(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0120963
(43) 공개일자 2020년10월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/015 (2006.01) *A61K 38/16* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/864* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/015 (2013.01)
A61K 38/16 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7029284(분할)
(22) 출원일자(국제) 2013년05월15일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2014-7035017
원출원일자(국제) 2013년05월15일
심사청구일자 2018년05월14일
(85) 번역문제출일자 2020년10월13일
(86) 국제출원번호 PCT/US2013/041234
(87) 국제공개번호 WO 2013/173512
국제공개일자 2013년11월21일
(30) 우선권주장
61/647,318 2012년05월15일 미국(US)
13/840,224 2013년03월15일 미국(US)

(71) 출원인
유니버시티 오브 플로리다 리서치 파운데이션, 인코포레이티드
미국, 플로리다 32611, 게인스빌, 박스 115500, 그린터 홀 223
(72) 발명자
스리바스타바, 아룬
미국 32608 플로리다주 게인스빌 사우쓰웨스트 92 드라이브 3823
아슬라니디, 조지 블라디미로비치
미국 32626 플로리다주 게인스빌 노쓰웨스트 69 테라스 2411
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 김영

전체 청구항 수 : 총 25 항

(54) 발명의 명칭 **고 형질도입 효율 RAAV 벡터, 조성물 및 사용 방법**

(57) 요 약

본 발명은 VP3 영역 내에 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기 중 하나 또는 그의 조합의 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다. 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온, 및 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 rAAV 벡터를 또한 제공한다. 유리하게는, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 야생형 rAAV 벡터 및 비리온에 비교할 때 관심있는 다양한 세포, 조직 및 장기의 형질도입에서 개선된 효율을 갖는다.

(52) CPC특허분류
A61K 48/00 (2013.01)
C12N 15/864 (2013.01)
(72) 발명자
반 블리트, 킴 엠.
미국 32608 플로리다주 게인스빌 사우쓰웨스트 57 플레이스 8124
악벤제-맥케나, 메이비스
미국 32607 플로리다주 게인스빌 사우쓰웨스트 17 플레이스 10202

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 또는 K706에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기;

(b) 서열 8의 야생형 AAV8 캡시드 단백질의 K530, K547 또는 K569에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기;

(c) 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707 또는 S721에 상응하는 위치에 비-세린 아미노산 잔기;

(d) 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713 또는 T716에 상응하는 위치에 비-트레오닌 아미노산 잔기; 및/또는

(e) 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 또는 Y730에 상응하는 위치에 비-티로신 아미노산 잔기

를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 K459, K490, K532, K544 또는 K556에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 서열 8의 야생형 AAV8 캡시드 단백질의 K530, K547 또는 K569에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 K544 및 K566에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 비-리신 아미노산 잔기가 글루탐산 (E), 아르기닌 (R), 세린 (S) 또는 이소류신 (I)으로부터 선택되는 것인 AAV VP3 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655 또는 K706에 상응하는 위치에 글루탐산 (E) 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 K544 및 K566에 상응하는 위치에 글루탐산 (E) 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 8의 야생형 AAV8 캡시드 단백질의 K530, K547 또는 K569에 상응하는 위치에 글루탐산 (E) 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 S662에 상응하는 위치에 비-

세린 아미노산 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 비-세린 아미노산 잔기가 발린 (V), 아스파르트산 (D) 또는 히스티딘 (H)으로부터 선택되는 것인 AAV VP3 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 서열 2의 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 S662에 상응하는 위치에 발린 잔기를 포함하는 AAV VP3 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV VP3 단백질을 코딩하는 단리된 핵산 분자.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항의 단백질을 코딩하거나 제12항의 단리된 핵산 분자를 포함하는 AAV 벡터.

청구항 14

제13항에 있어서, 벡터의 형질도입 효율이 상응하는 비변형 야생형 AAV 벡터의 형질도입 효율에 비교할 때 적어도 5배 더 높은 것인 AAV 벡터.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 아데노-연관 바이러스 입자 또는 감염성 rAAV 비리온 내에 포함되는 AAV 벡터.

청구항 16

(a) 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV VP3 단백질, 제12항에 따른 단리된 핵산 분자, 또는 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 AAV 벡터; 및 (b) 제약상 허용되는 완충제, 희석제 또는 비히클을 포함하는 조성물.

청구항 17

제16항에 있어서, 포유동물 질환, 손상, 장애, 외상 또는 기능장애의 하나 이상의 증상의 진단, 예방, 치료 또는 개선을 위한 키트 내에 포함되는 조성물.

청구항 18

제16항 또는 제17항에 있어서, 포유동물에서 암, 당뇨병, 자가면역 질환, 신장 질환, 심혈관 질환, 췌장 질환, 장 질환, 간 질환, 신경계 질환, 신경근육 장애, 신경운동 결핍, 신경골격 장애, 신경계 장애, 감각신경 기능장애, 졸중, 허혈, 섭식 장애, α_1-항트립신 (AAT) 결핍, 배튼병(Batten's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 파킨슨병(Parkinson's disease), 골격 질환, 외상 또는 폐 질환의 진단 또는 요법에 사용하기 위한, 또는 상기 질환의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 또는 개선에 사용하기 위한 조성물.

청구항 19

포유동물에서 질환, 장애, 기능장애, 손상, 비정상적 상태, 선천성 결함 또는 외상의 하나 이상의 증상의 진단, 치료, 예방 또는 개선을 위한 의약의 제조에 있어서 제16항 내지 제18항 중 어느 한 항에 따른 조성물의 용도.

청구항 20

유효량의 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 AAV 벡터를 포함하는 조성물을 포유동물 세포 집단의 하나 이상의 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 포유동물 세포 집단의 형질도입 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, AAV 벡터가 서열 2의 야생형 AAV2 VP3 단백질의 K459, K490, K532, K544 또는 K556, 또는 서열 8의 야생형 AAV8 캡시드 단백질의 K530, K547 또는 K569에 상응하는 위치에 비-리신 아미노산 잔기를 포함하는 VP3 단백질을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제20항 또는 제21항에 있어서, 비-리신 아미노산 잔기가 글루탐산 (E), 아르기닌 (R), 세린 (S) 또는 이소류신 (I)인 방법.

청구항 23

제20항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 비-리신 아미노산 잔기가 글루탐산 (E)인 방법.

청구항 24

제20항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 포유동물 세포인 방법.

청구항 25

제20항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 숙주 세포가 내피 세포, 상피 세포, 혈관 세포, 간 세포, 폐 세포, 심장(heart) 세포, 췌장 세포, 장 세포, 신장 세포, 근육 세포, 골 세포, 수지상 세포, 심장(cardiac) 세포, 신경 세포, 혈액 세포, 뇌 세포, 섬유모세포 또는 암 세포인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2013년 3월 15일 출원된 미국 특허 출원 13/840,224 (계류중) 및 2012년 5월 15일 출원된 미국 특허 가출원 61/647,318 (계류중)을 기초로 한 우선권의 이익을 주장한다. 본 출원은 또한 2009년 12월 31일 출원된 미국 특허 출원 12/595,196 (2013년 5월 21일자로 U.S. 8,445,267로 등록), 2008년 4월 8일 출원된 국제 특허 출원 PCT/US2008/059647 (국내 단계) 및 2007년 4월 9일 출원된 미국 특허 가출원 60/910,798 (만료됨), 2013년 3월 29일 출원된 미국 특허 출원 13/854,011 (계류중) 및 2013년 4월 2일 출원된 미국 특허 출원 13/855,640 (계류중)에 관련된다. 상기한 각각의 출원의 내용은 그 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **미 연방 정부 지원 연구 또는 개발에 대한 언급**

[0004] 해당 사항 없음

배 경 기 술

[0005] 유전자 요법 분야의 큰 진전은 치료적 유전 물질을 전달하기 위해 바이러스를 사용함으로써 달성되었다. 아데노-연관 바이러스 (AAV)는 그의 낮은 면역원성 및 비-분열 세포를 효과적으로 형질도입하는 그의 능력 때문에 유전자 요법을 위한 매우 효과적인 바이러스 벡터로서 상당한 주목을 끌었다. AAV는 다양한 세포 및 조직 종류를 감염시키는 것으로 밝혀졌고, 상기 바이러스 시스템을 인간 유전자 요법에 사용하기 위해 변경시키려는 유의한 진전이 지난 10년에 걸쳐 이루어졌다.

[0006] 그의 정상적인 "야생형" 형태에서, 재조합 AAV (rAAV) DNA는 길이가 약 4600개 뉴클레오티드 (nt)인 단일 가닥 분자로서 바이러스 캡시드(capsid) 내로 패키징된다. 바이러스에 의한 세포의 감염 후에, 세포의 분자 기구는 단일 DNA 가닥을 이중 가닥 형태로 전환한다.

[0007] AAV는 유전자 전달 비히클로서 그의 사용에 유리한 많은 특성을 갖는다: 1) 야생형 바이러스는 임의의 병리학적 인간 병태와 연관되지 않고; 2) 재조합 형태는 천연 바이러스 코딩 서열을 함유하지 않고; 3) 지속적인 트랜스제닉(transgenic) 발현이 많은 용도에서 관찰되었다. 유전자 요법의 주요 장애물 중의 하나인 벡터-유래 및 트랜스진(transgene)-유래 에피토프에 대한 세포 면역 반응에서 면역 경쟁의 유도는 복제-결핍 및 재조합 AAV에 의해 발현되는 바이러스 단백질의 결여에 의해 극복될 수 있다.

[0008] 재조합 아데노-연관 바이러스 벡터의 형질도입 효율은 시험관내에서 및 생체내에서 상이한 세포 및 조직에서 크

게 상이하다. AAV의 생활 주기의 근본적인 단계를 규명하기 위해 체계적인 연구가 수행되었다. 예를 들어, 표피 성장 인자 수용체 단백질 티로신 키나제 (EGFR-PTK)에 의해 티로신 잔기에서 인산화된 세포 단백질 FKBP52는 시험관내에서 및 생체내에서 AAV 제2 가닥 DNA 합성을 억제하고 따라서 트랜스진 발현을 억제함이 증명되었다. 또한, EGFR-PTK 신호전달은 유비퀴틴/프로테아솜 경로-매개 세포내 수송 및 AAV 벡터의 FKBP52-매개 제2 가닥 DNA 합성을 매개함이 입증되었다. 이들 연구에서, EGFR-PTK 신호전달의 억제는 AAV 캡시드 단백질의 유비퀴틴화 감소를 유발하였고, 이것은 다시 AAV 벡터의 프로테아솜-매개 분해를 제한함으로써 핵 수송을 촉진하고, AAV 캡시드 상의 티로신 잔기의 EGFR-PTK-매개 인산화가 관련됨을 나타내었다.

발명의 내용

[0009] **발명의 개요**

[0010] 본 발명은 VP3 영역 내에 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기 중 하나 또는 이들의 조합의 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다. 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온, 및 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 rAAV 벡터를 또한 제공한다. 유리하게는, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 야생형 rAAV 벡터 및 비리온에 비교할 때 관심있는 다양한 세포, 조직 및 장기의 형질도입에서 개선된 효율을 갖는다.

[0011] 한 실시양태에서, 본 발명은 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공하고, 여기서 AAV 캡시드 단백질의 VP3 영역은 야생형 AAV의 캡시드 단백질 [예를 들어, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 또는 서열 10; 및 한 실시양태에서, 바람직하게는 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 위치에 비-리신 잔기를 포함하고, 여기서 야생형 AAV 단백질의 VP3 영역 내의 리신 잔기는 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706 중 하나 이상 또는 이들의 임의의 조합이다.

[0012] 한 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E) 또는 아르기닌 (R)으로 변형된다. 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기는 아르기닌 (K532R)으로 변형된다.

[0013] 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K490, K544, K549 및 K556에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K490, K544, K549 및 K556에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E)으로 변형된다.

[0014] 한 실시양태에서, 본 발명은 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K544 및 K556 잔기에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 글루탐산 (E)으로 변형된 AAV2 벡터를 제공한다.

[0015] 특정 실시양태에서, 야생형 AAV8 캡시드 서열의 K530, K547 및 K569에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 특정한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K530, K547 및 K569에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E)으로 변형된다.

[0016] 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 조합이 변형되고, 여기서 변형은 야생형 AAV 캡시드 서열 [예를 들어, 서열 1-10 중 하나 이상; 및 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2 서열 (서열 2)의 캡시드 단백질]의

[0017] (Y444F+Y500F+Y730F+T491V),

[0018] (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T550V),

[0019] (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T659V),

[0020] (T491V+T550V+T659V),

[0021] (Y440F+Y500F+Y730F),

[0022] (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+S662V), 및/또는

[0023] (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T550V+T659V)

[0024] 에 상응하는 위치에서 발생한다.

[0025] 관련 실시양태에서, 본 발명은 본원에 개시된 벡터 및 조성물의 사용 방법을 제공하고, 개시된 바이러스 벡터 구축물을 사용하여 관심있는 하나 이상의 세포, 하나 이상의 조직 및/또는 하나 이상의 장기, 특히 포유동물의 것의 형질도입 방법을 추가로 제공한다. 전반적이고 일반적인 의미에서, 상기 방법은 일반적으로 바이러스 벡터를 사용하여 적어도 제1 세포 또는 제1 세포 집단을 형질전환하기에 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안, 유효량의 본 발명의 rAAV 벡터 및/또는 감염성 AAV 바이러스 입자 또는 재조합 AAV 비리온을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 다르게는 이로 이루어지는 적어도 제1 조성물을 관심있는 적합한 숙주 세포 내로 도입하는 단계를 적어도 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 벡터, 비리온 또는 감염성 바이러스 입자는 바람직하게는 하나 이상의 핵산 절편을 관심있는 선택된 숙주 세포 내로 도입하기 위한 벡터로서 유용하다. 바람직하게는, 숙주 세포는 포유동물 숙주 세포이고, 인간 숙주 세포가 본원에서 설명되는 재조합 벡터 및 비리온에 대한 표적으로서 특히 바람직하다. 특정 실시양태에서, 상기 벡터는 예를 들어 본원에서 설명되고 제공되는 하나 이상의 벡터, 바이러스 또는 감염성 비리온에 의해 형질전환된 포유동물 숙주 세포에서 발현될 수 있는 관심있는 하나 이상의 유전자를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드를 포함하는, 선택된 치료제 및/또는 진단제를 코딩하는 하나 이상의 단리된 DNA 절편을 추가로 포함할 것이다.

[0026] 한 측면에서, 본 발명은 하나 이상의 유익한 또는 치료 생성물(들)을 코딩하는 유전 물질을 포유동물 세포 및 조직에 전달하기 위한 방법에 유용한, 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터, 비리온, 바이러스 입자를 포함하는 조성물, 및 그의 제약 제제를 추가로 제공한다. 특히, 본 발명의 조성물 및 방법은 하나 이상의 포유동물 질환의 증상의 치료, 예방 및/또는 개선에 있어서 그의 사용을 통해 당업계에 유의한 진전을 제공한다. 인간 유전자 요법은 많은 다양한 질환, 장애, 및 기능장애의 치료에 사용하기 위한 새로운 개선된 바이러스 벡터 구축물을 제공함으로써 특히 본 개시내용으로부터 도움을 받을 것으로 고려된다.

[0027] 또 다른 측면에서, 본 발명은 벡터 구축물이 전달되는 포유동물에서 하나 이상의 장애의 예방, 치료 및/또는 개선을 위한 하나 이상의 포유동물 치료제를 코딩하는 변형된 rAAV 벡터에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 포유동물 질환, 기능장애, 손상 및/또는 장애의 하나 이상의 증상의 치료, 예방 및/또는 개선에 사용하기 위한, 예를 들어 단백질(들), 폴리펩티드(들), 펩티드(들), 효소(들), 항체, 항원 결합 단편 및 그의 변이체 및/또는 활성 단편을 포함하고 이로 제한되지 않는 하나 이상의 포유동물 치료제(들)을 코딩하는 rAAV-기반 발현 구축물을 제공한다.

[0028] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 세포에서 하나 이상의 내인성 생물학적 과정의 활성을 변경, 억제, 저하, 예방, 제거 또는 손상시키는 하나 이상의 치료제를 코딩하는 적어도 제1 핵산 절편을 포함하는 유전자 변형된 rAAV 벡터에 관한 것이다. 특정 실시양태에서, 상기 치료제는 하나 이상의 대사 과정, 기능장애, 장애 또는 질환의 효과를 선택적으로 억제하거나 감소시키는 것일 수 있다. 특정 실시양태에서, 결함은 치료가 요구되는 포유동물에 대한 손상 또는 외상에 의해 야기될 수 있다. 다른 실시양태에서, 결함은 내인성 생물학적 화합물의 과다발현에 의해 야기될 수 있고, 다른 실시양태에서 결함은 하나 이상의 내인성 생물학적 화합물의 과소발현 또는 심지어 결여에 의해 야기될 수 있다.

[0029] 벡터로 형질감염되는 특정 세포에 하나 이상의 외인성 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 리보자임, siRNA 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 도입하기 위해 상기 벡터의 사용이 고려될 때, 예를 들어 펩티드, 단백질, 폴리펩티드, 항체, 리보자임, siRNA 및 안티센스 올리고- 또는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코딩되는 치료제를 생산하기 위해 벡터를 포함하는 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현하는 적어도 제1 이종성 프로모터의 제어 하에 하류에 작동가능하게 위치하는 적어도 제1 외인성 폴리뉴클레오티드를 벡터 내에 통합함으로써, 본원에 개시된 변형된 AAV 벡터를 사용할 수 있다. 상기 구축물은 관심있는 치료제를 발현하기 위해 하나 이상의 이종성 프로모터를 이용할 수 있다. 상기 프로모터는 구성적, 유도가능, 또는 심지어 세포- 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다. 예시적인 프로모터는 CMV 프로모터, β-액틴 프로모터, 하이브리드(hybrid) CMV 프로모터, 하이브리드 β-액틴 프로모터, EF1 프로모터, U1a 프로모터, U1b 프로모터, Tet-유도가능 프로모터, VP16-LexA 프로모터, 조인트(joint)-특이적 프로모터 및 인간-특이적 프로모터를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0030] 본 발명의 유전자 변형된 rAAV 벡터 또는 발현 시스템은 또한 rAAV 벡터에 클로닝된 이종성 유전자의 전사를 변경하거나 실행하기 위해 하나 이상의 인핸서(enhancer), 조절 요소, 전사 요소를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 제2 핵산 절편을 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 rAAV 벡터는 적어도 제1 CMV 인핸서, 합성 인핸서, 또는 세포- 또는 조직-특이적 인핸서를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어지는 제2 핵산 절편을 추가로 포함할 수 있다. 제2 핵산 절편은 또한 하나 이상의 인트론 서열, 전사후 조절 요소 등을 추가로 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 이로 이루어질 수 있다. 본 발명의 벡터 및 발현 시스템은 또한 임의로 하나 이상의 선택된 유전 요소, 폴리뉴클레오티드 등

의 편리한 제한 부위에서 rAAV 벡터 내로의 삽입을 용이하게 하기 위해 하나 이상의 폴리링커 또는 다중 제한 부위/클로닝 영역(들)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 다르게는 이로 이루어지는 제3 핵산 절편을 추가로 포함할 수 있다.

[0031] 본 발명의 측면에서, 본원에 개시된 하나 이상의 개선된 rAAV 벡터 내에 포함되는 외인성 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 포유동물 기원의 것이고, 인간, 영장류, 뮤린(murine), 돼지, 소, 양, 고양이, 개, 말, 에핀(epine), 염소, 또는 이리 기원의 폴리펩티드 및 펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드가 특히 바람직하다.

[0032] 상기한 바와 같이, 외인성 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 하나 이상의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 효소, 항체, siRNA, 리보자임, 또는 안티센스 폴리뉴클레오티드, 올리고뉴클레오티드, PNA 분자, 또는 이들 치료제의 2 이상의 조합물을 코딩할 것이다. 사실상, 외인성 폴리뉴클레오티드는 2 이상의 상기 분자, 또는 요구될 수 있는 다수의 상기 분자를 코딩할 수 있다. 조합 유전자 요법이 요구될 경우, 2 이상의 상이한 분자가 단일 rAAV 발현 시스템으로부터 생산될 수 있거나, 또는 다르게는, 선택된 숙주 세포를 치료제를 코딩하는 하나 이상의 별개의 폴리뉴클레오티드를 각각 포함할 수 있는 2 이상의 특유한 rAAV 발현 시스템으로 형질감염될 수 있다.

[0033] 다른 실시양태에서, 본 발명은 또한 치료적 및/또는 예방적 유전자 요법을 위해 포유동물, 예컨대 인간에게 투여하기 위해 제제화된, 그 자체가 또한 하나 이상의 희석제, 완충제, 생리학적 용액 또는 제약 비히클 내에 포함될 수 있는 감염성 아데노-연관 바이러스 입자 또는 비리온, 또는 다수의 상기 입자 내에 포함된 유전자 변형된 rAAV 벡터를 제공한다. 상기 벡터, 바이러스 입자, 비리온, 및 이들의 조합물은 또한 선택된 가축, 외래 또는 사육 동물, 반려 동물 (애완동물 등 포함), 및 비-인간 영장류, 동물학적 또는 다른 포획 시료 등에 대한 수의학적 투여에 허용되는 부형제 제제 내에 제공될 수 있고, 상기 벡터 및 관련 유전자 요법의 사용은 상기 동물에 대한 투여시에 유익한 효과를 생성하기 위해 필요하다.

[0034] 본 발명은 또한 개시된 rAAV 벡터, 바이러스 입자 또는 비리온 중 적어도 하나를 포함하는 숙주 세포에 관한 것이다. 상기 숙주 세포는 특히 포유동물 숙주 세포이고, 인간 숙주 세포가 특히 더 바람직하고, 세포 또는 조직 배양액에서 단리될 수 있다. 유전자 변형된 동물 모델의 경우에, 형질전환된 숙주 세포는 심지어 비-인간 동물의 신체 자체 내에 포함될 수 있다.

[0035] 특정 실시양태에서, 하나 이상의 개시된 rAAV 벡터를 포함하는 재조합 비-인간 숙주 세포 및/또는 단리된 재조합 인간 숙주 세포의 생성은 또한 예를 들어 본원에서 설명되는 rAAV 벡터의 대량 생산을 위한 수단을 비롯하여 다양한 진단 및 실험 프로토콜에 유용할 것으로 고려된다. 특히 상기 바이러스 생산 방법은 특히 유전자 요법 도구로서 유용하도록 매우 높은 역가의 바이러스 스톡을 필요로 하는 것을 포함하는 기존의 방법보다 개선된 것으로 고려된다. 본 발명자들은 본 발명의 방법의 매우 유의한 한 이점이 적합한 수준의 형질감염 비율을 계속 유지하면서 포유동물 형질도입 프로토콜에서 보다 낮은 역가의 바이러스 입자를 이용하는 능력일 것으로 생각한다.

[0036] 또한, 하나 이상의 개시된 rAAV 벡터, 발현 시스템, 감염성 AAV 입자 또는 숙주 세포를 포함하는 조성물, 및 특히 요법에 사용하기 위한, 및 하나 이상의 포유동물 질환, 장애, 기능장애 또는 외상의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한 적어도 제1 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물은 본 발명의 일부를 형성한다. 상기 제약 조성물은 임의로 하나 이상의 희석제, 완충제, 리포솜, 지질, 지질 복합체를 추가로 포함할 수 있거나; 또는 티로신-변형된 rAAV 벡터는 미세구 또는 나노입자 내에 포함될 수 있다. 인간 또는 다른 포유동물의 근내, 정맥내, 또는 장기 또는 조직 또는 다수의 세포 또는 조직 내로의 직접 주사에 적합한 제약 제제가 특히 바람직하지만, 예를 들어 신체 내의 하나 이상의 장기, 조직 또는 세포 종류 내로의 직접 주사에 적합한 제제를 비롯하여 본원에 개시된 조성물은 또한 포유동물 신체의 조심스러운 영역에 대한 투여에 유용할 것이다. 상기 주사 부위는 뇌, 관절 또는 관절낭, 활막 또는 활막 아래 조직, 힘줄, 인대, 연골, 골, 관절 주위 근육 또는 포유동물 관절의 관절강, 및 예를 들어, 복강내, 흉곽내, 혈관내, 또는 뇌실내 전달을 통한 바이러스 벡터의 도입을 포함한, 장기, 예컨대 심장, 간, 폐, 췌장, 장, 뇌, 방광, 신장, 또는 환자의 신체 내의 다른 부위에 대한 직접 투여를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0037] 본 발명의 다른 측면은 본원에 개시된 하나 이상의 rAAV 벡터, 예컨대 예를 들어 적합한 수단을 통해, 예컨대 선택된 포유동물의 근내, 정맥내, 관절내, 또는 하나 이상의 세포, 조직 또는 장기에 대한 직접 주사에 의한 포유동물에 대한 투여가 의도되는 벡터의 제약 제제를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 또는 다르게는 이로 이루어지는 재조합 아데노-연관 바이러스 비리온 입자, 조성물 및 숙주 세포에 관한 것이다. 일반적으로, 상기 조성물은 아래에서 설명되는 제약상 허용되는 부형제로 제제화될 수 있고, 요법이 요구되는 선택된 장기,

조직 및 세포에 대한 투여를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구 또는 나노입자 제제를 포함할 수 있다.

[0038] 하나 이상의 개시된 rAAV 벡터, 비리온, 바이러스 입자, 형질전환된 숙주 세포 또는 이를 포함하는 제약 조성물; 및 치료, 진단 또는 임상 실시에서의 사용을 위한 지침서를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용의 바람직한 측면을 나타낸다. 상기 키트는 하나 이상의 시약, 제한 효소, 펩티드, 치료제, 제약 화합물 또는 조성물(들)을 숙주 세포에 또는 동물에 전달하기 위한 수단 (예를 들어, 주사기, 주사가능 기기 등)을 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트는 질환, 결핍, 기능장애 및/또는 손상의 증상을 치료, 예방 또는 개선하기 위한 치료 키트일 수 있고, 하나 이상의 변형된 rAAV 벡터 구축물, 발현 시스템, 비리온 입자 또는 다수의 상기 입자, 및 치료적 및/또는 진단적 의료 요법에서 키트의 사용을 위한 지침서를 포함할 수 있다. 상기 키트는 또한 상업적 판매를 위해, 또는 예를 들어, 바이러스 학자, 의료 전문가 등을 포함하는 타인에 의한 사용을 위해 다량의 바이러스 벡터 자체 (그 내에 치료제가 코딩되거나 코딩되지 않는)를 생산하기 위한 대규모 생산 방법에 사용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 추가의 중요한 측면은 동물, 예컨대 척추동물 포유동물에서 다양한 질환, 기능장애 또는 결핍의 증상을 예방, 치료 또는 개선하기 위한 의약의 제조시에, 본원에서 설명되는 개시된 rAAV 벡터, 비리온, 발현 시스템, 조성물 및 숙주 세포의 사용 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 일반적으로 이환된 동물에서 상기 질환, 기능장애 또는 결핍의 증상을 예방, 치료 또는 완화하기 위해 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 하나 이상의 개시된 벡터, 비리온, 바이러스 입자, 숙주 세포, 조성물 또는 이들의 조합물을 상기 예방, 치료 또는 완화가 필요한 포유동물 또는 인간에게 투여하는 것을 수반한다. 또한, 방법은 상기 병태를 갖는 것으로 의심되는 동물의 예방적 처치, 또는 진단 후에 또는 증상의 발생 전에 상기 병태가 발생할 위험이 있는 동물에게 상기 조성물의 투여를 포함할 수 있다.

[0040] 상기한 바와 같이, 외인성 폴리뉴클레오티드는 바람직하게는 하나 이상의 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 리보자임, 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 또는 이들의 조합물을 코딩할 것이다. 실제로, 외인성 폴리뉴클레오티드는 2 이상의 상기 분자, 또는 요구될 수 있는 다수의 상기 분자를 코딩할 수 있다. 조합 유전자 요법이 요구될 경우, 2 이상의 상이한 분자는 단일 rAAV 발현 시스템으로부터 생산될 수 있거나, 또는 다르게는, 선택된 숙주 세포는 각각 적어도 2개의 상이한 상기 분자를 코딩하는 특유한 이종성 폴리뉴클레오티드를 제공할 2 이상의 특유한 rAAV 발현 시스템으로 형질감염될 수 있다.

[0041] 다른 실시양태에서, 본 발명은 또한 하나 이상의 제약 비히클 내에 포함된 감염성 아데노-연관 바이러스 입자 내에 포함된 개시된 rAAV 벡터에 관한 것이고, 치료적 및/또는 예방적 유전자 요법을 위해 포유동물, 예컨대 인간에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 상기 벡터는 또한 선택된 가축, 사육 동물, 애완동물 등에 대한 수의학적 투여를 위해 허용되는 제약 제제에 제공될 수 있다.

[0042] 본 발명은 또한 개시된 rAAV 벡터 및 발현 시스템을 포함하는 숙주 세포, 특히 포유동물 숙주 세포에 관한 것이고, 인간 숙주 세포가 특히 바람직하다.

