatg accgccaagg tcgtggagtc
ggccaaagcc attctcggag gaagcaaggt gcgcgtggac cagaaatgca
agtcctcggc ccagatagac ccgactcccg tgatcgtcac ctccaacacc
aacatgtgcg ccgtgattga cgggaactca acgaccttcg aacaccagca
gccgttgcaa gaccggatgt tcaaatttga actcacccgc cgtctggatc
atgactttgg gaaggtcacc aagcaggaag tcaaagactt tttccggtgg
gcaaaggatc acgtggttga ggtggagcat gaattctacg tcaaaaaggg
tggagccaag aaaagacccg cccccagtga cgcagatata agtgagccca
aacgggtgcg cgagtcagtt gcgcagccat cgacgtcaga cgcggaagct
tcgatcaact acgcagacag gtaccaaaac aaatgttctc gtcacgtggg
catgaatctg atgctgtttc cctgcagaca atgcgagaga atgaatcaga
attcaaatat ctgcttcact cacggacaga aagactgttt agagtgcttt
cccgtgtcag aatctcaacc cgtttctgtc gtcaaaaagg cgtatcagaa
actgtgctac attcatcata tcatgggaaa ggtgccagac gcttgcactg

[0066]

[0067]

```
cctgcgatct ggtcaatgtg gatttggatg actgcatctt tgaacaataa
atgatttaaa tcaggtatgg ctgccgatgg ttatcttcca gattggctcg
aggacactct ctctgaagga ataagacagt ggtggaagct caaacctggc
ccaccaccac caaagcccgc agagcggcat aaggacgaca gcaggggtct
tgtgcttcct gggtacaagt acctcggacc cttcaacgga ctcgacaagg
gagagccggt caacgaggca gacgccgcgg ccctcgagca cgacaaagcc
tacgaccggc agctcgacag cggagacaac ccgtacctca agtacaacca
cgccgacgcg gagtttcagg agcgccttaa agaagatacg tcttttgggg
gcaacctcgg acgagcagtc ttccaggcga aaaagagggt tcttgaacct
ctgggcctgg ttgaggaacc tgttaagacg gctccgggaa aaaagaggcc
ggtagagcac tctcctgtgg agccagactc ctcctcggga accggaaagg
cgggccagca gcctgcaaga aaaagattga attttggtca gactggagac
gcagactcag tacctgaccc ccagcctctc ggacagccac cagcagcccc
ctctggtctg ggaactaata cgatggctac aggcagtggc gcaccaatgg
cagacaataa cgagggcgcc gacggagtgg gtaattcctc gggaaattgg
cattgcgatt ccacatggat gggcgacaga gtcatcacca ccagcacccg
aacctgggcc ctgcccacct acaacaacca cctctacaaa caaatttcca
gccaatcagg agcctcgaac gacaatcact actttggcta cagcacccct
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccactttt caccacgtga
ctggcaaaga ctcatcaaca acaactgggg attccgaccc aagagactca
acttcaagct ctttaacatt caagtcaaag aggtcacgca gaatgacggt
acgacgacga ttgccaataa ccttaccagc acggttcagg tgtttactga
ctcggagtac cagctcccgt acgtcctcgg ctcggcgcat caaggatgcc
tcccgccgtt cccagcagac gtcttcatgg tgccacagta tggatacctc
accctgaaca acgggagtca ggcagtagga cgctcttcat tttactgcct
ggagtacttt ccttctcaga tgctgcgtac cggaaacaac tttaccttca
gctacacttt tgaggacgtt ccttttccaca gcagctacgc tcacagccag
agtctggacc gtctcatgaa tcctctcatc gaccagtacc tgtattactt
gagcagaaca aacactccaa gtggaaccac cacgcagtca aggcttcagt
tttctcaggc cggagcgagt gacattcggg accagtctag gaactggctt
cctggaccct gttaccgcca gcagcgagta tcaaagacat ctgcggataa
caacaacagt gaatactcgt ggactggagc taccaagtac cacctcaatg
gcagagactc tctggtgaat ccgggcccgg ccatggcaag ccacaaggac
gatgaagaaa agttttttcc tcagagcggg gttctcatct ttgggaagca
aggctcagag aaaacaaatg tggacattga aaaggtcatg attacagacg
aagaggaaat caggacaacc aatcccgtgg ctacggagca gtatggttct
gtatctacca acctccagag aggcaacaga caagcagcta ccgcagatgt
caacacacaa ggcgttcttc caggcatggt ctggcaggac agagatgtgt
accttcaggg gcccatctgg gcaaagattc cacacacgga cggacatttt
cacccctctc ccctcatggg tggattcgga cttaaacacc ctcctccaca
gattctcatc aagaacaccc cggtacctgc gaatccttcg accaccttca
gtgcggcaaa gtttgcttcc ttcatcacac agtactccac gggacaggtc
agcgtggaga tcgagtggga gctgcagaag gaaaacagca aacgctggaa
tcccgaaatt cagtacactt ccaactacaa caagtctgtt aatgtggact
ttactgtgga cactaatggc gtgtattcag agcctcgccc cattggcacc
agatacctga ctcgtaatct gtaattgctt gttaatcaat aaaccgttta
attcgtttca gttgaacttt ggtctctgcg tatttctttc ttatctagtt
tccatgctct aggatccact agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg
ctttgtagtt aatgattaac ccgccatgct acttatctac gtagccatgc
tctagaggtc ctgtattaga ggtcacgtga gtgttttgcg acattttgcg
```

acaccatgtg gtcacgctgg gtatttaagc ccgagtgagc acgcagggtc
tccatttga agcgggaggt ttgaacgcgc agccgccaag ccgaattctg
cagatatcca aacactggcg gccgctcgac tagagcggcc gccaccgcgg
tggagctcca gcttttgttc cctttagtga gggttaattg cgcgcttggc
gtaatcatgg tcatagctgt ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa
ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa agtgtaaagc ctggggtgcc
taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac tgcccgcttt
ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg
cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact
gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc
aaaggcggta atacggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga
acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca ggaaccgtaa aaaggccgcg
ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa
tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc
aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg
ccgcttaccg gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct
ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct
ccaagctggg ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccga ccgctgcgcc
ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac acgacttatc
gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag
gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga
agaacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa
aagagttggt agctcttgat ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg
gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa
gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa
ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct
agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat
gagtaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat
ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg
tgtagataac tacgatacgg gagggcttac catctggccc cagtgctgca
atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa
ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg
cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg
ccagttaata gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt
gtcacgctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat
caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggttagctcc
ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag tgttatcact
catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa
gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag
tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac
cgcgccacat agcagaactt taaaagtgct catcattgga aaacgttctt
cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg
taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag
cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa
taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat
tattgaagca tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga
atgtatttag aaaaataaac aaatagggggt tccgcgcaca tttccccgaa
aagtgccacc taaattgtaa gcgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa
atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga aatcggcaaa
atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc

[0068]

agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag
ggcgaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc
taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc
taaagggagc ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtgg
cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca
agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acacccgccg cgcttaatgc
gccgctacag ggcgcgtccc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg
aagggcgatc ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg
ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta acgccagggt tttcccagtc
acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagcg cgcgtaatac gactcactat
agggcgaatt gggta

[0069]

[0070] **서열번호:1**에서, **pAAV-RC2**의 잔기 85-1950은 **Rep** 단백질인 **Rep78**을 인코딩하고(잔기 484-663은 **P19** 프로모터에 상응하고, 잔기 1464-1643은 **P40** 프로모터에 상응하고, 잔기 1668-1676은 공여체 부위임); 잔기 1967-4174는 캡시드 단백질인 **VP1**을 인코딩하고; 잔기 1992-2016은 **Rep68** 단백질의 일부를 인코딩하고; 잔기 4175-4256은

polyA 서열을 인코딩하고; 잔기 4610-4626은 *M13 Rev* 서열이고; 잔기 4634-4650은 *Lac* 작동자 서열이고; 4658-4688은 *Lac* 프로모터 서열이고; 잔기 4951-5675는 pMB ori 서열에 상응하고, 잔기 5771-6631은 암피실린 내성 결정인자를 인코딩하고; 그리고 잔기 6632-6730은 *bla* 프로모터 서열이다(**도 3**).

[0071] 본 명세서에 사용된 용어 "**비-AAV 헬퍼 기능**"은 Ad, CMV, HSV 또는 기타 비-AAD 바이러스(예를 들어, E1a, E1b, E2a, VA 및 E4)의 단백질 및/또는 rAAV의 복제 및 패키징에 필요한 Ad, CMV, HSV 또는 다른 비-AAD 바이러스의 폴리뉴클레오티드를 나타낸다. 이러한 비-AAV 헬퍼 기능은 "**비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드**"에 의해 제공되며, 이러한 용어는 본 명세서에 사용되는 바와 같이 바이러스, 플라스미드 벡터, 비-플라스미드 벡터, 또는 세포 염색체 내로 통합된 폴리뉴클레오티드이며, 비-AAV 헬퍼 기능을 제공한다. 벡터, **pHelper** 및 이의 유도체(Cell Biolabs, Inc., Invitrogen 및 Stratagene에서 상업적으로 입수 가능)는 적합한 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드이다(예를 들어, 문헌[Matsushita, T. 등 (1998) "*Adeno-Associated Virus Vectors Can Be Efficiently Produced Without Helper Virus*," Gene Ther. 5:938-945; Sharma, A. 등 (2010) "*Transduction Efficiency Of AAV 2/6, 2/8 And 2/9 Vectors For Delivering Genes In Human Corneal Fibroblasts*," Brain Res. Bull. 81(2-3):273-278] 참조) 플라스미드 **pHelper-Kan**(**서열번호:2; 도 4**)은 **비-AAV 헬퍼 기능**을 제공하기 위해 본 발명에 따라 사용될 수 있는 **비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드**이다.

[0072] 플라스미드 pHelper-Kan의 코딩 가닥(서열번호:2):

ggtacccaac tccatgctta acagtcccca ggtacagccc accctgcgtc
gcaaccagga acagctctac agcttcctgg agcgccactc gccctacttc
cgcagccaca gtgcgcagat taggagcgcc acttcttttt gtcacttgaa
aaacatgtaa aaataatgta ctaggagaca ctttcaataa aggcaaatgt
ttttatttgt acactctcgg gtgattattt acccccccacc cttgccgtct
gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgct atgcgccact
ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgctccact taaactcagg
cacaaccatc cgcggcagct cggtgaagtt ttcactccac aggctgcgca
ccatcaccaa cgcgtttagc aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag
ttggggcctc cgccctgcgc gcgcgagttg cgatacacag ggttgcagca
ctggaacact atcagcgccg ggtggtgcac gctggccagc acgctcttgt
cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga
gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggtgcatgcc caggctttga
gttgcactcg caccgtagtg gcatcagaag gtgaccgtgc ccggtctggg
cgttaggata cagcgcctgc atgaaagcct tgatctgctt aaaagccacc
tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg ccgcaagact tgccggaaaa
ctgattggcc ggacaggccg cgtcatgcac gcagcacctt gcgtcggtgt
tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttggcc
ttgctagact gctccttcag cgcgcgctgc ccgttttcgc tcgtcacatc
catttcaatc acgtgctcct tatttatcat aatgctcccg tgtagacact
taagctcgcc ttcgatctca gcgcagcggt gcagccacaa cgcgcagccc
gtgggctcgt ggtgcttgta ggttacctct gcaaacgact gcaggtacgc
ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg ctggtgaagg
tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttta gccaggtctt gcatacggcc
gccagagctt ccacttggtc aggcagtagc ttgaagtttg cctttagatc
gttatccacg tggtacttgt ccatcaacgc gcgcgcagcc tccatgccct
tctcccacgc agacacgatc ggcaggctca gcgggtttat caccgtgctt
tcactttccg cttcactgga ctcttccttt tcctcttgcg tccgcatacc
ccgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcaccgtg cgcttacctc
ccttgccgtg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt
agcgccacat cttctctttc ttcctcgctg tccacgatca cctctgggga
tggcgggcgc tcgggcttgg gagaggggcg cttcttttc tttttggacg
caatggccaa atccgccgtc gaggtcgatg gccgcgggct gggtgtgcgc
ggcaccagcg catcttgtga cgagtcttct tcgtcctcgg actcgagacg
ccgcctcagc cgcttttttg ggggcgcgcg gggaggcggc ggcgacggcg
acggggacga cacgtcctcc atggttggtg gacgtcgcgc cgcaccgcgt
ccgcgctcgg gggtggtttc gcgctgctcc tcttcccgac tggccatttc
cttctcctat aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aaggaggaca
gcctaaccgc ccccttgag ttcgccacca ccgcctccac cgatgccgcc
aacgcgccta ccaccttccc cgtcgaggca cccccgcttg aggaggagga
agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac gacgaggatc
gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacga cgcagaggca
aacgaggaac aagtcgggcg gggggaccaa aggcatggcg actacctaga
tgtgggagac gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta
tctgcgacgc gttgcaagag cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat
[0073] gtcagccttg cctacgaacg ccacctgttc tcaccgcgcg tacccccaa

[0074]

acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc aacttctacc
ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa
aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa
gcagctggcc ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgctcg
acgaagtgcc aaaaatcttt gagggtcttg gacgcgacga gaaacgcgcg
gcaaacgctc tgcaacaaga aaacagcgaa aatgaaagtc actgtggagt
gctggtggaa cttgagggtg acaacgcgcg cctagccgtg ctgaaacgca
gcatcgaggt cacccacttt gcctacccgg cacttaacct acccccaag
gttatgagca cagtcatgag cgagctgatc gtgcgccgtg cacgacccct
ggagagggat gcaaacttgc aagaacaaac cgaggagggc ctacccgcag
ttggcgatga gcagctggcg cgctggcttg agacgcgcga gcctgccgac
ttggaggagc gacgcaagct aatgatggcc gcagtgcttg ttaccgtgga
gcttgagtgc atgcagcggt tctttgctga cccggagatg cagcgcaagc
tagaggaaac gttgcactac acctttcgcc agggctacgt gcgccaggcc
tgcaaaattt ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctcct accttggaat
tttgcacgaa aaccgcctcg ggcaaaacgt gcttcattcc acgctcaagg
gcgaggcgcg ccgcgactac gtccgcgact gcgtttactt atttctgtgc
tacacctggc aaacggccat gggcgtgtgg cagcaatgcc tggaggagcg
caacctaaag gagctgcaga agctgctaaa gcaaaacttg aaggacctat
ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacattatc
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac
cagtcaaagc atgttgcaaa actttaggaa ctttatccta gagcgttcag
gaattctgcc cgccacctgc tgtgcgcttc ctagcgactt tgtgcccatt
aagtaccgtg aatgccctcc gccgctttgg ggtcactgct accttctgca
gctagccaac taccttgcct accactccga catcatggaa gacgtgagcg
gtgacggcct actggagtgt cactgtcgct gcaacctatg caccccgcac
cgctccctgg tctgcaattc gcaactgctt agcgaaagtc aaattatcgg
taccttgag ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtcc gcggctccgg
ggttgaaact cactccgggg ctgtggacgt cggcttacct tcgcaaattt
gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt aggttctacg aagaccaatc
ccgcccgcca aatgcggagc ttaccgcctg cgtcattacc cagggccaca
tccttggcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta
cgaaagggac ggggggttta cctggacccc cagtccggcg aggagctcaa
cccaatcccc ccgccgccgc agccctatca gcagccgcgg gcccttgctt
cccaggatgg cacccaaaaa gaagctgcag ctgccgccgc cgccacccac
ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc agaggaggtt ttggacgagg
aggaggagat gatggaagac tgggacagcc tagacgaagc ttccgaggcc
gaagaggtgt cagacgaaac accgtcaccc tcggtcgcat tcccctcgcc
ggcgccccag aaattggcaa ccgttcccag catcgctaca acctccgctc
ctcaggcgcc gccggcactg cctgttcgcc gacccaaccg tagatgggac
accactggaa ccagggccgg taagtctaag cagccgccgc cgttagccca
agagcaacaa cagcgccaag gctaccgctc gtggcgcggg cacaagaacg
ccatagttgc ttgcttgcaa gactgtgggg gcaacatctc cttcgcccgc
cgctttcttc tctaccatca cggcgtggcc ttcccccgta acatcctgca
ttactaccgt catctctaca gcccctactg caccggcggc agcggcagcg
gcagcaacag cagcggtcac acagaagcaa aggcgaccgg atagcaagac
tctgacaaag cccaagaaat ccacagcggc ggcagcagca ggaggaggag
cgctgcgtct ggcgcccaac gaacccgtat cgacccgcga gcttagaaat
aggatttttc ccactctgta tgctatattt caacaaagca ggggccaaga
acaagagctg aaaataaaaa acaggtctct gcgctccctc acccgcagct

[0075]

```
gcctgtatca caaaagcgaa gatcagcttc ggcgcacgct ggaagacgcg
gaggctctct tcagcaaata ctgcgcgctg actcttaagg actagtttcg
cgccctttct caaatttaag cgcgaaaact acgtcatctc cagcggccac
acccggcgcc agcacctgtc gtcagcgcca ttatgagcaa ggaaattccc
acgccctaca tgtggagtta ccagccacaa atgggacttg cggctggagc
tgcccaagac tactcaaccc gaataaacta catgagcgcg ggaccccaca
tgatatcccg ggtcaacgga atccgcgccc accgaaaccg aattctcctc
gaacaggcgg ctattaccac cacacctcgt aataacctta atccccgtag
ttggcccgct gccctggtgt accaggaaag tcccgctccc accactgtgg
tacttcccag agacgcccag gccgaagttc agatgactaa ctcaggggcg
cagcttgcgg gcggctttcg tcacagggtg cggtcgcccg ggcgttttag
ggcggagtaa cttgcatgta ttgggaattg tagtttttt aaaatgggaa
gtgacgtatc gtgggaaaac ggaagtgaag atttgaggaa gttgtgggtt
ttttggcttt cgtttctggg cgtaggttcg cgtgcggttt tctgggtgtt
ttttgtggac tttaaccgtt acgtcatttt ttagtcctat atatactcgc
tctgtacttg gccctttta cactgtgact gattgagctg gtgccgtgtc
gagtggtgtt ttttaatagg tttttttact ggtaaggctg actgttatgg
ctgccgctgt ggaagcgctg tatgttgttc tggagcggga gggtgctatt
ttgcctaggc aggagggttt ttcaggtgtt tatgtgtttt tctctcctat
taattttgtt atacctccta tgggggctgt aatgttgtct ctacgcctgc
gggtatgtat tcccccgggc tatttcggtc gctttttagc actgaccgat
gttaaccaac ctgatgtgtt taccgagtct tacattatga ctccggacat
gaccgaggaa ctgtcggtgg tgctttttaa tcacggtgac cagttttttt
acggtcacgc cggcatggcc gtagtccgtc ttatgcttat aagggttgtt
tttcctgttg taagacaggc ttctaatgtt taaatgtttt ttttttgtt
attttatttt gtgtttaatg caggaacccg cagacatgtt tgagagaaaa
atggtgtctt tttctgtggt ggttccggaa cttacctgcc tttatctgca
tgagcatgac tacgatgtgc ttgctttttt gcgcgaggct ttgcctgatt
ttttgagcag caccttgcat tttatatcgc cgcccatgca acaagcttac
ataggggcta cgctggttag catagctccg agtatgcgtg tcataatcag
tgtgggttct tttgtcatgg ttcctggcgg ggaagtggcc gcgctggtcc
gtgcagacct gcacgattat gttcagctgg ccctgcgaag ggacctacgg
gatcgcggta tttttgttaa tgttccgctt ttgaatctta tacaggtctg
tgaggaacct gaatttttgc aatcatgatt cgctgcttga ggctgaaggt
ggagggcgct ctggagcaga tttttacaat ggccggactt aatattcggg
atttgcttag agacatattg ataaggtggc gagatgaaaa ttatttgggc
atggttgaag gtgctggaat gtttatagag gagattcacc ctgaagggtt
tagcctttac gtccacttgg acgtgagggc agtttgcctt ttggaagcca
ttgtgcaaca tcttacaaat gccattatct gttctttggc tgtagagttt
gaccacgcca ccggagggga gcgcgttcac ttaatagatc ttcattttga
ggttttggat aatcttttgg aataaaaaaa aaaaaacatg gttcttccag
ctcttcccgc tcctcccgtg tgtgactcgc agaacgaatg tgtaggttgg
ctgggtgtgg cttattctgc ggtggtggat gttatcaggg cagcggcgca
tgaaggagtt tacatagaac ccgaagccag ggggcgcctg gatgctttga
gagagtggat atactacaac tactacacag agcgagctaa gcgacgagac
cggagacgca gatctgtttg tcacgcccgc acctggtttt gcttcaggaa
atatgactac gtccggcgtt ccatttggca tgacactacg accaacacga
tctcggttgt ctcggcgcac tccgtacagt agggatcgcc tacctccttt
tgagacagag acccgcgcta ccatactgga ggatcatccg ctgctgcccg
aatgtaacac tttgacaatg cacaacgtga gttacgtgcg aggtcttccc
```