[0043] 하나 이상의 개시된 rAAV 벡터, 발현 시스템, 감염성 AAV 입자, 숙주 세포를 포함하는 조성물, 및 특히 의약의 제조에 사용하기 위한 적어도 제1 제약상 허용되는 부형제를 포함하는 조성물 및 상기 rAAV 벡터의 치료적 투여를 수반하는 방법이 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 상기 제약 조성물은 임의로 리포솜, 지질, 지질 복합체를 추가로 포함할 수 있거나; 또는 rAAV 벡터는 미세구 또는 나노입자 내에 포함될 수 있다. 인간의 근내, 정맥내, 또는 장기 또는 조직 내로의 직접 주사에 적합한 제약 제제가 특히 바람직하다.

[0044] 본 발명의 다른 측면은 본원에 개시된 하나 이상의 AAV 벡터를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 비리온 입자, 조성물 및 숙주 세포, 예컨대 적합한 수단, 예컨대 선택된 포유동물의 근내, 정맥내, 또는 세포, 조직 또는 장기 내로의 직접 주사를 통해 포유동물에게 투여하는 것이 의도되는 벡터의 제약 제제에 관한 것이다. 일반적으로, 상기 조성물은 아래에서 설명되는 제약상 허용되는 부형제와 함께 제제화될 수 있고, 요법이 요구되는 선택된 장기, 조직 및 세포에 대한 투여를 용이하게 하기 위해 하나 이상의 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구 또는 나노입자 제제를 포함할 수 있다.

[0045] 하나 이상의 개시된 벡터, 비리온, 숙주 세포, 바이러스 입자 또는 조성물; 및 (ii) 치료, 진단 또는 임상 실시 양태에서 키트의 사용을 위한 지침서를 포함하는 키트가 또한 본 개시내용의 바람직한 측면을 나타낸다. 상기 키트는 하나 이상의 시약, 제한 효소, 펩티드, 치료제, 제약 화합물, 또는 숙주 세포, 또는 동물에 조성물을 전달하기 위한 수단, 예컨대 주사기, 주사가능 기기 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 키트는 특정 질환의 증상

을 치료하거나 개선하기 위한 치료 키트일 수 있고, 일반적으로 본원에서 설명되는 하나 이상의 변형된 AAV 벡터 구축물, 발현 시스템, 비리온 입자, 또는 치료 조성물, 및 키트의 사용을 위한 지침서를 포함할 것이다.

[0046] 본 발명의 또 다른 중요한 측면은 포유동물에서 다양한 폴리펩티드 결핍의 증상을 치료 또는 개선하기 위한 의약의 제조시에, 본원에서 설명되는 개시된 벡터, 비리온, 발현 시스템, 조성물 및 숙주 세포의 사용 방법에 관한 것이다. 상기 방법은 일반적으로 이환된 포유동물에서 상기 결핍의 증상을 치료 또는 개선하기 위해 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 하나 이상의 개시된 벡터, 비리온, 숙주 세포 또는 조성물을 상기 치료 또는 개선이 필요한 포유동물 또는 인간에게 투여하는 것을 수반한다. 또한, 방법은 상기 병태를 갖는 것으로 의심되는 동물의 예방적 처치, 또는 진단 후에 또는 증상의 발생 전에 상기 병태가 발생할 위험이 있는 동물에게 상기 조성물의 투여를 포함할 수 있다.

[0047] **서열의 간단한 설명**

[0048] 서열 1은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 1 (AAV1)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0049] 서열 2는 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 2 (AAV2)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0050] 서열 3은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 3 (AAV3)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0051] 서열 4는 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 4 (AAV4)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0052] 서열 5는 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 5 (AAV5)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0053] 서열 6은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 6 (AAV6)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0054] 서열 7은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 7 (AAV7)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0055] 서열 8은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 8 (AAV8)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0056] 서열 9는 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 9 (AAV9)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0057] 서열 10은 야생형 아데노-연관 바이러스 혈청형 10 (AAV10)의 캡시드 단백질의 아미노산 서열이고;

[0058] 서열 11은 본 발명에 따라 사용하기 유용한 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열이고;

[0059] 서열 12는 본 발명에 따라 사용하기 유용한 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열이다.

도면의 간단한 설명

[0060] 도 1은 포유동물 숙주 세포 내의 AAV2 수송을 위한 예시적인 개략적 모델을 보여준다.

도 2aa, 도 2ab, 도 2ac, 도 2ba, 도 2bb, 도 2bc, 도 2ca, 도 2cb, 도 2cc, 도 2da, 도 2db 및 도 2dc는 야생형 AAV1-10 캡시드의 아미노산 정렬을 보여준다. 도 2aa 및 도 2ab는 야생형 AAV1-10 혈청형 캡시드 (서열 1 내지 서열 10)의 아미노산 정렬을 보여준다. 도 2ba, 도 2bb 및 도 2bc는 야생형 AAV1-12 캡시드 내의 보존된, 표면-노출된 리신 잔기, 및 아미노산 변형의 실시양태를 보여준다. AAV1-12 사이에 보존된 리신 잔기는 굵은 글씨체로 제시된다. 도 2ca 내지 도 2cc는 야생형 AAV1-10 혈청형 캡시드의 아미노산 정렬, 및 AAV1-10 캡시드 사이에 보존된 표면-노출된 티로신 잔기를 보여준다 (보존된, 표면-노출된 잔기는 굵은 글씨체로 제시된다). 도 2da 내지 도 2dc는 야생형 AAV1-10 혈청형 캡시드의 아미노산 정렬, 및 AAV1-10 캡시드 사이에 보존된 표면-노출된 세린 및 트레오닌 잔기를 보여준다 (보존된, 표면-노출된 잔기는 굵은 글씨체로 제시된다).

도 3a 및 도 3b는 HEK293 세포에서 ssAAV 및 scAAV 매개 EGFP 발현에 대한 다양한 키나제 억제제의 효과를 보여준다. 세포를 감염 전에 1 hr 동안 억제제로 미리 처리한 후, 1 x 10^3 vgs/세포로 형질도입하였다. 도 3a: 트랜스진 발현은 감염 48 h 후에 형광 현미경에 의해 검출되었다. 도 3b: 3개의 시야로부터의 영상을 본원에서 설명되는 바와 같이 분석하였다. $^{*}P < 0.005$, $^{**}p < 0.001$ vs. WT AAV2.

도 4a 및 도 4b는 개별적인 부위-지정 AAV2 캡시드 돌연변이체를 사용한 293 세포의 형질도입 후에 EGFP 발현의 분석을 보여준다. AAV2 캡시드 내의 각각의 15개의 표면-노출된 세린 (S)을 발린 (V)으로 치환하고, 트랜스진 발현을 매개하는 그의 효율에 대해 평가하였다. 도 4a: 1 x 10^3 vgs/세포의 MOI에서 감염 48 h 후의 EGFP 발현 분석. 도 4b: 각각의 세린-돌연변이체 AAV2 벡터의 형질도입 효율의 정량. $^{*}P < 0.005$, $^{**}P < 0.001$ vs. WT AAV2.

도 5는 야생형 (WT) AAV2 벡터과 비교한 다양한 세린-발린 돌연변이체 AAV2 벡터의 패키징(packaging) 및 형질도입 효율을 보여준다. 간단히 설명하면, 벡터 패키징 및 감염성 검정을 각각의 돌연변이체-AAV 벡터에 대해 적어도 2회 수행하였다. 패키징 효율은 정량적 PCR 분석에 의해 결정하였다. 형질도입 효율은 형광 강도에 의해 추정하였다. *형광이 시험된 MOI에서 검출되지 않았다.

도 6a 및 도 6b는 AAV2 캡시드 내의 위치 662에서 세린의 상이한 아미노산으로의 치환의 트랜스진 발현의 매개에 대한 효과의 평가를 보여준다. 다음 8개의 세린 돌연변이체를 상이한 아미노산을 사용하여 생성하고, 293 세포에서 이들의 형질도입 효율을 분석하였다: S662→발린 (V), S662→알라닌 (A), S662→아스파라긴 (N), S662→아스파르트산 (D), S662→히스티딘 (H), S662→이소류신 (I), S662→류신 (L), 및 S662→페닐알라닌 (F). 도 6a: 1 x 10^3 vgs/세포의 MOI에서 293 세포의 감염 48-hr 후에 EGFP 발현 분석. 도 6b: 각각의 세린-돌연변이체 AAV2 벡터의 형질도입 효율의 정량. *P < 0.005, **P < 0.001 vs. WT AAV2.

도 7은 야생형 (WT) AAV2 벡터에 비해 다양한 아미노산으로 교체된, 본 발명의 한 측면에 따른 예시적인 세린-돌연변이체 벡터의 패키징 및 형질도입 효율을 보여준다. 패키징 및 감염성 검정은 본원에서 설명되는 바와 같이 수행하였다. V = 발린; A = 알라닌; D = 아스파르트산; F = 페닐알라닌 H = 히스티딘; N = 아스파라긴; L = 류신; 및 I = 이소류신.

도 8a 및 도 8b는 AAV2-S662V 벡터의 형질도입 효율과 다양한 세포 종류에서 p38 MAPK 활성의 상관성의 분석을 보여준다. 도 8a: 293, HeLa, NIH3T3, H2.35 및 moDC에서 WT- 및 S662V-AAV2 벡터의 형질도입 효율의 정량. 도 8b: p-p38 MAPK 발현 수준에 대한 상이한 세포주로부터의 용해물의 웨스턴 블롯(Western blot) 분석. 총 p38 MAPK 및 GAPDH 수준을 측정하고, 로딩 대조군으로 사용하였다. *P < 0.005, **P < 0.001 vs. WT AAV2.

도 9a, 도 9b, 및 도 9c는 본 발명의 한 측면에 따라 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)에서 AAV 벡터-매개 트랜스진 발현을 보여준다. 도 9a는 EGFP 발현에 대한 JNK 및 p38 MAPK 억제제, 및 위치 662에서의 세린 잔기의 부위-지정 치환의 효과를 보여준다. 도 9b는 감염 및 성숙 개시 48-hr 후에 도 9a에서의 데이터의 정량을 제공한다. 도 9c는 MOI 5 x 10^4 vgs/세포에서 본 발명에 따른 하나의 특정 벡터 (AAV2-S662V)로 감염된 moDC에서 동시-자극성 마커, 예컨대 CD80, CD83, CD86의 발현에 대한 대표적인 분석을 보여준다. 시토카인으로 자극되고 본원에서 설명되는 바와 같이 생성된 iDC (미성숙 수지상 세포), 및 mDC (성숙 수지상 세포)를 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였다. 대표적인 예가 제시된다. *P < 0.005, **P < 0.001 vs. WT AAV2.

도 10은 K562 세포에 대한 hTERT-특이적 세포독성 T-림프구 (CTL) 치사 활성의 분석을 보여준다. CTL은 끝을 절단한 인간 텔로머라제 (hTERT)를 코딩하는 AAV2-S662V 벡터에 의한 moDC의 형질도입 후에 생성되었다. AAV2-S662V-EGFP 벡터-형질도입된 moDC를 비-특이적 CTL을 생성하기 위해 사용하였다. 초록 형광 막 염색제인 3,3-디옥타데실옥사카르보시아닌 (DiOC18(3))으로 예비염색된 1 x 10^5 표적 K562 세포를 상이한 비율의 CTL (본 예시적인 예에서 80:1, 50:1, 20:1, 10:1, 및 5:1)과 밤새 동시 배양하였다. 막 투과성 핵산 역 염색제인 아이오딘화프로피듐을 손상된 원형질막을 갖는 세포를 표지하기 위해 첨가하였다. 죽은 이중 염색-양성 세포의 비율을 유동 세포 분석에 의해 분석하였다.

도 11a 및 도 11b는 표면-노출된 세린 잔기의 부위-지정 돌연변이유발이 본 발명의 한 측면에 따라 제조된 예시적인 scAAV 벡터에서 293 세포의 형질도입 효율을 증가시킴을 보여준다.

도 12a 및 도 12b는 표면-노출된 트레오닌 잔기의 부위-지정 돌연변이유발이 본 발명의 한 측면에 따라 제조된 예시적인 scAAV 벡터에서 293 세포의 형질도입 효율을 증가시킴을 보여준다.

도 13a 및 도 13b는 또한 표면-노출된 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 예시적인 조합의 부위-지정 돌연변이유발이, 특히 예시적인 scAAV 벡터가 본원에 설명된 방법에 따라 제조되고 사용될 때 H2.35 세포의 형질도입 효율을 유의하게 증가시킴을 보여준다.

도 14a, 도 14b, 도 14c, 도 14d 및 도 14e는 마우스 생체내에서 AAV 벡터-유도 선천 면역 반응을 보여준다. 도 14a는 선천 면역 매개체의 유전자 발현 프로파일링(profiling)이 수행됨을 보여주고, 2-hr 시점에서 Bay11가 존재하는 AAV 벡터 (평행사선 또는 개방 막대)를 Bay11이 존재하지 않는 AAV 벡터 (흑색 또는 회색 막대)와 비교한 유전자 발현의 변화 배수에 대한 데이터가 제시된다. 최소 역치 증가 배수 (수평 흑색선)는 2.5이었다. 도 14b는 Bay11을 사전 투여하거나 투여하지 않으면서 모의(mock)-주사 또는 ScAAV 벡터 주사 9-hr 후에 마우스

로부터의 간 균질액의 웨스턴 블롯 분석을 보여준다. 샘플을 AAV 노출에 반응한 NF-KB 신호전달의 검출을 위해 항-p52 항체를 사용함으로써 분석하였다. 항-β-액틴 항체를 로딩 대조군으로서 사용하였다. 도 14c는 NF-KB 억제제의 부재 또는 존재 하에 예시적인 AAV 벡터에 대한 체액 반응을 보여준다. 항-AAV2 IgG2a 수준은 Bay11을 사전 투여하거나 투여하지 않으면서 scAAV 벡터의 주사 후 제10일에 마우스로부터의 말초 혈액에서 결정하였다 (각각 n = 4). 도 14d는 꼬리 정맥을 통한 각각 1 x 10^{11} vgs의 WT-scAAV-EGFP 또는 TM-scAAV-EFGP 벡터/동물의 주사 10일 후에 뮤린 간세포에서 트랜스진 발현을 보여준다. 도 14e는 도 14d에 제시된 연구로부터의 대표적인 데이터의 정량적 분석을 보여준다.

도 15a, 도 15b, 도 15c 및 도 15d는 T47D 및 T47D+hHGFR 세포에서 AAV3-매개 트랜스진 발현을 보여준다. 도 15a: 동등한 수의 T47D 및 T47D+hHGFR 세포를 동일한 조건 하에 다양한 표시된 감염 다중도의 scAAV3-CBAp-EGFP 벡터로 감염시켰다. 트랜스진 발현은 감염 72시간 후에 형광 현미경에 의해 결정하였다. 도 15b: T47D+hHGFR 세포를 5 μg/mL의 hHGF의 부재 또는 존재 하에 2,000 vgs/세포의 scAAV3 벡터로 형질도입하였다. 트랜스진 발현은 상기한 바와 같이 결정하였다. 도 15c: HGFR 키나제-특이적 억제제, BMS-777607 (BMS)의 AAV3-매개 트랜스진 발현에 대한 효과가 제시된다. T47D 및 T47D+hHGFR 세포를 모의-처리하거나 또는 2 hs 동안 BMS로 예비처리하였다. 전세포 용해물을 제조하고, 다양한 표시된 1차 항체를 사용하여 웨스턴 블롯으로 분석하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. 도 15d: WT 및 단일, 이중 및 삼중 티로신-돌연변이체 AAV3 벡터의 형질도입 효율이 제시된다. Huh7 세포를 동일한 조건 하에 WT 또는 다양한 표시된 Y-F 돌연변이체 scAAV3-CBAp-EGFP 벡터로 형질도입하였다.

도 16은 AAV2-K544E, AAV2-K556E, AAV2-K544/566E, 및 AAV2-Y444/500/730F에 의한 트랜스진 발현의 정량을 보여준다.

도 17a, 도 17b, 도 17c, 도 17d 및 도 17e는 생체내에서 1차 간세포에서 WT- 및 리신-돌연변이체 scAAV8 벡터의 형질도입 효율을 보여준다 (C57BL/6 마우스; 1 x 10^{10} scAAV-2-CBAp-Fluc 벡터; 꼬리 정맥 주사; 2주) (실험 2).

도 18은 본 발명의 한 측면에 따른 AAV8-K530E, AAV8-K547E, 및 AAV8-K569E에 의한 트랜스진 발현의 정량을 보여준다.

도 19a 및 도 19b는 생체내에서 1차 간세포에서 WT- 및 리신-돌연변이체 scAAV2 벡터의 형질도입 효율을 보여준다 (C57BL/6 마우스; 1 x 10^{10} scAAV-2-CBAp-EGFP 벡터; 꼬리 정맥 주사; 2주).

도 20a 및 도 20b는 생체내 1차 간세포를 포함하는 연구에서 본 발명의 한 측면에 따른 WT- 및 예시적인 리신- 또는 티로신-치환된 돌연변이체 scAAV2 벡터의 형질도입 효율을 보여준다 (C57BL/6 마우스; 1 x 10^{10} scAAV-2-CBAp-Fluc 벡터; 꼬리 정맥 주사; 2주).

도 21a, 도 21b, 도 21c, 도 21d, 도 21e, 도 21f, 도 21g, 도 21h 및 도 21i는 시험관내에서 HeLa 세포에서 본 발명의 한 측면에 따라 WT- 및 예시적인 리신-돌연변이된 캡시드-함유 scAAV2 벡터의 형질도입 효율을 보여준다 (2,000 vgs/세포; 48 hrs).

도 22a, 도 22b, 도 22c, 도 22d, 도 22e, 도 22f, 도 22g, 도 22h 및 도 22i는 표면-노출된 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발이 본 발명의 한 측면에 따른 scAAV 벡터에 의한 단핵구-유래 수지상 세포의 형질도입 효율을 증가시키는 것을 보여준다.

도 23a, 도 23b, 도 23c, 도 23d, 도 23e 및 도 23f는 시험관내에서 HeLa 및 HEK293 세포에서 본원에 개시된 방법에 따라 제조된 예시적인 AAV2 리신 돌연변이체의 형질도입 효율을 보여준다 (MOI 2000). 유전자 발현의 상대적인 증가 배수는 삽입 도면으로 제시된다.

도 24는 생체내에서 뮤린 간세포에서 WT- 및 예시적인 리신-돌연변이된 캡시드-발현 scAAV8 벡터의 형질도입 효율을 보여준다 (C57BL/6 마우스; 1 x 10^{10} scAAV-2-CBAp-Fluc 벡터; 꼬리 정맥 주사; 2주) (실험 1).

도 25는 특정 리신-치환된 캡시드 단백질 돌연변이체를 발현하는 예시적인 AAV8 벡터에 의한 트랜스진 발현의 정량을 보여준다. 대표적인 구축물 AAV8-K530E, AAV8-K547E, 및 AAV8-K569E가 제시된다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0061] **예시적인 실시양태의 설명**

[0062] 본 발명은 VP3 영역 내의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기 중의 하나 또는 이들의 조합의 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다. 본원에 개시된 하나 이상의 AAV 캡시드 단백질 돌연변이를 포함하는 rAAV 비리온, 및 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 rAAV 벡터를 또한 제공한다. 유리하게는, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 야생형 rAAV 벡터 및 비리온에 비교할 때 관심있는 다양한 세포, 조직 및 장기의 형질도입에서 개선된 효율을 갖고/갖거나 벡터에 대한 숙주 면역 반응을 감소시킨다.

[0063] 한 실시양태에서, 본 발명은 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공하고, 여기서 AAV 캡시드 단백질의 VP3 영역은 야생형 AAV의 캡시드 단백질 [예를 들어, 서열 1, 서열 2, 서열 3, 서열 4, 서열 5, 서열 6, 서열 7, 서열 8, 서열 9, 또는 서열 10; 및 하나의 특히 예시적인 실시양태에서 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 VP3 영역 내에 하나 이상의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치에 비-리신 잔기를 포함하고, 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 하나 이상의 리신 잔기(들)은 도 2a 및 도 2b에 제시된 하나 이상의 리신 잔기로부터 선택된다.

[0064] 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV 캡시드 단백질 [예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다.

[0065] 한 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E) 또는 아르기닌 (R)으로 변형된다. 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기는 아르기닌으로 변형된다 (K532R).

[0066] 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 서열의 K490, K544, K549 및 K556에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 구체적인 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K490, K544, K549 및 K556에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E)으로 변형된다.

[0067] 한 실시양태에서, 본 발명은 야생형 AAV2 캡시드의 K544 및 K556 잔기에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 글루탐산 (E)으로 변형된 AAV2 벡터를 제공한다.

[0068] 특정 실시양태에서, 야생형 AAV8 캡시드 서열의 K530, K547 및 K569에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 구체적인 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K530, K547 및 K569에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E) 또는 아르기닌 (R)으로 변형된다.

[0069] 또한, 본 발명은 유효량의 본 발명의 rAAV 벡터 및/또는 비리온을 포함하는 조성물을 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 관심있는 세포, 조직 및/또는 장기의 형질도입 방법을 제공한다.

[0070] AAV 캡시드 상의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 인산화는 벡터의 유비퀴틴화/프로테아솜 분해를 야기할 수 있다. 세린/트레오닌 단백질 키나제는 세포 분화, 전사 조절 및 발달을 포함하는 매우 다양한 세포 과정에 관여한다. 바이러스 캡시드 상의 표면-노출된 세린 및/또는 트레오닌 잔기의 인산화는 벡터의 프로테아솜-매개 분해를 유도하고, 벡터 형질도입 효율을 저하시킨다. 세포 표피 성장 인자 수용체 단백질 티로신 키나제 (EGFR-PTK)는 또한 표면 티로신 잔기에서 캡시드를 인산화하고, 따라서 재조합 AAV2 벡터에 의한 핵 수송 및 후속적인 트랜스진 발현에 부정적인 영향을 준다.

[0071] AAV 캡시드 상의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기가 확인된다 (도 2a, 도 2b, 도 2c, 및 도 2d). 예를 들어, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질의 VP3 영역은 다양한 표면-노출된 리신 (K) 잔기 (K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665, K706), 표면-노출된 세린 (S) 잔기 (S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, S721), 표면-노출된 트레오닌 (T) 잔기 (T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, T716), 및 표면-노출된 티로신 잔기 (Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, Y730)를 함유한다. 도 2a, 도 2b, 도 2c, 및 도 2d에 도시된 바와 같이, 캡시드의 이들 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기는 AAV 1-12 사이에서 고도로 보존된다.

[0072] 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌, 및/또는 티로신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발을 수행하였고, 결과는 표면-노출된 잔기 중의 하나 또는 이들의 조합의 변형 또는 치환이, AAV 벡터가 유비퀴틴화 및 프로테아솜-매개 분

해 단계를 우회할 수 있도록 하여 고효율 형질도입을 보이는 신규한 AAV 벡터를 생성할 수 있음을 보여준다. AAV 캡시드 상의 표면 노출된 티로신 잔기의 치환은 벡터가 유비퀴틴화를 회피할 수 있도록 하고, 따라서 프로테아솜-매개 분해를 억제한다. 인산화된 AAV 벡터는 그의 비인산화된 상대물만큼 효율적으로 세포 내로 도입될 수 있지만, 그의 형질도입 효율은 유의하게 감소하였다. 상기 감소는 단일 가닥 AAV (ssAAV) 및 자가-상보성 AAV (rAAV) 벡터의 형질도입 효율이 모두 감소되었기 때문에 손상된 바이러스 제2 가닥 DNA 합성에 의한 것이 아니었다.

[0073] 표면 노출된 티로신 잔기에 점 돌연변이를 함유하는 재조합 AAV 벡터는 야생형 (WT) AAV 벡터에 비교할 때 보다 높은 형질도입 효율을 제공한다.

[0074] 또한, 본 발명에 따라, (i) AAV2 캡시드 상의 15개의 표면-노출된 세린 (S) 잔기의 발린 (V) 잔기로의 부위-지정 돌연변이유발은 WT AAV2 벡터에 비해 S458V, S492V, 및 S662V 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율을 개선하고; (ii) S662V 돌연변이체 벡터는 통상적인 AAV 벡터에 의한 형질도입이 쉽게 적용가능하지 않은 세포 종류인 1차 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)를 효율적으로 형질도입하고; (iii) S662V 돌연변이체에 의한 moDC의 고효율 형질도입은 이들 세포에서 임의의 표현형 변화를 유도하지 않고; (iv) 끝을 절단한 인간 텔로머라제 (hTERT) 유전자를 보유하는 재조합 S662V-rAAV 벡터 형질도입된 DC는 신속한 특이적 T-세포 클론 증식 및 강건한 CTL의 생성을 야기하고, 이것은 K562 세포의 특이적 세포 용해를 유발한다. 이 결과는 본 발명의 세린-변형된 rAAV2 벡터가 moDC의 고효율 형질도입을 유발함을 입증한다.

[0075] 종양 면역요법의 설정시에, T-세포 활성화의 시간 및 CD8 T 세포 반응의 효력 및 영속성은 치료 결과를 결정하는데 중대한 인자이다. 본 발명에 따라, 세린-돌연변이체 AAV2 벡터에 의한 moDC의 증가된 형질도입 효율은 T-세포의 매우 우수한 프라이밍(priming)을 유도하였다. 인간 텔로머라제가 많은 암 환자에서 널리 발현된 거부 항원에 대한 매력적인 후보임을 임상 시험이 보여주었기 때문에, 인간 텔로머라제를 특이적 표적으로서 사용하였다. 또한, S662V 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율은 JNK 및 p38 MAPK의 특이적 억제제를 사용한 세포의 예비-처리에 의해 추가로 증가하였고, 이것은 AAV2 캡시드 상의 하나 이상의 표면-노출된 트레오닌 (T) 잔기가 이들 키나제에 의해 인산화될 가능성이 가장 큼을 나타낸다.

[0076] **재조합 AAV 벡터 및 비리온**

[0077] 본 발명의 한 측면은 VP3 영역 내의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기 중의 하나 또는 이들의 조합의 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다. 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온, 및 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 분자 및 rAAV 벡터를 또한 제공한다. 유리하게는, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 야생형 rAAV 벡터 및 비리온에 비교할 때 관심있는 다양한 세포, 조직 및 장기의 형질도입에서 개선된 효율을 갖는다.

[0078] 한 실시양태에서, 본 발명은 VP3 영역 내의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기 중의 하나 또는 이들의 조합의 변형을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다. 유리하게는, 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 변형은 AAV 벡터의 유비퀴틴화를 억제하거나 그 수준을 감소시키고, 이에 의해 프로테아솜-매개 분해를 억제하거나 그 수준을 감소시킨다. 또한, 본 발명에 따른 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 변형은 형질도입 효율을 개선한다.

[0079] 한 실시양태에서, 핵산 분자는 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, AAV 캡시드 단백질의 VP3 영역은 다음 특징 중 하나 또는 이들의 조합을 포함한다:

[0080] (a)

[0081] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0082] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K665, K649, K655 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV

벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0083] (iii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K530, K547 및 K569로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0084] (iv) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K530, K547 및 K569로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0085] (b)

[0086] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 세린 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-세린 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 세린 잔기는 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, 및 S721로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0087] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 세린 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 세린 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 세린 잔기는 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, 및 S721로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0088] (c)

[0089] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 트레오닌 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-트레오닌 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 트레오닌 잔기는 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, 및 T716으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0090] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 트레오닌 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기, 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 트레오닌 잔기는 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, 및 T716으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0091] (d)

[0092] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 티로신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-티로신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 티로신 잔기는 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, 및 Y730으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0093] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 티로신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 티로신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 티로신 잔기는 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, 및 Y730으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음.

[0094] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 VP3 영역 내의 하나 이상의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기가 다음과 같이 변형된 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다:

[0095] (a)

[0096] (i) VP3 영역 내의 적어도 하나의 리신 잔기가 화학적으로 변형되거나 또는 비-리신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655 또는 K706에 상응하고, 상기 비-리신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0097] (ii) VP3 영역 내의 적어도 하나의 리신 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-리신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 K530, K547 또는 K569에 상응하고, 상기 비-리신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0098] (b) VP3 영역 내의 적어도 하나의 세린 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-세린 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707 또는 S721에 상응하고, 상기 비-세린 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0099] (c) VP3 영역 내의 적어도 하나의 트레오닌 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-트레오닌 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열: 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713 또는 T716에 상응하고, 상기 비-트레오닌 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및

[0100] (d) VP3 영역 내의 적어도 하나의 티로신 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-티로신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 또는 Y730에 상응하고, 상기 비-티로신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음.

[0101] 본 발명은 또한 하나 이상의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 변형을 갖는 AAV VP3 캡시드 단백질을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 발명은 다음 특징 중 하나 또는 이들의 조합을 포함하는 AAV VP3 캡시드 단백질을 제공한다:

[0102] (a)

[0103] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0104] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0105] (iii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K530, K547 및 K569로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0106] (iv) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 VP3 영역 내의 리신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 리신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 리신 잔기는 K530, K547 및 K569로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0107] (b)

[0108] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 세린 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-세린 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 세린 잔기는 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, 및 S721로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0109] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 세린 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 세린 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 세린 잔기는 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, 및 S721로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0110] (c)

[0111] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 트레오닌 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-트레오닌 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 트레오닌 잔기는 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, 및 T716으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0112] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 트레오닌 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 트레오닌 잔기는 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, 및 T716으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0113] (d)

[0114] (i) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 티로신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 비-티로신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 티로신 잔기는 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, 및 Y730으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 비-티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0115] (ii) 야생형 AAV의 캡시드 단백질 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 VP3 영역 내의 티로신 잔기에 상응하는 하나 이상의 위치의 화학적으로 변형된 티로신 잔기, 여기서 야생형 AAV의 VP3 영역 내의 상기 티로신 잔기는 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, 및 Y730으로 이루어진 군으로부터 선택되고, 상기 화학적으로 변형된 티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음.

[0116] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 VP3 영역 내의 하나 이상의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기가 다음과 같이 변형된 AAV 캡시드 단백질을 제공한다:

[0117] (a)

[0118] (i) VP3 영역 내의 적어도 하나의 리신 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-리신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 또는 K706에 상응하고, 상기 비-리신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및/또는

[0119] (ii) VP3 영역 내의 적어도 하나의 리신 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-리신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV8의 캡시드 단백질 (서열 8))의 K530, K547 또는 K569에 상응하고, 상기 비-리신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0120] (b) VP3 영역 내의 적어도 하나의 세린 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-세린 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707 또는 S721에

상응하고, 상기 비-세린 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 세린 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음;

[0121] (c) VP3 영역 내의 적어도 하나의 트레오닌 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-트레오닌 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713 또는 T716에 상응하고, 상기 비-트레오닌 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음; 및

[0122] (d) VP3 영역 내의 적어도 하나의 티로신 잔기가 화학적으로 변형되거나 비-티로신 잔기로 변형되고, 여기서 변형된 잔기는 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704 또는 Y730에 상응하고, 상기 비-티로신 잔기 또는 상기 화학적으로 변형된 티로신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않음. 도 2a, 도 2b, 도 2c, 및 도 2d에 도시된 바와 같이, 캡시드 단백질의 VP3 영역에 위치하는 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기는 다양한 AAV 혈청형 (AAV1 내지 12) 사이에서 고도로 보존된다. 한 실시양태에서, 핵산 분자는 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하고, 여기서 AAV 혈청형은 AAV1 내지 12로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 야생형 AAV 캡시드 단백질은 서열 1-10으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는다.

[0123] 한 구체적인 실시양태에서, 핵산 분자는 AAV2 캡시드 단백질을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 아데노-연관 바이러스 2 (AAV2)는 비-병원성 인간 파르보바이러스이다. 재조합 AAV2 벡터는 매우 다양한 세포 및 조직을 시험관내에서 및 생체내에서 형질도입하는 것으로 밝혀졌고, 현재 많은 질환, 예컨대 낭포성 섬유증, 알파-1 항트립신 결핍, 파킨슨병(Parkinson's disease), 배튼병(Batten's disease), 및 근위축증의 유전자 요법에 대한 I/II상 임상 시험에서 사용되고 있다.

[0124] 한 실시양태에서, 본 발명은 야생형 AAV2 캡시드의 하나 이상의 아미노산 잔기가 다음과 같이 변형된 것을 제외하고 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)의 아미노산 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공한다:

[0125] (a) 비-리신 잔기 또는 화학적으로 변형된 리신 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, K258, K321, K459, K490, K507, K527, K572, K532, K544, K549, K556, K649, K655, K665 및 K706으로 이루어진 군으로부터 선택되는 야생형 AAV2 캡시드 서열의 적어도 하나의 리신 잔기가 비-리신 잔기로 변형되거나 또는 화학적으로 변형됨;

[0126] (b) 비-세린 잔기 또는 화학적으로 변형된 세린 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, 및 S721로 이루어진 군으로부터 선택되는 야생형 AAV2 캡시드 서열의 적어도 하나의 세린 잔기가 비-세린 잔기로 변형되거나 또는 화학적으로 변형됨;

[0127] (c) 비-트레오닌 잔기 또는 화학적으로 변형된 트레오닌 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, T251, T329, T330, T454, T455, T503, T550, T592, T581, T597, T491, T671, T659, T660, T701, T713, 및 T716으로 이루어진 군으로부터 선택되는 야생형 AAV2 캡시드 서열의 적어도 하나의 트레오닌 잔기가 비-트레오닌 잔기로 변형되거나 또는 화학적으로 변형됨; 및/또는

[0128] (d) 비-티로신 잔기 또는 화학적으로 변형된 티로신 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, Y252, Y272, Y444, Y500, Y700, Y704, 및 Y730으로 이루어진 군으로부터 선택되는 야생형 AAV2 캡시드 서열의 적어도 하나의 티로신 잔기가 비-티로신 잔기로 변형되거나 또는 화학적으로 변형됨. 한 실시양태에서, 비-리신 잔기 또는 변형된 리신 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 K532, K459, K490, K544, K549, K556, K527, K490, K143 또는 K137로부터 선택된 리신 잔기에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기는 비-리신 잔기로 변형되고/되거나 화학적으로 변형된다.

[0129] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 야생형 AAV8 캡시드의 K530, K547 및 K569에 상응하는 하나 이상의 표면-노출된 리신 잔기가 비-리신 잔기 (예컨대, 글루탐산 (E), 아르기닌 (R))로 변형되고/되거나 화학적으로 변형된 것을 제외하고 야생형 AAV8 의 캡시드 단백질 (서열 8)의 아미노산 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 제공하고, 상기 비-리신 잔기 또는 상기 변형된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않는다. 특정 실시양태에서, AAV 서열의 표면-노출된 리신 잔기는 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 방지하기 위해 글루탐산 (E), 아르기닌 (R), 세린 (S) 또는 이소류신 (I)으로 변형된다.

[0130] 본 발명은 또한 본 발명의 AAV 캡시드 단백질 (예를 들어, VP3)을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 제공한다.

[0131] 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 리신 잔기는 글루탐산 (E) 또는 아르기닌 (R)으로 변형된다. 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 K532에 상응하는 표면-노출된 리신 잔기가 아르기닌으로 변형된다 (K532R).

[0132] 한 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 리신 위치에 상응하는 AAV 캡시드의 적어도 하나의 표면-노출된 리신 잔기는 도 2b에 나타낸 바와 같이 변형된다.

[0133] 한 실시양태에서, 비-세린 잔기 또는 변형된 세린 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 S662, S261, S468, S458, S276, S658, S384 또는 S492로부터 선택된 세린 잔기에 상응하는 적어도 하나의 표면-노출된 세린 잔기는 비-세린 잔기로 변형되고/되거나 화학적으로 변형된다.

[0134] 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 S662에 상응하는 표면-노출된 세린 잔기가 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 세린 잔기는 발린 (V), 아스파르트산 (D) 또는 히스티딘 (H)으로 변형된다. 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 S662에 상응하는 표면-노출된 세린 잔기는 발린으로 변형된다 (S662V).

[0135] 한 실시양태에서, 비-트레오닌 잔기 또는 변형된 트레오닌 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, 야생형 AAV 캡시드 서열 [예를 들어, 서열 1-10; 및 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 T455, T491, T550, T659 또는 T671로부터 선택된 트레오닌 잔기에 상응하는 표면-노출된 트레오닌 잔기는 비-트레오닌 잔기로 변형되고/되거나 화학적으로 변형된다.

[0136] 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 T491에 상응하는 표면-노출된 트레오닌 잔기가 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 트레오닌 잔기는 발린 (V)으로 변형된다. 한 구체적인 실시양태에서, 야생형 AAV2 캡시드 서열의 T491에 상응하는 표면-노출된 트레오닌 잔기는 발린으로 변형된다 (T491V).

[0137] 한 실시양태에서, AAV 벡터는 야생형 AAV 캡시드 서열 [예를 들어, 서열 1-10; 및 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 (T550V+T659V+T491V)에 상응하는 위치에서 표면-노출된 트레오닌 잔기의 변형을 포함한다. 한 실시양태에서, 비-티로신 잔기 또는 변형된 티로신 잔기가 AAV 벡터의 인산화 및/또는 유비퀴틴화를 유도하지 않도록, 야생형 AAV 캡시드 서열 (예를 들어, 서열 1-10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2))의 Y252, Y272, Y444, Y500, Y704, Y720, Y730 또는 Y673으로부터 선택된 티로신 잔기에 상응하는 표면-노출된 티로신 잔기는 비-티로신 잔기로 변형되고/되거나 화학적으로 변형된다.

[0138] 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 티로신 잔기는 페닐알라닌 (F)으로 변형된다. 한 실시양태에서, AAV 벡터는 야생형 AAV 캡시드 서열 [예를 들어, 서열 1 내지 서열 10; 및 특정 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 (Y730F+Y500F+Y444F)에 상응하는 위치에서 표면-노출된 티로신 잔기의 변형을 포함한다.

[0139] 한 실시양태에서, AAV 캡시드의 표면-노출된 리신, 세린, 트레오닌 및/또는 티로신 잔기의 조합이 변형되고, 여기서 변형은 야생형 AAV 캡시드 서열 [예를 들어, 서열 1 내지 서열 10; 한 실시양태에서, 야생형 AAV2의 캡시드 단백질 (서열 2)]의 (Y444F+Y500F+Y730F+T491V), (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T550V), (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T659V), (T491V+T550V+T659V), (Y440F+Y500F+Y730F), (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+S662V) 및/또는 (Y444F+Y500F+Y730F+T491V+T550V+T659V)에 상응하는 위치에서 발생한다. 본 발명의 핵산 분자에 의해 코딩되는 AAV 캡시드 단백질을 또한 제공한다.

[0140] 한 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터를 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 본 발명의 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온을 제공한다. 한 실시양태에서, rAAV 벡터 및 비리온은 야생형 rAAV 벡터 및 비리온에 비교할 때 향상된 형질도입 효율을 갖는다. 또 다른 실시양태에서, rAAV 벡터 및 비리온은 관심있는 세포, 조직 및/또는 장기의 효율적인 형질도입 능력을 갖는다.

[0141] 한 실시양태에서, rAAV 벡터는 프로모터 및 임의로 다른 조절 요소에 작동가능하게 연결된 트랜스진 (이종성 핵

산 분자로도 언급됨)을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 트랜스진은 관심있는 치료제를 코딩한다.

[0142] 예시적인 프로모터는 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터, 데스민 (DES), 베타-액틴 프로모터, 인슐린 프로모터, 에놀라제 프로모터, BDNF 프로모터, NGF 프로모터, EGF 프로모터, 성장 인자 프로모터, 축색돌기-특이적 프로모터, 수상돌기-특이적 프로모터, 뇌-특이적 프로모터, 해마-특이적 프로모터, 신장-특이적 프로모터, 엘라핀 프로모터, 시토카인 프로모터, 인터페론 프로모터, 성장 인자 프로모터, 알파-1 항트립신 프로모터, 뇌-특이적 프로모터, 신경 세포-특이적 프로모터, 중추 신경계 세포-특이적 프로모터, 말초 신경계 세포-특이적 프로모터, 인터류킨 프로모터, 세르핀 프로모터, 하이브리드 CMV 프로모터, 하이브리드 β-액틴 프로모터, EF1 프로모터, U1a 프로모터, U1b 프로모터, Tet-유도가능 프로모터 및 VP16-LexA 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되는 프로모터를 포함하고 이로 제한되지 않는 하나 이상의 이종성, 조직-특이적, 구성적 또는 유도가능 프로모터를 포함한다. 예시적인 실시양태에서, 프로모터는 포유동물 또는 조류 베타-액틴 프로모터이다.

[0143] 예시적인 인핸서 서열은 CMV 인핸서, 합성 인핸서, 간-특이적 인핸서, 혈관-특이적 인핸서, 뇌-특이적 인핸서, 신경 세포-특이적 인핸서, 폐-특이적 인핸서, 근육-특이적 인핸서, 신장-특이적 인핸서, 췌장-특이적 인핸서, 및 섬세포-특이적 인핸서로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 인핸서를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0144] 예시적인 치료제는 폴리펩티드, 펩티드, 항체, 항원 결합 단편, 리보자임, 펩티드 핵산, siRNA, RNAi, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료제를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0145] 예시적인 실시양태에서, 본 발명의 rAAV 벡터는 아드레날린성 효능제, 항-아폽토시스(apoptosis) 인자, 아폽토시스 억제제, 시토카인 수용체, 시토카인, 세포독소, 적혈구 생성제, 글루탐산 데카르복실라제, 당단백질, 성장 인자, 성장 인자 수용체, 호르몬, 호르몬 수용체, 인터페론, 인터류킨, 인터류킨 수용체, 키나제, 키나제 억제제, 신경 성장 인자, 네트린, 신경활성 펩티드, 신경활성 펩티드 수용체, 신경원성 인자, 신경원성 인자 수용체, 뉴로필린, 신경영양성(neurotrophic) 인자, 뉴로트로핀, 뉴로트로핀 수용체, N-메틸-D-아스파르테이트 길항제, 플렉신, 프로테아제, 프로테아제 억제제, 단백질 데카르복실라제, 단백질 키나제, 단백질 키나제 억제제, 단백질 분해성 단백질, 단백질 분해성 단백질 억제제, 세마포린, 세마포린 수용체, 세로토닌 수송 단백질, 세로토닌 흡수 억제제, 세로토닌 수용체, 세르핀, 세르핀 수용체, 및 종양 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 치료적 단백질 또는 폴리펩티드를 코딩할 것이다.

[0146] 특정 용도에서, 변형된 고 형질도입 효율 벡터는 BDNF, CNTF, CSF, EGF, FGF, G-SCF, GM-CSF, 고나도트로핀, IFN, IFG-1, M-CSF, NGF, PDGF, PEDF, TGF, TGF-B2, TNF, VEGF, 프로락틴, 소마토트로핀, XIAP1, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-10(187A), 바이러스 IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, 및 IL-18로 이루어진 군으로부터 선택되는 폴리펩티드를 코딩하는 핵산 절편을 포함할 수 있다. 상기 치료제는 인간, 뮤린, 조류, 돼지, 소, 양, 고양이, 개, 말, 에핀, 염소, 이리 또는 영장류 기원의 것일 수 있다.

[0147] 본 발명에 유용한 재조합 AAV 벡터는 단일 가닥 (ss) 또는 자가-상보성 (sc) AAV 벡터를 포함한다.

[0148] 본 발명의 rAAV 벡터는 또한 예를 들어 인간, 영장류, 뮤린, 고양이, 개, 돼지, 양, 소, 말, 에핀, 염소 및 이리 숙주 세포를 포함하는 단리된 포유동물 숙주 세포 내에 존재할 수 있다. rAAV 벡터는 단리된 포유동물 숙주 세포, 예컨대 인간 내피, 상피, 혈관, 간, 폐, 심장, 췌장, 장, 신장, 심장, 암 또는 종양, 근육, 골, 신경, 혈액, 또는 뇌 세포 내에 존재할 수 있다.

[0149] **치료 용도**

[0150] 본 발명의 또 다른 측면은 관심있는 세포, 조직 및/또는 장기의 효율적인 형질도입을 위한, 및/또는 유전자 요법에 사용하기 위한 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온의 용도에 관한 것이다.

[0151] 한 실시양태에서, 본 발명은 유효량의 본 발명의 rAAV 벡터 및/또는 비리온을 포함하는 조성물을 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 관심있는 세포, 조직 및/또는 장기의 형질도입 방법을 제공한다.

[0152] 특정 실시양태에서, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 예를 들어 인간, 영장류, 뮤린, 고양이, 개, 돼지, 양, 소, 말, 에핀, 염소 및 이리 숙주 세포를 포함하는 포유동물 숙주 세포의 형질도입을 위해 사용된다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온은 내피, 상피, 혈관, 간, 폐, 심장, 췌장, 장, 신장, 근육, 골, 수지상, 심장, 신경, 혈액, 뇌 세포, 섬유모세포 또는 암 세포의 형질도입을 위해 사용된다.

[0153] 한 실시양태에서, 대상체의 세포, 조직 및/또는 장기는 본 발명의 rAAV 벡터 및/또는 비리온을 사용하여 형질도입된다.

[0154] 본원에서 사용되는 용어 "대상체"는 본 발명에 따른 조성물을 사용한 치료가 제공될 수 있는 포유동물, 예컨대 영장류를 포함하는 유기체를 설명한다. 개시된 치료 방법이 이로울 수 있는 포유동물 종은 유인원; 침팬지; 오랑우탄; 인간; 원숭이; 사육 동물, 예컨대 개 및 고양이; 가축, 예컨대 말, 소, 돼지, 양, 염소, 및 닭; 및 다른 동물, 예컨대 마우스, 래트, 기니 피그, 및 햄스터를 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0155] 또한, 본 발명은 본 발명의 rAAV 벡터 및/또는 비리온을 포함하는 유효량의 조성물을 질환의 치료가 필요한 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, 상기 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0156] 본원에서 사용되는 용어 "치료" 또는 그의 임의의 문법적 변형 (예를 들어, 치료하다, 치료하는, 및 치료 등)은 질환 또는 병태의 증상 완화; 및/또는 질환 또는 병태의 진행, 중증도, 및/또는 범위를 감소시키거나, 저지하거나, 억제하거나, 완화하거나, 개선하거나 또는 영향을 주는 것을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0157] 본원에서 사용되는 용어 "유효량"은 질환 또는 병태를 치료 또는 개선할 수 있거나 의도된 치료 효과를 생성할 수 있는 양을 나타낸다.

[0158] 본 발명은 또한 질환, 장애 또는 기능장애의 치료, 방지 및/또는 예방 및/또는 상기 질환, 장애 또는 기능장애의 하나 이상의 증상의 개선을 포함하고 이로 제한되지 않는 질환, 장애, 기능장애, 손상 또는 외상의 증상의 치료, 예방 또는 개선을 위한 의약의 제조에 있어서 본원에 개시된 조성물의 용도를 제공한다. rAAV 바이러스 기반 유전자 요법이 특정 유용성을 가질 수 있는 예시적인 병태는 암, 당뇨병, 자가면역 질환, 신장 질환, 심혈관 질환, 췌장 질환, 장 질환, 간 질환, 신경 질환, 신경근육 장애, 신경운동 결핍, 신경골격 장애, 신경계 장애, 감각신경 기능장애, 졸중, 알파-1 항트립신 (AAT) 결핍, 배튼병, 허혈, 섭식 장애, 알츠하이머병 (Alzheimer's disease), 헌팅톤병(Huntington's disease), 파킨슨병, 골격 질환 및 폐 질환을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0159] 본 발명은 또한 포유동물에서 상기 질환, 손상, 장애 또는 기능장애의 증상의 치료 또는 개선 방법을 제공한다. 상기 방법은 일반적으로 상기 치료 또는 개선을 필요로 하는 포유동물에게 하나 이상의 본 발명의 rAAV 벡터 및 비리온을, 포유동물에서 상기 질환, 손상, 장애 또는 기능장애의 증상의 치료 또는 개선을 위해 충분한 양으로 및 충분한 시간 동안 투여하는 단계를 적어도 포함한다.

[0160] 상기 치료 요법은 특히 하나 이상의 조성물의 치료 대상체의 근내, 정맥내, 피하, 경막내, 복강내, 또는 장기 또는 조직의 직접 주사에 의한 투여를 통한 인간 요법에서 고려된다.

[0161] 본 발명은 또한 치료 유효량의 본 발명의 rAAV 조성물을 필요로 하는 포유동물에게 이러한 조성물을, rAAV 벡터 내에 포함된 하나 이상의 핵산 절편에 의해 코딩되는 치료 유효량의 목적하는 치료제(들)를 환자에게 제공하기 위해 효과적인 양으로 및 효과적인 시간 동안 제공하는 방법을 제공한다. 바람직하게는, 치료제는 폴리펩티드, 펩티드, 항체, 항원 결합 단편, 리보자임, 펩티드 핵산, siRNA, RNAi, 안티센스 올리고뉴클레오티드 및 안티센스 폴리뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0162] **제약 조성물**

[0163] 본 발명은 또한 치료상 또는 제약상 허용되는 담체와 조합할 수 있는 활성 성분을 포함하는 치료 또는 제약 조성물을 제공한다. 본 발명의 유전자 구축물은 다양한 조성물로 제조될 수 있고, 또한 인간 또는 동물 대상체에게 투여하기 위한 적절한 제약 비히클 내에 제제화될 수 있다.

[0164] 본 발명의 rAAV 분자 및 이를 포함하는 조성물은 다양한 장애, 및 특히 예를 들어 골관절염, 류마티스성 관절염, 및 관련 장애를 포함하는 관절 질환, 장애, 및 기능장애의 증상의 치료, 억제, 및 개선을 위한 새로운 유용한 치료제를 제공한다.

[0165] 본 발명은 또한 하나 이상의 개시된 rAAV 벡터, 발현 시스템, 비리온, 바이러스 입자; 또는 포유동물 세포를 포함하는 조성물을 제공한다. 아래에서 설명되는 바와 같이, 상기 조성물은 제약 부형제, 완충제, 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있고, 동물, 특히 인간에게 투여하기 위해 제제화될 수 있다. 상기 조성물은 임의로 리포솜, 지질, 지질 복합체, 미세구, 미세입자, 나노구(nanosphere), 또는 나노입자를 추가로 포함할 수 있거나, 또는 이를 필요로 하는 대상체의 세포, 조직, 장기, 또는 신체에 투여하기 위해 달리 제제화될 수 있다. 상기 조성물은 다양한 요법에, 예를 들어 암, 종양, 또는 다른 악성 성장, 신경학적 결핍 기능장애, 자가면역 질환, 관절 질환, 심장 또는 폐 질환, 허혈, 졸중, 뇌혈관 사고, 일과성 허혈 발작 (TIA); 당뇨병 및/또는 췌장의 다른 질

환; 심장순환 질환 또는 기능장애 (예를 들어, 저혈압, 고혈압, 아테롬성동맥경화증, 고콜레스테롤혈증, 혈관 손상 또는 질환 포함); 신경 질환 (예를 들어, 알츠하이머, 헌팅톤, 테이-삭스병(Tay-Sach's disease) 및 파킨슨병, 기억 상실, 외상, 운동성 손상, 신경병증, 및 관련 장애 포함); 담관, 신장 또는 간 질환 또는 기능장애; 근골격 또는 신경근 질환 (예를 들어, 관절염, 마비, 낭포성 섬유증 (CF), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 다발성 경화증 (MS), 근위축증 (MD) 등 포함)과 같은 질환 또는 장애를 야기하는 병태를 포함하는 병태, 예컨대 펩티드 결핍, 폴리펩티드 결핍, 펩티드 과다발현, 폴리펩티드 과다발현의 개선, 예방 및/또는 치료에 사용하기 위해 제제화될 수 있다.

[0166] 한 실시양태에서, 포유동물에게 투여되는 rAAV 벡터 및/또는 비리온 입자의 수는 10^3 내지 10^{13} 입자/ml, 또는 그 사이의 임의의 값, 예컨대 예를 들어, 약 10^7, 10^8, 10^9, 10^{10}, 10^{11}, 10^{12}, 또는 10^{13} 입자/ml의 규모일 수 있다. 한 실시양태에서, 10^{13} 입자/ml 초과의 rAAV 벡터 및/또는 비리온 입자가 투여된다. rAAV 벡터 및/또는 비리온은 단일 용량으로 투여되거나, 또는 치료되는 특정 질환 또는 장애의 치료를 달성하기 위해 요구될 수 있는 2 이상의 투여로 분할될 수 있다. 대부분의 rAAV-기반 유전자 요법 요법에서, 본 발명자들은 보다 낮은 역가의 감염성 입자가 통상적인 유전자 요법 프로토콜에 비해 변형된-캡시드 rAAV 벡터를 사용할 때 필요할 것으로 생각한다.

[0167] 특정 실시양태에서, 본 발명은 단독으로 또는 요법의 하나 이상의 다른 양식과 조합하여 세포 또는 동물에게 투여하기 위해, 및 특히 인간 세포, 조직, 및 인간을 침범하는 질환의 요법을 위해 제약상 허용되는 용액 내의 본원에 개시된 하나 이상의 rAAV-기반 조성물의 제제에 관한 것이다.

[0168] 필요한 경우, 하나 이상의 치료적 유전자 산물을 발현하는 핵산 절편, RNA, DNA 또는 PNA 조성물은 또한 치료적 폴리펩티드, 그의 생물학적 활성 단편, 또는 변이체의 하나 이상의 전신 또는 국소 투여를 비롯하여 다른 작용제, 예컨대 단백질 또는 폴리펩티드 또는 다양한 제약 활성제와 조합하여 투여될 수 있다. 실제로, 추가의 작용제가 표적 세포 또는 숙주 조직와 접촉시에 유의한 부작용을 야기하지 않는다면 포함될 수 있는 다른 성분에 대한 제한은 실질적으로 존재하지 않는다. rAAV-기반 유전자 조성물은 따라서 특정 예에서 필요한 다양한 다른 작용제와 함께 전달될 수 있다. 상기 조성물은 숙주 세포 또는 다른 생물학적 공급원으로부터 정제할 수 있거나, 또는 다르게는 본원에서 설명되는 바와 같이 화학적으로 합성될 수 있다. 이와 유사하게, 상기 조성물은 치환된 또는 유도체화된 RNA, DNA, siRNA, mRNA, tRNA, 리보자임, 촉매 활성의 RNA 분자, 또는 PNA 조성물 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0169] 제약상 허용되는 부형제 및 담체 용액의 제제는 예를 들어, 경구, 비경구, 정맥내, 비내, 관절내, 근내 투여 및 제제를 비롯한 다양한 치료 요법에서 본원에서 설명되는 특정 조성물을 사용하기 위한 적합한 투여 및 치료 요법의 개발처럼 당업자에게 공지되어 있다.

[0170] 일반적으로, 이들 제제는 적어도 약 0.1% 또는 그 초과의 활성 화합물을 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 물론 상이할 수 있고, 편리하게 총 제제의 중량 또는 부피의 약 1 또는 2% 내지 약 70% 또는 80% 또는 그 초과로 존재할 수 있다. 물론, 각각의 치료상 유용한 조성물 내의 활성 화합물(들)의 양은 적합한 용량이 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 얻어지도록 제조될 수 있다. 용해도, 생체이용성, 생물학적 반감기, 투여 경로, 제품 저장 수명, 및 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자가 상기 제약 제제의 제조 분야의 당업자에 의해 고려될 것이고, 따라서 다양한 용량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.

[0171] 특정 상황에서, 본원에 개시된 적절하게 제제화된 제약 조성물 내의 AAV 벡터-기반 치료 구축물을 피하, 안 내로, 유리체 내로, 비경구로, 피하, 정맥 내로, 뇌실 내로, 근 내로, 경막 내로, 경구, 복강 내로, 경구 또는 비내 흡입에 의해, 또는 하나 이상의 세포, 조직 또는 장기에 대한 직접 주사에 의해 전달하는 것이 바람직할 것이다. 투여 방법은 U.S. 특허 5,543,158, 5,641,515 및/또는 5,399,363 (각각 그 전문이 본원에 참조로 구체적으로 포함됨)에 기재된 양식을 포함할 수 있다. 유리 염기 또는 약리학상 허용되는 염으로서의 활성 화합물의 용액은 멸균수 내에 제조될 수 있고, 또한 하나 이상의 계면활성제, 예컨대 히드록시프로필셀룰로스와 적절하게 혼합될 수 있다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물 내 및 오일 내에서 제조될 수 있다. 통상적인 보관 및 사용 조건 하에, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위해 보존제를 함유한다.

[0172] 주사가능 용도에 적합한 AAV-기반 바이러스 조성물의 제약 형태는 멸균 주사가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다 (그 전문이 본원에 참조로 구체적으로 포함된 U.S. 특허 5,466,468). 모든 경우에, 형태는 멸균되어야 하고, 용이한 주사가능성이 존재할 정도로 유체이어야

한다. 형태는 제조 및 보관 조건 하에 안정하여야 하고, 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염 활동에 대해 추가로 보존될 수 있다. 담체는 예를 들면 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등) 및 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적당한 유동성은 예를 들어 레시틴과 같은 코팅을 이용하거나, 분산액의 경우에는 원하는 입자 크기를 유지하거나, 계면활성제를 사용함으로써 유지될 수 있다.

[0173] 용어 "담체"는 그와 함께 화합물이 투여되는 희석제, 아주반트(adjuvant), 부형제, 또는 비히클을 의미한다. 상기 제약 담체는 멸균 액체, 예컨대 물, 및 석유 유분의 오일, 예컨대 광유, 식물성 오일, 예컨대 땅콩 기름, 대두 오일, 및 참깨 오일, 동물성 오일, 또는 합성 기원의 오일을 포함하는 오일일 수 있다. 염수 용액 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액이 또한 액체 담체로서 사용될 수 있다.

[0174] 본 발명의 조성물은 폐, 비내, 경구, 흡입, 비경구, 예컨대 정맥내, 국소, 경피, 피내, 경점막, 복강내, 근내, 관절낭내, 안와내, 심장내, 경기관, 피하, 표피하, 관절내, 피막하, 지주막하, 척수내, 경막외 및 흉골내 주사를 포함하고 이로 제한되지 않는 표준 경로에 의해 치료되는 대상체에게 투여될 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 조성물은 비내, 폐, 또는 경구 경로를 통해 투여된다.