[0076]

```
tgcagtgtgg gatttacgct gattcaggaa tgggttgttc cctgggatat
ggttctgacg cgggaggagc ttgtaatcct gaggaagtgt atgcacgtgt
gcctgtgttg tgccaacatt gatatcatga cgagcatgat gatccatggt
tacgagtcct gggctctcca ctgtcattgt tccagtcccg gttccctgca
gtgcatagcc ggcgggcagg ttttggccag ctggtttagg atggtggtgg
atggcgccat gtttaatcag aggtttatat ggtaccggga ggtggtgaat
tacaacatgc caaaagaggt aatgtttatg tccagcgtgt ttatgagggg
tcgccactta atctacctgc gcttgtggta tgatggccac gtgggttctg
tggtccccgc catgagcttt ggatacagcg ccttgcactg tgggattttg
aacaatattg tggtgctgtg ctgcagttac tgtgctgatt taagtgagat
cagggtgcgc tgctgtgccc ggaggacaag gcgtctcatg ctgcgggcgg
tgcgaatcat cgctgaggag accactgcca tgttgtattc ctgcaggacg
gagcggcggc ggcagcagtt tattcgcgcg ctgctgcagc accaccgccc
tatcctgatg cacgattatg actctacccc catgtaggcg tggacttccc
cttcgccgcc cgttgagcaa ccgcaagttg gacagcagcc tgtggctcag
cagctggaca gcgacatgaa cttaagcgag ctgcccgggg agtttattaa
tatcactgat gagcgtttgg ctcgacagga aaccgtgtgg aatataacac
ctaagaatat gtctgttacc catgatatga tgctttttaa ggccagccgg
ggagaaagga ctgtgtactc tgtgtgttgg gagggaggtg gcaggttgaa
tactagggtt ctgtgagttt gattaaggta cggtgatcaa tataagctat
gtggtggtgg ggctatacta ctgaatgaaa aatgacttga aattttctgc
aattgaaaaa taaacacgtt gaaacataac atgcaacagg ttcacgattc
tttattcctg ggcaatgtag gagaaggtgt aagagttggt agcaaaagtt
tcagtggtgt attttccact ttcccaggac catgtaaaag acatagagta
agtgcttacc tcgctagttt ctgtggattc actagaatcg atgtaggatg
ttgcccctcc tgacgcggta ggagaagggg agggtgccct gcatgtctgc
cgctgctctt gctcttgccg ctgctgagga gggggggcgca tctgccgcag
caccggatgc atctgggaaa agcaaaaaag gggctcgtcc ctgtttccgg
aggaatttgc aagcggggtc ttgcatgacg gggaggcaaa cccccgttcg
ccgcagtccg gccggcccga gactcgaacc gggggtcctg cgactcaacc
cttggaaaat aaccctccgg ctacagggag cgagccactt aatgctttcg
ctttccagcc taaccgctta cgccgcgcgc ggccagtggc caaaaaagct
agcgcagcag ccgccgcgcc tggaaggaag ccaaaaggag cgctcccccg
ttgtctgacg tcgcacacct gggttcgaca cgcgggcggt aaccgcatgg
atcacggcgg acggccggat ccggggttcg aaccccggtc gtccgccatg
ataccttgc gaatttatcc accagaccac ggaagagtgc ccgcttacag
gctctccttt tgcacggtct agagcgtcaa cgactgcgca cgcctcaccg
gccagagcgt cccgaccatg gagcacttttt tgccgctgcg caacatctgg
aaccgcgtcc gcgactttcc gcgcgcctcc accaccgccg ccggcatcac
ctggatgtcc aggtacatct acggattacg tcgacgttta aaccatatga
tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa
cgcaggaaag aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta
aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgccc ccctgacgag
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact
ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg
ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga
agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta
ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg
accgctgcgc cttatccggt aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc
```

```
gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg cctaactacg
gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt
accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc
tggtagcggt ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa
aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag
tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcatgagat tatcaaaaag
gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct
aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gtcagaagaa ctcgtcaaga
aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag
cacgaggaag cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca gcaatatcac
gggtagccaa cgctatgtcc tgatagcggt ccgccacacc cagccggcca
cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt tccaccatga tattcggcaa
gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc ctcgccgtcg ggcatgctcg
ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg atgctcttcg
tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg
ctcgatgcga tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa
gcgtatgcag ccgccgcatt gcatcagcca tgatggatac tttctcggca
ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc cccggcactt cgcccaatag
cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagtaca gctgcgcaag
gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgcagt
tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc
ctgcgctgac agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt
gtgcccagtc atagccgaat agcctctcca cccaagcggc cggagaacct
gcgtgcaatc catcttgttc aatcatactc ttccttttc aatattattg
aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata tttgaatgta
tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg
ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt
tgttaaatca gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc
ttataaatca aaagaataga ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt
ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg actccaacgt caaagggcga
aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat caccctaatc
aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag
ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga
aaggaaggga agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt
agcggtcacg ctgcgcgtaa ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc
tacagggcgc gatggatcc
```

[0077]

[0078] **서열번호:2**에서, **pHelper-Kan**의 잔기 1-5343은 아데노바이러스로부터 유래되었으며, **E2A** 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(잔기 258-1847)를 포함하고; 잔기 5344-8535는 아데노바이러스로부터 유래되고, **E4orf6** 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 잔기 9423-10011은 ori 서열에 해당하고; 잔기 10182-10976은 *bla* 프로모터 서열(잔기 10977-11081)에 의해 발현되는 카나마이신 내성 결정인자를 인코딩하고; 잔기 11107-11561은 f1 ori 서열에 해당한다(**도 4**).

[0079] 상기 논의된 바와 같이, **AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드** 및 **비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드**는 전형적으로 삼중 플라스미드 형질감염 시스템을 포함하기 위해 rAAV 플라스미드 벡터와 협력하여 사용된다. 다수의 상업적으로 입수가능한 rAAV 플라스미드 벡터(예를 들어, **pAV-CMV-EGFP**, **pGOI** 등(Cell Biolabs, Inc., Invitrogen 및 Stratagene))가 본 발명에 따라 사용될 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 예시적인 rAAV 플라스미드 벡터는 5' ITR, U6 프로모터, CMV 인핸서 및 프로모터 서열, 향상된 녹색 형광 단백질(**EGFP**)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 (Gambotto, A. 등 (2000) "*Immunogenicity Of* Enhanced *Green Fluorescent Protein (EGFP) In BALB/C Mice: Identification Of An H2-Kd-Restricted CTL Epitope*," Gene Ther. 7(23):2036-2040; Tsien, R.Y. (1998) "*The Green Fluorescent Protein*," Annu. Rev. Biochem. 67:509-544; Cinelli, R.A. 등 (2000) "*The Enhanced Green Fluorescent Protein As A Tool For The Analysis Of Protein Dynamics And Localization: Local Fluorescence Study At The Single-Molecule Level*," Photochem. Photobiol. 71(6):771-776; Chopra A. (2008) "*Recombinant Adenovirus With Enhanced Green Fluorescent Protein*," In: Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD), National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD), 발현된 단백질의 회수 또는 국재화를 촉진하기 위한 FLAG 태그 및 6xHis 태그 부위, SV40 폴리(A) 부위 및 3' ITR을 포함하는 **pAV-CMV-EGFP**(**서열번호:3; 도 5**)이다.

[0080] 플라스미드 pAV-CMV-EGFP의 코딩 가닥(서열번호:3):

```
cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg
ggcgaccttt ggtcgcccgg ccctccagtg agcgagcgcg cagagaggga
gtggccaact ccatcactag gggttcctgc ggccgcacgc gtctagttat
taatagtaat cgaattcgtg ttactcataa ctagtaaggt cgggcaggaa
gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac gatacaaggc
tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag
tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt
ttaaaattat gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa
gtatttcgat ttcttgggtt tatatatctt gtggaaagga cgcgggatcc
actggaccag gcagcagcgt cagaagactt ttttggaaaa gcttgactag
taatactgta atagtaatca attacggggt cattagttca tagcccatat
atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc
gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag
taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg
taaactgccc acttggcagt acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc
ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc cgcctggcat tatgcccagt
acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta cgtattagtc
atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg
```

[0081]

[0082]

```
atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca
atgggagttt gttttgcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta
acaactccgc cccattgacg caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag
gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac cgtcagatcc gctagagatc
cggtaccgag gagatctgcc gccgcgatcg ccggcgcgcc agatctcacg
cttaactagc tagcggaccg acgcgtacgc ggccgctcga gatggtgagc
aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga
cggcgacgta aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg
atgccaccta cggcaagctg accctgaagt tcatctgcac caccggcaag
ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc accctgacct acggcgtgca
gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac ttcttcaagt
ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac
gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct
ggtgaaccgc atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca
tcctggggca caagctggag tacaactaca acagccacaa cgtctatatc
atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag gtgaacttca agatccgcca
caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac cagcagaaca
ccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc
acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt
cctgctggag ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc
tgtacaagta agtcgaggat tataaggatg acgacgataa attcgtcgag
caccaccacc accaccacta ataaggttta tccgatccac cggatctaga
taagatatcc gatccaccgg atctagataa ctgatcataa tcagccatac
cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc
tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt
gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa
taaagcattt ttttcactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca
atgtatctta acgcggtaac cacgtgcgga ccgagcggcc gcaggaaccc
ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga
ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct
cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc aggggcgcct gatgcggtat
tttctcctta cgcatctgtg cggtatttca caccgcatac gtcaaagcaa
ccatagtacg cgccctgtag cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt
tacgcgcagc gtgaccgcta cacctgccag cgccttagcg cccgctcctt
tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt tccccgtcaa
gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca
cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggccat
cgccctgata gacggttttt cgcccttga cgttggagtc cacgttcttt
aatagtggac tcttgttcca aactggaaca acactcaacc ctatctcggg
ctattctttt gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa
aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta
acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc
atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac
gggcttgtct gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc
gggagctgca tgtgtcagag gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag
acgaaagggc ctcgtgatac gcctatttttt ataggttaat gtcatgataa
taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa tgtgcgcgga
acccctattt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat
gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta
tgagtattca acatttccgt gtcgccctta ttccctttttt tgcggcattt
```

```
tgccttcctg tttttgctca cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc
tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta catcgaactg gatctcaaca
gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt tccaatgatg
agcacttttа aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc
cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg
ttgagtactc accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta
agagaattat gcagtgctgc cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa
cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa ggagctaacc gcttttttgc
acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga accggagctg
aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat
ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt
cccggcaaca attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca
cttctgcgct cggcccttcc ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg
agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat tgcagcactg gggccagatg
gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag tcaggcaact
atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa
gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt
taaaacttca tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat cctttttgat
aatctcatga ccaaaatccc ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc
agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc ttgagatcct ttttttctgc
gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc agcggtggtt
tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt
cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag
gccaccactt caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta
atcctgttac cagtggctgc tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg
gttggactca agacgatagt taccggataa ggcgcagcgg tcgggctgaa
cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac ctacaccgaa
ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg
gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc
gcacgaggga gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc
gggtttcgcc acctctgact tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg
ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa cgcggccttt ttacggttcc
tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt
```

[0083]

[0084] **서열번호:3**에서, **pAV-CMV-EGFP**의 잔기 1-128은 5' ITR에 해당하고; 잔기 201-441은 U6 프로모터 서열이고; 잔기 562-865는 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 전초기 인핸서 서열이고; 잔기 866-1068은 CMV 전초기 프로모터를 포함하고; 잔기 1192-1911은 EGFP를 인코딩하는 포유동물 코돈 최적화 폴리뉴클레오티드를 포함하고; 잔기 1918-1941은 FLAG-태그를 인코딩하고; 잔기 1951-1968은 6xHis-태그를 인코딩하고; 잔기 2139-2260은 SV40 폴리(A) 서열을 인코딩하고; 잔기 2293-2433은 3' ITR에 해당하고; 잔기 2508-22963은 F1 ori 서열에 해당하고; 잔기 3350-4210은 *bla* 프로모터 서열(잔기 3245-3349)에 의해 발현되는 암피실린 내성 결정인자 및 이의 신호 서열(잔기 3350-3418)을 인코딩하고; 잔기 4381-4969는 ori 서열에 해당한다(**도 5**).

[0085] 본 발명에 따라 사용될 수 있는 제2 예시적인 rAAV 플라스미드 벡터는 5' ITR, 갑상선 호르몬-결합 글로불린(TBG) 프로모터, 향상된 녹색 형광 단백질 (EGFP)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드, 발현된 단백질의 회수 또는 국소화(localization)를 용이하게 하기 위한 FLAG-태그 및 6xHis-태그 부위, SV40 폴리(A) 부위 및 3' ITR을 포함하는 **pAV-TBG-EGFP** (**서열번호:4; 도 6**)이다.

[0086] 플라스미드 pAV-TBG-EGFP의 코딩 가닥(서열번호:4):

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg
ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg
gagtggccaa ctccatcact aggggttcct gcggccggtc gcgtctagta
ctagtaggtt aatttttaaa aagcagtcaa aagtccaagt ggcccttggc
agcatttact ctctctgttt gctctggtta ataatctcag gagcacaaac
attccagatc caggttaatt tttaaaaagc agtcaaaagt ccaagtggcc
cttggcagca tttactctct ctgtttgctc tggttaataa tctcaggagc
acaaacattc cagatccggc gcgccagggc tggaagctac ctttgacatc
atttcctctg cgaatgcatg tataatttct acagaaccta ttagaaagga
tcacccagcc tctgcttttg tacaactttc ccttaaaaaa ctgccaattc
cactgctgtt tggcccaata gtgagaactt tttcctgctg cctcttggtg
cttttgccta tggcccctat tctgcctgct gaagacactc ttgccagcat
ggacttaaac ccctccagct ctgacaatcc tctttctctt ttgttttaca
tgaagggtct ggcagccaaa gcaatcactc aaagttcaaa ccttatcatt
ttttgctttg ttcctcttgg ccttggtttt gtacatcagc tttgaaaata
ccatcccagg gttaatgctg gggttaattt ataactaaga gtgctctagt
tttgcaatac aggacatgct ataaaaatgg aaagatgttg ctttctgaga
gacaggtacc gaggagatct gccgccgcga tcgccaccat ggtgagcaag
ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg
cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg
ccacttacgg caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg
cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg
cttcagccgc taccccgacc acatgaagca gcacgacttc ttcaagtccg
ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac
ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt
gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc
tggggcacaa gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg
gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa
catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag cagaacaccc
ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc
cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct
gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt
acaagtagac gcgtacgcgg ccgctcgagg attataagga tgacgacgat
aaattcgtcg agcaccacca ccaccaccac taataaggtt tatccgatcc
accggatcta gataagatat ccgatccacc ggatctagat aactgatcat
aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt
aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac
aaatttcaca aataaagcat ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt
ccaaactcat caatgtatct taacgcggta accacgtgcg gacccaacgg

[0087]

```
ccgcaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg
ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg
cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct gcaggggcgc
ctgatgcggt attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat
acgtcaaagc aaccatagta cgcgccctgt agcggcacat taagcgcggc
gggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc tacacctgcc agcgccttag
cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct ttctcgccac gttcgccggc
tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac
gtagtgggcc atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag
tccacgttct ttaatagtgg actcttgttc caaactggaa caacactcaa
ctctatctcg ggctattctt ttgatttata agggattttg ccgatttcgg
tctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa cgcgaatttt
aacaaaatat taacgtttac aattttatgg tgcactctca gtacaatctg
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg
acgcgccctg acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct
gtgaccgtct ccgggagctg catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc
gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat acgcctattt ttataggtta
atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac ttttcgggga
aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat
gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa
aaaggaagag tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt
tttgcggcat tttgccttcc tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa
agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc acgagtgggt tacatcgaac
tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc cgaagaacgt
tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc
agaatgactt ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat
ggcatgacag taagagaatt atgcagtgct gccataacca tgagtgataa
cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat cggaggaccg aaggagctaa
ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct tgatcgttgg
gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat
gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac
ttactctagc ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa
gttgcaggac cacttctgcg ctcggccctt ccggctggct ggtttattgc
tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc tcgcggtatc attgcagcac
tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta cacgacgggg
agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc
ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac
tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag
atccttttttg ataatctcat gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt
ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc
ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta
ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa
ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt
agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac
ctcgctctgc taatcctgtt accagtggct gctgccagtg gcgataagtc
gtgtcttacc gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc
ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg
acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac
```

[0088]

```
gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg
gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt
tatagtcctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg
atgctcgtca ggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct
ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat gt
```

[0089]

[0090] **서열번호:4**에서, **pAV-TBG-EGFP**의 잔기 1-130은 5' ITR에 해당하고; 잔기 150-854는 TBG 프로모터 서열이고, 잔기 415-824는 TBG 프로모터를 포함하고; 잔기 886-1608은 EGFP를 인코딩하고; 잔기 1630-1653은 FLAG-태그를 인코딩하고; 잔기 1663-1680은 6xHis-태그를 인코딩하고; 잔기 1851-1972는 폴리(A) 서열을 인코딩하고; 잔기 2005-2145는 3' ITR에 해당하고; 잔기 2220-2675는 F1 ori 서열에 해당하고; 잔기 3062-3922는 *bla* 프로모터 서열(잔기 2957-3061)에 의해 발현되는 암피실린 내성 결정인자 및 이의 신호 서열(잔기 3062-3130)을 인코딩하고; 잔기 4093-4681은 ori 서열에 해당한다(**도 6**).

[0091] 본 명세서에 사용된 용어 "**생산 역가**"는 제제에서 감염성 rAAV의 농도의 양을 나타내기 위한 것이다. 이러한 양

또는 농도는 바람직하게는 이러한 제제에서 AAV 또는 rAAV를 적정함으로써 결정된다. 본 발명의 rAAV 제제의 생산 역가는 바람직하게는 생산 세포(예를 들어, rAAV 플라스미드 벡터, **Rep** 및 **Cap** 단백질을 제공하는 AAV 헬퍼 벡터, 및 필요한 아데노바이러스 전사 및 번역 인자를 제공하는 Ad 헬퍼 벡터)에 대해 3 라운드의 동결/해동에 이어 초음파 처리하여 rAAV 입자를 방출한 후에 적정된다. 그런 다음 제제를 원심분리한다. 이용된 AAV 벡터는 상청액에 국한된다. 제제의 분취량을 프로테이나제 K로 처리하고 AAV 게놈의 수를 결정한다. 제제의 분취량을 HeLa-32C2 세포(AAV2 **Rep** 및 **Cap** 단백질을 발현함)에 감염시키고 감염 역가를 감염 센터 검정(**ICA**)을 사용하여 측정한다 (Fraηois, A. 등 (2018) "*Accurate Titration of Infectious AAV Particles Requires Measurement of Biologically Active Vector Genomes and Suitable Controls*," Molec. Ther. Meth. Clin. Develop. 10:223-236) or more preferably, as the median tissue culture infective dose (**TCID50**) (Zen, Z. 등 (2004) "*Infectious Titer Assay For Adeno-Associated Virus Vectors With Sensitivity Sufficient To Detect Single Infectious Events*," Hum. Gene Ther. 15:709-715).

[0092] 본 명세서에 사용된 바와 같이, rAAV 생산 역가는, 본 발명의 방법의 사용으로부터 수득된 생산 역가가 추가로 제공된 이온이 제공되지 않은 유사하게 수행된 생산으로부터 수득된 역가보다 적어도 10% 초과, 더 바람직하게는 적어도 20% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 30% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 40% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 50% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 60% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 70% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 80% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 90% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 2-배 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 110% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 120% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 130% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 140% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 2.5-배 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 160% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 170% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 180% 초과, 더욱 더 바람직하게는 적어도 190% 초과, 및 더욱 더 바람직하게는 적어도 3-배 초과인 경우 본 방법에 의해 "**증가된**" 이라고 한다.

[0093] 본 발명의 방법을 사용하여 생산 역가가 증가될 수 있는 rAAV는 rAAV가 AAV 캡시드 입자 내에 캡시드화될 수도 있는 rAAV 플라스미드 벡터 내로 패키징되게 하는 임의의 이식유전자 카세트를 포함할 수 있다. 제한 없이, 그러한 이식유전자 카세트(들)는 인간, 영장류 (침팬지, 긴팔원숭이, 고릴라, 오랑우탄 등 포함), 세로피테신 (개코원숭이, 사이노몰구스 원숭이, 벨벳 원숭이 등 포함), 갯과, 설치류 (랫트, 마우스, 햄스터, 기니아 피그 등 포함), 고양이, 양, 염소, 또는 말과 기원의 것일 수 있다.

[0094] 바람직한 구현예에서, 이러한 rAAV 또는 rAAV 플라스미드 벡터는 단백질(예를 들어, 효소, 호르몬, 항체, 수용체, 리간드 등)을 인코딩하거나, 전사된 핵산을 포함하여, 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태과 관련이 있어 그러한 질환 또는 병태를 치료하기 위한 유전자 요법에 사용될 수 있다.