[0175] 주사가능한 수용액의 투여를 위해, 예를 들어 용액은 필요한 경우 적절하게 완충될 수 있고, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성으로 만들 수 있다. 이들 특정 수용액은 특히 정맥내, 근내, 피하 및 복강내 투여에 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 배지는 본 개시내용에 비추어 당업자에게 알려질 것이다. 예를 들어, 1 용량을 1 ml의 등장성 NaCl 용액에 용해시키고 1000 ml의 피하주입액에 첨가하거나 또는 제시된 주입 부위에 주사될 수 있다 (예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 및 1570-1580] 참조). 용량의 일부 변경이 치료받는 대상체의 상태에 따라 반드시 실시될 것이다. 투여를 책임지는 사람은 어떠한 경우든, 개별적인 대상체에 적절한 용량을 결정할 것이다. 또한, 인간 투여를 위해, 제제는 FDA 생물제제 표준 사무소 (Office of Biologics standards)에 의해 요구되는 멸균성, 발열성, 및 일반적인 안전 및 순도 기준을 충족하여야 한다.

[0176] 멸균 주사가능한 용액은 활성 AAV 벡터-전달된 치료적 폴리펩티드-코딩 DNA 단편을 요구되는 양으로 적절한 용매 내에, 필요한 경우 상기 나열된 다른 여러 성분과 함께 도입한 후, 여과 멸균에 의해 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 기본적인 분산매 및 상기 나열된 것 중의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 도입함으로써 제조된다. 멸균 주사가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 그의 앞서 멸균-여과된 용액으로부터 활성 성분 + 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조 기술이다.

[0177] 본원에 개시된 AAV 벡터 조성물은 또한 중성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 제약상 허용되는 염은 무기산, 예컨대 염산 또는 인산, 또는 유기산, 예컨대 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등을 사용하여 형성된 산부가 염 (단백질의 유리 아미노기를 사용하여 형성됨)을 포함한다. 또한, 유리 카르복실기는 무기 염기, 예컨대 수산화나트륨, 수산화칼륨, 수산화암모늄, 수산화칼슘, 또는 수산화제이철, 및 유기 염기, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래될 수 있다. 제제화시에, 용액은 투여 제제에 적합한 방식으로 및 치료상 효과적인 양으로 투여될 것이다. 제제는 다양한 투여 형태, 예컨대 주사가능한 용액, 약물 방출 캡슐 등으로 쉽게 투여된다.

[0178] AAV 조성물의 양 및 상기 조성물의 투여 시간은 본 교시내용의 이점을 파악한 당업자의 능력에 의해 결정될 수 있다. 그러나, 치료 유효량의 개시된 조성물의 투여는 상기 치료를 받고 있는 환자에게 치료적 이익을 제공하기 위해 충분한 수의 감염성 입자의 단일 투여, 예컨대 단일 주사에 의해 달성될 수 있다. 다르게는, 몇몇 상황에서, 조성물의 투여를 감독하는 의사에 의해 결정될 수 있는 비교적 짧은 또는 비교적 긴 기간에 걸쳐 AAV 벡터 조성물의 다수의, 또는 연속적인 투여를 제공하는 것이 바람직할 수 있다.

[0179] **발현 벡터**

[0180] 본 발명은 다양한 AAV-기반 발현 시스템, 및 벡터를 고려한다. 한 실시양태에서, 바람직한 AAV 발현 벡터는 치료적 펩티드, 단백질, 또는 폴리펩티드를 코딩하는 적어도 제1 핵산 절편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 개시된 바람직한 AAV 발현 벡터는 안티센스 분자를 코딩하는 적어도 제1 핵산 절편을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 프로모터는 기능성 mRNA, tRNA, 리보자임 또는 안티센스 RNA를 코딩하는 서열 영역에 작동가능하게 연결된다.

[0181] 어떤 발현 벡터 및 궁극적으로 어떤 프로모터에 폴리펩티드 코딩 영역이 작동가능하게 연결되는지에 대한 선택

은 요구되는 기능성 특성, 예를 들어 단백질 발현의 위치 및 타이밍, 및 형질전환되는 숙주 세포에 의해 직접 결정된다. 이들은 재조합 DNA 분자의 구축 기술에 고유한 잘 알려진 제한사항이다. 그러나, 본 발명을 실시하는데 유용한 벡터는 작동가능하게 연결되는 기능성 RNA의 발현을 유도할 수 있다.

[0182] 상보성 코헤시브(cohesive) 말단 또는 블런트(blunt) 말단을 통해 DNA를 벡터에 작동가능하게 연결하기 위한 다양한 방법이 개발되었다. 예를 들어, 상보성 단일 중합체 영역(tract)이 삽입되는 DNA 절편에 및 벡터 DNA에 부가될 수 있다. 이어서, 벡터 및 DNA 절편은 재조합 DNA 분자를 형성하기 위해 상보성 단일 중합체 테일(tail) 사이의 수소 결합에 의해 연결된다.

[0183] 본 발명에 따른 치료제를 발현하기 위해, 하나 이상의 프로모터의 제어 하에 치료제-코딩 핵산 절편을 포함하는 티로신-변형된 rAAV 발현 벡터를 제조할 수 있다. 서열을 프로모터의 "제어 하에" 두기 위해, 전사 리딩 프레임(reading frame)의 전사 개시 부위의 5' 말단을 일반적으로 선택된 프로모터의 약 1 및 약 50개 뉴클레오티드 "하류" (즉, 프로모터의 3')에 위치시킨다. "상류" 프로모터는 DNA의 전사를 자극하고, 코딩된 폴리펩티드의 발현을 촉진한다. 이것은 본 문맥에서 "재조합 발현"의 의미이다. 특히 바람직한 재조합 벡터 구축물은 rAAV 벡터를 포함하는 것이다. 상기 벡터는 본원에서 상세하게 설명된다.

[0184] 하나 이상의 외인성 단백질, 폴리펩티드, 펩티드, 리보자임, 및/또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 벡터로 형질감염되는 특정 세포로 도입하기 위해 상기 벡터의 사용이 고려될 때, 코딩되는 펩티드, 단백질, 폴리펩티드, 리보자임, siRNA, RNAi 또는 안티센스 올리고뉴클레오티드를 생산하기 위해 벡터를 포함하는 세포에서 폴리뉴클레오티드를 발현하는 적어도 제1 이종성 프로모터의 제어 하에 및 하류에 작동가능하게 위치하는 적어도 제1 외인성 폴리뉴클레오티드를 추가로 포함하도록 벡터를 유전적으로 변형함으로써 본원에 개시된 rAAV 벡터 또는 티로신-변형된 rAAV 벡터를 이용할 수 있다. 상기 구축물은 구성적, 유도가능, 또는 심지어 세포-특이적 프로모터인 이종성 프로모터를 이용할 수 있다. 예시적인 상기 프로모터는 예를 들어 CMV 프로모터, β-액틴 프로모터, 하이브리드 CMV 프로모터, 하이브리드 β-액틴 프로모터, EF1 프로모터, U1a 프로모터, U1b 프로모터, Tet-유도가능 프로모터, VP16-LexA 프로모터 등을 포함하는 바이러스, 포유동물, 및 조류 프로모터을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0185] 벡터 또는 발현 시스템은 또한 rAAV 벡터에 클로닝된 이종성 유전자의 전사를 변경하거나 실행하기 위해 하나 이상의 인핸서, 조절 요소, 전사 요소를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 rAAV 벡터는 적어도 제1 CMV 인핸서, 합성 인핸서, 또는 세포- 또는 조직-특이적 인핸서를 추가로 포함할 수 있다. 외인성 폴리뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함할 수 있다.

[0186] **치료 키트**

[0187] 본 발명은 또한 특정 rAAV-폴리뉴클레오티드 전달 제제의 제제화, 및 대상체, 특히 인간에게 투여하기 위한 치료제의 제조에 사용될 수 있는, 하나 이상의 제약상 허용되는 부형제, 담체, 희석제, 아주반트, 및/또는 다른 성분과 함께 본원에서 설명되는 하나 이상의 유전자 변형된 rAAV 벡터 조성물을 포함한다. 특히, 상기 키트는 하나 이상의 개시된 rAAV 조성물을 대상체에서 상기 장애의 치료시에 바이러스 벡터의 사용을 위한 지침서와 함께 포함할 수 있고, 일반적으로 편리한 상업적 포장을 위해 제조된 용기를 추가로 포함할 수 있다.

[0188] 따라서, 본원에 개시된 제약 조성물의 투여에 바람직한 동물은 포유동물, 특히 인간을 포함한다. 다른 바람직한 동물은 뮤린, 소, 말, 돼지, 개, 및 고양이를 포함한다. 조성물은 부분적으로 또는 유의하게 정제된 rAAV 조성물을 단독으로, 또는 천연 또는 재조합 공급원으로부터 얻을 수 있거나, 또는 천연적으로 얻을 수 있거나 화학적으로 합성되거나, 또는 다르게는 추가의 활성 성분을 코딩하는 DNA 절편을 발현하는 재조합 숙주 세포로부터 시험관내에서 생산될 수 있는 하나 이상의 추가의 활성 성분과 조합하여 포함할 수 있다.

[0189] 적어도 하나의 본원에 개시된 조성물 및 치료제로서 조성물의 사용을 위한 지침서를 포함하는 치료 키트를 또한 제조할 수 있다. 상기 키트를 위한 용기 수단은 일반적으로 개시된 rAAV 조성물(들)이 그 내에 배치되는, 바람직하게는 적절하게 분취될 수 있는 적어도 하나의 바이알, 시험관, 플라스크, 병, 주사기 또는 다른 용기 수단을 포함할 수 있다. 제2 치료적 폴리펩티드 조성물이 또한 제공될 경우, 키트는 또한 이 제2 조성물이 배치될 수 있는 제2의 별개의 용기를 포함할 수 있다. 다르게는, 복수의 치료적 생물학적 활성 조성물은 단일 제약 조성물로 제조될 수 있고, 단일 용기 수단, 예컨대 바이알, 플라스크, 주사기, 병, 또는 다른 적합한 단일 용기 수단 내에 포장될 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 일반적으로 바이알(들)을 상업적 판매를 위해 엄중히 속박된 상태로 보유하기 위한 수단, 예컨대 목적하는 바이알(들)이 보관되는 사출 또는 취입 성형된(blow-molded) 플라스틱 용기를 포함할 것이다.

[0190] **AAV 캡시드 단백질**

[0191] 60개의 개별적인 캡시드 단백질 서브유닛의, 4.7-kb 단일 가닥 DNA 게놈을 보호할 수 있는 비-외피형 T-1 20면체 격자로의 초분자적 회합(supramolecular assembly)은 헬퍼-의존적 인간 파르보바이러스인 아데노-연관 바이러스2 (AAV2)의 생활 주기에서 중대한 단계이다. 성숙 20-nm 직경 AAV2 입자는 1:1:18의 비율의 VP1, VP2, 및 VP3으로 지정된 3개의 구조적 단백질 (각각 분자 질량 87, 73, 및 62 kDa)로 이루어진다. 그의 대칭 및 이들 분자량 추정치를 기초로 할 때, 입자를 포함하는 60개의 캡시드 단백질 중에서 3개는 VP1 단백질이고, 3개는 VP2 단백질이고, 54개는 VP3 단백질이다.

[0192] **생물학적 기능적 동등물**

[0193] 특히 다양한 질환 및 장애의 치료, 억제, 및 예방을 위해 선택된 포유동물 세포, 조직, 및 장기에 대한 치료 유전자 구축물의 개선된 전달에 관하여 목적하는 특징, 및 상기 질환의 증상의 개선을 위한 수단을 갖는 기능성 바이러스 벡터를 얻기 위해 본 발명에서 설명되는 개선된 rAAV 비리온을 제공하기 위해, 및 rAAV 벡터-매개 유전자 요법을 통해 관심있는 외인성 치료적 및/또는 예방적 폴리펩티드의 발현을 용이하게 하기 위해 야생형 rAAV 벡터의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 구조에 대한 변형 및 변화. 상기한 바와 같이, 본 발명의 핵심 측면 중의 하나는 개시된 rAAV 구축물에 의해 코딩되는 하나 이상의 치료제를 코딩하는 특이적 폴리뉴클레오티드 서열 내의 하나 이상의 돌연변이의 생성이다. 특정 환경에서, 생성되는 폴리펩티드 서열은 이들 돌연변이에 의해 변경되거나, 또는 다른 경우에, 폴리펩티드의 서열은 포유동물 시스템에서 유전자 요법을 시행하기 위한 개선된 특성을 갖는 변형된 벡터를 생성하기 위한 코딩 폴리뉴클레오티드 내의 하나 이상의 돌연변이에 의해 변화되지 않는다.

[0194] 예를 들어, 특정 아미노산은 예를 들어 항체의 항원-결합 영역 또는 기질 분자 상의 결합 부위와 같은 구조와의 상호작용성 결합 능력의 평가가능한 상실을 보이지 않으면서 단백질 구조 내의 다른 아미노산을 치환할 수 있다. 단백질의 생물학적 기능성 활성을 규정하는 것은 단백질의 상호작용 능력 및 특성이기 때문에, 특정 아미노산 서열 치환이 단백질 서열, 및, 물론, 그의 기초를 이루는 DNA 코딩 서열에 이루어질 수 있고, 그럼에도 불구하고 유사한 특성을 갖는 단백질을 얻을 수 있다. 따라서, 본 발명자들은 다양한 변화가 그의 생물학적 유용성 또는 활성의 평가가능한 상실 없이 본원에 개시된 폴리뉴클레오티드 서열에 이루어질 수 있음을 고려한다.

[0195] 상기 변화를 만드는 데 있어서, 아미노산의 수치 지수(hydropathic index)가 고려될 수 있다. 단백질의 상호작용성 생물학적 기능의 부여시에 아미노산 수치 지수의 중요성은 일반적으로 당업계에서 이해되고 있다 (본원에 참조로 포함된 문헌 [Kyte and Doolittle, 1982]). 아미노산의 상대적인 수치 특성이 생성되는 단백질의 2차 구조에 영향을 주고, 이것은 다시 단백질의 다른 분자, 예를 들어 효소, 기질, 수용체, DNA, 항체, 항원 등과의 상호작용을 규정하는 것으로 받아들여지고 있다. 각각의 아미노산에는 그의 소수성 및 전하 특징을 기초로 하여 다음과 같이 수치 지수가 할당되었다 (Kyte and Doolittle, 1982): 이소류신 (+4.5); 발린 (+4.2); 류신 (+3.8); 페닐알라닌 (+2.8); 시스테인/시스틴 (+2.5); 메티오닌 (+1.9); 알라닌 (+1.8); 글리신 (-0.4); 트레오닌 (-0.7); 세린 (-0.8); 트립토판 (-0.9); 티로신 (-1.3); 프롤린 (-1.6); 히스티딘 (-3.2); 글루타메이트 (-3.5); 글루타민 (-3.5); 아스파르테이트 (-3.5); 아스파라긴 (-3.5); 리신 (-3.9); 및 아르기닌 (-4.5)이다.

[0196] **예시적인 정의**

[0197] 본 발명에 따르면, 천연 공급원으로부터 얻거나, 화학적으로 합성되거나, 변형되거나, 또는 달리 사람에 의해 전체적으로 또는 부분적으로 제조되거나 또는 합성된 폴리뉴클레오티드, 핵산 절편, 핵산 서열 등은 DNA (게놈 또는 게놈외 DNA를 포함하고 이로 제한되지 않음), 유전자, 펩티드 핵산 (PNA) RNA (rRNA, mRNA 및 tRNA를 포함하고 이로 제한되지 않음), 뉴클레오시드, 및 적합한 핵산 절편을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0198] 달리 규정하지 않으면, 본원에서 사용되는 모든 기술 및 학술 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에서 설명되는 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 조성물이 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 바람직한 방법 및 조성물을 본원에서 설명한다. 본 발명의 목적을 위해, 다음과 같은 용어를 아래에서 규정한다:

[0199] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 전사를 조절하는 핵산 서열의 영역 또는 영역들을 의미한다.

[0200] 본원에서 사용되는 용어 "조절 요소"는 전사를 조절하는 핵산 서열의 영역 또는 영역들을 의미한다. 예시적인 조절 요소는 인핸서, 전사후 요소, 전사 제어 서열 등을 포함하고 이로 제한되지 않는다.

[0201] 본원에서 사용되는 용어 "벡터"는 숙주 세포의 복제를 가능하게 하는 및/또는 부착된 절편의 복제를 유발하기

위해 또 다른 핵산 절편이 작동가능하게 연결될 수 있는 핵산 분자 (일반적으로 DNA로 이루어짐)를 의미한다. 플라스미드, 코스미드, 또는 바이러스가 예시적인 벡터이다.

[0202] 본원에서 사용되는 용어 "실질적으로 상응하는", "실질적으로 상동성인", 또는 "실질적인 동일성"은 선택된 핵산 또는 아미노산 서열이 선택된 참조 핵산 또는 아미노산 서열에 대해 적어도 약 70 또는 약 75%의 서열 동일성을 갖는다는 것을 나타낸다. 보다 일반적으로, 선택된 서열 및 참조 서열은 적어도 약 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84 또는 심지어 85%의 서열 동일성, 및 보다 바람직하게는 적어도 약 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 또는 95%의 서열 동일성을 가질 것이다. 보다 더 바람직하게는, 고 상동성 서열은 종종 선택된 서열과 그와 비교되는 참조 서열 사이에 적어도 약 96, 97, 98, 또는 99%의 서열 동일성을 공유한다.

[0203] 서열 동일성의 백분율은 비교할 서열의 전체 길이에 걸쳐 계산될 수 있거나, 또는 선택된 참조 서열의 총 약 25% 미만 정도의 작은 결실 또는 부가를 제외함으로써 계산될 수 있다. 참조 서열은 보다 큰 서열의 하위세트, 예컨대 유전자 또는 인접 서열의 일부, 또는 염색체의 반복 부분일 수 있다. 그러나, 2 이상의 폴리뉴클레오티드 서열의 서열 상동성의 경우에, 참조 서열은 일반적으로 적어도 약 18-25개의 뉴클레오티드, 보다 일반적으로는 적어도 약 26 내지 35개의 뉴클레오티드, 및 훨씬 더 일반적으로는 적어도 약 40, 50, 60, 70, 80, 90, 또는 심지어 100개 정도의 뉴클레오티드를 포함할 것이다.

[0204] 바람직하게는, 고도 상동성 단편이 요구될 경우, 2개의 서열 사이의 동일성 비율의 정도는 적어도 약 80%, 바람직하게는 적어도 약 85%, 및 보다 바람직하게는 약 90% 또는 95% 또는 그 초과일 것이고, 이것은 당업자에게 공지된 하나 이상의 서열 비교 알고리즘, 예컨대 문헌 [Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85(8):2444-8, April 1988]에서 설명된 FASTA 프로그램 분석에 의해 쉽게 결정된다.

[0205] 본원에서 사용되는 용어 "작동가능하게 연결된"은 연결되는 핵산 서열이 일반적으로 인접하거나 또는 실질적으로 인접하고, 2개의 단백질 코딩 영역을 연결하기 위해 필요한 경우 인접하고 리딩 프레임으로 존재함을 의미한다. 그러나, 인핸서는 일반적으로 프로모터로부터 수 킬로베이스 분리될 때 기능하고 인트론 서열이 가변적인 길이를 가질 수 있기 때문에, 몇몇 폴리뉴클레오티드 요소는 인접하지 않고도 작동가능하게 연결될 수 있다.

[0206] **실시예**

[0207] 본 발명을 실시하기 위한 절차 및 실시양태를 예시하는 실시예를 다음에 제공한다. 실시예는 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다.

[0208] **물질 및 방법:**

[0209] ***세포 및 항체***: HEK293, HeLa, NIH3T3 세포를 아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나싸스)으로부터 입수하고, 10% FBS (시그마-알드리치, 미국 미주리주 세인트루이스) 및 항생제 (론자(Lonza))를 보충한 DMEM (인비트로젠(Invitrogen)) 내에 단층 배양물로서 유지하였다. 백혈구 분리반출술-유래 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC) (올셀즈(AllCells))를 피콜-파크(Ficoll-Paque) (지이헬스케어(GEHeathCare)) 상에서 정제하고, 혈청-비함유 AIM-V 배지 (론자) 내에 재현탁하고, 반-부착 세포 분획을 재조합 인간 IL-4 (500 U/mL) 및 GM-CSF (800 U/mL) (알앤디 시스템즈(R&D Systems))와 함께 7일 동안 인큐베이션하였다. 세포 성숙은 48 hr 동안 10 ng/mL TNF-α, 10 ng/mL IL-1, 10 ng/mL IL-6, 및 1 mg/mL PGE2 (알앤디 시스템즈)을 포함하는 시토카인 혼합물을 사용하여 개시하였다. EGFP 발현에 앞서, 세포를 이들이 성숙 수지상 세포 (mDC)의 대표적인 표현형에 일치하도록 보장하기 위해 동시-자극성 분자 발현에 대해 특성화하였다 (CD80, RPE, 뮤린 IgG1; CD83, RPE, 뮤린 IgG1; CD86, FITC, 뮤린 IgG1; 인비트로젠).

[0210] ***부위-지정 돌연변이유발***: 터보(Turbo)® Pfu 폴리머라제 (스트라타진(Stratagene))를 이용하여 이전에 설명된 바와 같이 플라스미드 pACG2를 사용하는 2-스테이지 PCR을 수행하였다 (Wang et al, 1999). 간단히 설명하면, 제1 스테이지에서, 3 사이클 동안 정방향 및 역방향 PCR 프라이머에 대해 2개의 PCR 연장 반응을 별개의 튜브 내에서 수행하였다. 제2 스테이지에서, 2개의 반응물을 혼합하고, 추가 15 사이클 동안 PCR 반응을 수행한 후, 1 hr 동안 DpnI 소화를 수행하였다. 프라이머는 각각의 돌연변이된 잔기에 대해 세린 (TCA 또는 AGC)로부터 발린 (GTA 또는 GTC)로의 변화를 도입하도록 설계되었다.

[0211] ***재조합 AAV 벡터의 생산***: 닭 β-액틴 프로모터에 의해 구동된 EGFP 유전자를 함유하는 재조합 AAV2 벡터를 이전에 설명된 바와 같이 생성하였다 (Zolotukhin, 2002). 간단히 설명하면, HEK293 세포를 폴리에텔렌이민 (PEI, 선형, MW 25,000, 폴리사이언시스, 인크(Polysciences, Inc.))을 사용하여 형질감염시켰다. 형질감염 72 hr 후에, 세포를 수확하고, 벡터를 아이오딕산올 (시그마-알드리치) 구배 원심분리 및 이온 교환 컬럼 크로마토그래피 (HiTrap Sp Hp 5 mL, 지이 헬쓰케어(GE Healthcare))에 의해 정제하였다. 이어서, 바이러스를 농축시키

고, 원심분리 회전 농축기 (아폴로(Apollo), 150-kDa 컷오프(cut-off), 20-mL 용적, CLP)를 사용하여 완충제를 3개의 사이클에서 락테이트화 링거(Ringer)액으로 교환하였다 (Cheng et al., 2011). 10 ㎕의 정제된 바이러스를 37℃에서 2 hr 동안 DNAse I (인비트로젠)으로 처리한 후, 56℃에서 추가의 2 hrs 동안 프로테이나제 K (인비트로젠)로 처리하였다. 반응 혼합물을 페놀/클로로포름에 의해 정제한 후, 클로로포름 처리하였다. 포장된 DNA를 20 ㎍ 글라이코겐 (인비트로젠)의 존재 하에 에탄올로 침전시켰다. DNAse I-저항성 AAV 입자 역가를 CBA 프로모터에 대해 특이적인 다음 프라이머-쌍을 사용하는 RT-PCR에 의해 결정하였다:

[0212] 정방향 5'-TCCCATAGTAACGCCAATAGG-3' (서열 11)

[0213] 역방향 5'-CTTGGCATATGATACACTTGATG-3' (서열 12), 및

[0214] SYBR 그린(Green) PCR 매스터(Master) 혼합물 (인비트로젠).

[0215] ***시험관내 재조합 AAV 벡터 형질도입 검정***: HEK293 또는 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)를 각각 1,000 vgs/세포 또는 2,000 vgs/세포로 AAV2 벡터로 형질도입하고, 48 hrs 동안 인큐베이션하였다. 다르게는, 세포를 형질도입 1 hr 전에 50 μM의 선택적 세린/트레오닌 키나제 억제제 2-(2-히드록시에틸아미노)-6-아미노헥실카르밤산 tert-부틸 에스테르-9-이소프로필푸린 (CaMK-II에 대해), 안트라[1,9-cd]피라졸-6(2H)-온, 1,9-피라졸로안트론 (JNK에 대해), 및 4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-피리딜) 1H-이미다졸 (MAPK에 대해) (CK59, JNK 억제제 2, PD 98059, 칼비오켐(Calbiochem))로 예비처리하였다. 트랜스진 발현은 시야당 초록 형광의 총 면적 (픽셀^2)으로서 (평균±SD), 또는 이전에 설명된 바와 같이 유동 세포분석에 의해 평가하였다 (Markusic et al., 2011; Jayandharan et al., 2011). 시험 결과 및 대조군을 비교하기 위해 변수 분석을 사용하였고, 이것은 통계상 유의한 것으로 결정되었다.

[0216] ***웨스턴 블롯 분석***: 웨스턴 블롯 분석을 이전에 설명된 바와 같이 수행하였다 (Aslanidi et al., 2007). 세포를 원심분리에 의해 수확하고, PBS로 세척하고, 프로테아제 및 포스파타제 억제제 혼합물 (세트 2 및 3, 칼비오켐)을 보충한, 50 mM Tris_HCl, pH 7.5, 120 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 10% 글리세롤, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 1 mM 페닐메틸술포닐 플루오라이드 (PMSF), 1 mM EDTA, 및 1 mM EGTA를 함유하는 용해 완충제 내에 재현탁하였다. 현탁액을 얼음 상에서 1 hr 동안 인큐베이션하고, 4℃에서 14,000 rpm에서 30 min 동안 원심분리에 의해 청정화하였다. 단백질 농도에 대한 표준화 이후, 샘플을 12% 폴리아크릴아미드/SDS 전기영동을 이용하여 분리하고, 니트로셀룰로스 막에 옮기고, 1차 항체, 즉, 항 p-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) 토끼 mAb, 총 p38 MAPK 토끼 mAb, 및 GAPDH 토끼 mAb (1:1000, 셀시그널링(CellSignaling)), 이어서 2차 양고추냉이 페록시다제-연결된 항체 (1:1000, 셀시그널링)로 프로빙하였다,

[0217] ***특이적 세포독성 T-림프구 생성 및 세포독성 검정***: 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)를 상기 설명된 바와 같이 생성하였다. 미성숙 DC를 인간 텔로머라제 cDNA를 코딩하는 AAV2-S662V 벡터 (카리나 크로토바 박사(Dr. Karina Krotova, 플로리다 대학교))로 감염시키고, 각각 MOI 2,000 vgs/세포에서 2개의 중첩 ORF - $hTERT_{838-2229}$ 및 $hTERT_{2042-3454}$로 분리하였다. 이어서, 성숙을 유도하기 위해 세포를 보충제로 자극시켰다. 48 hr 후에, hTERT를 발현하는 성숙 DC를 수확하고, PBMC와 20:1의 비로 혼합하였다. CTL을 25 cm^2 플라스크 내에서 20 x 10^6 세포에서 재조합 인간 IL-15 (20 IU/ml) 및 IL-7 (20 ng/mL)을 함유하는 AIM-V 배지 내에서 배양하였다. 신선한 시토카인을 2일마다 첨가하였다. 후-프라이밍의 7일 후에, 세포를 수확하고 치사 검정을 위해 사용하였다 (Heiser et al., 2002). 치사 곡선을 생성하고, 특이적 세포 용해를 이전에 설명된 바와 같이 생/사 세포 비의 FACS 분석에 의해 결정하였다 (Mattis et al., 1997). 인간 불멸화 골수성 백혈병 세포주 K562를 표적으로서 사용하였다.

[0218] ***통계 분석***: 결과를 평균±S.D.로서 제시하였다. 스튜던트(Student) t-검정(t-test)의 그룹-독립(grouped-unpaired) 양측(two-tailed) 분포를 이용하여 군들 사이의 차이를 확인하였다. P-값<0.05을 통계상 유의한 것으로 간주하였다.

[0219] **실시예 1 - 특이적 세포성 세린/트레오닌 키나제의 억제는 rAAV2 벡터의 형질도입 효율을 증가시킨다.**

[0220] 세포 표피 성장 인자 수용체 단백질 티로신 키나제 (EGFR-PTK) 활성의 억제, 및 7개의 표면-노출된 티로신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발은 이들 잔기의 인산화를 방지하여 벡터의 유비퀴틴화 및 후속적인 프로테아솜-매개 분해를 회피함으로써 AAV2 벡터의 형질도입 효율을 유의하게 증가시켰다. AAV2 캡시드는 또한 15개의 표면-노출된 세린 잔기를 함유하고, 이것은 잠재적으로 다양한 세포 종류 및 조직 내에서 널리 발현되는 세포성 세린/

트레오닌 키나제에 의해 인산화될 수 있다.