[0095] 본 발명의 방법은 원하는 rAAV 또는 rAAV 플라스미드 벡터로 형질감염된 세포에서 rAAV 및 rAAV 플라스미드 벡터의 생산 역가를 증가시키기 위해 사용될 수 있고, 이러한 하나 이상의 바이러스 및/또는 헬퍼 플라스미드는 이러한 rAAV 또는 AAV 플라스미드 벡터에 의해 제공되지 않지만 이들의 생산에 필요한 단백질 또는 RNA 분자를 제공할 수 있다. 위에서 논의된 바와 같이, 이러한 단백질 또는 RNA 분자는 벡터 전사 조절 및 복제, 바이러스 게놈을 바이러스 캡슐로 패키징하는 데 필요한 **Rep52** 및 **Rep78** 단백질을 인코딩하는 유전자, 및 rAAV의 경우, 감염성 입자를 형성하는 데 필요한 VP 캡시드 단백질을 인코딩하는 ***cap*** 유전자를 포함한다. 이러한 단백질 또는 RNA 분자는 또한 AAV 증식에 필요한 바이러스 전사 및 번역 인자(E1a, E1b, E2a, VA 및 E4)를 포함한다. 본 발명의 rAAV를 생산하기 위한 한 구현예에서, 이들 유전자 및 RNA 분자 모두는 rAAV와 협력하여 이중 플라스미드 형질감염 시스템을 포함하도록 동일한 헬퍼 바이러스(또는 보다 바람직하게는 헬퍼 벡터)에 제공된다. 그러나, 보다 바람직하게는, 본 발명의 rAAV를 생산하기 위해, 필요한 ***rep*** 및 ***cap*** 유전자는 하나의 플라스미드에 의해 제공되고 바이러스 전사 및 번역 인자를 코딩하는 유전자는 두 번째 플라스미드에 제공되어 이러한 플라스미드는 rAAV와의 협력하여 삼중 플라스미드 형질감염 시스템을 포함한다.

[0096] 본 발명의 방법은 AAV1, AAV2, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 및 AAV10 혈청형 및 rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9, 및 rAAV10 혈청형을 포함하고 하이브리드 혈청형(예를 들어, AAV2/5 및 rAAV2/5, 이는 혈청형 2 및 5의 하이브리드이고 따라서 이러한 혈청형 둘 다의 영양성(trophism)을 갖는다)을 포함하는 임의의 혈청역에 속하는 임의의 혈청형에 속하는 rAAV의 생산 역가를 증가시키기 위해 사용될 수 있다.

[0097] 본 발명의 방법은 "헬퍼" RNA 또는 아데노바이러스, 단순 포진 바이러스, 사이토메갈로바이러스, 백시니아 바이러스 또는 파필로마바이러스에 의해 제공되는 단백질을 사용하여 생산될 rAAV의 생산 역가를 향상시키기 위해 사용될 수 있다.

[0098] 본 발명의 방법은 부착성 단층 배양 또는 현탁 배양에서 세포에 의해 생산된 rAAV의 생산 역가를 향상시키기 위해 사용될 수 있고, rAAV를 생산할 수 있는 임의의 방법과 함께 사용될 수 있다. 그러나, 바람직하게는, rAAV는 어린 햄스터 신장(BHK) 세포, 또는 보다 바람직하게는 조직 배양에서 성장한 인간 배아 신장(HEK) 세포를 전술한 플라스미드 벡터로 형질감염시킴으로써 생산된다. 내인성 레트로바이러스가 없는 BHK 세포주 BHK-21(ATCC CCL-10)이 바람직한 BHK 세포주이다. HEK 세포주 HEK293(ATCC CRL-1573) 및 HEK293T(ATCC CRL-3216, 이는 SV40 T-항원에 대한 온도 민감성 유전자가 삽입된 HEK293 세포주의 형질전환 가능성이 높은 유도체임)와 같은 그 유도체 또는 HEK293T/17(ATCC® CRL-11268, 이는 형질감염의 용이성을 위해 선택됨)이 특히 바람직하다. HEK293T/17 SF 세포주(ATCC ACS-4500)는 293T/17 세포주(ATCC CRL-11268)의 유도체이고, 이는 무혈청 배지 및 현탁액에 적합하며 원하는 경우 사용할 수 있다.

[0099] 이러한 세포를 배양하기 위한 본 발명의 바람직한 기본 배지는 이글스 최소 필수 배지 (ATCC 카탈로그 번호 30-2003) 또는 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM; Mediatech, Manassas, VA)이다. 우태 혈청(예를 들어, FBS; HyClone Laboratories, South Logan, UT)은 완전한 성장 배지를 만들기 위해 10%의 최종 농도로 첨가된다. 이글스 최소 필수 배지 및 둘베코 변형 이글 배지는 다양한 무기염 외에 아미노산, 비타민, 및 선택적으로 글루코스를 함유하는 복합 배지이다. 공급원에 따라 이러한 염의 농도가 약간 다르지만 둘베코 변형 이글 배지(예를 들어, ThermoFisher Scientific에서 시판)에는 **표 1**에 보여진 대략적인 무기 염이 추가로 함유되어 있다. 배지는, 둘베코 변형된 이글 배지가 이글스 최소 필수 배지의 원래 공식에 존재하는 4배의 비타민과 아미노산, 및 2내지4배의 글루코스를 함유한다는 점에서 다르다. 또한, 황산 제2철 및 pH 표시를 위한 페놀 레드 형태의 철을 함유하고 있다 (Yao, T 등 (2017) "*Animal-Cell Culture Media: History, Characteristics, And Current Issues*," Reproduc. Med. Biol. 16(2): 99-117).

표 1

무기 염	식	농도	
		mg/L	몰농도
염화칼슘	$CaCl_2$	200	1.80 mM
질산제 2 철	$Fe(NO_3)_3$-$9H_2O$	0.1	0.25 μM
황산마그네슘(무수)	$MgSO_4$	97.67	0.81 mM
염화칼륨	KCl	400	5.37 mM
중탄산나트륨	$NaHCO_3$	3700	44.04 mM
염화나트륨	NaCl	6400	109.5 mM
일염기성 인산나트륨	NaH_2PO4-H_2O	125	0.78 mM
이염기성 인산나트륨	Na_2HPO_4-H_2O		

[0100]

[0101] 이러한 형질감염에 사용되는 세포는 바람직하게는 지수 성장 단계에서 세포를 유지하기 위해 매주 2회 계대된다. 소규모 형질감염의 경우, 예를 들어 다중 웰 플레이트 상의 웰당 1 x 10^6 HEK293 또는 BHK 세포 또는 15-cm 접시당 1.5 x 10^7 HEK293 세포의 분취량을 사용할 수 있다. 대규모 생산을 위해, HEK293 또는 BHK 세포를 여러 개의 합류 15-cm 플레이트로부터 수집하고 1리터의 완전한 배양 배지를 함유하는 두 개의 10-층 세포 스택(Corning, Corning, NY)으로 분할할 수 있다. 한 구현예에서, 이러한 세포는 형질감염 전에 이러한 배지에서 4일 동안 성장된다. 형질감염 전날, 2개의 세포 스택을 트립신 처리하고 세포(예를 들어, 대략 6 x 10^8 세포)를 배지 200 ml에서 재현탁할 수 있다. 바람직하게는, 세포는 형질감염 전에 24시간 동안 부착되도록 한다. 세포 스택의 합류는 현미경 스테이지에서 세포 스택을 수용하기 위해 위상차 하드웨어가 제거된 Diaphot 도립 현미경(Nikon, Melville, NY)을 사용하여 모니터링할 수 있다.

[0102] 본 명세서에 사용된 바와 같이, "**이온 강도**"라는 문구는 용액 내 이온의 농도를 나타내기 위한 것이다. 본 발명은 rAAV 형질감염된 세포를 배양하는 데 사용되는 배지에 추가 이온을 제공함으로써 배양 배지의 이온 강도를 증가시킴으로써 rAAV 생산 역가를 향상시킨다. 한 구현예에서, 제공된 이온은 양이온이다. 적합한 양이온은 Na^+, K^+, Ca^{++}, 및 Mg^{++}를 포함한다. 이러한 양이온은 무기 염 또는 유기 분자의 염으로 제공될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 제공된 이온은 음이온이다. 적합한 음이온은 다음과 같은 무기 음이온을 포함한다: $CO_3^=$, HCO_3^-, HPO_4^-, $PO_4^=$, SCN^- (티오시아네이트), $SO_4^=$, HSO_4^-, 및 Cl^-, 및 유기 이온, 예컨대: 아세테이트 (CH_3COO^-), 아스파

르테이트, 비프탈레이트, 바이타르트레이트, 부톡시에톡시 아세테이트, 카프릴레이트, 시트레이트 ($C_6H_5O_7^{\equiv}$), 데하이드로아세테이트, 디아세테이트, 디하이드록시 글리시네이트, d-사카레이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리시네이트, 글리코설페이트, 하이드록시메탄 설포네이트, 락테이트, 메티오네이트, 옥살레이트, 페네이트, 페노설포네이트, 프로피오네이트, 프로피오네이트, 사카린, 살리실레이트, 사르코시네이트, 소르베이트, 티오글라이콜레이트, 및 톨루엔 설포네이트.

[0103] 이러한 양이온 또는 음이온은 추가로 제공된 양이온 없이 동일한 배양 배지에서 생산된 역가보다 rAAV 생산 역가를 향상시키기에 충분한 임의의 농도로 제공될 수 있다. 이러한 양이온 또는 음이온의 적합한 농도는 배양 배지에서 이러한 이온의 초기 농도를 약 30 mM 내지 약 80 mM, 약 40 mM 내지 약 80 mM, 약 50 mM 내지 약 80 mM, 약 60 mM 내지 약 80 mM, 약 70 mM 내지 약 80 mM, 또는 약 80 mM까지 증가시키기에 충분한 농도를 포함하고, 이러한 농도는 이러한 첨가 전에 이러한 배양 배지에 존재하는 이러한 이온의 임의의 농도에 추가된다. 이러한 배양 배지는 처음에 투여될 이온을 함유하지 않은 경우, 이러한 첨가 이온은 mM의 이러한 배양 배지에 제공된 이온의 농도를 약 30 mM 내지 약 80 mM, 약 40 mM 내지 약 80 mM, 약 50 mM 내지 약 80 mM, 약 60 mM 내지 약 80 mM, 약 70 mM 내지 약 80 mM 또는 약 80 mM로 제공하기에 충분한 양으로 제공된다.

[0104] 초기 배양 배지에 첨가될 이온 또는 염은 생산된 rAAV의 수확 전에 언제든지 첨가될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 이온 또는 염은 배양 개시 후 적어도 약 1 시간, 적어도 약 2 시간, 적어도 약 3 시간, 적어도 약 4 시간, 적어도 약 5 시간, 적어도 약 6 시간, 적어도 약 7 시간, 적어도 약 8 시간, 적어도 약 9 시간, 적어도 약 10 시간, 적어도 약 12 시간, 적어도 약 15 시간, 적어도 약 18 시간, 적어도 약 20 시간, 적어도 약 22 시간, 또는 적어도 약 24 시간에 첨가될 것이다.

[0105] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 농도, 양 또는 시간과 관련하여 사용될 때 용어 "**약**"은 이러한 농도 및 또한 이러한 농도의 ±40%, 및 더 바람직하게는 이러한 농도의 ±30%, 및 더욱 더 바람직하게는 이러한 농도의 ±20%, 및 더욱 더 바람직하게는 이러한 농도의 ±10%, 및 더욱 더 바람직하게는 이러한 농도의 ± 5% 이내의 농도 범위를 나타내기 위한 것이다. 따라서, 예를 들어, 10.0 mM의 인용된 농도는 10.0 mM의 농도뿐만 아니라 6-14 mM의 농도, 더욱 바람직하게는 7-13 mM의 농도, 더욱 더 바람직하게는 8-12mM, 및 훨씬 더 바람직하게는 9-11 mM의 농도, 더욱 더 바람직하게는 9.5-10.5 mM의 농도를 나타낸다.

[0106] 따라서, 예를 들어 둘베코 변형 이글 배지는 초기 K^+ 농도가 약 5.37 mM이므로, 이러한 양이온의 농도를 약 30 mM까지 증가시키기에 충분한 추가 K^+의 제공은 배양 배지가 결과적으로 약 35.4 mM의 Na^+ 농도를 갖도록 한다. 마찬가기조, 둘베코 변형 이글 배지는 초기 HCO_3^- 농도가 약 44.04 mM이므로, 이러한 양이온의 농도를 약 30 mM까지 증가시키기에 충분한 추가 HCO_3^-의 제공은 배양 배지가 결과적으로 약 74.04 mM의 HCO_3^- 농도를 갖도록 한다.

[0107] 특히, 본 발명은 따라서 다음 단계를 포함하는 재조합으로 변형된 AAV(rAAV)의 생산 역가를 증가시키는 방법을 제공한다:

[0108] (A) rAAV의 생산을 허용하기에 충분한 조건 하에 초기 기간 동안 배양 배지에서 이러한 rAAV로 형질감염된 세포를 배양하는 단계;

[0109] (B) 하나 이상의 이온, 바람직하게는 Na^+ 이외의 하나 이상의 이온을 배양 배지 중 이러한 이온의 농도를 약 30 mM 내지 약 80 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 배양 배지에 첨가함으로써, 초기 기간 후 배양 배지의 이온 강도를 변화시키는 단계;

[0110] (C) 세포 배양을 계속하여, 단계 (B)의 부재 하에 수득된 역가보다 더 큰 rAAV의 생산 역가를 생성하는 단계.

[0111] 본 발명은 특히 rAAV 생산 역가를 향상시키기 위한 $KHCO_3$의 사용을 고려한다. 이러한 $KHCO_3$는 바람직하게는 배양 배지에서 K^+ 및 HCO_3^-의 농도를 약 20 mM, 약 30 mM, 약 40 mM, 또는 약 50 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 제공된다. 이러한 첨가는, 둘베코 변형 이글 배지의 K^+ 농도가 약 25mM, 약 35mM, 약 45mM 또는 약 55mM이 되게 하고 이러한 배지에서 HCO_3^- 농도가 약 약 64 mM, 약 74 mM, 약 84 mM 또는 약 94 mM이 되게 한다. 이러한 배양

배지는 K^+ 및 HCO_3^- 이온을 함유하지 않는 경우, 이러한 $KHCO_3$는 바람직하게는 이러한 배양 배지에서 약 20 mM, 약 30 mM 또는 약 40 mM의 K^+ 및 HCO_3^- 농도를 제공하기에 충분한 양으로 제공된다.

[0112] **II. 본 발명의 약제학적 조성물**

[0113] 본 발명은 추가로 본 발명의 방법에 따라 생산된 rAAV의 약제학적으로 허용 가능한 제제, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물을 포함한다. 이러한 약제학적 조성물의 rAAV는 유전성 또는 유전가능한 질환 또는 병태에 대한 치료제인, 전사된 핵산을 포함하거나 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 이러한 약제학적 조성물에 유효한 양("**유효량**")으로 존재한다

[0114] "**약제학적으로 허용 가능한**"이라는 용어는 동물, 및 보다 구체적으로 인간에 사용하기 위해 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인식된 약전에 열거된 것을 의미한다. "**담체**"라는 용어는 치료제가 투여되는 희석제, 보조제(예를 들어, 프로인트 보조제(Freund's adjuvant) 완전 및 불완전), 부형제 또는 비히클을 의미한다. 이러한 약제학적 담체는 물과 같은 멸균 액체 및 석유, 동물성, 식물성 또는 합성 기원을 포함하는 오일, 예를 들어 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등일 수 있다. 약제학적 조성물이 정맥내 투여될 때 물은 바람직한 담체이다. 식염수, 덱스트로스 및 글리세롤 수용액은 특히 주사용 용액의 경우 액체 담체로 사용할 수도 있다. 적합한 약제학적 부형제는 전분, 글루코스, 락토스, 수크로스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카겔, 스테아르산나트륨, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글라이콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 원하는 경우, 조성물은 또한 소량의 습윤제 또는 유화제, 또는 pH 완충제를 함유할 수 있다. 이러한 조성물은 용액, 현탁액, 에멀젼, 정제, 환제, 캡슐, 분말, 서방성 제형 등 등의 형태를 취할 수 있다. 적합한 약제학적 부형제는 미국 특허 제8,852,607호; 제8,192,975호; 제6,764,845호; 제6,759,050호; 및 제7,598,070호에 기재되어 있다.

[0115] 일반적으로, 본 발명의 조성물의 성분은 개별적으로 또는 단위 복용 형태로 함께 혼합되어, 예를 들어 건조 동결건조된 분말 또는 무수 농축물로서, 또는 바이알과 같은 용봉한 용기 내의 수용액, 활성제의 수량을 나타내는 앰플 또는 샤세트로서 공급된다. 조성물이 주입에 의해 투여되는 경우, 멸균 약품 등급의 물 또는 식염수가 들어 있는 주입 병과 함께 분배될 수 있다. 조성물이 주사에 의해 투여되는 경우, 주사용 멸균수 또는 식염수, 또는 기타 희석제의 앰풀이 제공되어 투여 전에 성분이 혼합될 수 있도록 제공될 수 있다.

[0116] 본 발명은 또한 이러한 약제학적 조성물과 같은 하나 이상의 용기를 포함하는 약제학적 팩 또는 키트를 제공한다. 이러한 용기(들)에는 제약회사 또는 생물학적 제품의 제조, 사용 또는 판매를 규제하는 정부 기관에 의해 규정된 형태의 통지서가 임의로 연관될 수 있으며, 이러한 통지서는 인간 투여를 위한 제조, 용도 또는 판매의 기관에 의한 승인을 반영한다.

[0117] 이러한 약제학적 조성물의 rAAV는 바람직하게는 분자의 양을 표시하고 임의로 사용 설명서를 포함하는 바이알, 앰플 또는 사세트와 같은 용봉한 용기에 패키징된다. 한 구현예에서, 이러한 키트의 rAAV는 용봉한 용기에 건조 멸균된 동결건조 분말 또는 무수 농축물로서 공급되고, 예를 들어, 물, 식염수 또는 기타 희석제를 사용하여 대상체에 투여하기에 적절한 농도로 재구성될 수 있다. 동결건조된 물질은 원래 용기에 넣어 2℃ 내지 8℃에서 보관해야 하며, 물질은 재구성 후 12시간 이내, 바람직하게는 6시간 이내, 5시간 이내, 3시간 이내 또는 1시간 이내 투여해야 한다. 또 다른 구현예에서, 이러한 키트의 rAAV는 용봉한 용기에 수용액으로서 공급되고, 예를 들어 물, 염수 또는 기타 희석제로 대상체에 투여하기에 적절한 농도로 희석될 수 있다. 키트는 하나 이상의 용기에 질환 또는 병태의 치료에 유용한 하나 이상의 다른 예방제 및/또는 치료제를 추가로 포함할 수 있고/있거나; 키트는 암과 연관된 하나 이상의 암 항원에 결합하는 하나 이상의 세포독성 항체를 추가로 포함할 수 있다. 특정 구현예에서, 다른 예방제 또는 치료제는 화학요법제이다. 다른 구체예에서, 예방제 또는 치료제는 생물학적 또는 호르몬 치료제이다.

[0118] **III. 발명의 용도**

[0119] 본 발명의 방법은 rAAV의 생산을 촉진하기 위해 사용될 수 있으며, 특히 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태와 관련이 있어, 그러한 질환 또는 병태를 치료하기 위한 유전자 요법에 사용될 수 있는, 전사된 핵산을 포함하는 rAAV 또는 단백질(예를 들어, 효소, 호르몬, 항체, 수용체, 리간드 등)을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 rAAV의 생산을 촉진하기 위해 사용될 수 있다. 그러한 질환 및 상태의 예는 다음을 포함한다: 색맹(**ACHM**); 알파-1 항트립신 (**AAT**) 결핍; 알츠하이머병; 방향족 L-아미노산 탈탄산효소 (**AADC**) 결핍; 맥락막결손(**CHM**); 암; 뒤센 근육 이상증; 다이스페린 결핍; 폴리스타틴 유전자 결핍 (**BMDSIBM**); A형 혈우병; B형 혈우병;

A형 간염; B형 간염; C형 간염; 헌팅턴병; 특발성 파킨슨병; 후기 유아 신경 세로이드 지질갈색소증 (**LINCL**, 바텐병의 유아형); 베버(Leber) 선천성 흑내장 (**LCA**); 레버 선천성 시신경병증 (**LHON**); 팔다리 이음 근육 이상증 1B (**LGMD1B**); 팔다리 이음 근육 이상증 1C (**LGMD1C**); 팔다리 이음 근육 이상증 2A (**LGMD2A**); 팔다리 이음 근육 이상증 2B (**LGMD2B**); 팔다리 이음 근육 이상증 2I (**LGMD2I**); 팔다리 이음 근육 이상증 2L (**LGMD2L**); 지질단백질 리파제 (**LPL**) 결핍; 이염성 백질이상증; 신경적 장애; 신경운동 결손; 신경골격 손상; 파킨슨병; 류마티스성 관절염; 산필립포 A 증후군; 척추 근육 위축증 (**SMA**); X-연결된 망막층간분리증 (**XLRS**); α-사르코글리칸 결핍 (**LGMD2D**); β-사르코글리칸 결핍 (**LGMD2E**); γ-사르코글리칸 결핍 (**LGMD2C**) 및 δ-사르코글리칸 결핍 (**LGMD2F**).

[0120] **IV. 본 발명의 구현예**

[0121] 본 발명은 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키는 방법, 이러한 방법으로부터 생산된 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(AAV) 헬퍼 벡터, 및 이의 용도 및 조성물에 관한 것이다. 특히 하기 구현예 **E1 내지 E19**에 관한 것이다:

[0122] **E1**. 재조합적으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 생산 역가를 증가시키는 방법으로서, 다음 단계를 포함하는, 방법:

[0123] (A) rAAV의 생산을 허용하기에 충분한 조건 하에 초기 기간 동안 초기 배양 배지에서 상기 rAAV로 형질감염된 세포를 배양하는 단계로서, 상기 세포는 AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드 및 비-AAV 헬퍼 기능 제공 폴리뉴클레오티드를 추가로 함유하는 단계;

[0124] (B) 상기 배양 배지에 Na^+ 이외의 하나 이상의 이온을 첨가함으로써 상기 초기 기간 후 상기 배양 배지의 이온 강도를 변화시키는 단계; 및

[0125] (C) 상기 세포의 상기 배양을 계속하여 단계 (B)의 부재 하에 수득된 역가보다 더 큰 상기 rAAV의 생산 역가를 생성하는 단계.

[0126] **E2**. **E1**에 있어서, 상기 첨가된 이온(들) 각각은 상기 초기 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 약 10 mM 내지 약 80 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 제공되는, 방법.

[0127] **E3**. **E1** 또는 **E2**에 있어서, 생산 역가는 상기 단계 (B)의 부재 하에 유사하게 수행된 세포 배양으로부터 수득된 역가보다 50% 이상 더 큰 것인, 방법.

[0128] **E4**. **E1** 내지 **E3** 중 어느 하나에 있어서, 상기 rAAV는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하거나, 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태에 대한 치료제인 전사된 핵산을 포함하는, 방법.

[0129] **E5**. **E1** 내지 **E4** 중 어느 하나에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV1, rAAV2, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9 또는 rAAV10 혈청형, 또는 상기 혈청형의 하이브리드에 속하는, 방법.

[0130] **E6**. **E5**에 있어서, 상기 rAAV는 rAAV2, rAAV5, 또는 rAAV9 혈청형, 또는 상기 혈청형의 하이브리드에 속하는, 방법.

[0131] **E7**. **E1** 내지 **E6** 중 어느 하나에 있어서, 상기 첨가된 이온은 K^+, Ca^{++}, 또는 Mg^{++} 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

[0132] **E8**. **E1** 내지 **E7** 중 어느 하나에 있어서, 상기 첨가된 이온은 $CO_3^=$, HCO_3^-, HPO_4^-, $PO_4^=$, SCN^-, $SO_4^=$, HSO_4^-, 및 Cl^- 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

[0133] **E9**. **E1** 내지 **E7** 중 어느 하나에 있어서, 상기 첨가된 이온은 아세테이트, 아스파르테이트, 비프탈레이트, 바이타르트레이트, 부톡시에톡시 아세테이트, 카프릴레이트, 시트레이트, 데하이드로아세테이트, 디아세테이트, 디하이드록시 글리시네이트, d-사카레이트, 글루코네이트, 글루타메이트, 글리시네이트, 글리코설페이트, 하이드록시메탄 설포네이트, 락테이트, 메티오네이트, 옥살레이트, 페네이트, 페노설포네이트, 프로피오네이트, 프로피오네이트, 사카린, 살리실레이트, 사르코시네이트, 소르베이트, 티오글라이콜레이트, 및 톨루엔 설포네이트 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

[0134] **E10**. **E1** 내지 **E8** 중 어느 하나에 있어서, 상기 첨가된 이온은 K^+ 및 $CO_3^=$를 포함하는, 방법.

[0135] **E11**. **E1** 내지 **E10** 중 어느 하나에 있어서, 상기 세포는 인간 배아 신장 세포인, 방법.

[0136] **E12**. **E11**에 있어서, 세포는 HEK293 세포인, 방법.

[0137] **E13**. **E1** 내지 **E10** 중 어느 하나에 있어서, 세포는 어린 햄스터 신장 세포인, 방법.

[0138] **E14**. **E13**에 있어서, 세포는 BHK21 세포인, 방법.

[0139] **E15**. **E1** 내지 **E10** 중 어느 하나에 있어서, 세포는 sf9 곤충 세포인, 방법.

[0140] **E16**. **E1** 내지 **E15** 중 어느 하나에 있어서, 초기 배양 배지는 둘베코 변형 이글 배지인, 방법.

[0141] **E17**. **E16**에 있어서, 초기 배양 배지는 혈청이 보충되는, 방법.

[0142] **E18**. 다음을 포함하는 약제학적 조성물:

[0143] (A) **E1** 내지 **E17** 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 재조합으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, 상기 rAAV는 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태에 대한 치료제인 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하고, 그리고 상기 약제학적 조성물은 유효량의 상기 rAAV 제제를 함유하는 제제; 및

[0144] (B) 약제학적으로 허용 가능한 담체.

[0145] **E19**. **E1** 내지 **E17** 중 어느 하나의 방법에 의해 생산된 재조합적으로 변형된 아데노 연관 바이러스(rAAV)의 제제로서, 상기 rAAV는 전사된 핵산, 또는 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 제제, 또는 **E18**의 약제학적 조성물로서, 유전적 또는 유전 가능한 질환 또는 병태의 치료에 사용하기 위한 제제 또는 약제학적 조성물.

[0146] 실시예

[0147] 이제 본 발명을 일반적으로 기술하였지만, 이는 하기 실시예를 참조로 하여 보다 용이하게 이해될 것이며, 하기 실시예는 예시로서 제공되며, 특정되지 않는 한 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0148] **실시예 1**

[0149] **rAAV 생산에 대한 양이온 및 양이온 농도의 효과**

[0150] AAV 생산에 대한 양이온 및 양이온 농도의 효과는 배양된 HEK293 세포를 사용하여 입증되었다. 배양 배지를 교환하고, 1시간 후, 세포를 다음으로 형질감염시켰다:

[0151] (1) rAAV의 복제 및 패키징에 필요한 AAV ***rep*** 및 ***cap*** 유전자 기능을 발현할 수 있는 플라스미드 벡터 **pAAV-RC2**;

[0152] (2) AAV 증식에 필요한 바이러스 전사 및 번역 인자(E1a, E1b, E2a, VA 및 E4)를 제공할 수 있는 플라스미드 벡터 **pHelper**; 및

[0153] (3) 향상된 녹색 형광 단백질(**EGFP**) 및 AAV ITR을 인코딩하는 이식유전자 카세트를 포함하는 rAAV 플라스미드 벡터 **pAV-CMV-EGFP**.

[0154] 이러한 형질감염 5시간 후, 염(NaCl, KCl, $CaCl_2$ 또는 $MgCl_2$)이 0, 20, 40, 60 80 또는 100 mM의 최종 농도로 제공되었다. **도 7a**는 형질감염된 세포에서 EGFP의 발현 정도 및 감염 센터 검정을 사용한 rAAV 스톡의 역가를 보여준다. **도 7b**는 이러한 양이온 및 양이온 농도의 함수로서 감염 센터의 배수 변화 그래프이다. **도 7c**는 이러한 양이온 및 양이온 농도의 함수로서 AAV의 전체 게놈(**TG**)의 배수 변화 그래프이다. 결과는 양이온의 제공이 생성된 전체 게놈(TG)에 영향을 미치고 NaCl, KCl 및 MgCl2의 제공이 AAV 게놈 복제 및 AAV 생성을 증가시켰음을 보여준다. NaCl 및 KCl의 제공은 전체 게놈의 가장 높은 역가 및 AAV 생산의 가장 큰 증가를 야기하는 것으로 밝혀졌고, 배양 배지 중 이러한 이온의 농도를 약 40 mM 내지 약 80 mM만큼 증가시키기에 충분한 NaCl과 KCl 농도에서 가장 큰 증가가 나타났다. 더 높은 농도의 양이온 제공은 EGFP 발현을 억제하는 것으로 밝혀졌다($NaCl \geq 180mM$; $KCl \geq 100mM$; $MgCl_2 \geq 60mM$).

[0155] **실시예 2**

[0156] **rAAV 생산에 대한 음이온 및 음이온 농도의 효과**

[0157] AAV 생산에 대한 음이온 및 음이온 농도의 효과는 배양된 HEK293 세포를 사용하여 또한 입증되었다. **실시예 1**과

같이, 배양액을 교환하고 1시간 후, Ad 헬퍼 플라스미드, AAV 헬퍼 플라스미드, 및 향상된 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트 및 AAV ITR을 제공하는 pAAV-ITR 플라스미드 벡터로 세포를 형질감염시켰다. 이러한 형질감염 5시간 후, 염(K_2CO_3, $KHCO_3$, KH_2PO_4, KCH_3COO (아세트산칼륨), KCNS, K_2SO_4, KNO_3, $K_3C_6H_5O_7$ (시트르산칼륨) 또는 KCL)은 배양 배지 내의 이온의 농도를 40, 50, 60 또는 70 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 제공하였다. 72시간 후에 rAAV 감염 센터의 배수 변화를 측정하였다. $KHCO_3$의 제공은 rAAV 생산의 가장 큰 증가를 일으키는 것으로 밝혀졌으며, 이러한 이온의 농도를 약 40 mM 내지 약 50 mM으로 증가시키기에 충분한 농도에서 가장 큰 증가가 나타났다(**도 8a**). 도 8b는 이러한 음이온 및 음이온 농도의 함수로서 rAAV 벡터의 역가의 배수 변화 그래프이다. 결과는 음이온의 제공이 생성된 전체 게놈(TG)에 영향을 미친다는 것을 보여준다. 고농도 이온(> 60 mM)의 제공은 rAAV 생산을 약화시키는 것으로 밝혀졌다. 결과는 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 약 30 mM 내지 약 50 mM까지 증가시키기에 충분한 양의 $KHCO_3$의 제공이 다른 염으로 수득된 결과보다 예상외로 더 나은 결과를 제공함을 입증한다(**도 9a-9b**). 약 30 mM까지 농도 증가가 최적인 것으로 간주되었다.

[0158] **실시예 3**

[0159] **rAAV 생산에 대한 $KHCO_3$ 제공 시간의 효과**

[0160] 형질감염 후 다른 시간에 $KHCO_3$를 제공함으로써 야기되는 효과도 조사되었다. HEK293 세포를 배양하고 다음으로 공동 형질감염시켰다: (1) 전술한 Ad 헬퍼 플라스미드, (2) 향상된 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트 및 AAV ITR을 제공하는 pAAV-ITR 플라스미드 벡터 및 (3) AAV ***rep*** 및 ***cap*** 유전자 기능을 제공하기 위한 AAV2 헬퍼 플라스미드 또는 AAV8 헬퍼 플라스미드. 배양 배지는 공동 형질감염 1시간 전에 교체되었다. 형질감염 후 2, 4, 6, 8 및 10시간에, $KHCO_3$를 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 30 mM의 농도만큼 증가시키기에 충분한 양으로 첨가하였고, 배지 내로 방출된 rAAV의 배수 변화를 72시간에 평가하였다. 생성된 rAAV의 총량의 배수 변화도 평가되었다(**도 10**). 결과는 형질감염 후 4 내지 8시간에 염을 첨가할 때 가장 큰 향상이 관찰되었음을 나타낸다.

[0161] **실시예 4**

[0162] **rAAV 생산에 대한 혈청형의 효과**

[0163] 위에서 논의된 바와 같이, rAAV의 생산을 향상시키기 위한 이전 방법은 AAV2 혈청형을 갖는 rAAV에 대해 성공적이지 않았다 (Lock, M. 등 (2010) "*Rapid, Simple, and Versatile Manufacturing of Recombinant Adeno-Associated Viral Vectors at Scale*," Hum. Gene Ther. 21:1259-1271). 다양한 혈청형의 rAAV 생성을 향상시키는 $KHCO_3$ 첨가의 능력을 평가하기 위해, 혈청형 1, 2, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10의 **Cap** 단백질을 인코딩하는 AAV2 헬퍼 플라스미드를 전술한 Ad 헬퍼 플라스미드, 및 향상된 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트 및 AAV ITR을 제공하는 pAAV-ITR 플라스미드 벡터 (pAV-TBG-EGFP)와 함께 HEK293 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 4시간 후, KHCO3를 30 mM의 최종 농도로 첨가하고 배지 내로 방출된 rAAV의 배수 변화를 72시간에 평가하였다. 이 연구의 결과는 **도 11a-11b**에 나타나 있으며, 이온의 첨가, 특히 $KHCO_3$의 첨가가 rAAV2 혈청형을 포함하여 시험된 모든 혈청형의 rAAV 생산 역가를 유의하게 증가시켰음을 나타낸다.

[0164] **실시예 5**

[0165] **대규모 rAAV 생산에 대한 이온 제공의 효과**

[0166] 이온의 제공이 대규모 제제에서 rAAV의 생산을 향상시킨다는 것을 입증하기 위해, 녹색 형광 단백질 또는 기타 외인성 분자를 인코딩하는 이식유전자 카세트를 갖는 혈청형 1, 5, 6 및 9의 rAAV는 5개의 15 cm 접시에서 30 mM의 $KHCO_3$의 총 농도 존재 또는 부재 하에 대규모로 생산되었다. 정제 후 AAV 역가를 얻었다. 이 시범의 결과는 표 2에 나와 있다(pDNA_001 공여체 작제물, PiBFXNco3 및 PiBFXNco11은 대조군 벡터임).

표 2
대규모 AAV 생산에 대한 $KHCO_3$ 제공의 효과

AAV	이식유전자	수율 (mL 당)	배수 변화	$KHCO_3$ 첨가
AAV1				
A5514-1	pAV-CMV-EGFP	1.17×10^{13}	--	없음
A5514-2	pAV-CMV-EGFP	3.8×10^{13}	3.2	30 mM, 형질감염 후 4 시간
AAV5				
A5658	pAV-CMV-EGFP	1.14×10^{13}	--	없음
A5659	pAV-CMV-GFP	3.03×10^{13}	2.7	30 mM, 형질감염 후 4 시간
AAV6				
A5516-1	pAV-CMV-EGFP	1.25×10^{13}	--	없음
A5516-2	pAV-CMV-EGFP	2.69×10^{13}	2.2	30 mM, 형질감염 후 4 시간
A5555	pDNA_001 공여체 작제물	8.99×10^{12}		없음
A5556	pDNA_001 공여체 작제물	2.64×10^{13}	2.9	30 mM, 형질감염 후 4 시간
AAV9				
A5474-1	PiBFXNco3	1.34×10^{13}	--	없음
A5474-2	PiBFXNco3	1.61×10^{13}	1.2	30 mM, 형질감염 후 밤새
A5475-1	PiBFXNco11	3.14×10^{12}	--	없음
A5475-2	PiBFXNco11	1.46×10^{13}	4.6	30 mM, 형질감염 후 밤새

[0167]

[0168] **표 2**에 나타낸 바와 같이, 이온의 제공, 특히 $KHCO_3$의 제공은 약 3배의 평균 배수 증가와 함께 1.2 내지 4.6배의 rAAV 생성 증가를 초래하였다.

[0169] **실시예 6**

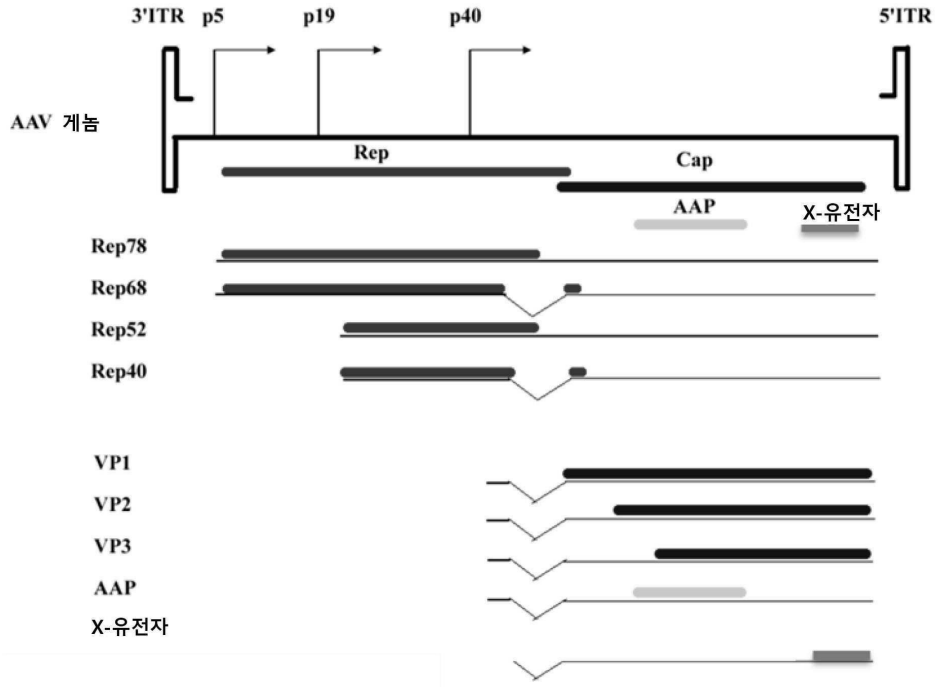
[0170] **현탁액에서 성장한 세포에 의한 rAAV 생산에 대한 이온 제공의 효과**

[0171] 이온의 제공이 현탁액에서 성장한 세포에 의한 rAAV의 생산을 향상시킨다는 것을 입증하기 위해, HEK293 세포를 다음으로 공동-형질감염시켰다: (1) 전술한 Ad 헬퍼 플라스미드, (2) 향상된 녹색 형광 단백질을 인코딩하는 이식유전자 카세트 및 AAV ITR을 제공하는 pAAV-ITR 플라스미드 벡터 및 (3) AAV ***rep*** 및 ***cap*** 유전자 기능을 제공하기 위한 AAV5 헬퍼 플라스미드 또는 AAV6 헬퍼 플라스미드. 형질감염 후 5시간 또는 20시간에 배양 배지에서 이러한 이온의 농도를 10, 20, 30, 40, 50 또는 60 mM만큼 증가시키기에 충분한 양으로 $KHCO_3$를 첨가하였다. 생산된 rAAV의 전체 게놈은 형질감염 후 72시간에 결정되었다. 현탁 세포를 120rpm의 진탕 속도로 37℃, 5% CO_2에서 배양하였다. 이온 제공에 반응하여 향상된 수준의 rAAV를 생성하는 현탁액에서 배양된 세포의 능력은 **도 8**에 제시되어 있다. **도 12**에 나타낸 바와 같이, 약 20 mM 초과의 최종 농도에서 이온의 제공은 rAAV5 및 rAAV6의 생성을 향상시켰다.

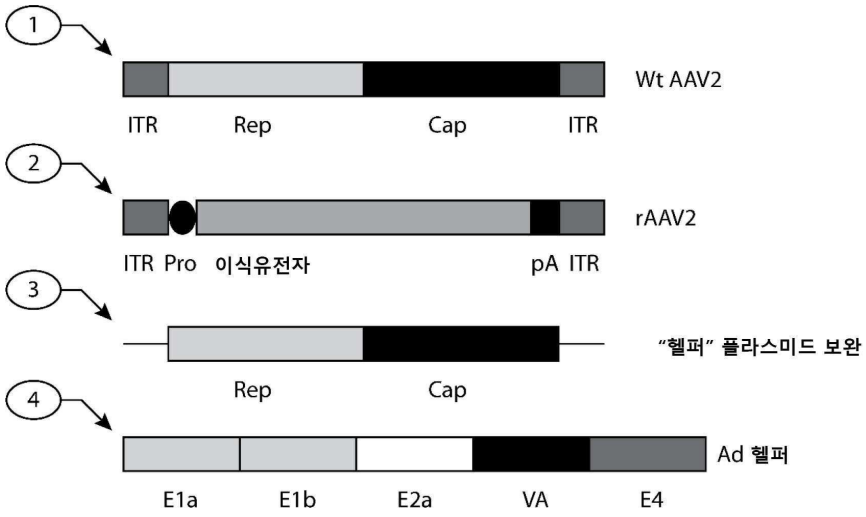
[0172] 본 명세서에 언급된 모든 공보 및 특허는 각각의 개별 공보 또는 특허 출원이 구체적이고 개별적으로 그 전문이 참조로 포함되는 것으로 나타낸 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다. 본 발명을 그의 특정 구현예와 관련하여 기재하였지만, 본 발명은 추가의 변형이 가능하며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르는 본 발명의 임의의 변형, 용도 또는 적합화를 포함하고, 본 발명이 속하는 기술 분야의 공지되거나 통상적인 실시내에 있고 상기 기재된 본질적인 특징에 적용될 수 있는 본 개시내용으로부터의 이러한 이탈을 포함하는 것으로 의도됨을 이해할 것이다.