[0221] 상기 키나제 활성의 억제가 표면-노출된 세린 잔기의 인산화를 방지하고, 따라서, AAV2 벡터의 세포내 수송 및 핵 수송을 개선할 수 있는지 여부를 검사하기 위해, 세포성 세린/트레오닌 키나제의 몇몇 상업적으로 이용가능한 특이적 억제제, 예컨대 칼모듈린-의존적 단백질 키나제 II (CamK-II), c-Jun N-말단 키나제 (JNK), 및 미토겐-활성화 단백질 키나제 (p38 MAPK)를 사용하였다. HEK293 세포를 특이적 억제제, 예컨대 2-(2-히드록시에틸아미노)-6-아미노헥실카르밤산 tert-부틸 에스테르-9-이소프로필푸린 (CaMK-II에 대해), 안트라[1,9-cd]피라졸-6(2H)-온, 1,9-피라졸로안트론 (JNK에 대해), 및 4-(4-플루오로페닐)-2-(4-메틸술피닐페닐)-5-(4-피리딜) 1H-이미다졸 (p38 MAPK에 대해)로 1 hr 동안 다양한 농도에서 예비-처리하였다. 세포를 후속적으로 단일 가닥 (ss) 또는 자가-상보성 (sc) AAV2 벡터로 1,000 벡터 게놈 (vgs)/세포로 형질도입하였다.

[0222] 이들 결과는 50 μM의 농도에서 모든 억제제가 ssAAV2 및 scAAV2 벡터의 형질도입 효율을 유의하게 증가시켰고, p38 MAPK 억제제가 가장 효과적이었음을 보여준다 (도 3a 및 도 3b). 결과는 형질도입 효율의 증가가 개선된 바이러스 제2 가닥 DNA 합성보다는 벡터 캡시드의 인산화의 방지 때문이었음을 나타낸다.

[0223] **실시예 2 - 표면-노출된 세린 잔기의 부위-지정 돌연변이유발은 벡터-매개 트랜스진 발현을 개선시킨다.**

[0224] AAV2 캡시드는 3개의 캡시드 VP의 바이러스 단백질 3 (VP3) 공통 영역 내에 50개의 세린 (S) 잔기를 함유하고, 그 중에 15개의 잔기 (S261, S264, S267, S276, S384, S458, S468, S492, S498, S578, S658, S662, S668, S707, S721)는 표면-노출되어 있다. 각각의 15개의 S 잔기를 이전에 설명된 바와 같이 부위-지정 돌연변이유발에 의해 발린 (V) 잔기로 치환시켰다. 대부분의 돌연변이체는 WT AAV2 벡터와 유사한 역가로 생성될 수 있었고, 단, S261V, S276V, 및 S658V는 ~10배 더 낮은 역가로 생산되었고, S267V 및 S668V는 DNAse I-저항성 벡터 입자의 검출가능한 수준으로 생산되지 않았다. S468V 및 S384V 돌연변이체의 역가는 WT AAV2 벡터보다 ~3-5배 더 높았다. 각각의 S-V 돌연변이체 벡터를 293 세포에서 형질도입 효율에 대해 평가하였다.

[0225] 도 4a 및 도 4b에 제시된 이들 결과는 15개의 돌연변이체 중에서, S662V 돌연변이체가 293 세포를 그의 WT 상대물보다 ~20배 더 효율적으로 형질도입함을 나타낸다. S458V 및 S492V 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율은 각각 ~4배 및 2배 증가하였다. WT AAV2 벡터보다 더 높은 역가로 생산된 S468V 및 S384V 돌연변이체의 형질도입 효율은 동일한 감염 다중도 (MOI)에서 변하지 않고 남거나(S468V), ~10배(S384V) 감소하였다. 다양한 세린-대-발린 돌연변이된 AAV2 벡터의 형질도입 효율을 도 5에 요약한다. 놀랍게도, 이중 돌연변이체 (S458V+S662V 및 S492V+S662V)를 함유한 벡터에서 또는 삼중 돌연변이체 (S458V+S492V+S662V)를 함유한 벡터에서 형질도입 효율의 추가의 증가는 관찰되지 않았다.

[0226] **실시예 3 - 다양한 아미노산을 사용한 S662의 치환**

[0227] 위치 662에서 S-대-V 치환에 추가로, 상이한 아미노산 치환을 갖는 다음 7개의 돌연변이체를 또한 생성하였다: S662→알라닌 (A), S662→아스파라긴 (N), S662→아스파르트산 (D), S662→히스티딘 (H), S662→이소류신 (I), S662→류신 (L), 및 S662→페닐알라닌 (F). 각각의 이들 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율을 또한 상기 설명된 바와 유사하게 293 세포에서 평가하였다.

[0228] 도 6a 및 도 6b에 제시하고 도 7에 요약한 결과는 S 대 V로의 치환이 다른 돌연변이체에 비교할 때 벡터 역가의 임의의 변화 없이 가장 효율적인 돌연변이체의 생산을 일으켰음을 입증한다. S를 N, I, L, 또는 F로 교체하면 형질도입 효율에 대한 유의한 효과 없이 패키징 효율을 ~10배 감소시킨 반면, D 또는 H로의 치환은 벡터 역가에 대한 효과 없이 형질도입 효율을 각각 ~8배 및 ~4배 증가시켰다. S에서 A로의 치환은 WT AAV2 벡터에 비해 바이러스 역가를 ~5배까지 증가시키고 트랜스진 발현을 ~3배 향상시켰다. 위치 662에서 세린-돌연변이체의 역가 및 감염성에서 관찰된 변동성은 각각의 아미노산이 AAV2 패키징 효율 및 그의 생물학적 활성 모두를 조정하는데 있어서 중요한 역할을 하는 것을 제안한다.

[0229] **실시예 4 - 다양한 세포 종류에서 p38 MAPK 활성과 상관성이 있는 S662V 벡터의 형질도입 효율**

[0230] 다음 세포 종류를 사용하여 S662V 벡터-매개 트랜스진 발현을 검사하였다: (i) NIH3T3 (마우스 배아 섬유모세포), (ii) H2.35 (마우스 태아 간세포), (iii) HeLa (인간 자궁경부암 세포), 및 (iv) 1차 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC). 이들 세포 종류를 동일한 조건 하에 WT scAAV2-EGFP 또는 S662V scAAV2-EGFP 벡터로 2,000 vgs/세포의 MOI에서 형질도입하였다. HeLa, 293 및 moDC에 대해 감염 48 hr 후 (p.i.), 및 H2.35 및 NIH3T3 세포에 대해 감염 5일 후에 EGFP 유전자 발현을 평가하였다.

[0231] 도 8a에 제시한 결과는 WT 및 S662V 돌연변이체 벡터 사이의 형질도입 효율에서 절대적인 차이가 ~3배 (H2.35

세포에서) 내지 ~20배 (293 세포에서) 범위이지만, 돌연변이체 벡터는 시험한 각각의 세포 종류에서 일정하게 더 효율적이었음을 보여준다.

[0232] WT 및 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율에서 관찰된 차이가 세포 p38 MAPK의 발현 및/또는 활성의 수준에서 변이 때문인지 검사하기 위해, 각각의 세포 종류로부터 제조된 세포 용해물을 총 p38 MAPK 및 포스포-p38 MAPK 수준 둘 모두를 검출하기 위해 특이적 항체로 프로빙한 웨스턴 블롯 상에서 분석하였다. GAPDH를 로딩 대조군으로서 사용하였다.

[0233] 도 8b에 제시한 결과는 p38 MAPK 단백질 수준은 유사하지만, 인산화의 수준에 의해 결정한 키나제 활성은 상이한 세포 종류 사이에서 유의하게 상이하였고, S662V 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율은 p38 MAPK 활성와 대략 상관성이 있음을 나타낸다. 결과는 AAV2 벡터의 p38 MAPK-매개 인산화를 보여준다. 또한, WT-AAV2 벡터에 의한 형질도입은 293 세포 또는 moDC에서 p38 MAPK의 인산화의 상향-조절을 일으키지 않았고; 이것은 AAV가 moDC에서 강건한 표현형 변화를 유도하지 않음을 나타낸다.

[0234] **실시예 5 - moDC의 S662V 돌연변이체 벡터-매개 형질도입은 표현형 변경을 일으키지 않았다.**

[0235] MAPK 패밀리 구성원은 APC의 발달 및 성숙에서 중요한 역할을 한다. 본 실시예에서, 건강한 공여자 백혈구 분리 반출술로부터 단리된 moDC를 상기 설명된 바와 같이 50 μM 선택적 키나제 억제제로 처리한 후, WT scAAV2-EGFP 벡터로 형질도입하였다. 2시간 p.i.에서, 세포를 보충물 (TNF-α, IL-1β, IL-6, PGE2)로 처리하여 성숙을 유도하였다. EGFP 트랜스진 발현을 48 hrs p.i.에서 형광 현미경에 의해 평가하였다.

[0236] 결과는 JNK 및 p38 MAPK의 특이적 억제제를 사용한 moDC의 예비-처리가 EGFP 발현 수준을 각각 ~2배 및 ~3배 증가시켰고, S662V 돌연변이체 벡터를 사용한 형질도입 효율은 ~5배 향상되었음을 보여준다 (도 9a, 도 9b, 및 도 9c).

[0237] 이들 키나제의 억제는 수지상 세포의 성숙을 방지하는 것으로 이전에 보고되었으므로, DC에서 표현형 변화를 유도하는 S662V 돌연변이체의 능력을 또한 검사하였다. 간단히 설명하면, moDC를 50,000 vgs/세포까지 점증적으로 더 높은 MOI로 감염시키고, 48 hr p.i.에서 수확하고, 표면 동시-자극성 분자의 상향 조절에 대해 형광-활성화 세포 분류 (FACS)에 의해 분석하였다. CD80, CD83 및 CD86과 같은 DC 성숙 마커의 유동 세포측정 분석은 WT AAV2 벡터와 유사하게, S662V 돌연변이체 벡터가 또한 moDC의 성숙을 유도하지 않았음을 나타낸다 (도 9c). 결과는 본 발명에 따라 제조된 캡시드-돌연변이된 AAV 벡터가 낮은 면역원성을 나타냄을 보여주었다.

[0238] **실시예 6 - AAV2-S662V 벡터로 형질도입된 moDC에 의한 hTERT-특이적 CTL의 생성**

[0239] moDC에서 세린-돌연변이체 AAV2 벡터-매개 트랜스진 발현이 WT-AAV2 벡터에 비해 유의하게 개선되었으므로, 본 연구는 세포독성 T-림프구의 생성 및 표적 세포의 효과적인 특이적 치사를 자극하는 S662V-로딩된 moDC의 능력을 입증한다. 인간 텔로머라제가 대부분의 암 세포에서 공통적으로 발현되는 특유한 항암 표적으로서 인정되는 것을 감안하면, 닭 β-액틴 프로모터의 제어 하에 끝을 절단한 인간 텔로머라제 (hTERT) 유전자를 클로닝하고, DNA를 AAV2 S662V 돌연변이체 내로 패키징하였다. 25%까지의 CD8 양성 세포를 함유하는 비-부착 말초 혈액 단핵 세포 (PBMC)를 S662V 벡터에 의해 전달된 moDC/hTERT로 1회 자극하였다. 이펙터 대 표적 세포 비를 후속적으로 감소시키면서 치사 곡선을 생성하기 위해 세포-매개 세포독성의 2-색 형광 검정을 위해 불멸화 골수성 백혈병 세포주 K562를 사용하였다.

[0240] 도 10에 제시된 결과는 hTERT로 로딩된 moDC가 GFP를 발현하는 moDC에 비해 특이적 T 세포 클론 증식 및 치사 활성을 효과적으로 자극할 수 있었음을 나타낸다. 이들 결과는 또한 캡시드-돌연변이된 rAAV-벡터 기반 전달 방법이 또한 다양한 포유동물 예방접종 방법에 사용될 수 있음을 나타낸다.

[0241] **실시예 7 - 표면-노출된 티로신, 세린 및/또는 트레오닌 잔기의 부위-지정 돌연변이유발에 의해 얻어진 고효율 rAAV2 벡터**

[0242] AAV 벡터는 현재 많은 임상 시험에서 치료 유전자의 지속적인 발현을 달성하기 위해 다양한 조직을 표적으로 하는 전달 비히클로서 사용되고 있다. 그러나, 치료 이익을 관찰하기 위해 큰 벡터가 필요하지 않다. 충분한 양의 벡터의 생산에는 또한 도전에 제기되고, 벡터에 대한 면역 반응을 개시하는 위험이 있다. 따라서, 보다 낮은 용량에서 높은 형질도입 효율을 갖는 신규한 AAV 벡터를 개발하는 것이 중요하다.

[0243] 세포 표피 성장 인자 수용체 단백질 티로신 키나제 (EGFR-PTK)는 주로 티로신 잔기에서 AAV2 캡시드의 인산화 때문에, 재조합 AAV2 벡터로부터 트랜스진 발현에 부정적으로 영향을 미친다. 티로신-인산화된 캡시드는 숙주 프로테아솜 기구에 의해 후속적으로 분해되고, 이것은 AAV 벡터의 형질도입 효율에 부정적인 영향을 미친다.

JNK 및 p38 MAPK 세린/트레오닌 키나제의 선택적 억제제는 형질도입 효율을 개선시키고, 이것은 특정 표면-노출된 세린 및/또는 트레오닌 잔기의 인산화가 AAV 벡터의 형질도입 효율을 감소시킴을 나타낸다.

[0244] 야생형 AAV2의 캡시드 단백질에 대한 부위-지정 돌연변이유발을 수행하였다. 도 11a, 도 11b, 도 12a, 및 도 12b에 도시된 바와 같이, 야생형 AAV2 캡시드 단백질의 세린 (S662V) 및 트레오닌 (T491V) 돌연변이체는 AAV 벡터의 형질도입 효율을 실질적으로 증가시킨다.

[0245] 세린 (S662V) 및 트레오닌 (T491V) 돌연변이를 최상으로 수행하는 단일 (Y730F) 및 삼중 (Y730F+500+444F) 티로신-돌연변이체와 조합하여 다음 벡터를 생성하였다: (i) 3개의 이중 (S662V+T491V; Y730F+S662V; Y730F+T491V); (ii) 1개의 삼중 (S662V+Y730F+T491V); (iii) 2개의 사중 (Y730+500+444F+S662V; Y730+500+44F+T491V); 및 (iv) 1개의 5중 (Y730+500+4440F+S662V+T491V). 1차 뮤린 간세포 세포주 H3.25를 사용하여 각각의 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율을 평가하였다.

[0246] 도 13a 및 도 13b에 도시된 바와 같이, AAV2 사중 돌연변이체 (Y730+500+730F+T491V)-기반 벡터는 형질도입 효율을 상응하는 비변형 야생형 (WT) AAV2 벡터에 비해 약 30배 증가시키고, AAV2 삼중 돌연변이체 (Y730+500+444F)-기반 벡터에 의해 생산된 것에 비해 약 3배 증가시켰다. S662V 돌연변이를 단일 (Y730F)- 또는 삼중-티로신 돌연변이체 (Y730F+500+444F) 벡터와 조합시키면 형질도입 효율에 부정적으로 영향을 미쳤다.

[0247] 유전자 변형된 수지상 세포 (DC)는 광범위하게 연구되었고, 암 환자에서 이들의 효율을 평가하는 수많은 I상 및 II상 임상 시험이 개시되었다. 그러나, DC 로딩을 위한 현재의 방법은 세포 생존성, 항원 제시의 영속성, 및 환자의 반수체에 의한 제한에 관한 불활식성의 면에서 부적당하다. AAV 벡터의 상이한 흔히 사용되는 혈청형에 의한 상이한 하위세트의 DC의 성공적인 형질도입이 입증되었고, AAV-기반 항종양 백신의 잠재적인 이점이 논의되었다. 그러나, 특이성 및 형질도입 효율의 면에서 DC에 대한 재조합 AAV 벡터에 의한 유전자 전달에서 추가의 개선은 항종양 백신으로서 사용될 때 유의한 영향을 달성하는 것을 보증한다.

[0248] 세린/트레오닌 단백질 키나제는 바이러스 캡시드 상의 표면-노출된 세린 및/또는 트레오닌 잔기를 인산화함으로써 재조합 AAV 벡터-매개 트랜스진 발현의 효율을 부정적으로 조절하고, 프로테아솜-매개 분해에 대해 벡터를 표적화할 수 있다. 표면-노출된 세린 및 트레오닌 잔기의 인산화의 방지는 벡터가 인산화 및 후속적인 유비퀴틴화를 회피하도록 하고, 따라서, 프로테아솜 분해를 방지하도록 할 수 있다.

[0249] 각각의 15개의 표면-노출된 세린 (S) 잔기의 야생형 AAV 벡터에 대해 부위-지정 돌연변이유발을 수행하였다. 결과는 S662에서 발린 (V)으로의 치환이 야생형 AAV2 벡터에 비교할 때 S662V 돌연변이체의 형질도입 효율을 6배까지 증가시켰음을 보여준다. 또한, 야생형 AAV2 벡터의 각각의 17개의 표면-노출된 트레오닌 (T) 잔기를 V로 치환하는 부위-지정 돌연변이유발을 수행하였다 (T251V, T329V, T330V, T454V, T455V, T503V, T550V, T592V, T581V, T597V, T491V, T671V, T659V, T660V, T701V, T713V, T716V). 각각의 T-V 돌연변이체 벡터의 형질도입 효율을 2,000 vgs/세포의 MOI에서 1차 인간 단핵구-유래 수지상 세포 (moDC)를 사용하여 평가하였다. 10 ng/mL TNF-α, 10 ng/mL IL-1, 10 ng/mL IL-6, 및 1 mg/mL PGE2를 포함하는 시토카인 혼합물을 사용한 성숙 후에, EGFP 발현을 감염 48-hr 후에 형광 현미경 하에 분석하였다. 세포를 이들이 성숙 수지상 세포 (mDC)의 대표적인 표현형에 일치하도록 보장하기 위해 동시-자극성 분자 (CD80, CD83, 및 CD86)의 발현에 대해 특성화하였다.

[0250] 도 14a 및 도 14b에 제시된 바와 같이, 다음 T 잔기의 돌연변이 (T455V, T491V, T550V, T659V, T671V)는 moDC의 형질도입 효율을 5배까지 증가시켰고, 여기서, T491V 돌연변이체가 본 연구에서 시험한 것 중에서 가장 높은 형질도입 효율을 나타냈다.

[0251] T 잔기의 다중 돌연변이가 형질도입 효율을 추가로 향상시킬 수 있는지 검사하기 위해, 다음 AAV2 돌연변이체를 또한 생성하였다: (i) 야생형 AAV2 벡터에 관하여 이중 돌연변이를 갖는 4개의 AAV2 벡터 (T455V+T491V; T550V+T491V; T659V+T491V; T671V+T491V); (ii) 2개의 삼중 돌연변이된 AAV2 벡터 (T455V+T491V+T550V 및 T550V+T659V+T491V); 및 (iii) 1개의 사중 돌연변이된 AAV2 벡터 (T455V+T550V+T659V+T491V). 결과는 이들 다중 돌연변이체 벡터의 몇몇이 수지상 세포의 형질도입 효율을 증가시켰고, 특히 삼중 돌연변이체 (T550V+T659V+T491V)가 최적의 형질도입 효율 (상응하는 비변형 야생형 AAV2 벡터보다 약 10배 더 큼)을 갖는 것으로 나타났음을 입증하였다. 이들 결과는 많은 적합한 캡시드-돌연변이된 벡터를 생성하기 위해 "믹스-앤-매치(mix-and-match)" 방식으로 다양한 조합 돌연변이체를 제조함으로써 추가로 향상되었다. 하나의 그러한 조합, 즉, 최상으로 수행하는 세린 치환 (S662V) 돌연변이체를 최상으로 수행하는 트레오닌 치환 (T491V)과의 조합은 개별적인 단일 돌연변이에 비해 형질도입 효율을 약 8배 추가로 향상시켰다.

[0252] **실시예 8 - AAV2 캡시드 상에서 유비퀴틴-결합 리신 잔기의 표적화 돌연변이유발은 그의 형질도입 효율을 개선시킨다.**

[0253] 혈우병 임상 시험으로부터 이용가능한 데이터로부터 고용량의 AAV 벡터의 간 유전자 전달이 강건한 적응 면역 반응을 일으킨다는 것으 현재 잘 인정되고 있다. 따라서, 보다 저용량의 벡터가 지속적인 표현형 교정을 달성하고 벡터 관련 면역-독성을 제한하기 위해 사용되도록 허용할 신규한 전략을 개발하는 것이 필요하다.

[0254] 본 실시예는 VVA2 캡시드 단백질의 VP3 영역의 표면-노출된 리신 잔기가 숙주 유비퀴틴 리가제에 대한 직접 표적이고, 이들 리신 잔기의 돌연변이유발이 AAV 벡터의 형질도입 효율을 개선시킴을 보여준다.

[0255] 유비퀴틴화 예측 소프트웨어 (UbPred)를 사용하는 인 실리코(in silico) 분석으로 야생형 AAV2 캡시드의 7개의 리신 잔기 (K39, K137, K143, K161, K490, K527 및 K532)가 유비퀴틴화될 수 있음을 확인하였다. AAV2 Rep/Cap 코딩 플라스미드에서 리신 대 아르기닌 돌연변이를 수행하고, EGFP를 발현하는 재조합 자가-상보성 AAV2 벡터 [scAAV-CBa-EGFP]의 고도 정제된 원액을 각각의 7개의 리신 돌연변이체 플라스미드에서 생성하였다. 리신 돌연변이체 벡터의 물리적 입자 역가는 야생형 (WT) scAAV 벡터 (~0.5 - 1 x 10^{12} vgs/mL)와 대등하였고, 이것은 이들 돌연변이가 돌연변이체 캡시드의 구조 또는 패키징 능력을 해치지 않았음을 제안한다.

[0256] 이어서, WT 또는 각각의 7개의 리신 돌연변이체 캡시드를 함유하는 scAAV 벡터를 시험관내에서 그들의 형질도입 잠재성에 대해 평가하였다. 약 8 x 10^{4}개의 HeLa 또는 HEK293 세포를 500, 2000 또는 5000 vgs/세포를 비롯한 상이한 감염 다중도 (MOI)에서 AAV로 모의-감염시키거나 감염시켰다. 감염 48시간 후, 트랜스진 (EGFP) 발현을 형광 현미경 및 유동 세포측정에 의해 측정하였다.

[0257] 도 15에 제시된 결과는 K532R 돌연변이체 벡터가 WT-AAV2 벡터에 비교할 때, 시험관내에서 HeLa (18X) 및 HEK 293 (9X) 세포에서 유전자 발현을 유의하게 증가시켰음을 입증한다. K532R 벡터의 증가된 형질도입 효율은 시험한 3개의 상이한 MOI에 걸쳐 일정하였고, 여기서 WT 벡터에 비해 10배의 평균 증가를 가졌다.

[0258] **실시예 9 - 생체내에서 정규(canonical) 및 대안적 NF-KB 경로의 AAV 벡터-매개 활성화**

[0259] 시험관내에서 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터를 사용한 HeLa 세포의 감염은 세포 면역 및 염증 반응의 중심 조절제인 NF-KB의 대안적인 경로의 활성화를 일으킨다. 또한, 대안적 경로의 활성화는 이들 세포 내에서 AAV-매개 트랜스진 발현을 조절하지만 정규 경로는 그렇지 않다.

[0260] 본 실시예는 마우스 내에서 간-지정 AAV-매개 유전자 전달에서 NF-KB에 대한 역할을 규정한다. 생체내에서, AAV-매개 유전자 전달은 정규 및 대안적 NF-KB 경로의 연속적인 활성화를 일으킨다. 이들 경로는 주로 염증 (정규) 또는 적응 반응 (대안적 경로)을 구동시키는 것으로 생각된다. 야생형 (WT) 또는 티로신 삼중 돌연변이체 (TM) 캡시드를 갖는 AAV2 벡터는 정규 NF-KB 경로를 2 hr 이내에 활성화시켰고, 이것은 전-염증성 시토카인 및 케모카인의 발현을 일으켰다 (도 14a). 상기 일시적인 과정은 Toll-유사 수용체 9 (TLR9)-의존적이고, 아마도 항원-제시 세포에 의한 벡터 게놈의 초기 감지를 반영한다. 벡터 전달 9 hr 후에 제조된 간 균질액의 웨스턴 블롯 분석 (도 14b)은 대안적 NF-KB 경로의 핵 p52 단백질 성분의 풍부함을 보여주었고, 이것은 아마도 간 세포로의 유전자 전달로부터 기인한다.

[0261] 유전자 전달에 앞서 NF-KB 억제제 Bay11의 투여는 두 경로의 활성화를 효과적으로 차단하였다. 이것은 전-염증성 선천 면역 반응을 방지하고, 또한 항-AAV 캡시드 항체 형성을 약화시켰다 (도 14c). 중요하게는, Bay11은 WT 및 TM AAV2 벡터에 의해 매개된 장기 트랜스진 발현을 저해하지 않았다 (도 14d). 이들 결과는 벡터 투여에 앞서 NF-KB 억제제를 사용한 일시적인 면역-억제가 염증 (선천 반응에 의해 유발된)을 제거하고, 또한 적응 반응을 제한하였음을 입증한다.

[0262] **실시예 10 - 최적화 rAAV3 벡터의 개발: 인간 간암 세포의 고효율 형질도입의 메카니즘**

[0263] 10개의 흔히 사용되는 AAV 혈청형 중에서, AAV3은 세포 및 조직을 불량하게 형질도입하는 것으로 보고되었다. 그러나, 본 발명자들은 AAV3 벡터가 확립된 인간 간모세포종 (HB) 및 인간 간세포 암종 (HCC) 세포주뿐만 아니라 1차 인간 간세포를 극히 효율적으로 형질도입하는 것을 발혀냈다. AAV3은 바이러스 도입을 위해 인간 HGFR을 세포 수용체/보조-수용체로서 이용한다.

[0264] 본 실시예는 hHGFR의 세포외 및 세포내 키나제 도메인이 둘 모두 AAV3 벡터 도입 및 AAV3-매개 트랜스진 발현에 관여하는 것을 보여준다. 결과는 다음을 보여준다: (i) hHGFR의 안정한 형질감염 및 과다-발현 이후에 AAV3 벡터-매개 형질도입이 T47D 세포, 즉, 검출불가능한 수준의 내인성 hHGFR을 발현하는 인간 유방암 세포주 내에서

유의하게 증가되고 (도 15a); (ii) hHGFR과 연관된 티로신 키나제 활성은 AAV3 벡터의 형질도입 효율에 부정적으로 영향을 미치고 (도 15b, 도 15c); (iii) 프로테아솜 억제제의 사용은 AAV3 벡터-매개 형질도입을 유의하게 개선시키고; (iv) AAV3 캡시드 상에서 특이적 표면-노출된 티로신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발은 개선된 형질도입 효율을 일으키고; (v) 2개의 티로신-돌연변이의 특이적 조합은 트랜스진 발현의 정도를 추가로 개선시킨다 (도 15d). 이들 AAV3 벡터는 인간에서 간암의 유전자 요법을 위해 유용할 수 있다.

[0265] **실시예 11 - 표면-노출된 리신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발은 생체내에서 뮤린 간세포에서 rAAV2 및 rAAV8 벡터에 의한 개선된 형질도입을 일으킨다.**

[0266] 유비퀴틴-프로테아솜 경로는 재조합 AAV2 벡터의 세포내 수송에서 중대한 역할을 하고, 이것은 이들 벡터의 형질도입 효율에 부정적으로 영향을 미친다. 유비퀴틴화를 위한 1차 신호는 AAV2 캡시드 상에서 특이적 표면-노출된 티로신 (Y), 세린 (S), 및 트레오닌 (T) 잔기의 인산화이고; 이들 잔기 의 일부의 제거는 야생형 (WT) AAV2 벡터의 형질도입 효율을 유의하게 증가시킨다.

[0267] 본 실시예는 표면-노출된 리신 잔기의 부위-지정 돌연변이유발이 AAV2 캡시드의 유비퀴틴화를 방지하였고, 이것은 다시 세포 프로테아솜 기구에 의한 벡터 분해를 방지하여, 선택된 포유동물 세포에 치료 또는 진단 폴리뉴클레오티드를 전달하기 위한 개선된 벡터를 생산하였음을 예시한다.

[0268] 표면-노출된 리신 (K) 잔기에서 글루탐산 (E)으로의 단일 돌연변이를 갖는 AAV2 벡터 (K258, K490, K527, K532, K544, 549 및 K556)를 제조하고 분석하였다. EGFP 리포터 유전자를 발현하는 K490E, K544E, K549E 및 K556E scAAV2 벡터의 형질도입 효율은 상응하는 비변형된 WT AAV2 벡터에 비교할 때 5배만큼 증가하였다 (도 16 참조). 본 연구에서 분석한 예시적인 구축물 중에서, K556E 단일 돌연변이체가 리신-치환된 돌연변이체들 사이에서 최고 형질도입 효율 (Hela 세포 내에서 시험관내에서 2,000 vgs/세포의 형질도입 비율을 가짐)을 가졌다. 1 x 10^{10} vgs의 각각의 벡터가 생체내에서 C57BL/6 마우스에 정맥내 전달될 때 유사한 결과가 또한 관찰되었고, 간세포 내에서 트랜스진 발현을 주사 2주 후에 평가하였다. 반딧불이 루시퍼라제 (Fluc) 리포터 유전자를 발현하는 WT 또는 라인신-돌연변이된 ssAAV2 벡터의 1 x 10^{10} vgs/동물의 정맥내 전달 이후 주사 2주 후에 생물발광 영상화가 이들 결과를 추가로 확증하였다.