도면

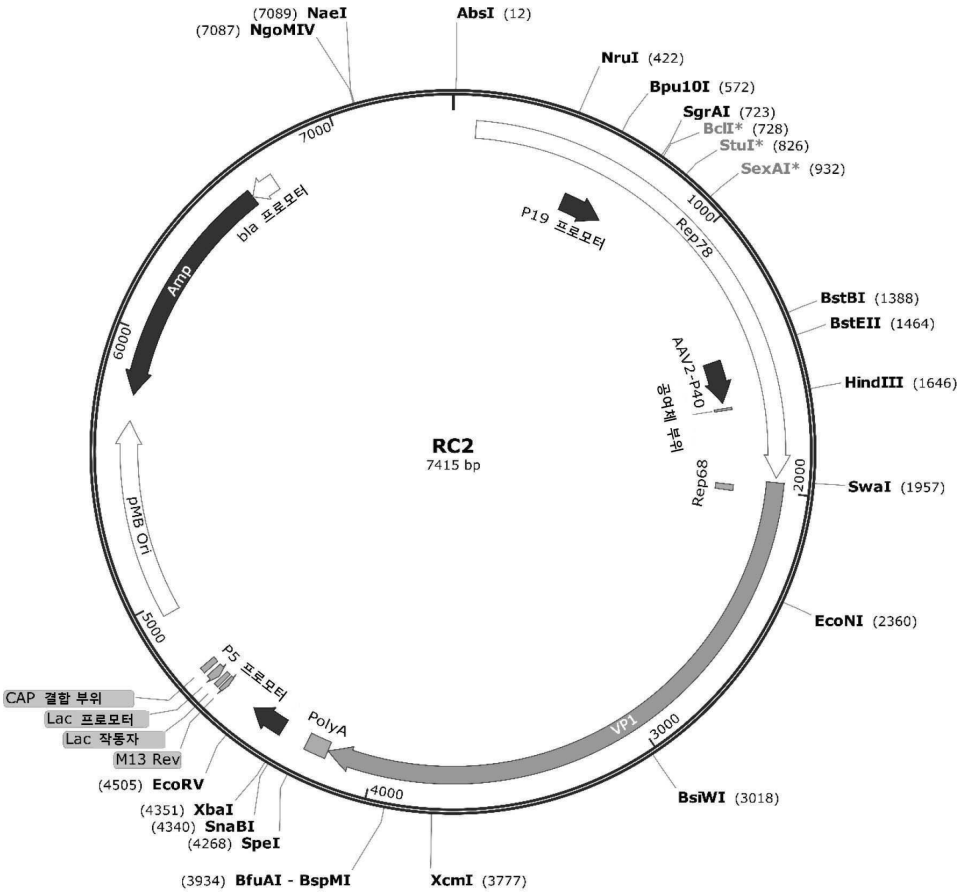
도면1


3'ITR
p5
p19
p40
5'ITR
AAV 게놈
Rep
Cap
AAP
X-유전자
Rep78
Rep68
Rep52
Rep40
VP1
VP2
VP3
AAP
X-유전자

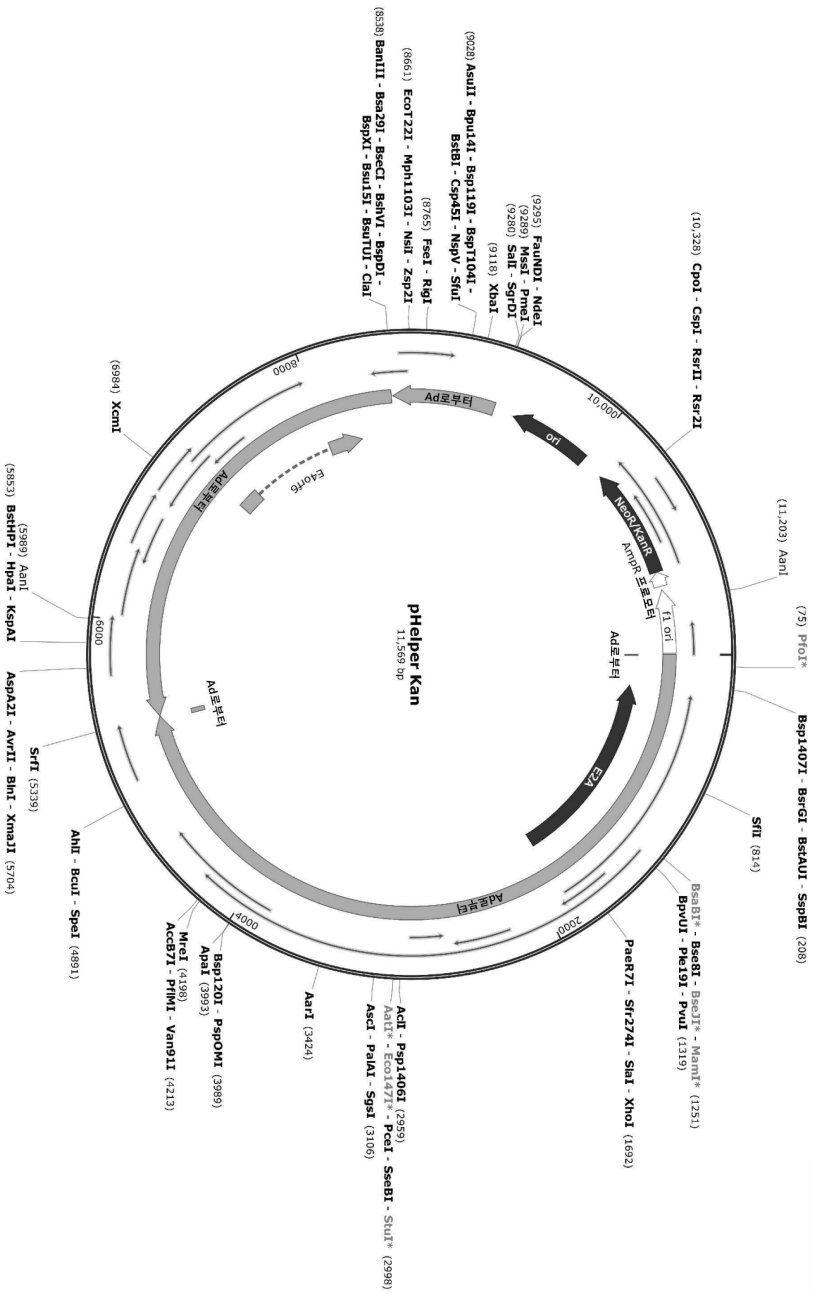
도면2


1
Wt AAV2
ITR
Rep
Cap
ITR
2
rAAV2
ITR
Pro
이식유전자
pA
ITR
3
"헬퍼" 플라스미드 보완
Rep
Cap
4
Ad 헬퍼
E1a
E1b
E2a
VA
E4

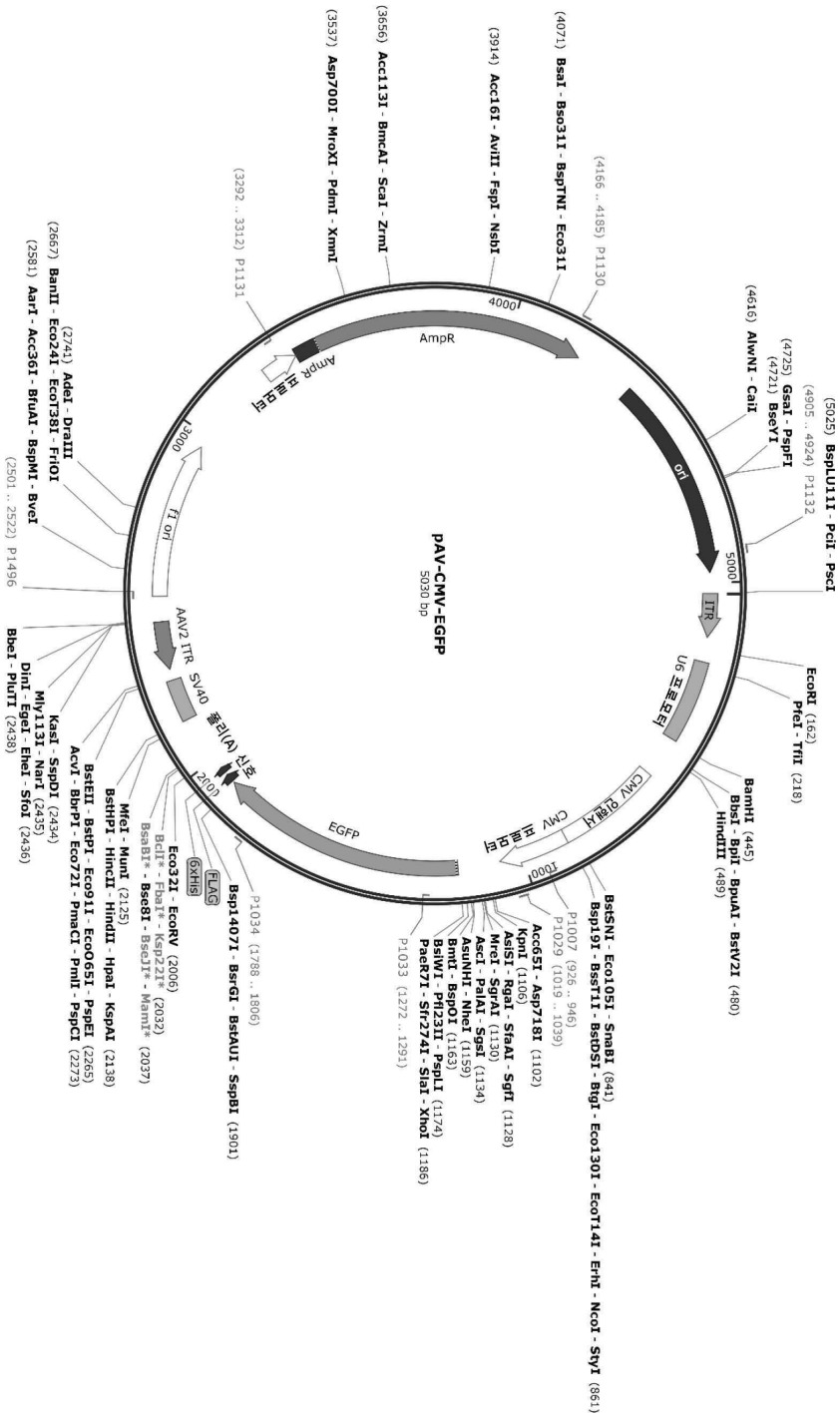
도면3


(7089) NaeI
(7087) NgoMIV
AbsI (12)
NruI (422)
Bpu10I (572)
SgrAI (723)
BclI* (728)
StuI* (826)
SexAI* (932)
BstBI (1388)
BstEII (1464)
HindIII (1646)
SwaI (1957)
EcoNI (2360)
BsiWI (3018)
XcmI (3777)
(3934) BfuAI - BspMI
(4268) SpeI
(4340) SnaBI
(4351) XbaI
(4505) EcoRV
M13 Rev
Lac 작동자
Lac 프로모터
CAP 결합 부위
P5 프로모터
PolyA
VP1
Rep68
AAV2-P40
꼼여제 부위
P19 프로모터
Rep78
bla 프로모터
Amp
pMB Ori
RC2
7415 bp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
7000

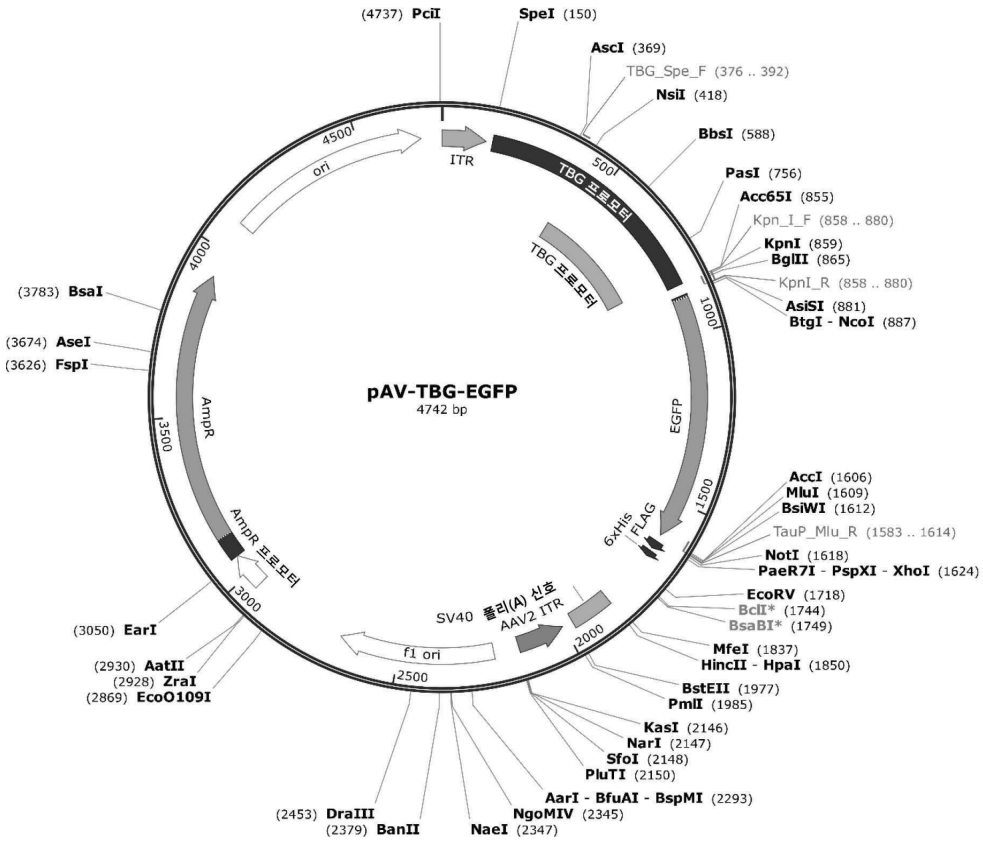
도면4


pHelper Kan
11,569 bp
Ad로부터
E4orf6
ori
NeoR/KanR
AmpR 프로모터
f1 ori
E2A
(10,328) CpoI - CspI - RsrII - RsrZI
(11,203) AanI
(75) PfoI*
Bsp1407I - BsrGI - BstAUI - SspBI (208)
SfiI (814)
BsaBI* - Bse8I - BseJI* - MamI* (1251)
BpvUI - Ple19I - PvuI (1319)
PaeR7I - Sfr274I - SlaI - XhoI (1692)
AcII - Psp1406I (2959)
AatI* - Eco147I* - PceI - SseBI - StuI* (2998)
AscI - PalAI - SgsI (3106)
AarI (3424)
Bsp120I - PspOMI (3989)
ApaI (3993)
MreI (4198)
AccB7I - PflMI - Van91I (4213)
AhlI - BcuI - SpeI (4891)
SrfI (5339)
AspA2I - AvrII - BlnI - XmaJI (5704)
(5989) AanI
(5853) BstHPI - HpaI - KspAI
(6984) XcmI
(8538) BanIII - Bsa29I - BseCI - BshVI - BspDI - BspXI - Bsu15I - BsuTUI - ClaI
(8661) EcoT22I - Mph1103I - NsiI - Zsp2I
(8765) FseI - RigI
(9028) AsuII - Bpu14I - Bsp119I - BspT104I - BstBI - Csp45I - NspV - SfuI
(9118) XbaI
(9280) SalI - SgrDI
(9289) MssI - PmeI
(9295) FauNDI - NdeI
10,000
8000
6000
4000
2000

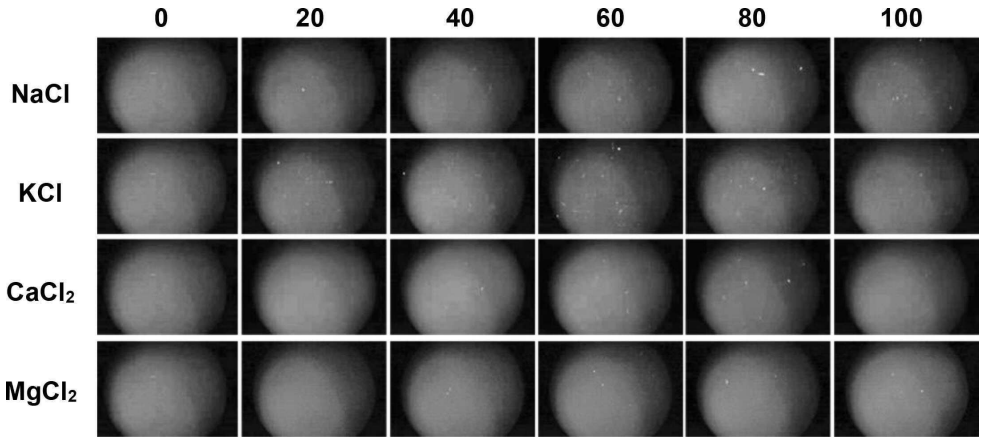
도면5


pAV-CMV-EGFP
5030 bp
AmpR
ori
ITR
U6 프로모터
CMV 인핸서
CMV 프로모터
EGFP
AAV2 ITR
SV40
AmpR 프로모터
f1 ori
4000
5000
1000
2000
3000
(4071) BsaI - Bso31I - BspTNI - Eco31I
(4166 .. 4185) P1130
(3914) Acc16I - AviII - FspI - NsbI
(3656) Acc113I - BmcAI - ScaI - ZrmI
(3537) Asp700I - MroXI - PdmI - XmnI
(3292 .. 3312) P1131
(4616) AlwNI - CaiI
(4725) GsaI - PspFI
(4721) BseYI
(4905 .. 4924) P1132
(5025) BspLU11I - PciI - PscI
EcoRI (162)
PfeI - TfiI (218)
BamHI (445)
BbsI - BpiI - BpuAI - BstV2I (480)
HindIII (489)
BstSNI - Eco105I - SnaBI (841)
Bsp19I - BssT1I - BstDSI - BtgI - Eco130I - EcoT14I - ErhI - NcoI - StyI (861)
P1007 (926 .. 946)
P1029 (1019 .. 1039)
Acc65I - Asp718I (1102)
KpnI (1106)
AsiSI - RgaI - SfaAI - SgfI (1128)
MreI - SgrAI (1130)
AscI - PalAI - SgsI (1134)
AsuNHI - NheI (1159)
BmtI - BspOI (1163)
BsiWI - Pfl23II - PspLI (1174)
PaeR7I - Sfr274I - SlaI - XhoI (1186)
P1033 (1272 .. 1291)
P1034 (1788 .. 1806)
Bsp1407I - BsrGI - BstAUI - SspBI (1901)
FLAG
6xHis
Eco32I - EcoRV (2006)
BclI* - FbaI* - Ksp22I* (2032)
BsaBI* - BseBI - BseJI* - MamI* (2037)
MfeI - MunI (2125)
BstHPI - HincII - HindII - HpaI - KspAI (2138)
BstEII - BstPI - Eco91I - EcoO65I - PspEI (2265)
AcvI - BbrPI - Eco72I - PmaCI - PmlI - PspCI (2273)
KasI - SspDI (2434)
Mly113I - NarI (2435)
DinI - EgeI - EheI - SfoI (2436)
BbeI - PluTI (2438)
(2741) AdeI - DraIII
(2667) BanII - Eco24I - EcoT38I - FriOI
(2581) AarI - Acc36I - BfuAI - BspMI - BveI
(2501 .. 2522) P1496

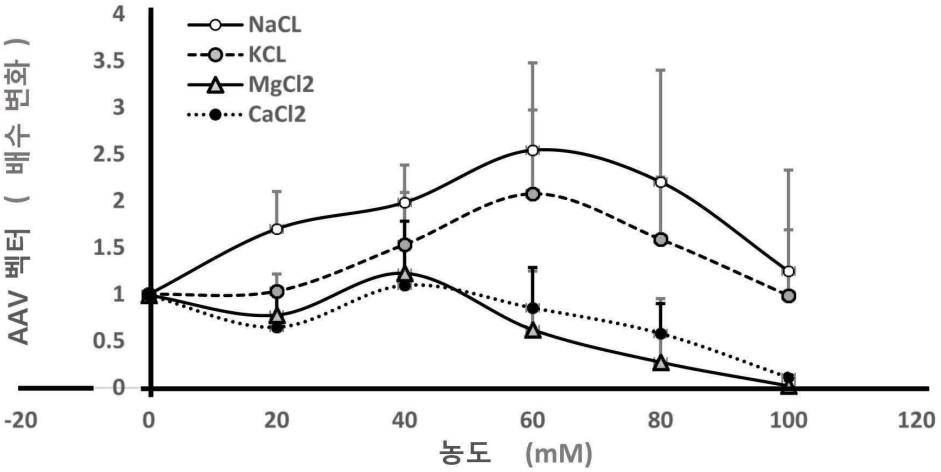
도면6


pAV-TBG-EGFP
4742 bp
ori
ITR
TBG 프로모터
TBG 프로모터
EGFP
6xHis
FLAG
SV40 폴리(A) 신호
AAV2 ITR
f1 ori
AmpR
AmpR 프로모터
500
1000
1500
2000
2500
3000
3500
4000
4500
(4737) PciI
SpeI (150)
AscI (369)
TBG_Spe_F (376 .. 392)
NsiI (418)
BbsI (588)
PasI (756)
Acc65I (855)
Kpn_I_F (858 .. 880)
KpnI (859)
BglII (865)
KpnI_R (858 .. 880)
AsiSI (881)
BtgI - NcoI (887)
AccI (1606)
MluI (1609)
BsiWI (1612)
TauP_Mlu_R (1583 .. 1614)
NotI (1618)
PaeR7I - PspXI - XhoI (1624)
EcoRV (1718)
BclI* (1744)
BsaBI* (1749)
MfeI (1837)
HincII - HpaI (1850)
BstEII (1977)
PmlI (1985)
KasI (2146)
NarI (2147)
SfoI (2148)
PluTI (2150)
AarI - BfuAI - BspMI (2293)
NgoMIV (2345)
NaeI (2347)
(2453) DraIII
(2379) BanII
(3050) EarI
(2930) AatII
(2928) ZraI
(2869) EcoO109I
(3783) BsaI
(3674) AseI
(3626) FspI