[0269] 중요하게는, 가장 효율적인 단일 아미노산 잔기 돌연변이 중 2개를 조합하여 이중 돌연변이체 (K544E+K556E)를 생성하였다. 생체내에서 뮤린 간세포에서 상기 이중 돌연변이체 ssAAV2-Fluc 벡터의 형질도입 효율은 단일 돌연변이체에 비해 ~2배, 및 WT 비변형된 ssAAV2 대조 벡터에 비해 ~10배 증가하였다.

[0270] AAV8 벡터는 이전에 뮤린 간세포를 대단히 잘 형질도입하는 것으로 나타났다. 표면-노출된 K 잔기의 일부는 상기 혈청형에서 또한 보존되므로, K530E-, K547E- 또는 K569E-돌연변이체를 갖는 ssAAV8-Fluc 벡터를 또한 생성되었다. 생체내에서 뮤린 간세포에서 K547E 및 K569E ssAAV8-Fluc 벡터의 형질도입 효율은 WT ssAAV8 벡터에 비해 각각 ~3배 및 ~2배 증가하였다 (도 17a, 도 17b, 도 17c, 도 17d, 도 17e, 및 도 18).

[0271] 결과 (본원에서 도 19a, 도 19b, 도 20a 및 도 20b, 도 21a-도21i, 도 22a-도 22i, 도 23a-도 23f, 도 24 및 도 25에 요약)는 표면-노출된 리신 잔기를 표적화하는 것이 또한 인간 세포의 증가된 형질도입을 위한 새로운 개선된 AAV-기반 바이러스 벡터 및 중요하게는 유전자 요법에서 유용한 새로운 표적화 벡터를 생성하기 위해 연구될 수 있음을 입증하였다.

[0272] **참고문헌:**

[0273] 다음 참고문헌은 본원에 기재된 것에 보충적인 예시적인 절차 또는 다른 상세한 내용을 제공하는 정도로 본원에 참조로 구체적으로 포함된다.

[0274] Aldrich, WA *et al.*, "Enhanced transduction of mouse bone marrow-derived dendritic cells by repetitive infection with self-complementary adeno-associated virus 6 combined with immunostimulatory ligands," *Gene Ther.*, **13**:29-39 (2006).

Aslanidi, G *et al.,* "Ectopic expression of Wnt10b decreases adiposity and improves glucose homeostasis in obese rats,' *Am. J. Physiol. – Endocrinol. Metab.,* **293:**E726-E736 (2007).

Aslanidi, G *et al.,* "An inducible system for highly efficient production of recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors in insect Sf9 cells," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA,* **106:**5059-5064 (2009).

Banchereau, J and Steinman, RM, "Dendritic cells and the control of immunity," *Nature,* **392:**245-252 (1998).

Beatty, GL and Vonderheide, RH "Telomerase as a universal tumor antigen for cancer vaccines," *Exp. Rev. Vaccines,* **7:**881-887 (2008).

Boisleve, F *et al.,* "Implication of the MAPK pathways in the maturation of human dendritic cells induced by nickel and TNF-alpha," *Toxicology,* **206:**233-244 (2005).

Chapuis, F *et al.,* "Differentiation of human dendritic cells from monocytes *in vitro*, *Eur. J. Immunol.,* **27:**431-441 (1997).

Cheng, B *et al.*, "Development of optimized AAV3 serotype vectors: mechanism of high-efficiency transduction of human liver cancer cells," *Gene Ther.,* **19(4):**375-84 (2012).

Daya, S and Berns, KI, "Gene therapy using adeno-associated virus vectors," *Clin. Microbiol. Rev.,* **21:**583-593 (2008).

den Brok, MH *et al.,* "Dendritic cells: tools and targets for antitumor vaccination," *Exp. Rev. Vaccines,* **4:**699-710 (2005).

DiPrimio, N *et al.,* "Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly," *J. Virol.,* **82:**5178-5189 (2008).

Eisold, S *et al.,* "Induction of an antitumoral immune response by wild-type adeno-associated virus type 2 in an in vivo model of pancreatic carcinoma," *Pancreas,* **35:**63-72 (2007).

Figdor, CG *et al.,* "Dendritic cell immunotherapy: mapping the way," *Nat. Med.,* **10:**475-480 (2004).

Gao, G *et al.,* "Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infections," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA,* **100:**6081-6086 (2003).

Girod, A *et al.,* "Genetic capsid modifications allow efficient re-targeting of adeno-associated virus type 2," *Nat. Med.,* **5:**1438 (1999).

Harley, CB, "Telomerase and cancer therapeutics," *Nat. Rev.,* **8:**167-179 (2008).

[0275]

Heiser, A *et al.*, "Autologous dendritic cells transfected with prostate-specific antigen RNA stimulate CTL responses against metastatic prostate tumors," *J. Clin. Investig.*, **109:**409-417 (2002).

Jayandharan, GR *et al.*, "Activation of the NF-kB pathway by adeno-associated virus (AAV) vectors and its implications in immune response and gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci.USA,* **108:**3743-3748 (2011).

Levy, HC *et al.*, "Heparin binding induces conformational changes in Adeno-associated virus serotype 2," *J. Struct. Biol.*, **165:**146-156 (2009).

Liu, MA, "Immunologic basis of vaccine vectors," *Immunity,* **33:**504-515 (2010).

Mah, C *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated gene transfer: role of epidermal growth factor receptor protein tyrosine kinase in transgene expression," *J. Virol.*, **72:**9835-9843 (1998).

Mahadevan, M *et al.*, "Generation of robust cytotoxic T lymphocytes against prostate specific antigen by transduction of dendritic cells using protein and recombinant adeno-associated virus," *Cancer Immunol. Immunother.*, **56:**1615-1624 (2007).

Markusic, DM *et al.*, "High-efficiency transduction and correction of murine hemophilia B using AAV2 vectors devoid of multiple surface-exposed tyrosines," *Mol. Ther.*, **18:**2048-2056 (2011).

Mattis, AE *et al.*, "Analyzing cytotoxic T lymphocyte activity: a simple and reliable flow cytometry-based assay," *J. Immunol. Methods,* **204:**135-142 (1997).

Mueller, C and Flotte, TR, "Clinical gene therapy using recombinant adeno-associated virus vectors," *Gene Ther.*, **15:**858-863 (2008).

Nakahara, T *et al.*, "Differential role of MAPK signaling in human dendritic cell maturation and Th1/Th2 engagement," *J. Dermatol. Sci.*, **42:**1-11 (2006).

Nakahara, T *et al.*, "Role of c-Jun N-terminal kinase on lipopolysaccharide induced maturation of human monocyte-derived dendritic cells," *Int. Immunol.*, **16:**1701-1709 (2004).

O'Neill, DW and Bhardwaj, N "Exploiting dendritic cells for active immunotherapy of cancer and chronic infections," *Molec. Biotechnol.*, **36:**131-141 (2007).

Palucka, K *et al.*, "Recent developments in cancer vaccines," *J. Immunol.*, **186:**1325-1331 (2011).

Petrs-Silva, H *et al.*, "High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors," *Mol. Ther.*, **17:**463-471 (2009).

[0276]

Ponnazhagan, S *et al.*, "Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of human monocyte-derived dendritic cells: implications for *ex vivo* immunotherapy," *J. Virol.*, **75**:9493-9501 (2001).

Robert-Guroff, M, "Replicating and non-replicating viral vectors for vaccine development," *Curr. Opin. Biotechnol.*, **18**:546-556 (2007).

Shin, O *et al.*, "Effective transduction by self-complementary adeno-associated viruses of human dendritic cells with no alteration of their natural characteristics," *J. Gene Med.*, **10**:762-769 (2008).

Smith, CL *et al.*, "Immunodominance of poxviral-specific CTL in a human trial of recombinant-modified vaccinia Ankara," *J. Immunol.*, **175**:8431-8437 (2005).

Srivastava, A "Adeno-associated virus-mediated gene transfer," *J. Cell Biochem.*, **105**:17-24 (2008).

Tacken, PJ *et al.*, "Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting," *Nat. Rev. Immunol.*, **7**:790-802 (2007).

Ussher, JE and Taylor, JA, "Optimized transduction of human monocyte-derived dendritic cells by recombinant adeno-associated virus serotype 6," *Hum. Gene Ther.*, **21**:1675-1686 (2010).

Vandenberghe, LH *et al.*, "Tailoring the AAV vector capsid for gene therapy," *Gene Ther.*, **16**:311-319 (2009).

Veron, P *et al.*, "Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2," *J. Virol.*, **81**:5385-5394 (2007).

Wang, W and Malcolm, BA, "Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange site-directed mutagenesis," *BioTechniques,* **26**:680-682 (1999).

Wang, Z *et al.*, "Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors *in vitro* and *in vivo*," *Gene Ther.*, **10**:2105-2111 (2003).

Wu, P *et al.*, "Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 (AAV2) capsid gene and construction of AAV2 vectors with altered tropism," *J. Virol.*, **74**:8635-8647 (2000).

Wu, Z *et al.*, "Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy," *Mol. Ther.*, **14**:316-327 (2006).

[0277]

Wu, Z *et al.*, "Single amino acid changes can influence titer, heparin binding, and tissue tropism in different adeno-associated virus serotypes," *J. Virol.*, **80**:11393-11397 (2006).

Xie, Q *et al.*, "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA,* **99**:10405-10410 (2002).

Yu, Y *et al.*, "rAAV/Her-2/neu loading of dendritic cells for a potent cellular-mediated MHC class I restricted immune response against ovarian cancer." *Viral Immunol.*, **21**:435-442 (2008).

Zhong, L *et al.*, "A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis," *Mol. Ther.*, **15**:1323-1330 (2007).

Zhong, L *et al.*, "Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: Point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses," *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA,* **105**:7827-7832 (2008).

Zhong, L *et al.*, "Tyrosine-phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression," *Virology,* **381**:194-202 (2008).

Zolotukhin, S *et al.*, ""Production and purification of serotype 1, 2, and 5 recombinant adeno-associated viral vectors," *Methods (San Diego, CA),* **28**:158-167 (2002).

[0278]

[0279] 본원에서 설명되는 실시예 및 실시양태는 예시의 목적을 위한 것이고, 그를 고려하여 당업자에게 다양한 변형 또는 변화가 제안될 것이고 본원의 취지와 범위 및 첨부된 청구항의 범위 내에 포함되어야 함을 이해해야 한다.

[0280] 본원에 인용되는 간행물, 특허 출원 및 특허를 비롯한 모든 참고문헌은 각각의 참고문헌이 참조로 포함되는 것으로 개별적으로 및 구체적으로 나타내지고 그 전체가 본원에 기재된 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

[0281] 용어 부정관사 ("a" 및 "an") 및 정관사 ("the") 및 유사한 지시어는 본 발명을 설명하는 문맥에서 사용될 때 본원에서 달리 지시하거나 문맥상 명백하게 모순되지 않으면 단수 및 복수를 모두 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0282] 본원에서 일정 범위의 값의 언급은 본원에서 달리 지시하지 않으면 범위 내에 해당하는 각각의 별개의 값을 개별적으로 언급하는 것을 단지 약칭하는 방법으로서 사용하고자 의도되고, 각각의 별개의 값은 이들이 마치 개별적으로 본원에서 언급되는 것처럼 본원 명세서에 포함된다.

[0283] 본원에서 설명되는 모든 방법은 본원에서 달리 지시하거나 문맥상 명백하게 모순되지 않으면 임의의 적합한 순서로 수행할 수 있다.

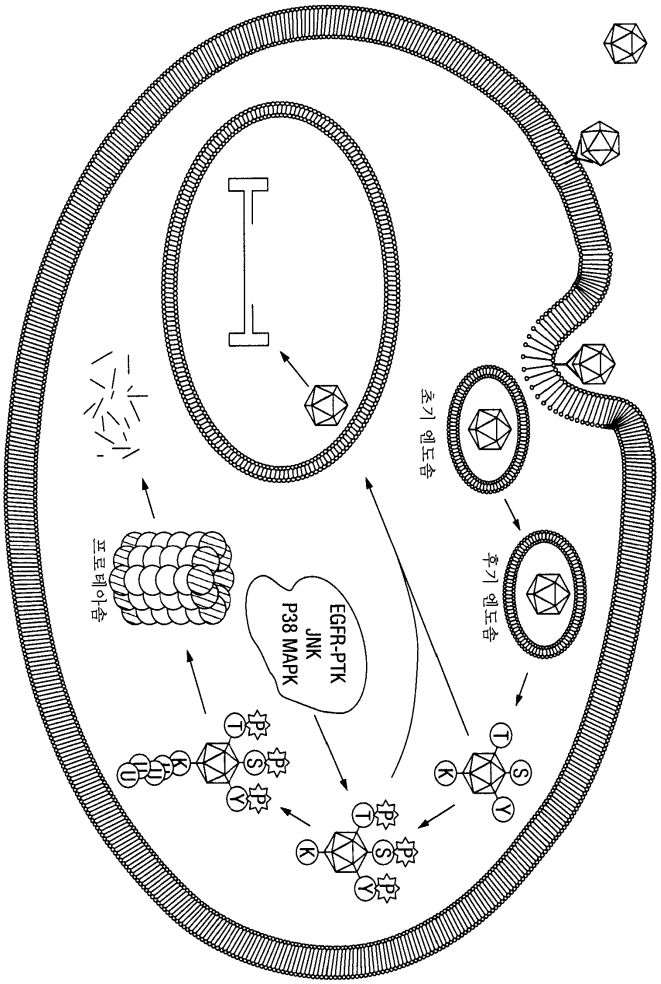
[0284] 본원에서 제시되는 임의의 및 모든 예, 또는 예시적인 언어 (예를 들어, "예컨대")의 사용은 단지 본 발명을 보다 잘 예시하기 위한 것으로서, 달리 나타내지 않으면 본 발명의 범위에 대한 제한을 제시하지 않는다. 명백하게 언급되지 않는 한, 명세서의 어떠한 용어도 임의의 요소가 본 발명의 실시에 필수적임을 나타내는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0285] 요소 또는 요소들과 관련하여 "포함하는", "갖는", "포괄하는" 또는 "함유하는"과 같은 용어를 사용한 본원에서 본 발명의 임의의 측면 또는 실시양태의 설명은 달리 설명하거나 문맥상 명백하게 모순되지 않으면, 특정 요소 또는 요소들로 "이루어지는", 이로 "본질적으로 이루어지는", 또는 이를 "실질적으로 포함하는" 본 발명의 유사한 측면 또는 실시양태에 대한 지지를 제공하고자 의도된다 (예를 들어, 특정 요소를 포함하는 것으로서 본원에서 설명되는 조성물은 달리 설명하거나 문맥상 명백하게 모순되지 않으면 그 요소로 이루어지는 조성물을 또한 설명하는 것으로 이해하여야 한다).

[0286] 본원에 개시되고 특허청구된 모든 조성물 및 방법은 본 명세서에 비추어 과도한 실험을 수행하지 않으면서 제조 및 실시될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법은 바람직한 실시양태의 측면에서 설명되었지만, 본 발명의 개념, 취지 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 본원에서 설명되는 조성물 및 방법에 대한, 및 방법의 단계에 또는 단계의 순서에 대한 변경이 적용될 수 있음은 당업자에게 명백할 것이다. 보다 구체적으로, 화학적으로 및 생리학적으로 관련되는 특정 작용제가 동일하거나 유사한 결과를 달성하면서 본원에서 설명되는 작용제를 치환할 수 있음이 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 모든 상기 유사한 치환 및 변형은 첨부되는 청구의 범위에 의해 규정되는 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 해당하는 것으로 간주된다.

도면

도면1



도면2aa

```
캡시드                1                                                서열                                                100
AAV1 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV2 (1)  MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF
AAV3 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV4 (1)  -MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV5 (1)  MSFVDHPPDWLEEVG-EGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEF
AAV6 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV7 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV8 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF
AAV9 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV10 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
                101                                                                                                 200
AAV1 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV2 (101)  QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVE-PDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLG
AAV3 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQE-PDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLG
AAV4 (100)  QQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQ-PDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAGDGP---PEGSTSGAMSDDS
AAV5 (100)  QEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKR---------KKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGS-QQLQIPAQPASSLG
AAV6 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV7 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSSVG
AAV8 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSGVG
AAV9 (101)  QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVG
AAV10 (101) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG
                201                                                                                                 300
AAV1 (200)  PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV2 (200)  TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV3 (200)  SNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV4 (196)  EMRAAAGGAAVEGG--QGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPTYNNHLYKRLGESLQ----SNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV5 (190)  ADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGS-VDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQ
AAV6 (200)  PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV7 (201)  SGTVAAGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAG-STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV8 (201)  FNTMAAGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV9 (200)  SLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV10 (201) SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
```

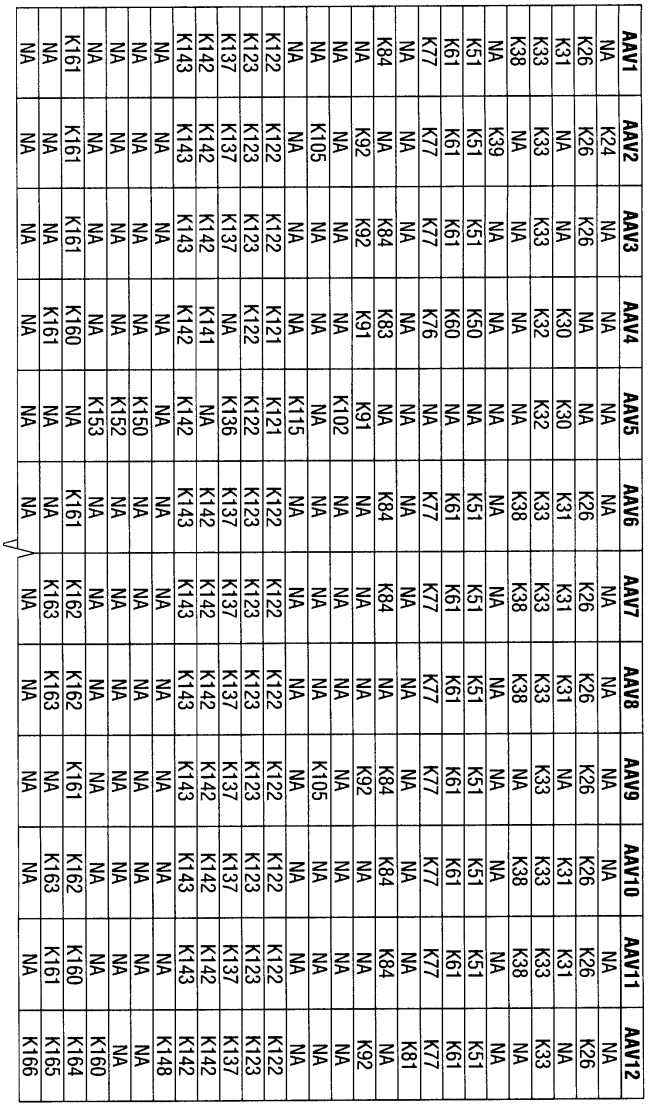
도면2ab

```
                                                
```

도면2ac

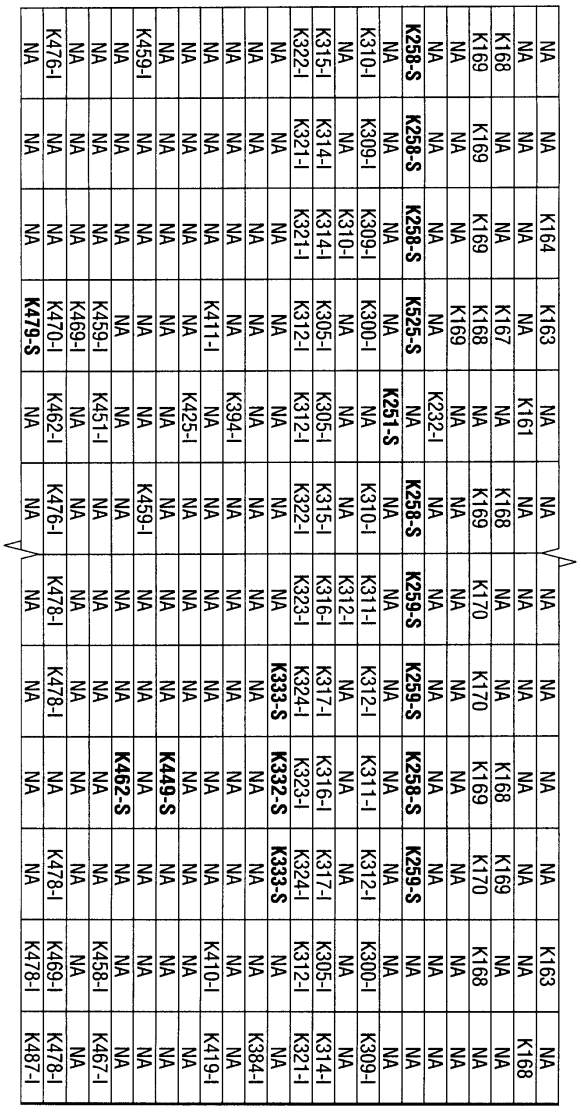
```
                                                
```

도면2ba

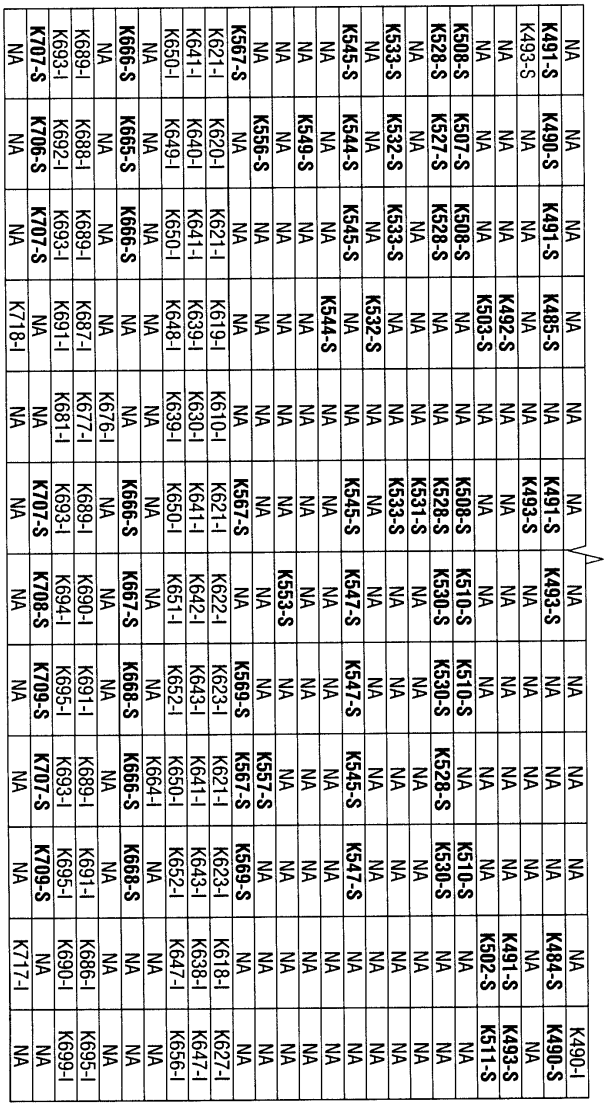


AAV1	AAV2	AAV3	AAV4	AAV5	AAV6	AAV7	AAV8	AAV9	AAV10	AAV11	AAV12
NA	K24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K26	K26	K26	NA	NA	K26	K26	K26	K26	K26	K26	K26
K31	NA	NA	K30	K30	K31	K31	K31	NA	K31	K31	NA
K33	K33	K33	K32	K32	K33	K33	K33	K33	K33	K33	K33
K38	NA	NA	NA	NA	K38	K38	K38	NA	K38	K38	NA
NA	K39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K51	K51	K51	K50	NA	K51	K51	K51	K51	K51	K51	K51
K61	K61	K61	K60	NA	K61	K61	K61	K61	K61	K61	K61
K77	K77	K77	K76	NA	K77	K77	K77	K77	K77	K77	K77
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K81
K84	NA	K84	K83	NA	K84	K84	NA	K84	K84	K84	NA
NA	K92	K92	K91	K91	NA	NA	NA	K92	NA	NA	K92
NA	NA	NA	NA	K102	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	K105	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K105	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K115	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
K122	K122	K122	K121	K121	K122	K122	K122	K122	K122	K122	K122
K123	K123	K123	K122	K122	K123	K123	K123	K123	K123	K123	K123
K137	K137	K137	NA	K136	K137	K137	K137	K137	K137	K137	K137
K142	K142	K142	K141	NA	K142	K142	K142	K142	K142	K142	K142
K143	K143	K143	K142	K142	K143	K143	K143	K143	K143	K143	K142
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K148
NA	NA	NA	NA	K150	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	NA	K152	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
NA	NA	NA	K153	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K160
K161	K161	K161	K160	NA	K161	K162	K162	K161	K162	K160	K164
NA	NA	NA	K161	NA	NA	K163	K163	NA	K163	K161	K165
NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	K166

도면2bb


NA NA K164 K163 NA NA NA NA NA NA NA NA K163 NA
NA NA NA NA K161 NA NA NA NA NA NA K163 NA
K168 NA NA K167 NA K168 NA NA K168 K169 NA K168 K168
K169 K169 K169 K168 NA K169 K170 K170 K169 K170 K168 NA
NA NA NA K169 NA NA NA NA NA NA NA NA
NA NA NA K232-I NA NA NA NA NA NA NA NA
K258-S K258-S K258-S K525-S NA K258-S K259-S K259-S K258-S K259-S NA NA
NA NA NA NA K251-S NA NA NA NA NA NA NA
K310-I K309-I K309-I K300-I NA K310-I K311-I K312-I K311-I K312-I K300-I K309-I
NA NA K310-I NA NA NA K312-I NA NA NA NA NA
K315-I K314-I K314-I K305-I K305-I K315-I K316-I K317-I K316-I K317-I K305-I K314-I
K322-I K321-I K321-I K312-I K312-I K322-I K323-I K324-I K323-I K324-I K312-I K321-I
NA NA NA NA NA NA NA K333-S K332-S K333-S NA NA
NA NA NA NA K394-I NA NA NA NA NA NA K384-I
NA NA NA K411-I NA NA NA NA NA NA K410-I K419-I
NA NA NA NA K425-I NA NA NA K449-S NA NA NA
NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA NA
K459-I NA NA NA NA K459-I NA NA NA NA NA NA
NA NA NA NA NA NA NA NA K462-S NA NA NA
NA NA NA K459-I K451-I NA NA NA NA NA K458-I K467-I
NA NA NA K469-I NA NA NA NA NA NA NA NA
K476-I NA NA K470-I K462-I K476-I K478-I K478-I NA K478-I K469-I K478-I
NA NA NA K479-S NA NA NA NA NA NA K478-I K487-I

도면2bc


NA NA NA

도면2ca

```
캡시드                1                                                 서열                                                  100
AAV1  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV2  (1)  MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF
AAV3  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV4  (1)  -MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV5  (1)  MSFVDHPPDWLEEVG-EGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEF
AAV6  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV7  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV8  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF
AAV9  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV10 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
                   101                                                                                                   200
AAV1  (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV3  (101)  QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVE-PDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLG
AAV4  (100)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQE-PDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLG
AAV5  (100)  QQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQ-PDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAGDGP---PEGSTSGAMSDDS
AAV6  (101)  QERLADDTSFGGNLGKAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKR---------KKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGS-QQLQIPAQPASSLG
AAV7  (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV8  (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPAKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSSVG
AAV9  (101)  QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGTESVPDPQPIGEPPAAPSGVG
AAV10 (101)  QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAAPSGVG
                   201                                                                                                   300
AAV1  (200)  PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV2  (200)  TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV3  (200)  SNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV4  (196)  EMRAAAGGAAVEGG--QGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPTYNNHLYKRLGESLQ-----SNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV5  (190)  ADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGS-VDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQ
AAV6  (200)  PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV7  (201)  SGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAG-STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV8  (201)  PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV9  (200)  SLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV10 (201)  SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
```

도면2cb

```
                                                
```

도면2cc

```
                                                
```

도면2da

```
캡시드                1                                                서열                                                100
AAV1  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV2  (1)  MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEF
AAV3  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGVPQPKANQQHQDNRRGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV4  (1)  -MTDGYLPDWLEDNLSEGVREWWALQPGAPKPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV5  (1)  MSFVDHPPDWLEEVG-EGLREFLGLEAGPPKPKPNQQHQDQARGLVLPGYNYLGPGNGLDRGEPVNRADEVAREHDISYNEQLEAGDNPYLKYNHADAEF
AAV6  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV7  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGIVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
AAV8  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADAEF
AAV9  (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGIVLPGYKYLGPGNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEF
AAV10 (1)  MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADAEF
                101                                                                                                 200
AAV1 (101) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEP-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV3 (101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVE-PDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLG
AAV4 (100) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRILEPLGLVEEAAKTAPGKKGAVDQSPQE-PDSSSGVGKSGKQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPTSLG
AAV5 (100) QQRLQGDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEQAGETAPGKKRPLIESPQQ-PDSSTGIGKKGKQPAKKKLVFEDETGAGDGP---PEGSTSGAMSDDS
AAV6 (101) QEKLADDTSFGGNLGKAVFQAKRVLEPFGLVEEGAKTAPTGKRIDDHFPKR--------KKARTEEDSKPSTSSDAEAGPSGS-QQLQIPAQPASSLG
AAV7 (101) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPFGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPATPAAVG
AAV8 (101) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVPDPQPLGEPPAAPSSVG
AAV9 (101) QERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRLLEPLGLVEERAAKTAPGKKRPVEQSPQE-PDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTESVPDPQPIGEPPAAPSGVG
AAV10 (101) QERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG
                201                                  *                  ◊  ◊     ◊                  ◊                 300
AAV1 (200) PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSASTGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV2 (200) TNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV3 (200) SNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQS--GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV4 (196) EMRAAAGGAAVEGG--QGADGVGNASGDWHCDSTWSEGHVTTTSTRTWVLPTYNNHLYKRLGESLQ-----SNTYNGFSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV5 (190) ADTMSAGGGGPLGDNNQGADGVGNASGDWHCDSTWMGDRVVTKSTRTWVLPSYNNHQYREIKSGS-VDGSNANAYFGYSTPWGYFDFNRFHSHWSPRDWQ
AAV6 (200) PTTMASGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSAST-GASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV7 (201) SGTVAAGGGAPMADNNEGADGVGNASGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSETAG-STNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV8 (201) PNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV9 (200) SLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
AAV10 (201) SGTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQ
```