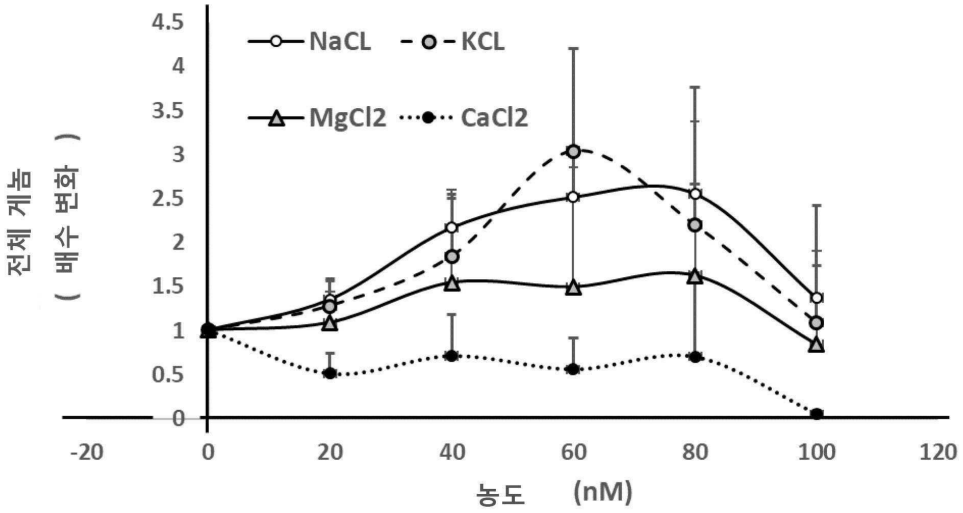
도면7a


0
20
40
60
80
100
NaCl
KCl
CaCl2
MgCl2

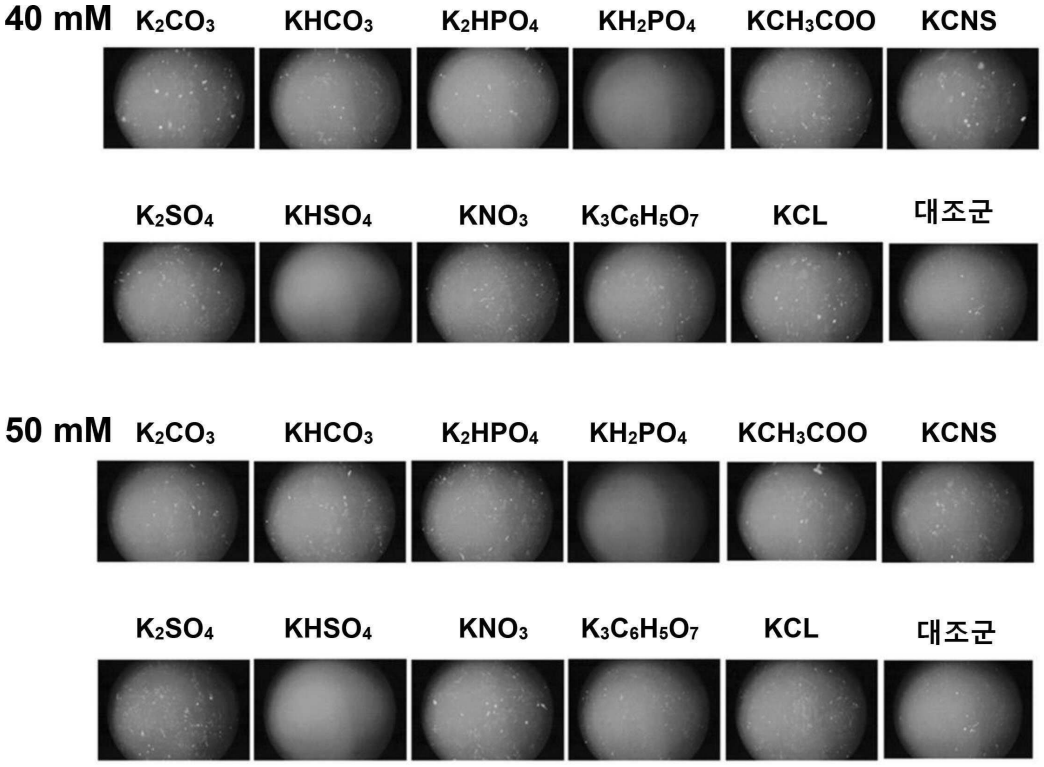
도면7b


NaCL
KCL
MgCl2
CaCl2
AAV 벡터 (배수 변화)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
농도 (mM)

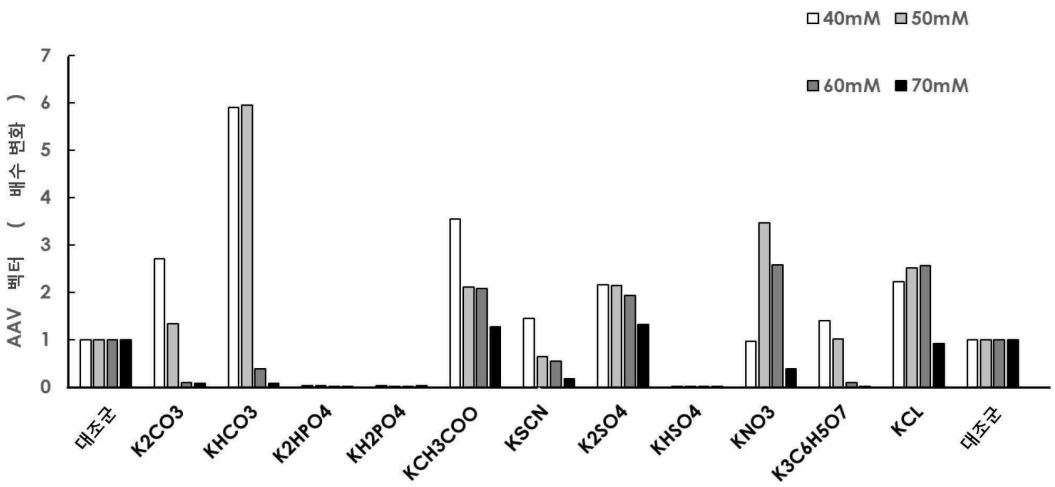
도면7c


NaCL
KCL
MgCl2
CaCl2
전체 게놈
(배수 변화)
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
-20
0
20
40
60
80
100
120
농도 (nM)

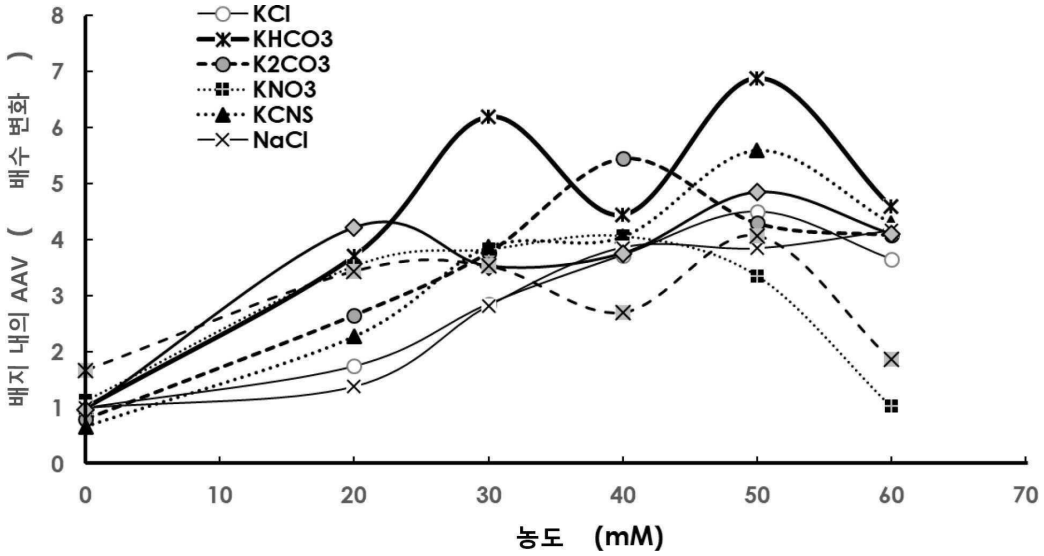
도면8a


40 mM
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KCNS
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
대조군
50 mM
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KCNS
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
대조군

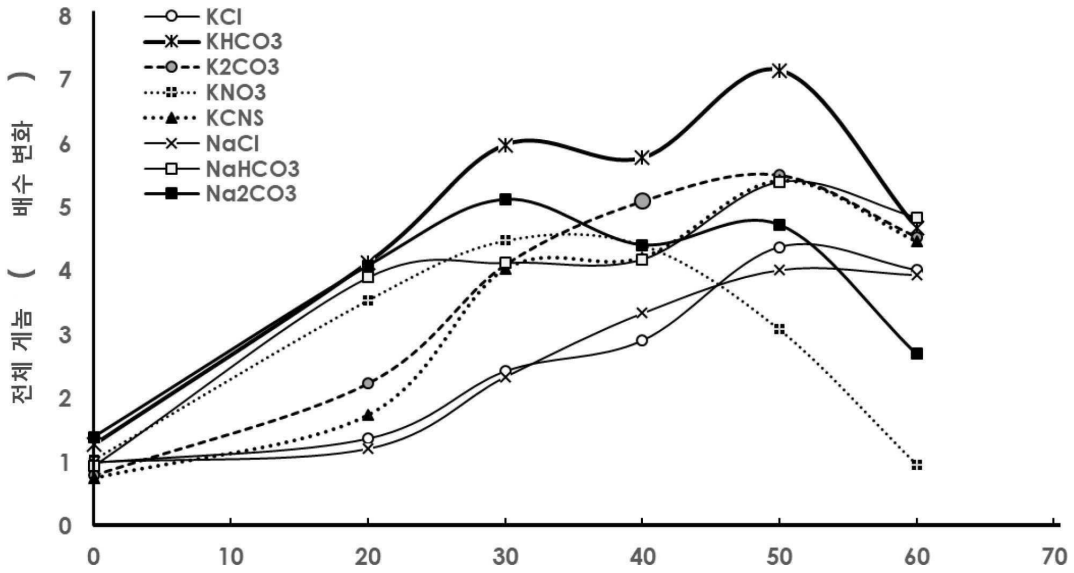
도면8b


40mM
50mM
60mM
70mM
AAV 벡터 (배수 변화)
0
1
2
3
4
5
6
7
대조군
K2CO3
KHCO3
K2HPO4
KH2PO4
KCH3COO
KSCN
K2SO4
KHSO4
KNO3
K3C6H5O7
KCL
대조군

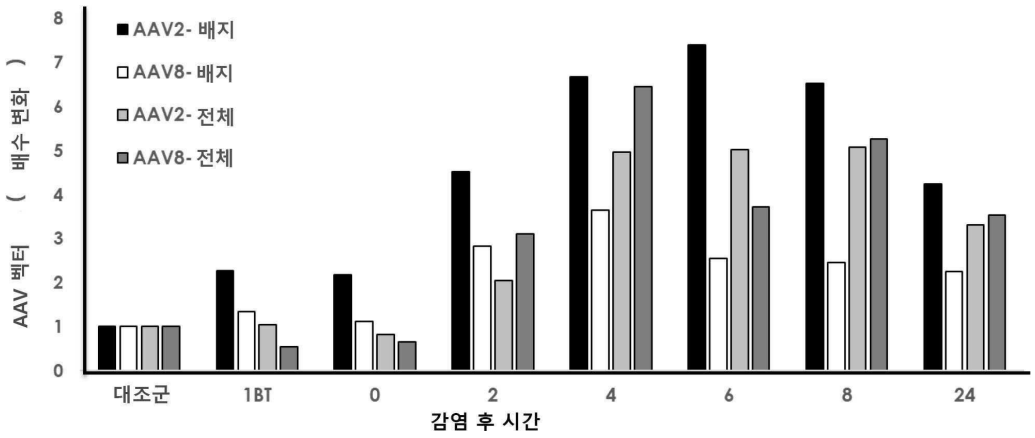
도면9a



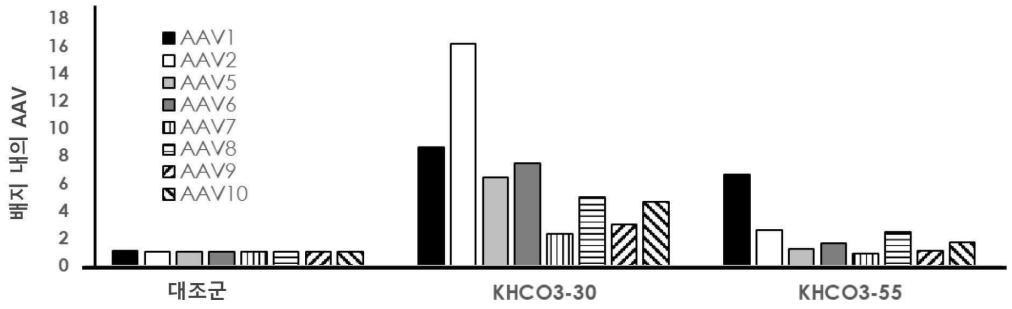
도면9b



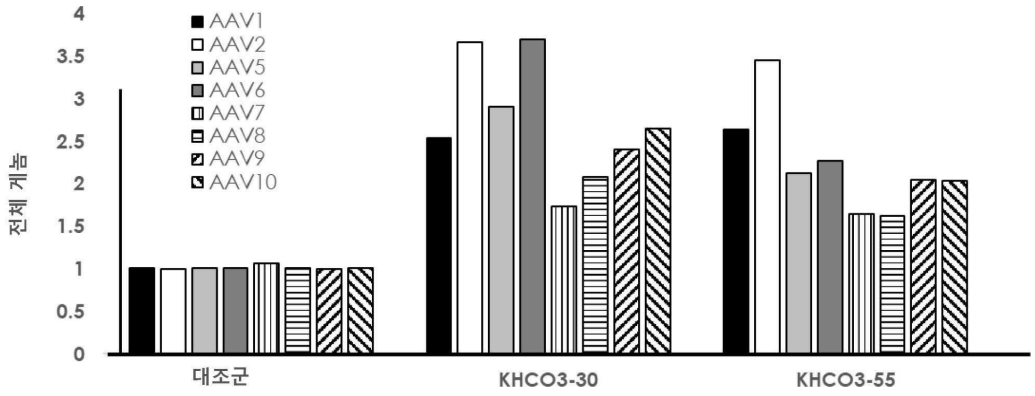
도면10



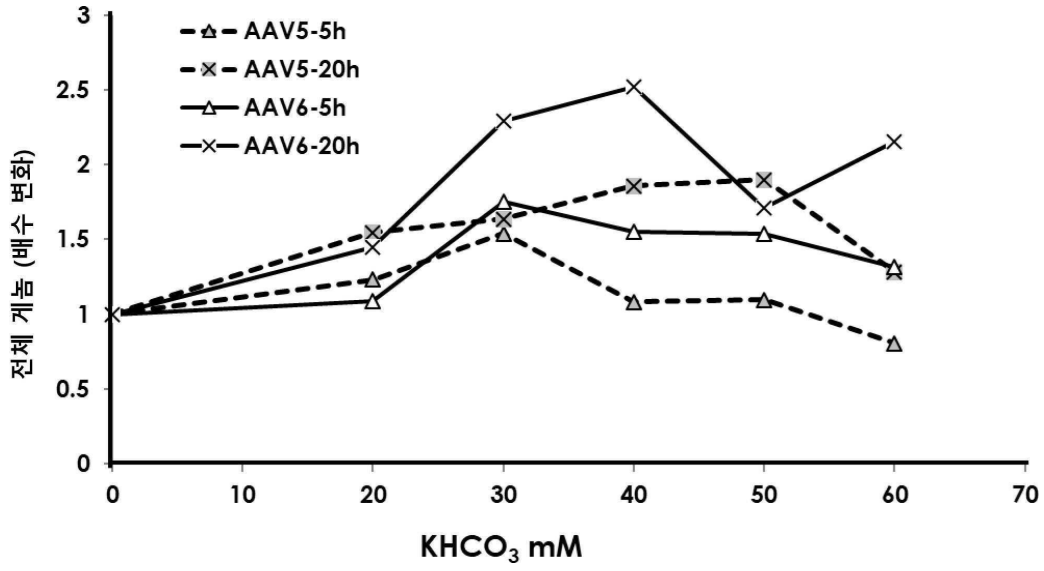
도면11a



도면11b



도면12



서 열 목 록

<110> Vigene Biosciences, Inc.

<120> Use of Ion Concentrations to Increase the Packaging Efficiency of Recombinant Adeno-Associated Virus

<130> 2650.0002US

<150> US 16/511,612

<151> 2019-07-15

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 7415

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Strand of Plasmid pAAV-RC2

<400> 1

ccgggccccc cctcgaggtc gacggtatcg ggggagctcg cagggtctcc attttgaagc 60

gggaggtttg aacgcgcagc cgccatgccg gggttttacg agattgtgat taaggtcccc 120

agcgaccttg acgagcatct gcccggcatt tctgacagct ttgtgaactg ggtggccgag 180

aaggaatggg agttgccgcc agattctgac atggatctga atctgattga gcaggcaccc 240

ctgaccgtgg ccgagaagct gcagcgcgac tttctgacgg aatggcgccg tgtgagtaag 300

gccccggagg ctcttttctt tgtgcaattt gagaagggag agagctactt ccacatgcac 360

gtgctcgtgg aaaccaccgg ggtgaaatcc atggttttgg gacgtttcct gagtcagatt 420

cgcgaaaaac tgattcagag aatttaccgc gggatcgagc cgactttgcc aaactggttc 480

gcggtcacaa agaccagaaa tggcgccgga ggcgggaaca aggtggtgga tgagtgctac 540

atccccaatt acttgctccc caaaacccag cctgagctcc agtgggcgtg gactaatatg 600

gaacagtatt taagcgcctg tttgaatctc acggagcgta aacggttggt ggcgcagcat 660

ctgacgcacg tgtcgcagac gcaggagcag aacaaagaga atcagaatcc caattctgat 720

gcgccggtga tcagatcaaa aacttcagcc aggtacatgg agctggtcgg gtggctcgtg 780

gacaagggga ttacctcgga gaagcagtgg atccaggagg accaggcctc atacatctcc 840

ttcaatgcgg cctccaactc gcggtcccaa atcaaggctg ccttggacaa tgcgggaaag 900

attatgagcc tgactaaaac cgcccccgac tacctggtgg gccagcagcc cgtggaggac 960

atttccagca atcggattta taaaattttg gaactaaacg ggtacgatcc ccaatatgcg 1020

gcttccgtct ttctgggatg ggccacgaaa aagttcggca agaggaacac catctggctg 1080

tttgggcctg caactaccgg gaagaccaac atcgcggagg ccatagccca cactgtgccc 1140

ttctacgggt gcgtaaactg gaccaatgag aactttccct tcaacgactg tgtcgacaag 1200

atggtgatct ggtgggagga ggggaagatg accgccaagg tcgtggagtc ggccaaagcc 1260

attctcggag gaagcaaggt gcgcgtggac cagaaatgca agtcctcggc ccagatagac 1320

ccgactcccg tgatcgtcac ctccaacacc aacatgtgcg ccgtgattga cgggaactca 1380

acgaccttcg aacaccagca gccgttgcaa gaccggatgt tcaaatttga actcacccgc 1440
cgtctggatc atgactttgg gaaggtcacc aagcaggaag tcaaagactt tttccggtgg 1500
gcaaaggatc acgtggttga ggtggagcat gaattctacg tcaaaaaggg tggagccaag 1560
aaaagacccg cccccagtga cgcagatata agtgagccca aacgggtgcg cgagtcagtt 1620
gcgcagccat cgacgtcaga cgcggaagct tcgatcaact acgcagacag gtaccaaaac 1680
aaatgttctc gtcacgtggg catgaatctg atgctgtttc cctgcagaca atgcgagaga 1740
atgaatcaga attcaaatat ctgcttcact cacggacaga aagactgttt agagtgcttt 1800