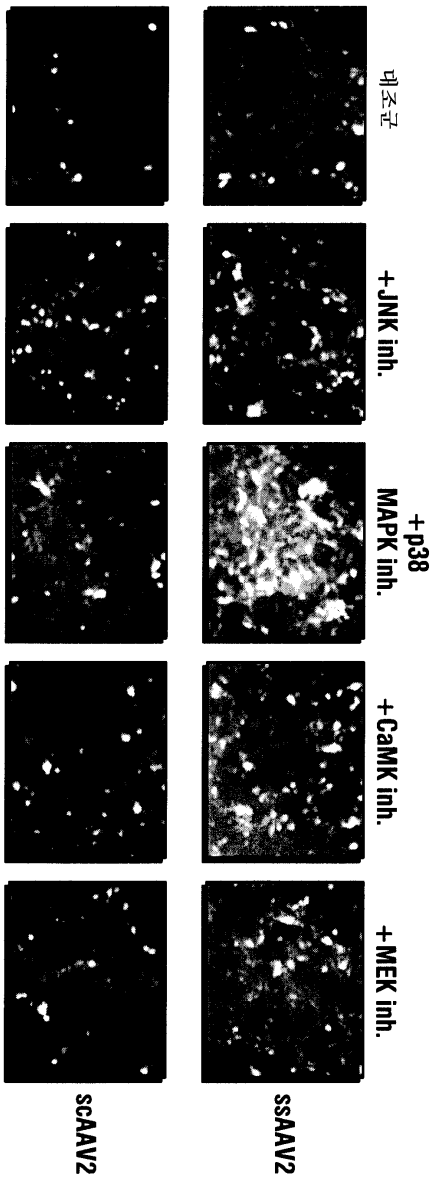
도면2db

```
                    301                                                
```

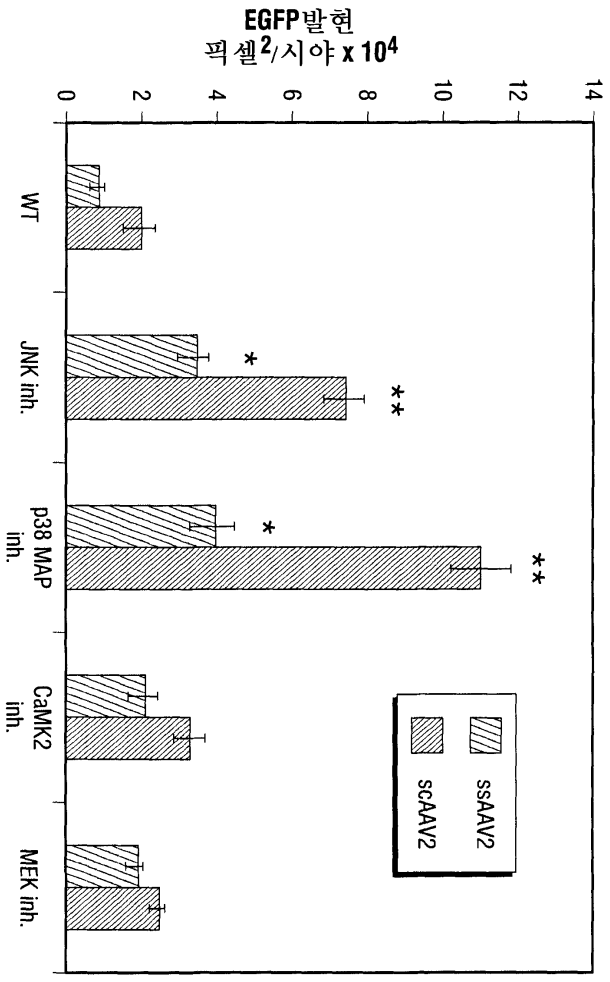
도면2dc

```
                601       *         ◇                                                                                ◇*  ◇     ◇  *          700
AAV1 (587) SSTDPATGDVHAMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKNPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV2 (586) GNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV3 (587) SNTAPTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQIMIKNTPVPANPPTTFSPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV4 (585) NSNLPTVDRLTALGAVPGMVWQNRDIYYQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLIGGFGLKHPPPQIFIKNTPVPANPATTFSSTPVNSFITQYSTGQVSVQIDWE
AAV5 (576) STTAPATGTYNLQEIVPGSVWMERDVYLQGPIWAKIPETGAHFHPSPAMGGFGLKHPPPMMLIKNTPVPGN-ITSFSDVPVSSFITQYSTGQTVEMEWE
AAV6 (587) SSTDPATGDVHVMGALPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPAEFSATKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV7 (588) ANTAAQTQVVNNQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPPEVFTPAKFASFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV8 (589) QNTAPQIGTVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV9 (587) AQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWE
AAV10 (589) QNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWE
                701       *         ◇       * *       ◇                                                          751
AAV1 (687) LQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL-서열 1
AAV2 (686) LQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 2
AAV3 (687) LQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 3
AAV4 (685) IQKERSKRWNPEVQFTSNYGQQNSLLWAPDAAGKYTEPRAIGTRYLTHHL-서열 4
AAV5 (675) LKKENSKRWNPEIQYTNNYNDPQFVDFAPDSTGEYRTTRPIGTRYLTRPL-서열 5
AAV6 (687) LQKENSKRWNPEVQYTSNYAKSANVDFTVDNNGLYTEPRPIGTRYLTRPL-서열 6
AAV7 (688) LQKENSKRWNPEIQYTSNFEKQTGVDFAVDSQGVYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 7
AAV8 (689) LQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 8
AAV9 (687) LQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 9
AAV10 (689) LQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYSEPRPIGTRYLTRNL-서열 10
```

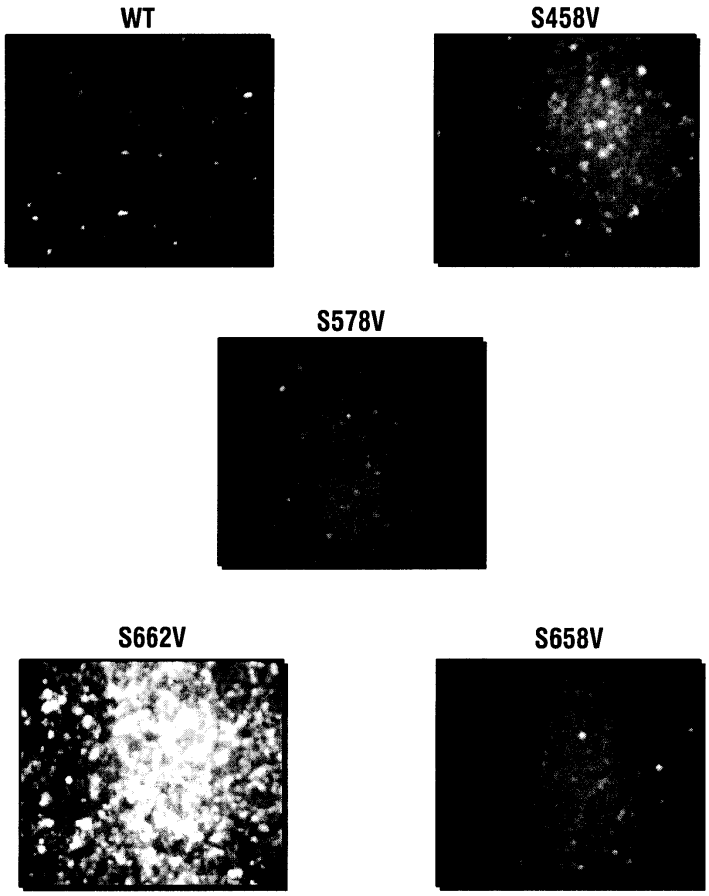
도면3a



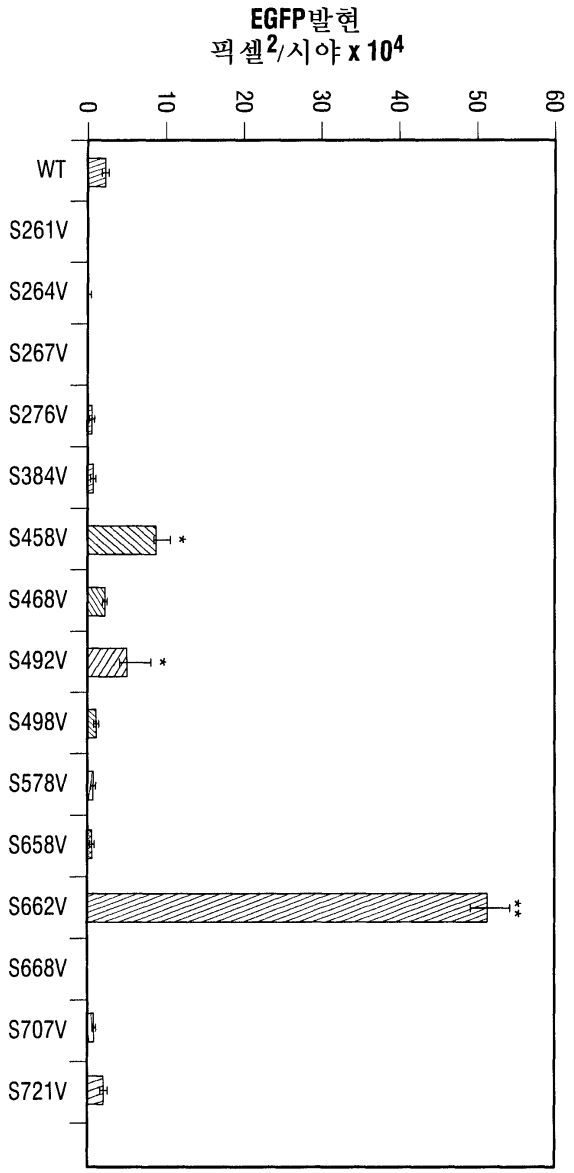
도면3b


EGFP발현
픽셀²/시야 x 10⁴
0
2
4
6
8
10
12
14
WT
JNK inh.
p38 MAP inh.
CaMK2 inh.
MEK inh.
*
**
*
**
ssAAV2
scAAV2

도면4a



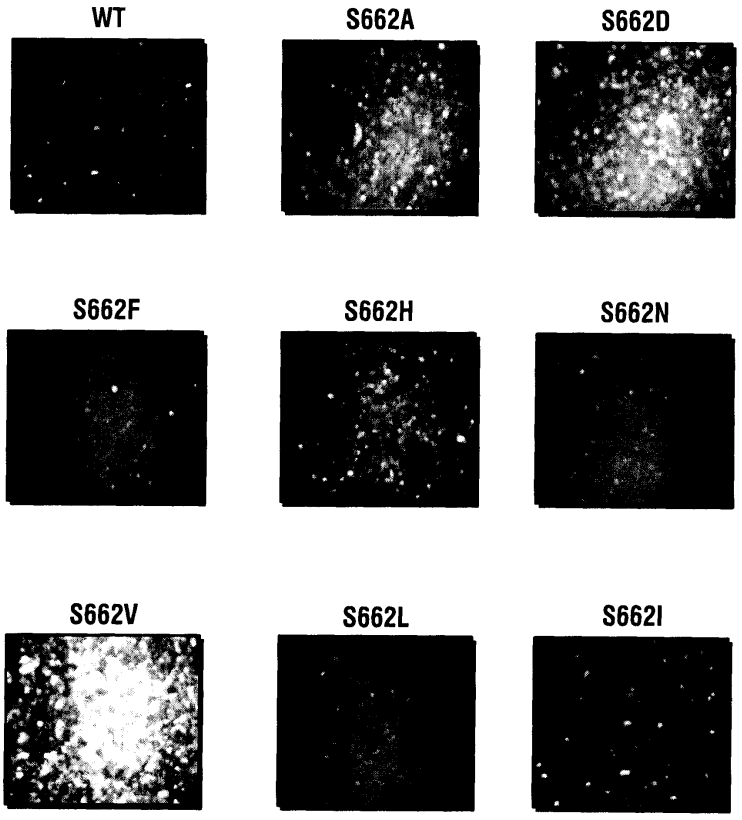
도면4b


EGFP발현
픽셀2/시야 x 10^4
0
10
20
30
40
50
60
WT
S261V
S264V
S267V
S276V
S384V
S458V
S468V
S492V
S498V
S578V
S658V
S662V
S668V
S707V
S721V
*
*
**

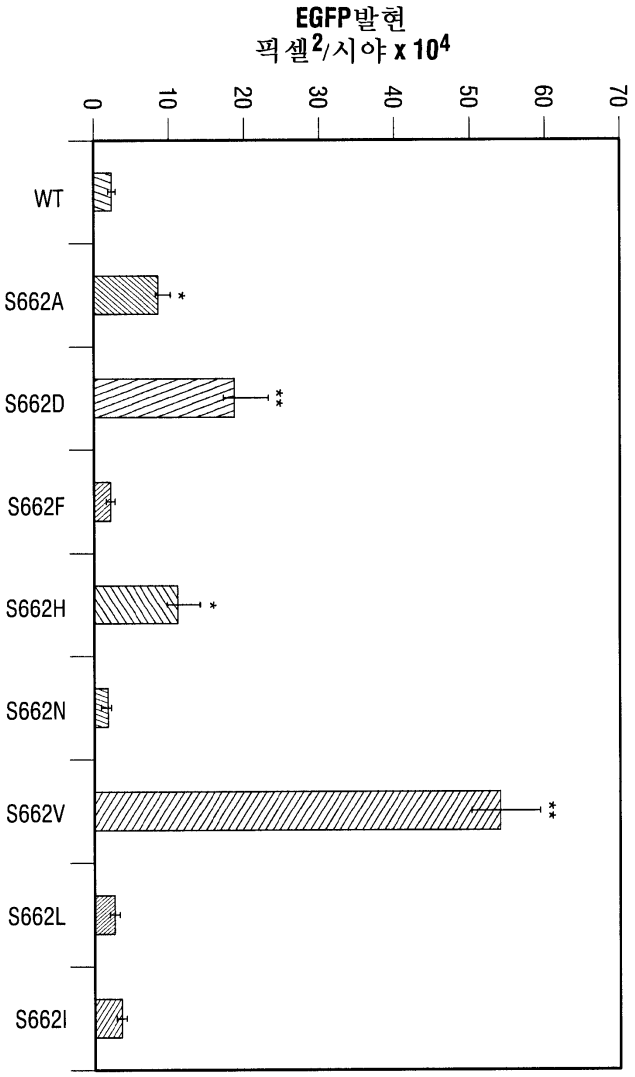
도면5

돌연변이체	패키징 효율	형질도입 효율
AAV2-S261V	~10배 더 낮음	-*
AAV2-S264V	변화 없음	-*
AAV2-S267V	DNAse I-저항성 입자 없음	-*
AAV2-S276V	~10배 더 낮음	-*
AAV2-S384V	~3배 더 높음	~10배 더 낮음
AAV2-S458V	변화 없음	~4배 더 높음
AAV2-S468V	~5배 더 높음	변화 없음
AAV2-S492V	변화 없음	~2배 더 높음
AAV2-S498V	변화 없음	~10배 더 낮음
AAV2-S578V	변화 없음	~10배 더 낮음
AAV2-S658V	~10배 더 낮음	-*
AAV2-S662V	변화 없음	~25배 더 높음
AAV2-S668V	DNAse I-저항성 입자 없음	-*
AAV2-S707V	변화 없음	~10배 더 낮음
AAV2-S721V	변화 없음	변화 없음

도면6a



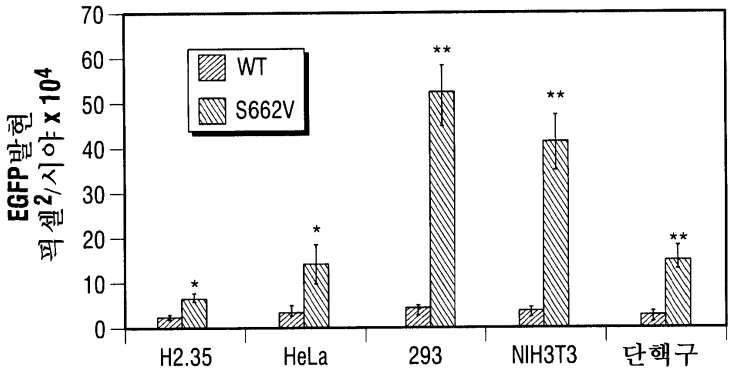
도면6b



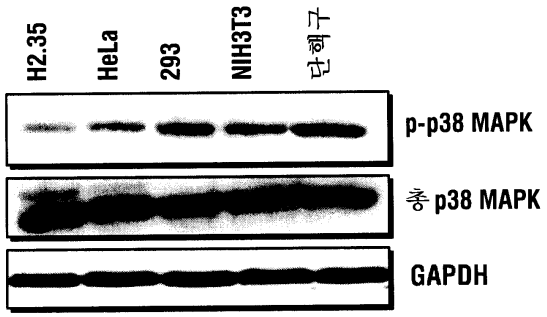
도면7

돌연변이체	패키징 효율	형질도입 효율
AAV2-S662V	변화 없음	~25배 더 높음
AAV2-S662A	~5배 더 높음	~3배 더 높음
AAV2-S662D	변화 없음	~8배 더 높음
AAV2-S662F	~10배 더 낮음	~변화 없음
AAV2-S662H	변화 없음	~4배 더 높음
AAV2-S662N	~10배 더 낮음	~변화 없음
AAV2-S662L	~10배 더 낮음	~변화 없음
AAV2-S662I	~10배 더 낮음	~변화 없음

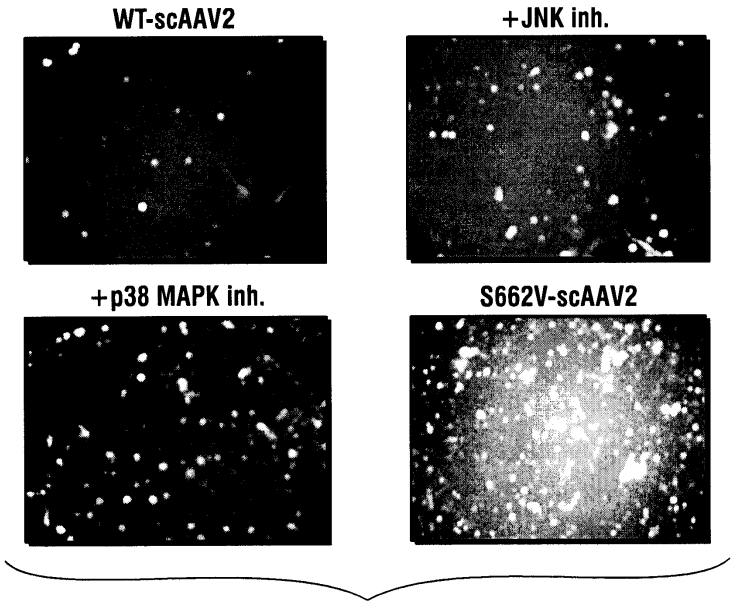
도면8a



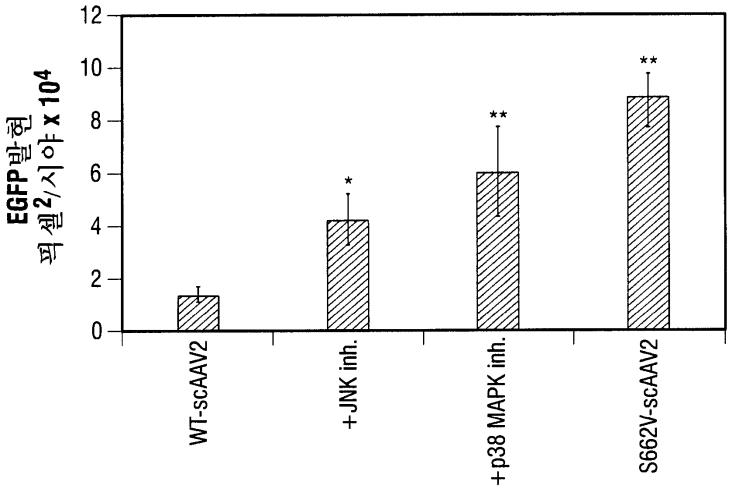
도면8b



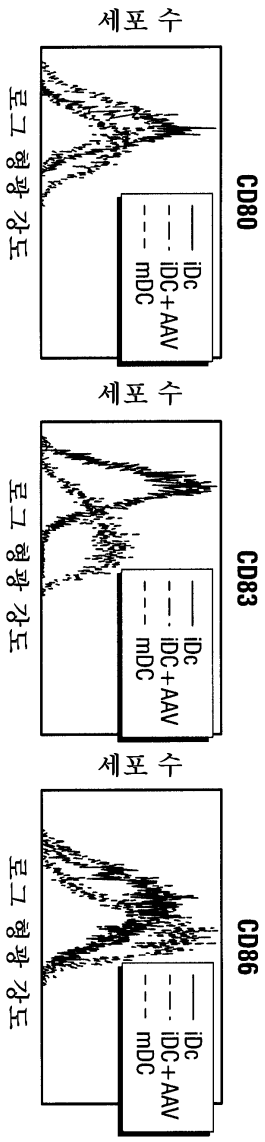
도면9a



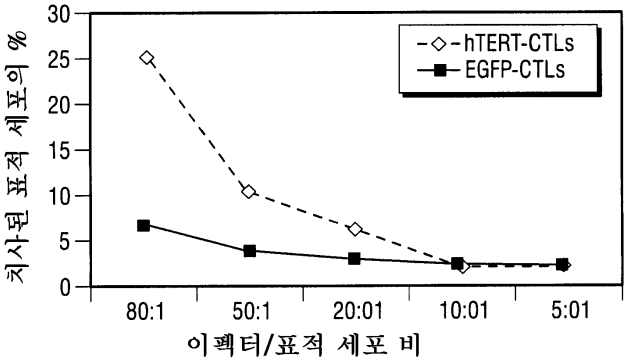
도면9b


EGFP발현
픽셀2/시야 x 10^4
12
10
8
6
4
2
0
*
**
**
WT-scAAV2
+JNK inh.
+p38 MAPK inh.
S662V-scAAV2

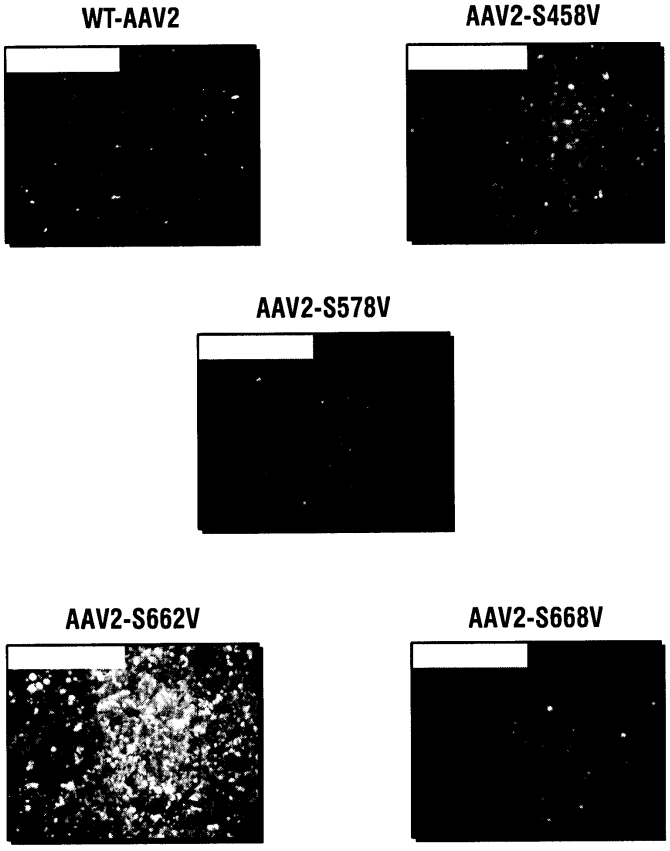
도면9c


세포 수
로그 형광 강도
CD80
iDc
iDC+AAV
mDC
세포 수
로그 형광 강도
CD83
iDc
iDC+AAV
mDC
세포 수
로그 형광 강도
CD86
iDc
iDC+AAV
mDC

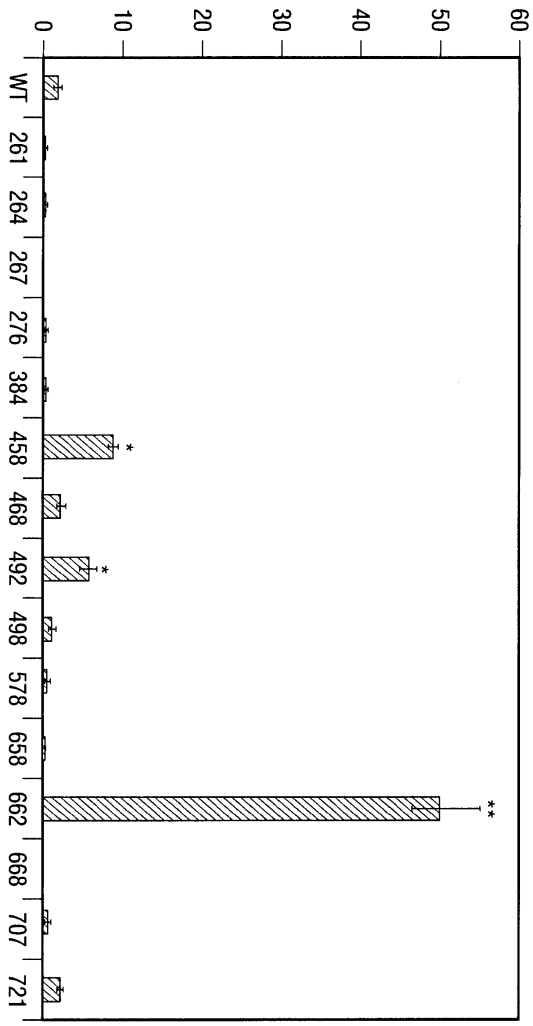
도면10


30
25
20
15
10
5
0
치사된 표적 세포의 %
hTERT-CTLs
EGFP-CTLs
80:1
50:1
20:01
10:01
5:01
이펙터/표적 세포 비