cccgtgtcag aatctcaacc cgtttctgtc gtcaaaaagg cgtatcagaa actgtgctac 1860
attcatcata tcatgggaaa ggtgccagac gcttgcactg cctgcgatct ggtcaatgtg 1920
gatttggatg actgcatctt tgaacaataa atgatttaaa tcaggtatgg ctgccgatgg 1980
ttatcttcca gattggctcg aggacactct ctctgaagga ataagacagt ggtggaagct 2040
caaacctggc ccaccaccac caaagcccgc agagcggcat aaggacgaca gcaggggtct 2100
tgtgcttcct gggtacaagt acctcggacc cttcaacgga ctcgacaagg gagagccggt 2160
caacgaggca gacgccgcgg ccctcgagca cgacaaagcc tacgaccggc agctcgacag 2220

cggagacaac ccgtacctca agtacaacca cgccgacgcg gagtttcagg agcgccttaa 2280
agaagatacg tcttttgggg gcaacctcgg acgagcagtc ttccaggcga aaaagagggt 2340
tcttgaacct ctgggcctgg ttgaggaacc tgttaagacg gctccgggaa aaaagaggcc 2400
ggtagagcac tctcctgtgg agccagactc ctcctcggga accggaaagg cgggccagca 2460
gcctgcaaga aaaagattga attttggtca gactggagac gcagactcag tacctgaccc 2520
ccagcctctc ggacagccac cagcagcccc ctctggtctg ggaactaata cgatggctac 2580
aggcagtggc gcaccaatgg cagacaataa cgagggcgcc gacggagtgg gtaattcctc 2640

gggaaattgg cattgcgatt ccacatggat gggcgacaga gtcatcacca ccagcacccg 2700
aacctgggcc ctgcccacct acaacaacca cctctacaaa caaatttcca gccaatcagg 2760
agcctcgaac gacaatcact actttggcta cagcacccct tgggggtatt ttgacttcaa 2820
cagattccac tgccactttt caccacgtga ctggcaaaga ctcatcaaca acaactgggg 2880
attccgaccc aagagactca acttcaagct ctttaacatt caagtcaaag aggtcacgca 2940
gaatgacggt acgacgacga ttgccaataa ccttaccagc acggttcagg tgtttactga 3000
ctcggagtac cagctcccgt acgtcctcgg ctcggcgcat caaggatgcc tcccgccgtt 3060

cccagcagac gtcttcatgg tgccacagta tggatacctc accctgaaca acgggagtca 3120

ggcagtagga cgctcttcat tttactgcct ggagtacttt ccttctcaga tgctgcgtac 3180

cggaaacaac tttaccttca gctacacttt tgaggacgtt cctttccaca gcagctacgc 3240

tcacagccag agtctggacc gtctcatgaa tcctctcatc gaccagtacc tgtattactt 3300

gagcagaaca aacactccaa gtggaaccac cacgcagtca aggcttcagt tttctcaggc 3360

cggagcgagt gacattcggg accagtctag gaactggctt cctggaccct gttaccgcca 3420

gcagcgagta tcaaagacat ctgcggataa caacaacagt gaatactcgt ggactggagc 3480

taccaagtac cacctcaatg gcagagactc tctggtgaat ccgggcccgg ccatggcaag 3540

ccacaaggac gatgaagaaa agttttttcc tcagagcggg gttctcatct ttgggaagca 3600

aggctcagag aaaacaaatg tggacattga aaaggtcatg attacagacg aagaggaaat 3660

caggacaacc aatcccgtgg ctacggagca gtatggttct gtatctacca acctccagag 3720

aggcaacaga caagcagcta ccgcagatgt caacacacaa ggcgttcttc caggcatggt 3780

ctggcaggac agagatgtgt accttcaggg gcccatctgg gcaaagattc cacacacgga 3840

cggacatttt caccctctc ccctcatggg tggattcgga cttaaacacc ctcctccaca 3900

gattctcatc aagaacaccc cggtacctgc gaatccttcg accaccttca gtgcggcaaa 3960

gtttgcttcc ttcatcacac agtactccac gggacaggtc agcgtggaga tcgagtggga 4020

gctgcagaag gaaaacagca aacgctggaa tcccgaaatt cagtacactt ccaactacaa 4080

caagtctgtt aatgtggact ttactgtgga cactaatggc gtgtattcag agcctcgccc 4140

cattggcacc agatacctga ctcgtaatct gtaattgctt gttaatcaat aaaccgttta 4200

attcgtttca gttgaacttt ggtctctgcg tatttctttc ttatctagtt tccatgctct 4260

aggatccact agtaacggcc gccagtgtgc tggaattcgg ctttgtagtt aatgattaac 4320

ccgccatgct acttatctac gtagccatgc tctagaggtc ctgtattaga ggtcacgtga 4380

gtgttttgcg acattttgcg acaccatgtg gtcacgctgg gtatttaagc ccgagtgagc 4440

acgcagggtc tccattttga agcgggaggt ttgaacgcgc agccgccaag ccgaattctg 4500

cagatatcca aacactggcg gccgctcgac tagagcggcc gccaccgcgg tggagctcca 4560

gcttttgttc cctttagtga gggttaattg cgcgcttggc gtaatcatgg tcatagctgt 4620

ttcctgtgtg aaattgttat ccgctcacaa ttccacacaa catacgagcc ggaagcataa 4680

agtgtaaagc ctggggtgcc taatgagtga gctaactcac attaattgcg ttgcgctcac 4740

tgcccgcttt ccagtcggga aacctgtcgt gccagctgca ttaatgaatc ggccaacgcg 4800

cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc ctcgctcact gactcgctgc 4860

gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcggtat cagctcactc aaaggcggta atacggttat 4920

ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 4980

ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 5040

atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 5100

aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 5160

gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 5220

ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg 5280

ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac 5340

acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 5400

gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat 5460

ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 5520

ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 5580

gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 5640

ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 5700

agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 5760

ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 5820

gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 5880

catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat 5940

cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 6000

cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 6060

gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 6120

tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 6180

gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 6240

tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 6300

gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 6360

gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 6420

taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 6480

tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 6540

ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 6600

taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca 6660

tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 6720

aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc taaattgtaa gcgttaatat 6780

tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca ttttttaacc aataggccga 6840

aatcggcaaa atcccttata aatcaaaaga atagaccgag atagggttga gtgttgttcc 6900

agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc aacgtcaaag ggcgaaaaac 6960

cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcaccc taatcaagtt ttttggggtc 7020

gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaccc taaagggagc ccccgattta gagcttgacg 7080

gggaaagccg gcgaacgtgg cgagaaagga agggaagaaa gcgaaaggag cgggcgctag 7140

ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc acacccgccg cgcttaatgc 7200

gccgctacag ggcgcgtccc attcgccatt caggctgcgc aactgttggg aagggcgatc 7260

ggtgcgggcc tcttcgctat tacgccagct ggcgaaaggg ggatgtgctg caaggcgatt 7320

aagttgggta acgccagggt tttcccagtc acgacgttgt aaaacgacgg ccagtgagcg 7380

cgcgtaatac gactcactat agggcgaatt gggta 7415

<210> 2

<211> 11569

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Strand of Plasmid pHelper-Kan

<400> 2

ggtacccaac tccatgctta acagtcccca ggtacagccc accctgcgtc gcaaccagga 60

acagctctac agcttcctgg agcgccactc gccctacttc cgcagccaca gtgcgcagat 120

taggagcgcc acttcttttt gtcacttgaa aaacatgtaa aaataatgta ctaggagaca 180

ctttcaataa aggcaaatgt ttttatttgt acactctcgg gtgattattt acccccccacc 240

cttgccgtct gcgccgttta aaaatcaaag gggttctgcc gcgcatcgct atgcgccact 300

ggcagggaca cgttgcgata ctggtgttta gtgctccact taaactcagg cacaaccatc 360

cgcggcagct cggtgaagtt ttcactccac aggctgcgca ccatcaccaa cgcgtttagc 420

aggtcgggcg ccgatatctt gaagtcgcag ttggggcctc cgccctgcgc gcgcgagttg 480

cgatacacag ggttgcagca ctggaacact atcagcgccg ggtggtgcac gctggccagc 540

acgctcttgt cggagatcag atccgcgtcc aggtcctccg cgttgctcag ggcgaacgga 600

gtcaactttg gtagctgcct tcccaaaaag ggtgcatgcc caggctttga gttgcactcg 660

caccgtagtg gcatcagaag gtgaccgtgc ccggtctggg cgttaggata cagcgcctgc 720

atgaaagcct tgatctgctt aaaagccacc tgagcctttg cgccttcaga gaagaacatg 780

ccgcaagact tgccggaaaa ctgattggcc ggacaggccg cgtcatgcac gcagcacctt 840

gcgtcggtgt tggagatctg caccacattt cggccccacc ggttcttcac gatcttggcc 900

ttgctagact gctccttcag cgcgcgctgc ccgttttcgc tcgtcacatc catttcaatc 960

acgtgctcct tatttatcat aatgctcccg tgtagacact taagctcgcc ttcgatctca 1020

gcgcagcggt gcagccacaa cgcgcagccc gtgggctcgt ggtgcttgta ggttacctct 1080

gcaaacgact gcaggtacgc ctgcaggaat cgccccatca tcgtcacaaa ggtcttgttg 1140

ctggtgaagg tcagctgcaa cccgcggtgc tcctcgttta gccaggtctt gcatacggcc 1200

gccagagctt ccacttggtc aggcagtagc ttgaagtttg cctttagatc gttatccacg 1260

tggtacttgt ccatcaacgc gcgcgcagcc tccatgccct tctcccacgc agacacgatc 1320

ggcaggctca gcgggtttat caccgtgctt tcactttccg cttcactgga ctcttccttt 1380

tcctcttgcg tccgcatacc ccgcgccact gggtcgtctt cattcagccg ccgcaccgtg 1440

cgcttacctc ccttgccgtg cttgattagc accggtgggt tgctgaaacc caccatttgt 1500

agcgccacat cttctctttc ttcctcgctg tccacgatca cctctgggga tggcgggcgc 1560

tcgggcttgg gagaggggcg cttctttttc tttttggacg caatggccaa atccgccgtc 1620

gaggtcgatg gccgcgggct gggtgtgcgc ggcaccagcg catcttgtga cgagtcttct 1680

tcgtcctcgg actcgagacg ccgcctcagc cgctttttg ggggcgcgcg gggaggcggc 1740

ggcgacggcg acggggacga cacgtcctcc atggttggtg gacgtcgcgc cgcaccgcgt 1800

ccgcgctcgg gggtggtttc gcgctgctcc tcttcccgac tggccatttc cttctcctat 1860

aggcagaaaa agatcatgga gtcagtcgag aaggaggaca gcctaaccgc ccccttgag 1920

ttcgccacca ccgcctccac cgatgccgcc aacgcgccta ccaccttccc cgtcgaggca 1980

cccccgcttg aggaggagga agtgattatc gagcaggacc caggttttgt aagcgaagac 2040

gacgaggatc gctcagtacc aacagaggat aaaaagcaag accaggacga cgcagaggca 2100

aacgaggaac aagtcgggcg gggggaccaa aggcatggcg actacctaga tgtgggagac 2160

gacgtgctgt tgaagcatct gcagcgccag tgcgccatta tctgcgacgc gttgcaagag 2220

cgcagcgatg tgcccctcgc catagcggat gtcagccttg cctacgaacg ccacctgttc 2280

tcaccgcgcg taccccccaa acgccaagaa aacggcacat gcgagcccaa cccgcgcctc 2340

aacttctacc ccgtatttgc cgtgccagag gtgcttgcca cctatcacat ctttttccaa 2400

aactgcaaga taccctatc ctgccgtgcc aaccgcagcc gagcggacaa gcagctggcc 2460

ttgcggcagg gcgctgtcat acctgatatc gcctcgctcg acgaagtgcc aaaaatcttt 2520

gagggtcttg gacgcgacga gaaacgcgcg gcaaacgctc tgcaacaaga aaacagcgaa 2580

aatgaaagtc actgtggagt gctggtggaa cttgagggtg acaacgcgcg cctagccgtg 2640

ctgaaacgca gcatcgaggt cacccacttt gcctacccgg cacttaacct acccccccaag 2700
gttatgagca cagtcatgag cgagctgatc gtgcgccgtg cacgacccct ggagagggat 2760
gcaaacttgc aagaacaaac cgaggagggc ctacccgcag ttggcgatga gcagctggcg 2820
cgctggcttg agacgcgcga gcctgccgac ttggaggagc gacgcaagct aatgatggcc 2880
gcagtgcttg ttaccgtgga gcttgagtgc atgcagcggt tctttgctga cccggagatg 2940
cagcgcaagc tagaggaaac gttgcactac acctttcgcc agggctacgt gcgccaggcc 3000
tgcaaaattt ccaacgtgga gctctgcaac ctggtctcct accttggaat tttgcacgaa 3060

aaccgcctcg ggcaaaacgt gcttcattcc acgctcaagg gcgaggcgcg ccgcgactac 3120
gtccgcgact gcgtttactt atttctgtgc tacacctggc aaacggccat gggcgtgtgg 3180
cagcaatgcc tggaggagcg caacctaaag gagctgcaga agctgctaaa gcaaaacttg 3240
aaggacctat ggacggcctt caacgagcgc tccgtggccg cgcacctggc ggacattatc 3300
ttccccgaac gcctgcttaa aaccctgcaa cagggtctgc cagacttcac cagtcaaagc 3360
atgttgcaaa actttaggaa ctttatccta gagcgttcag gaattctgcc cgccacctgc 3420
tgtgcgcttc ctagcgactt tgtgcccatt aagtaccgtg aatgccctcc gccgctttgg 3480

ggtcactgct accttctgca gctagccaac taccttgcct accactccga catcatggaa 3540
gacgtgagcg gtgacggcct actggagtgt cactgtcgct gcaacctatg caccccgcac 3600
cgctccctgg tctgcaattc gcaactgctt agcgaaagtc aaattatcgg taccttttgag 3660
ctgcagggtc cctcgcctga cgaaaagtcc gcggctccgg ggttgaaact cactccgggg 3720
ctgtggacgt cggcttacct tcgcaaattt gtacctgagg actaccacgc ccacgagatt 3780
aggttctacg aagaccaatc ccgcccgcca aatgcggagc ttaccgcctg cgtcattacc 3840
cagggccaca tccttggcca attgcaagcc atcaacaaag cccgccaaga gtttctgcta 3900

cgaaagggac ggggggttta cctggacccc cagtccggcg aggagctcaa cccaatcccc 3960
ccgccgccgc agccctatca gcagccgcgg gcccttgctt cccaggatgg cacccaaaaa 4020
gaagctgcag ctgccgccgc cgccacccac ggacgaggag gaatactggg acagtcaggc 4080
agaggaggtt ttggacgagg aggaggagat gatggaagac tgggacagcc tagacgaagc 4140
ttccgaggcc gaagaggtgt cagacgaaac accgtcaccc tcggtcgcat tcccctcgcc 4200
ggcgccccag aaattggcaa ccgttcccag catcgctaca acctccgctc ctcaggcgcc 4260
gccggcactg cctgttcgcc gacccaaccg tagatgggac accactggaa ccagggccgg 4320

taagtctaag cagccgccgc cgttagccca agagcaacaa cagcgccaag gctaccgctc 4380

gtggcgcggg cacaagaacg ccatagttgc ttgcttgcaa gactgtgggg gcaacatctc 4440

cttcgcccgc cgctttcttc tctaccatca cggcgtggcc ttcccccgta acatcctgca 4500

ttactaccgt catctctaca gcccctactg caccggcggc agcggcagcg gcagcaacag 4560

cagcggtcac acagaagcaa aggcgaccgg atagcaagac tctgacaaag cccaagaaat 4620

ccacagcggc ggcagcagca ggaggaggag cgctgcgtct ggcgcccaac gaacccgtat 4680

cgacccgcga gcttagaaat aggatttttc ccactctgta tgctatattt caacaaagca 4740

ggggccaaga acaagagctg aaaataaaaa acaggtctct gcgctccctc acccgcagct 4800

gcctgtatca caaaagcgaa gatcagcttc ggcgcacgct ggaagacgcg gaggctctct 4860

tcagcaaata ctgcgcgctg actcttaagg actagtttcg cgccctttct caaatttaag 4920

cgcgaaaact acgtcatctc cagcggccac acccggcgcc agcacctgtc gtcagcgcca 4980

ttatgagcaa ggaaattccc acgccctaca tgtggagtta ccagccacaa atgggacttg 5040

cggctggagc tgcccaagac tactcaaccc gaataaacta catgagcgcg ggaccccaca 5100

tgatatcccg ggtcaacgga atccgcgccc accgaaaccg aattctcctc gaacaggcgg 5160

ctattaccac cacacctcgt aataacctta atccccgtag ttggcccgct gccctggtgt 5220

accaggaaag tcccgctccc accactgtgg tacttcccag agacgcccag gccgaagttc 5280

agatgactaa ctcaggggcg cagcttgcgg gcggctttcg tcacagggtg cggtcgcccg 5340

ggcgttttag ggcggagtaa cttgcatgta ttgggaattg tagttttttt aaaatgggaa 5400

gtgacgtatc gtgggaaaac ggaagtgaag atttgaggaa gttgtgggtt ttttggcttt 5460

cgtttctggg cgtaggttcg cgtgcggttt tctgggtgtt ttttgtggac tttaaccgtt 5520

acgtcatttt ttagtcctat atatactcgc tctgtacttg gccctttta cactgtgact 5580

gattgagctg gtgccgtgtc gagtggtgtt ttttaatagg tttttttact ggtaaggctg 5640

actgttatgg ctgccgctgt ggaagcgctg tatgttgttc tggagcggga gggtgctatt 5700

ttgcctaggc aggagggttt ttcaggtgtt tatgtgtttt tctctcctat taattttgtt 5760

atacctccta tgggggctgt aatgttgtct ctacgcctgc gggtatgtat tcccccgggc 5820

tatttcggtc gctttttagc actgaccgat gttaaccaac ctgatgtgtt taccgagtct 5880

tacattatga ctccggacat gaccgaggaa ctgtcggtgg tgctttttaa tcacggtgac 5940

cagttttttt acggtcacgc cggcatggcc gtagtccgtc ttatgcttat aagggttgtt 6000

tttcctgttg taagacaggc ttctaatgtt taaatgtttt tttttttgtt attttatttt 6060

gtgtttaatg caggaacccg cagacatgtt tgagagaaaa atggtgtctt tttctgtggt 6120

ggttccggaa cttacctgcc tttatctgca tgagcatgac tacgatgtgc ttgctttttt 6180

gcgcgaggct ttgcctgatt ttttgagcag caccttgcat tttatatcgc cgcccatgca 6240

acaagcttac ataggggcta cgctggttag catagctccg agtatgcgtg tcataatcag 6300

tgtgggttct tttgtcatgg ttcctggcgg ggaagtggcc gcgctggtcc gtgcagacct 6360

gcacgattat gttcagctgg ccctgcgaag ggacctacgg gatcgcggta tttttgttaa 6420

tgttccgctt ttgaatctta tacaggtctg tgaggaacct gaatttttgc aatcatgatt 6480

cgctgcttga ggctgaaggt ggagggcgct ctggagcaga tttttacaat ggccggactt 6540

aatattcggg atttgcttag agacatattg ataaggtggc gagatgaaaa ttatttgggc 6600

atggttgaag gtgctggaat gtttatagag gagattcacc ctgaagggtt tagcctttac 6660

gtccacttgg acgtgagggc agtttgcctt ttggaagcca ttgtgcaaca tcttacaaat 6720

gccattatct gttctttggc tgtagagttt gaccacgcca ccggagggga gcgcgttcac 6780

ttaatagatc ttcattttga ggttttggat aatcttttgg aataaaaaaa aaaaaacatg 6840

gttcttccag ctcttcccgc tcctcccgtg tgtgactcgc agaacgaatg tgtaggttgg 6900

ctgggtgtgg cttattctgc ggtggtggat gttatcaggg cagcggcgca tgaaggagtt 6960

tacatagaac ccgaagccag ggggcgcctg gatgctttga gagagtggat atactacaac 7020

tactacacag agcgagctaa gcgacgagac cggagacgca gatctgtttg tcacgcccgc 7080

acctggtttt gcttcaggaa atatgactac gtccggcgtt ccatttggca tgacactacg 7140

accaacacga tctcggttgt ctcggcgcac tccgtacagt agggatcgcc tacctccttt 7200

tgagacagag acccgcgcta ccatactgga ggatcatccg ctgctgcccg aatgtaacac 7260

tttgacaatg cacaacgtga gttacgtgcg aggtcttccc tgcagtgtgg gatttacgct 7320

gattcaggaa tgggttgttc cctgggatat ggttctgacg cgggaggagc ttgtaatcct 7380

gaggaagtgt atgcacgtgt gcctgtgttg tgccaacatt gatatcatga cgagcatgat 7440

gatccatggt tacgagtcct gggctctcca ctgtcattgt tccagtcccg gttccctgca 7500

gtgcatagcc ggcgggcagg ttttggccag ctggtttagg atggtggtgg atggcgccat 7560

gtttaatcag aggtttatat ggtaccggga ggtggtgaat tacaacatgc caaaagaggt 7620

aatgtttatg tccagcgtgt ttatgagggg tcgccactta atctacctgc gcttgtggta 7680

tgatggccac gtgggttctg tggtccccgc catgagcttt ggatacagcg ccttgcactg 7740

tgggattttg aacaatattg tggtgctgtg ctgcagttac tgtgctgatt taagtgagat 7800

cagggtgcgc tgctgtgccc ggaggacaag gcgtctcatg ctgcgggcgg tgcgaatcat 7860

cgctgaggag accactgcca tgttgtattc ctgcaggacg gagcggcggc ggcagcagtt 7920

tattcgcgcg ctgctgcagc accaccgccc tatcctgatg cacgattatg actctacccc 7980

catgtaggcg tggacttccc cttcgccgcc cgttgagcaa ccgcaagttg gacagcagcc 8040

tgtggctcag cagctggaca gcgacatgaa cttaagcgag ctgcccgggg agtttattaa 8100

tatcactgat gagcgtttgg ctcgacagga aaccgtgtgg aatataacac ctaagaatat 8160

gtctgttacc catgatatga tgctttttaa ggccagccgg ggagaaagga ctgtgtactc 8220

tgtgtgttgg gagggaggtg gcaggttgaa tactagggtt ctgtgagttt gattaaggta 8280

cggtgatcaa tataagctat gtggtggtgg ggctatacta ctgaatgaaa aatgacttga 8340

aattttctgc aattgaaaaa taaacacgtt gaaacataac atgcaacagg ttcacgattc 8400

tttattcctg ggcaatgtag gagaaggtgt aagagttggt agcaaaagtt tcagtggtgt 8460

attttccact ttcccaggac catgtaaaag acatagagta agtgcttacc tcgctagttt 8520

ctgtggattc actagaatcg atgtaggatg ttgcccctcc tgacgcggta ggagaagggg 8580

agggtgccct gcatgtctgc cgctgctctt gctcttgccg ctgctgagga ggggggcgca 8640

tctgccgcag caccggatgc atctgggaaa agcaaaaaag gggctcgtcc ctgtttccgg 8700

aggaatttgc aagcggggtc ttgcatgacg gggaggcaaa cccccgttcg ccgcagtccg 8760

gccggcccga gactcgaacc gggggtcctg cgactcaacc cttggaaaat aaccctccgg 8820

ctacagggag cgagccactt aatgctttcg ctttccagcc taaccgctta cgccgcgcgc 8880

ggccagtggc caaaaaagct agcgcagcag ccgccgcgcc tggaaggaag ccaaaaggag 8940

cgctcccccg ttgtctgacg tcgcacacct gggttcgaca cgcgggcggt aaccgcatgg 9000

atcacggcgg acggccggat ccggggttcg aaccccggtc gtccgccatg ataccttgc 9060

gaatttatcc accagaccac ggaagagtgc ccgcttacag gctctccttt tgcacggtct 9120

agagcgtcaa cgactgcgca cgcctcaccg gccagagcgt cccgaccatg gagcactttt 9180

tgccgctgcg caacatctgg aaccgcgtcc gcgactttcc gcgcgcctcc accaccgccg 9240

ccggcatcac ctggatgtcc aggtacatct acggattacg tcgacgttta aaccatatga 9300

tcagctcact caaaggcggt aatacggtta tccacagaat caggggataa cgcaggaaag 9360

aacatgtgag caaaaggcca gcaaaaggcc aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg 9420

tttttccata ggctccgccc ccctgacgag catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg 9480

tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg 9540

cgctctcctg ttccgaccct gccgcttacc ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga 9600

agcgtggcgc tttctcatag ctcacgctgt aggtatctca gttcggtgta ggtcgttcgc 9660

tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc gttcagcccg accgctgcgc cttatccggt 9720

aactatcgtc ttgagtccaa cccggtaaga cacgacttat cgccactggc agcagccact 9780

ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta ggcggtgcta cagagttctt gaagtggtgg 9840

cctaactacg gctacactag aagaacagta tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt 9900

accttcggaa aaagagttgg tagctcttga tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggt 9960

ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct 10020

ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag tggaacgaaa actcacgtta agggattttg 10080

gtcatgagat tatcaaaaag gatcttcacc tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt 10140

aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact tggtctgaca gtcagaagaa ctcgtcaaga 10200

aggcgataga aggcgatgcg ctgcgaatcg ggagcggcga taccgtaaag cacgaggaag 10260

cggtcagccc attcgccgcc aagctcttca gcaatatcac gggtagccaa cgctatgtcc 10320

tgatagcggt ccgccacacc cagccggcca cagtcgatga atccagaaaa gcggccattt 10380

tccaccatga tattcggcaa gcaggcatcg ccatgggtca cgacgagatc ctcgccgtcg 10440

ggcatgctcg ccttgagcct ggcgaacagt tcggctggcg cgagcccctg atgctcttcg 10500

tccagatcat cctgatcgac aagaccggct tccatccgag tacgtgctcg ctcgatgcga 10560

tgtttcgctt ggtggtcgaa tgggcaggta gccggatcaa gcgtatgcag ccgccgcatt 10620

gcatcagcca tgatggatac tttctcggca ggagcaaggt gagatgacag gagatcctgc 10680

cccggcactt cgcccaatag cagccagtcc cttcccgctt cagtgacaac gtcgagtaca 10740

gctgcgcaag gaacgcccgt cgtggccagc cacgatagcc gcgctgcctc gtcttgcagt 10800

tcattcaggg caccggacag gtcggtcttg acaaaaagaa ccgggcgccc ctgcgctgac 10860

agccggaaca cggcggcatc agagcagccg attgtctgtt gtgcccagtc atagccgaat 10920

agcctctcca cccaagcggc cggagaacct gcgtgcaatc catcttgttc aatcatactc 10980

ttccttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag cggatacata 11040

tttgaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc ccgaaaagtg 11100

ccacctaaat tgtaagcgtt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca 11160

gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga 11220

ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg 11280

actccaacgt caaagggcga aaaaccgtct atcagggcga tggcccacta cgtgaaccat 11340

caccctaatc aagttttttg gggtcgaggt gccgtaaagc actaaatcgg aaccctaaag 11400

ggagcccccg atttagagct tgacggggaa agccggcgaa cgtggcgaga aaggaaggga 11460

agaaagcgaa aggagcgggc gctagggcgc tggcaagtgt agcggtcacg ctgcgcgtaa 11520

ccaccacacc cgccgcgctt aatgcgccgc tacagggcgc gatggatcc 11569

<210> 3

<211> 5030

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Strand of Plasmid pAV-CMV-EGFP

<400> 3

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg ccctccagtg agcgagcgcg cagagaggga gtggccaact ccatcactag 120

gggttcctgc ggccgcacgc gtctagttat taatagtaat cgaattcgtg ttactcataa 180

ctagtaaggt cgggcaggaa gagggcctat ttcccatgat tccttcatat ttgcatatac 240

gatacaaggc tgttagagag ataattagaa ttaatttgac tgtaaacaca aagatattag 300

tacaaaatac gtgacgtaga aagtaataat ttcttgggta gtttgcagtt ttaaaattat 360

gttttaaaat ggactatcat atgcttaccg taacttgaaa gtatttcgat ttcttgggtt 420

tatatatctt gtggaaagga cgcgggatcc actggaccag gcagcagcgt cagaagactt 480

ttttggaaaa gcttgactag taatactgta atagtaatca attacggggt cattagttca 540

tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccgc ctggctgacc 600

gcccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag taacgccaat 660

agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc acttggcagt 720

acatcaagtg tatcatatgc caagtacgcc ccctattgac gtcaatgacg gtaaatggcc 780

cgcctggcat tatgcccagt acatgacctt atgggacttt cctacttggc agtacatcta 840

cgtattagtc atcgctatta ccatggtgat gcggttttgg cagtacatca atgggcgtgg 900

atagcggttt gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca atgggagttt 960

gttttgcacc aaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc cccattgacg 1020

caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctgg tttagtgaac 1080

cgtcagatcc gctagagatc cggtaccgag gagatctgcc gccgcgatcg ccggcgcgcc 1140

agatctcacg cttaactagc tagcggaccg acgcgtacgc ggccgctcga gatggtgagc 1200

aagggcgagg agctgttcac cggggtggtg cccatcctgg tcgagctgga cggcgacgta 1260

aacggccaca agttcagcgt gtccggcgag ggcgagggcg atgccaccta cggcaagctg 1320

accctgaagt tcatctgcac caccggcaag ctgcccgtgc cctggcccac cctcgtgacc 1380

accctgacct acggcgtgca gtgcttcagc cgctaccccg accacatgaa gcagcacgac 1440

ttcttcaagt ccgccatgcc cgaaggctac gtccaggagc gcaccatctt cttcaaggac 1500

gacggcaact acaagacccg cgccgaggtg aagttcgagg gcgacaccct ggtgaaccgc 1560

atcgagctga agggcatcga cttcaaggag gacggcaaca tcctggggca caagctggag 1620

tacaactaca acagccacaa cgtctatatc atggccgaca agcagaagaa cggcatcaag 1680

gtgaacttca agatccgcca caacatcgag gacggcagcg tgcagctcgc cgaccactac 1740

cagcagaaca cccccatcgg cgacggcccc gtgctgctgc ccgacaacca ctacctgagc 1800

acccagtccg ccctgagcaa agaccccaac gagaagcgcg atcacatggt cctgctggag 1860

ttcgtgaccg ccgccgggat cactctcggc atggacgagc tgtacaagta agtcgaggat 1920

tataaggatg acgacgataa attcgtcgag caccaccacc accaccacta ataaggttta 1980

tccgatccac cggatctaga taagatatcc gatccaccgg atctagataa ctgatcataa 2040

tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa aaacctccca cacctccccc 2100

tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttgttaa cttgtttatt gcagcttata 2160

atggttacaa ataaagcaat agcatcacaa atttcacaaa taaagcattt ttttcactgc 2220

attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta acgcggtaac cacgtgcgga 2280

ccgagcggcc gcaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 2340

cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 2400

cagtgagcga gcgagcgcgc agctgcctgc aggggcgcct gatgcggtat tttctcctta 2460

cgcatctgtg cggtatttca caccgcatac gtcaaagcaa ccatagtacg cgccctgtag 2520

cggcgcatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacctgccag 2580

cgccttagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttccttt ctcgccacgt tcgccggctt 2640

tccccgtcaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 2700

cctcgacccc aaaaaacttg atttgggtga tggttcacgt agtgggccat cgccctgata 2760

gacggttttt cgcccctttga cgttggagtc cacgttcttt aatagtggac tcttgttcca 2820

aactggaaca acactcaacc ctatctcggg ctattctttt gatttataag ggattttgcc 2880

gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa aaatttaacg cgaattttaa 2940

caaaatatta acgtttacaa ttttatggtg cactctcagt acaatctgct ctgatgccgc 3000

atagttaagc cagccccgac acccgccaac acccgctgac gcgccctgac gggcttgtct 3060

gctcccggca tccgcttaca gacaagctgt gaccgtctcc gggagctgca tgtgtcagag 3120

gttttcaccg tcatcaccga aacgcgcgag acgaaagggc ctcgtgatac gcctatttttt 3180

ataggttaat gtcatgataa taatggtttc ttagacgtca ggtggcactt ttcggggaaa 3240

tgtgcgcgga acccctattt gtttatttttt ctaaatacat tcaaatatgt atccgctcat 3300

gagacaataa ccctgataaa tgcttcaata atattgaaaa aggaagagta tgagtattca 3360

acatttccgt gtcgccctta ttccctttttt tgcggcattt tgccttcctg tttttgctca 3420

cccagaaacg ctggtgaaag taaaagatgc tgaagatcag ttgggtgcac gagtgggtta 3480

catcgaactg gatctcaaca gcggtaagat ccttgagagt tttcgccccg aagaacgttt 3540

tccaatgatg agcactttta aagttctgct atgtggcgcg gtattatccc gtattgacgc 3600

cgggcaagag caactcggtc gccgcataca ctattctcag aatgacttgg ttgagtactc 3660

accagtcaca gaaaagcatc ttacggatgg catgacagta agagaattat gcagtgctgc 3720

cataaccatg agtgataaca ctgcggccaa cttacttctg acaacgatcg gaggaccgaa 3780

ggagctaacc gcttttttgc acaacatggg ggatcatgta actcgccttg atcgttggga 3840

accggagctg aatgaagcca taccaaacga cgagcgtgac accacgatgc ctgtagcaat 3900

ggcaacaacg ttgcgcaaac tattaactgg cgaactactt actctagctt cccggcaaca 3960

attaatagac tggatggagg cggataaagt tgcaggacca cttctgcgct cggcccttcc 4020

ggctggctgg tttattgctg ataaatctgg agccggtgag cgtgggtctc gcggtatcat 4080

tgcagcactg gggccagatg gtaagccctc ccgtatcgta gttatctaca cgacggggag 4140

tcaggcaact atggatgaac gaaatagaca gatcgctgag ataggtgcct cactgattaa 4200

gcattggtaa ctgtcagacc aagtttactc atatatactt tagattgatt taaaacttca 4260

tttttaattt aaaaggatct aggtgaagat ccttttttgat aatctcatga ccaaaatccc 4320

ttaacgtgag ttttcgttcc actgagcgtc agaccccgta gaaaagatca aaggatcttc 4380

ttgagatcct ttttttctgc gcgtaatctg ctgcttgcaa acaaaaaaac caccgctacc 4440

agcggtggtt tgtttgccgg atcaagagct accaactctt tttccgaagg taactggctt 4500

cagcagagcg cagataccaa atactgtcct tctagtgtag ccgtagttag gccaccactt 4560

caagaactct gtagcaccgc ctacatacct cgctctgcta atcctgttac cagtggctgc 4620

tgccagtggc gataagtcgt gtcttaccgg gttggactca agacgatagt taccggataa 4680

ggcgcagcgg tcgggctgaa cgggggggttc gtgcacacag cccagcttgg agcgaacgac 4740

ctacaccgaa ctgagatacc tacagcgtga gctatgagaa agcgccacgc ttcccgaagg 4800

gagaaaggcg gacaggtatc cggtaagcgg cagggtcgga acaggagagc gcacgaggga 4860

gcttccaggg ggaaacgcct ggtatcttta tagtcctgtc gggtttcgcc acctctgact 4920

tgagcgtcga tttttgtgat gctcgtcagg ggggcggagc ctatggaaaa acgccagcaa 4980

cgcggccttt ttacggttcc tggccttttg ctggcctttt gctcacatgt 5030

<210> 4

<211> 4742

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Coding Strand of Plasmid pAV-TBG-EGFP

<400> 4

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct gcggccggtc gcgtctagta ctagtaggtt aatttttaaa aagcagtcaa 180

aagtccaagt ggcccttggc agcatttact ctctctgttt gctctggtta ataatctcag 240

gagcacaaac attccagatc caggttaatt tttaaaaagc agtcaaaagt ccaagtggcc 300

cttggcagca tttactctct ctgtttgctc tggttaataa tctcaggagc acaaacattc 360

cagatccggc gcgccagggc tggaagctac ctttgacatc atttcctctg cgaatgcatg 420

tataatttct acagaaccta ttagaaagga tcacccagcc tctgcttttg tacaactttc 480

ccttaaaaaa ctgccaattc cactgctgtt tggcccaata gtgagaactt tttcctgctg 540

cctcttggtg cttttgccta tggcccctat tctgcctgct gaagacactc ttgccagcat 600

ggacttaaac ccctccagct ctgacaatcc tctttctctt ttgttttaca tgaagggtct 660

ggcagccaaa gcaatcactc aaagttcaaa ccttatcatt ttttgctttg ttcctcttgg 720

ccttggtttt gtacatcagc tttgaaaata ccatcccagg gttaatgctg gggttaattt 780

ataactaaga gtgctctagt tttgcaatac aggacatgct ataaaaatgg aaagatgttg 840

ctttctgaga gacaggtacc gaggagatct gccgccgcga tcgccaccat ggtgagcaag 900

ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg cgacgtaaac 960

ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacttacgg caagctgacc 1020

ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct cgtgaccacc 1080

ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca gcacgacttc 1140

ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt caaggacgac 1200

ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt gaaccgcatc 1260

gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa gctggagtac 1320

aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg catcaaggtg 1380

aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga ccactaccag 1440

cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta cctgagcacc 1500

cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct gctggagttc 1560

gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtagac gcgtacgcgg 1620

ccgctcgagg attataagga tgacgacgat aaattcgtcg agcaccacca ccaccaccac 1680

taataaggtt tatccgatcc accggatcta gataagatat ccgatccacc ggatctagat 1740

aactgatcat aatcagccat accacatttg tagaggtttt acttgcttta aaaaacctcc 1800
cacacctccc cctgaacctg aaacataaaa tgaatgcaat tgttgttgtt aacttgttta 1860
ttgcagctta taatggttac aaataaagca atagcatcac aaatttcaca aataaagcat 1920
ttttttcact gcattctagt tgtggtttgt ccaaactcat caatgtatct taacgcggta 1980
accacgtgcg gacccaacgg ccgcaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc 2040
tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg 2100
cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagctgcct gcaggggcgc ctgatgcggt 2160

attttctcct tacgcatctg tgcggtattt cacaccgcat acgtcaaagc aaccatagta 2220
cgcgccctgt agcggcacat taagcgcggc gggtgtggtg gttacgcgca gcgtgaccgc 2280
tacacctgcc agcgccttag cgcccgctcc tttcgctttc ttcccttcct ttctcgccac 2340
gttcgccggc tttccccgtc aagctctaaa tcgggggctc cctttagggt tccgatttag 2400
tgctttacgg cacctcgacc ccaaaaaact tgatttgggt gatggttcac gtagtgggcc 2460
atcgccctga tagacggttt ttcgcccttt gacgttggag tccacgttct ttaatagtgg 2520
actcttgttc caaactggaa caacactcaa ctctatctcg ggctattctt ttgatttata 2580

agggattttg ccgatttcgg tctattggtt aaaaaatgag ctgatttaac aaaaatttaa 2640
cgcgaatttt aacaaaatat taacgtttac aattttatgg tgcactctca gtacaatctg 2700
ctctgatgcc gcatagttaa gccagccccg acacccgcca acacccgctg acgcgccctg 2760
acgggcttgt ctgctcccgg catccgctta cagacaagct gtgaccgtct ccgggagctg 2820
catgtgtcag aggttttcac cgtcatcacc gaaacgcgcg agacgaaagg gcctcgtgat 2880
acgcctattt ttataggtta atgtcatgat aataatggtt tcttagacgt caggtggcac 2940
ttttcgggga aatgtgcgcg gaacccctat ttgtttattt ttctaaatac attcaaatat 3000

gtatccgctc atgagacaat aaccctgata aatgcttcaa taatattgaa aaaggaagag 3060
tatgagtatt caacatttcc gtgtcgccct tattcccttt tttgcggcat tttgccttcc 3120
tgtttttgct cacccagaaa cgctggtgaa agtaaaagat gctgaagatc agttgggtgc 3180
acgagtgggt tacatcgaac tggatctcaa cagcggtaag atccttgaga gttttcgccc 3240
cgaagaacgt tttccaatga tgagcacttt taaagttctg ctatgtggcg cggtattatc 3300
ccgtattgac gccgggcaag agcaactcgg tcgccgcata cactattctc agaatgactt 3360
ggttgagtac tcaccagtca cagaaaagca tcttacggat ggcatgacag taagagaatt 3420

atgcagtgct gccataacca tgagtgataa cactgcggcc aacttacttc tgacaacgat 3480

cggaggaccg aaggagctaa ccgctttttt gcacaacatg ggggatcatg taactcgcct 3540

tgatcgttgg gaaccggagc tgaatgaagc cataccaaac gacgagcgtg acaccacgat 3600

gcctgtagca atggcaacaa cgttgcgcaa actattaact ggcgaactac ttactctagc 3660

ttcccggcaa caattaatag actggatgga ggcggataaa gttgcaggac cacttctgcg 3720

ctcggcccttt ccggctggct ggtttattgc tgataaatct ggagccggtg agcgtgggtc 3780

tcgcggtatc attgcagcac tggggccaga tggtaagccc tcccgtatcg tagttatcta 3840

cacgacgggg agtcaggcaa ctatggatga acgaaataga cagatcgctg agataggtgc 3900

ctcactgatt aagcattggt aactgtcaga ccaagtttac tcatatatac tttagattga 3960

tttaaaactt cattttaat ttaaaaggat ctaggtgaag atccttttg ataatctcat 4020

gaccaaaatc ccttaacgtg agttttcgtt ccactgagcg tcagaccccg tagaaaagat 4080

caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc tgctgcttgc aaacaaaaaa 4140

accaccgcta ccagcggtgg tttgtttgcc ggatcaagag ctaccaactc tttttccgaa 4200

ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt cttctagtgt agccgtagtt 4260

aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac ctcgctctgc taatcctgtt 4320

accagtggct gctgccagtg gcgataagtc gtgtcttacc gggttggact caagacgata 4380

gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt tcgtgcacac agcccagctt 4440

ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt gagctatgag aaagcgccac 4500

gcttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc ggcagggtcg gaacaggaga 4560

gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt tatagtcctg tcgggtttcg 4620

ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca gggggggcgga gcctatggaa 4680

aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt tgctggcctt ttgctcacat 4740

gt 4742