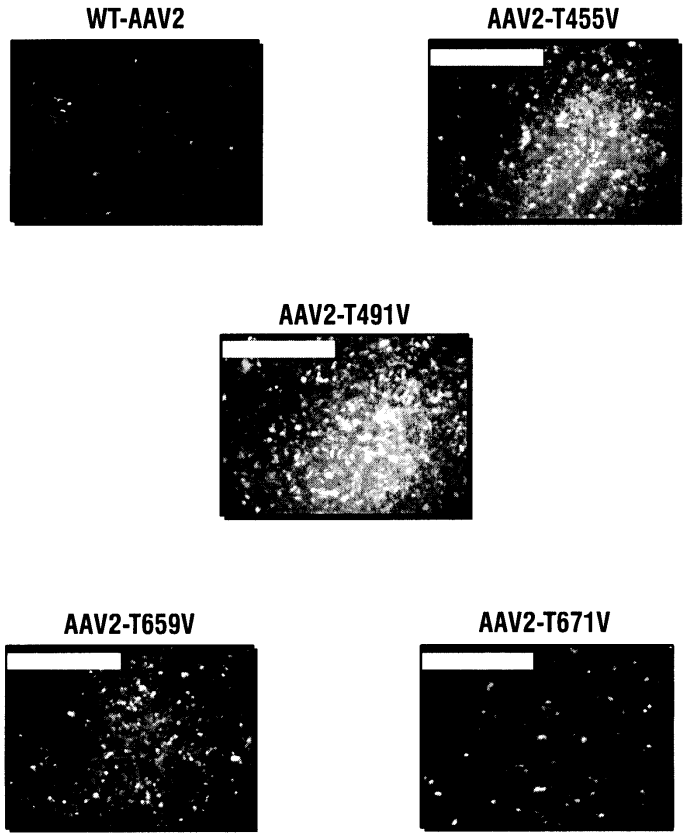
도면11a


WT-AAV2
AAV2-S458V
AAV2-S578V
AAV2-S662V
AAV2-S668V

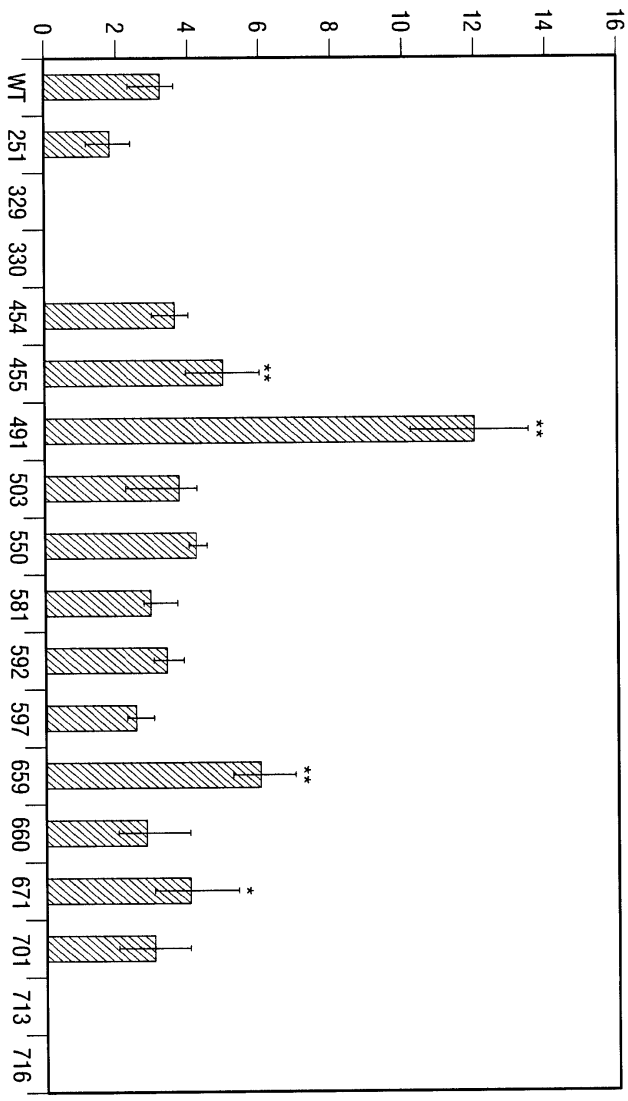
도면11b


0
10
20
30
40
50
60
WT
261
264
267
276
384
458
468
492
498
578
658
662
668
707
721
*
*
**

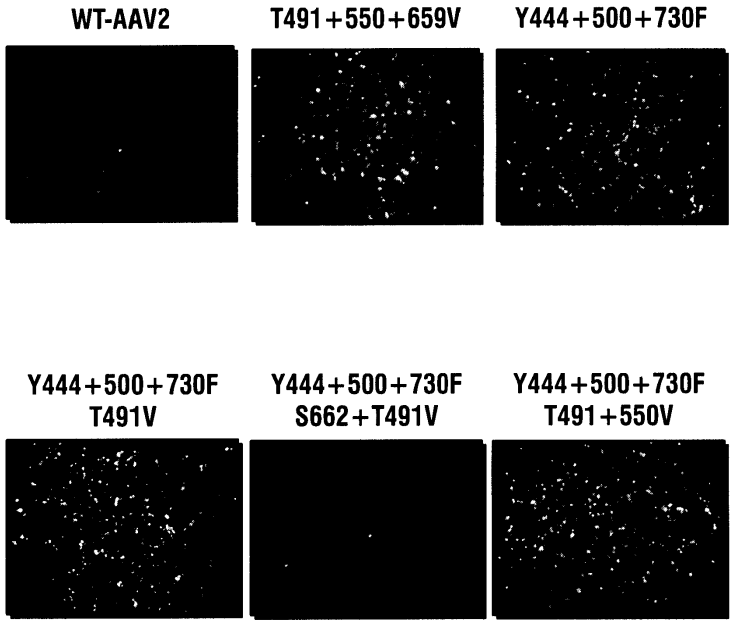
도면12a



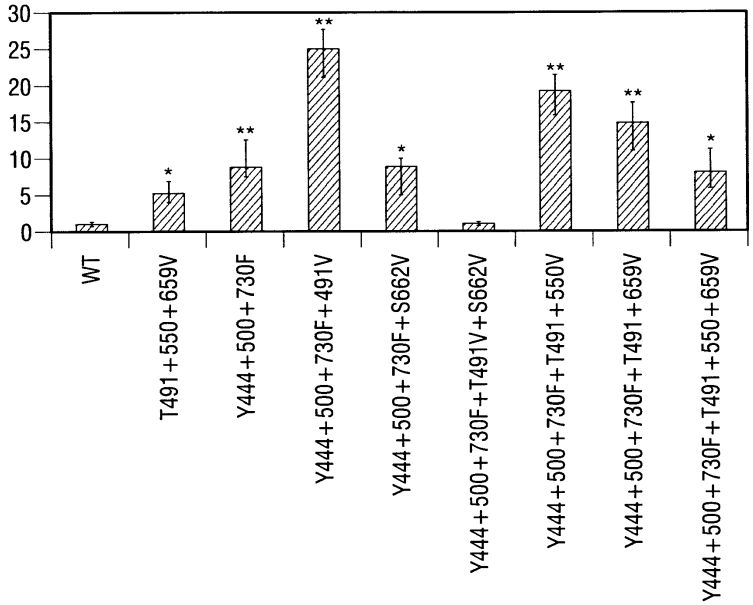
도면12b


0
2
4
6
8
10
12
14
16
WT
251
329
330
454
455
491
503
550
581
592
597
659
660
671
701
713
716
**
**
**
*

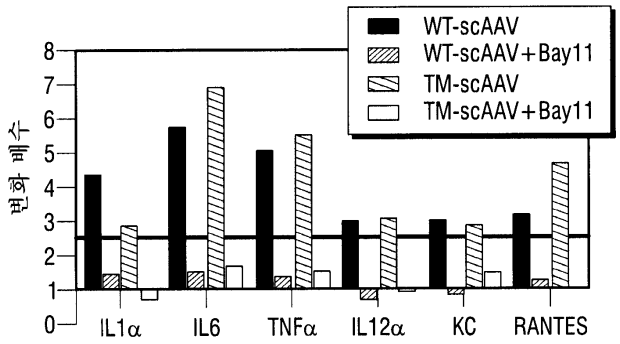
도면13a


WT-AAV2
T491+550+659V
Y444+500+730F
Y444+500+730F
T491V
Y444+500+730F
S662+T491V
Y444+500+730F
T491+550V

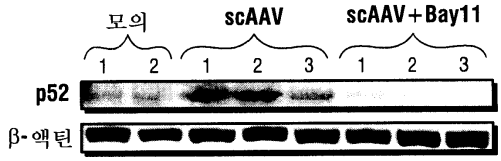
도면13b


30
25
20
15
10
5
0
WT
T491+550+659V
Y444+500+730F
Y444+500+730F+491V
Y444+500+730F+S662V
Y444+500+730F+T491V+S662V
Y444+500+730F+T491+550V
Y444+500+730F+T491+659V
Y444+500+730F+T491+550+659V

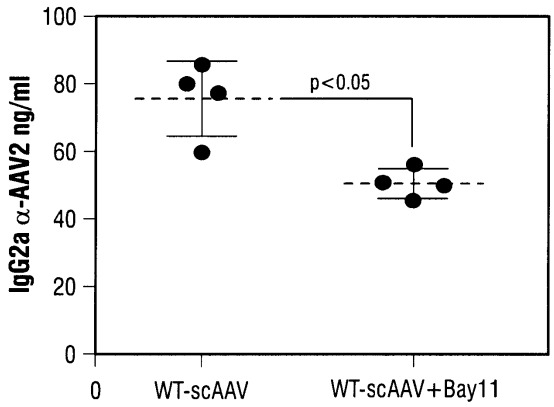
도면14a



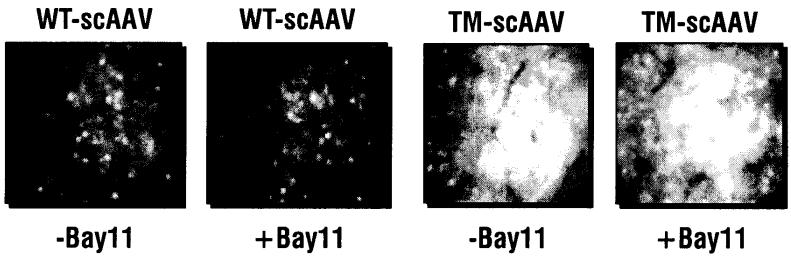
도면14b



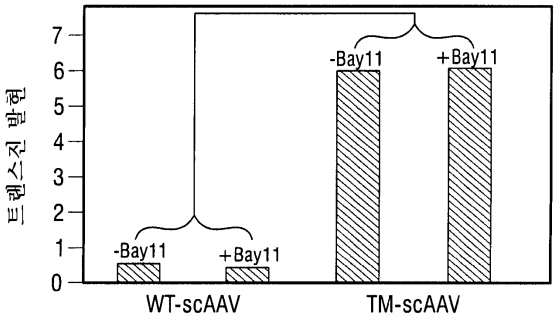
도면14c



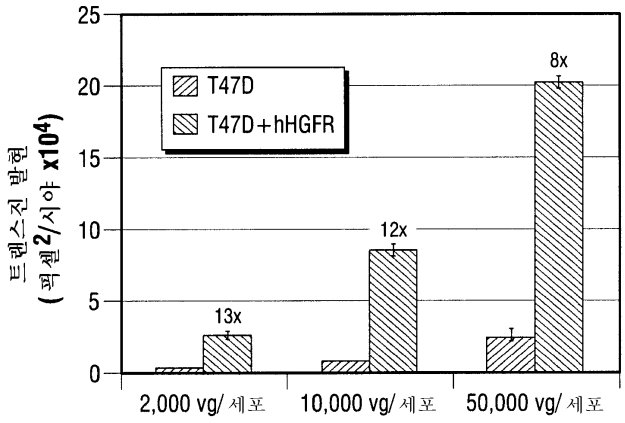
도면14d



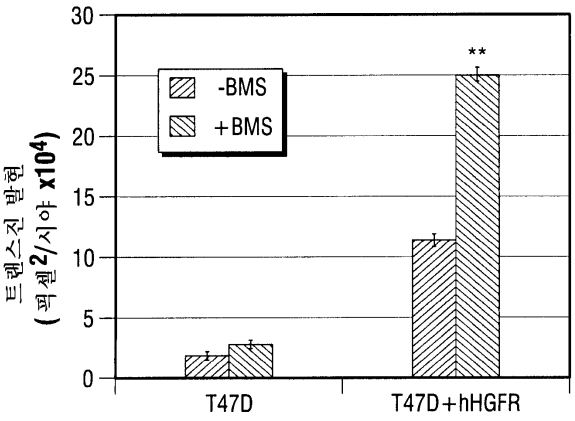
도면14e



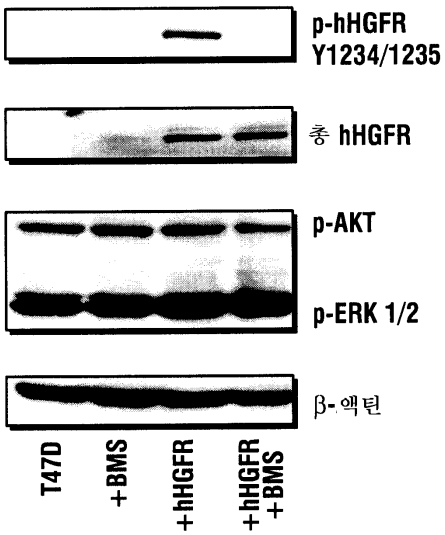
도면15a



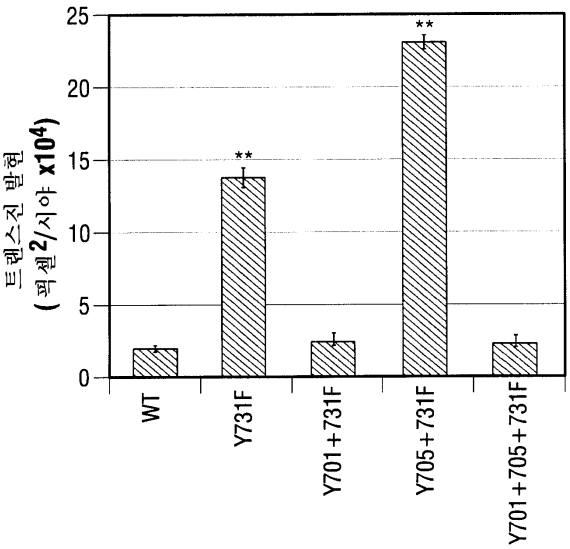
도면15b



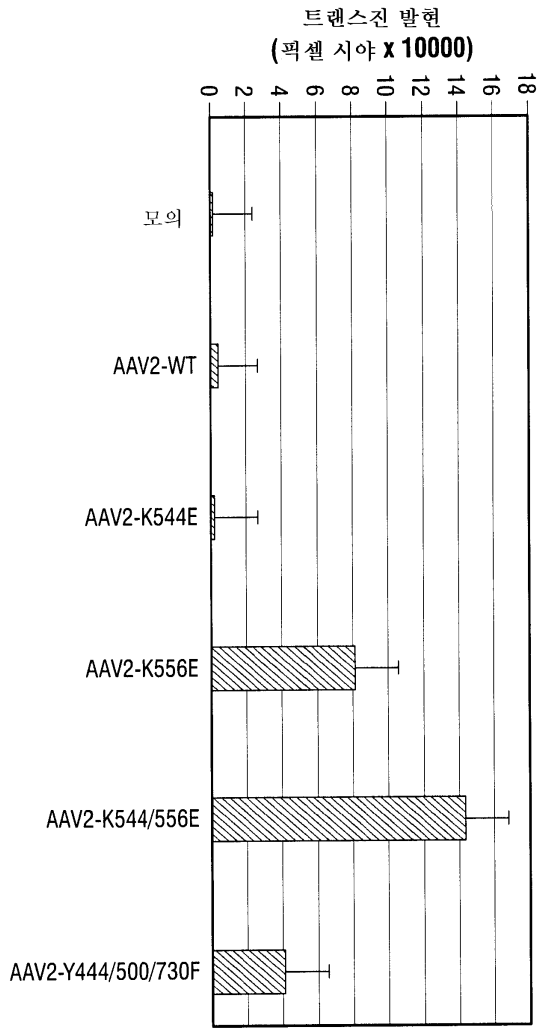
도면15c


p-hHGFR
Y1234/1235
총 hHGFR
p-AKT
p-ERK 1/2
β-액틴
T47D
+BMS
+hHGFR
+hHGFR
+BMS

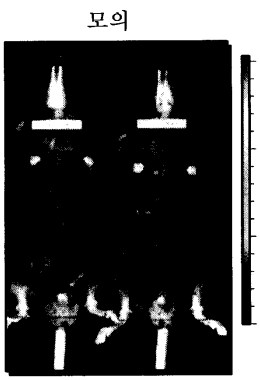
도면15d


트랜스진 발현
(픽셀2/시야 x10⁴)
25
20
15
10
5
0
**
**
WT
Y731F
Y701+731F
Y705+731F
Y701+705+731F

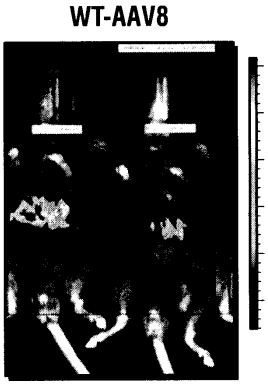
도면16


트랜스진 발현
(픽셀 시야 x 10000)
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
모의
AAV2-WT
AAV2-K544E
AAV2-K556E
AAV2-K544/556E
AAV2-Y444/500/730F

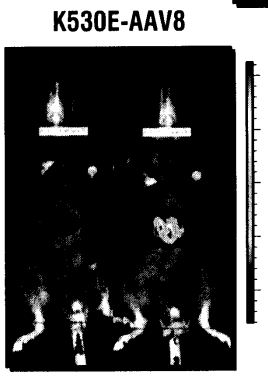
도면17



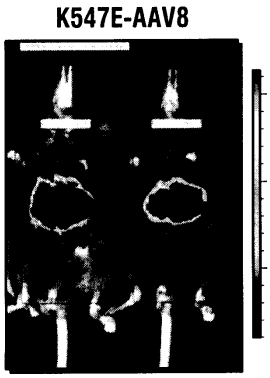
도 17a



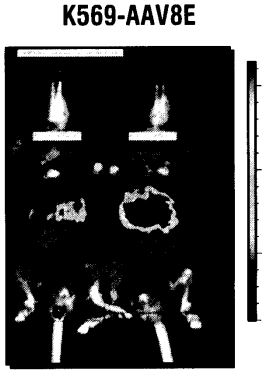
도 17b



도 17c

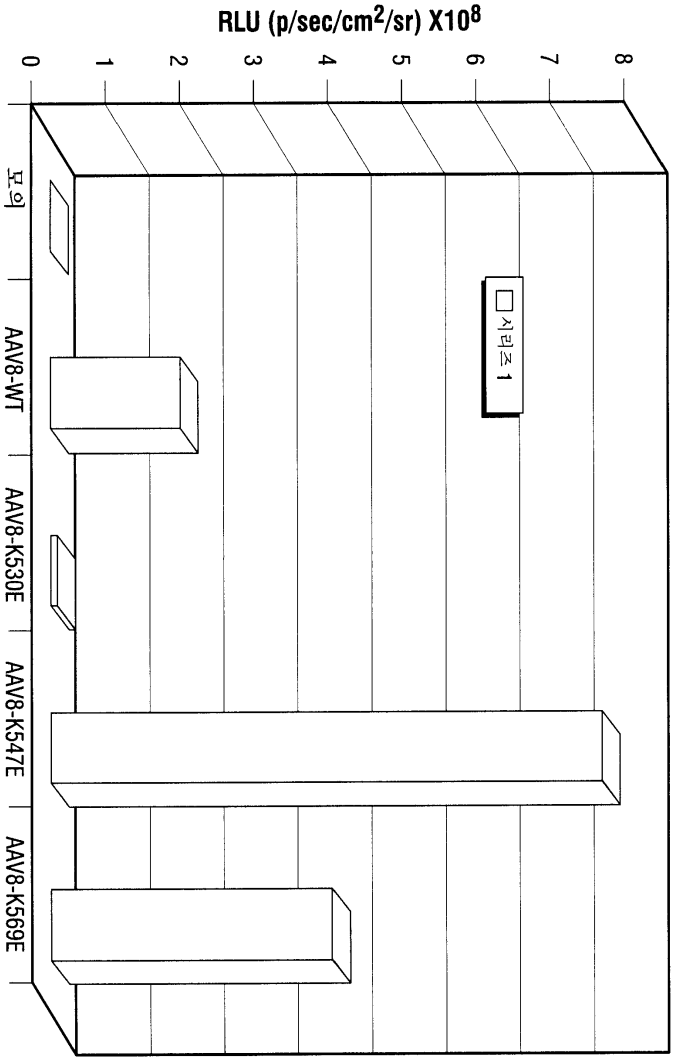


도 17d

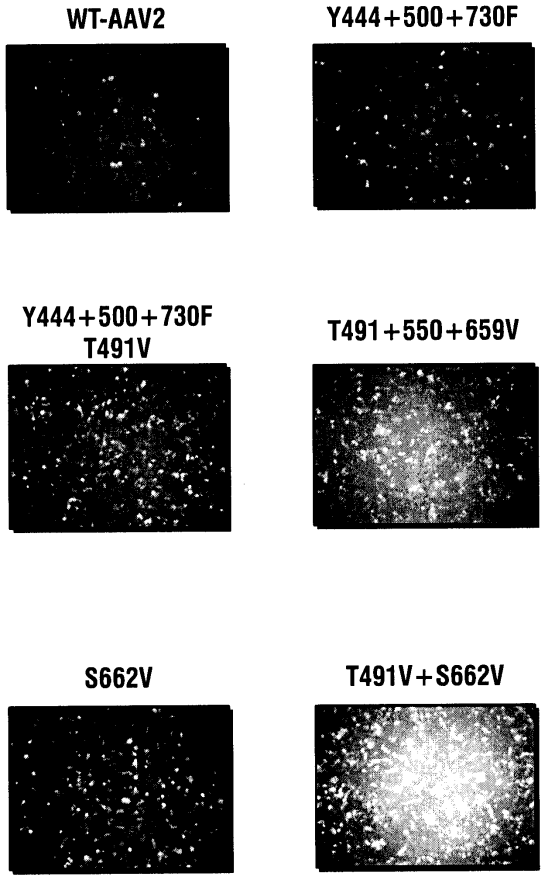


도 17e

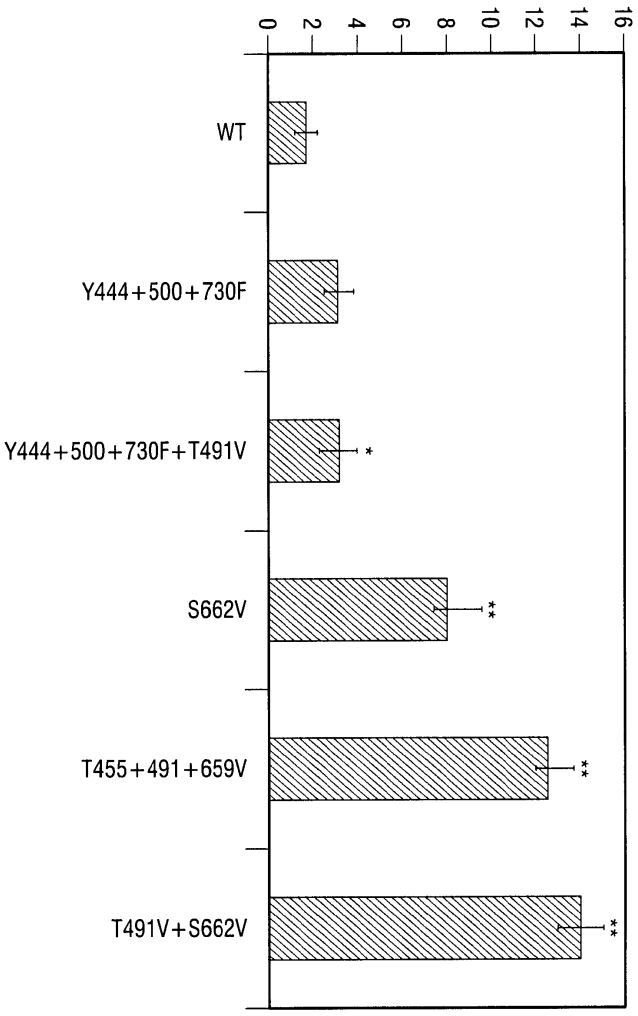
도면18


RLU (p/sec/cm2/sr) X108
0
1
2
3
4
5
6
7
8
모의
AAV8-WT
AAV8-K530E
AAV8-K547E
AAV8-K569E
시리즈1

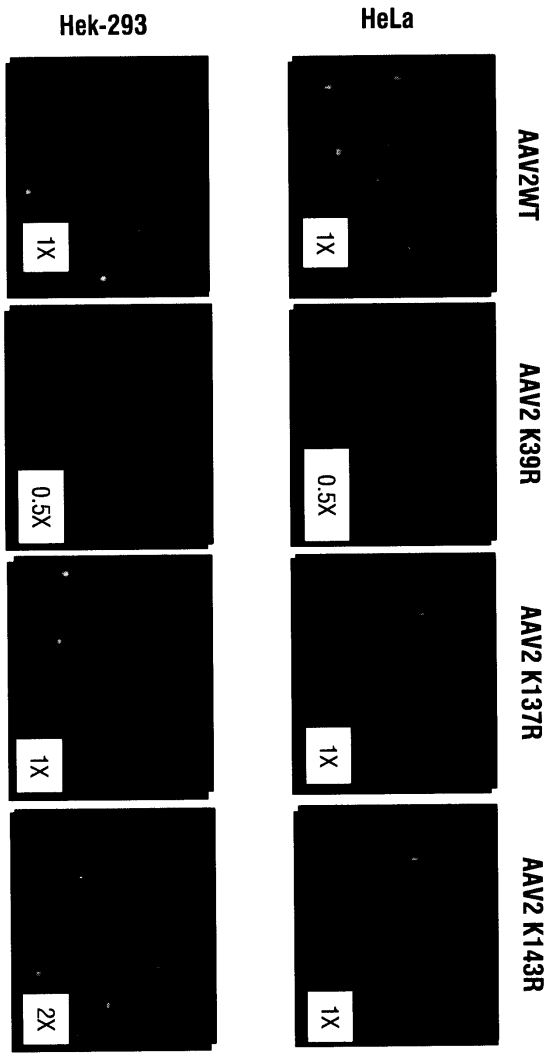
도면19a


WT-AAV2
Y444+500+730F
Y444+500+730F
T491V
T491+550+659V
S662V
T491V+S662V

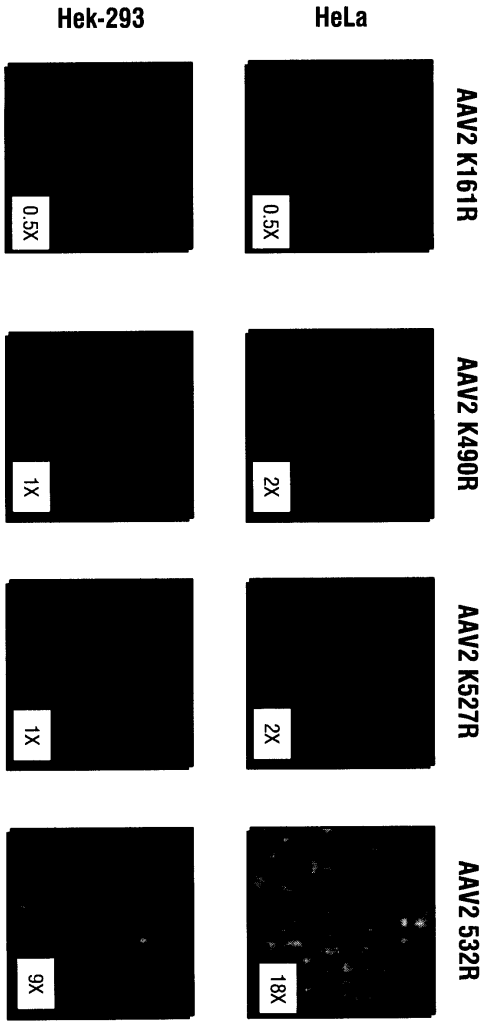
도면19b


0
2
4
6
8
10
12
14
16
WT
Y444+500+730F
Y444+500+730F+T491V
*
S662V
**
T455+491+659V
**
T491V+S662V
**

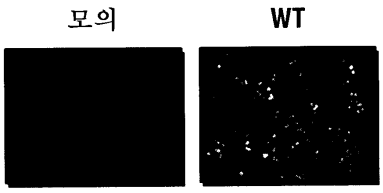
도면20a


Hek-293
HeLa
AAV2WT
AAV2 K39R
AAV2 K137R
AAV2 K143R
1X
0.5X
1X
2X
1X
0.5X
1X
1X

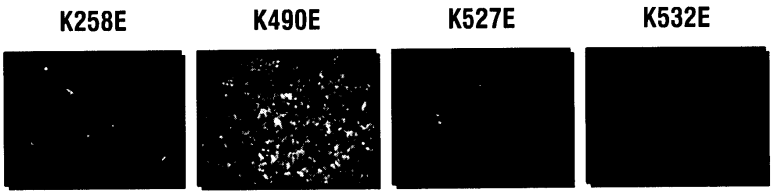
도면20b


Hek-293
HeLa
AAV2 K161R
AAV2 K490R
AAV2 K527R
AAV2 532R
0.5X
0.5X
1X
2X
1X
2X
9X
18X

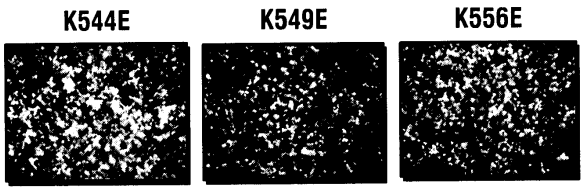
도면21



도 21a 도 21b

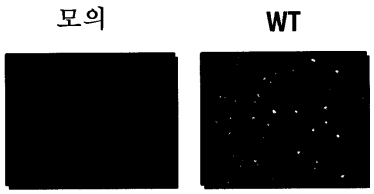


도 21c 도 21d 도 21e 도 21f



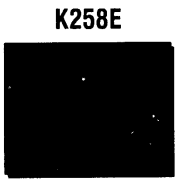
도 21g 도 21h 도 21i

도면22

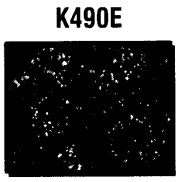


도 22a

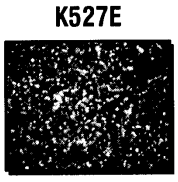
도 22b



도 22c



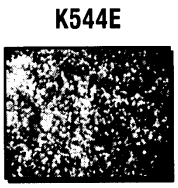
도 22d



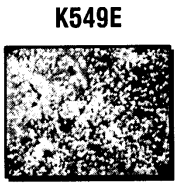
도 22e



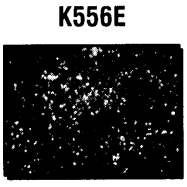
도 22f



도 22g

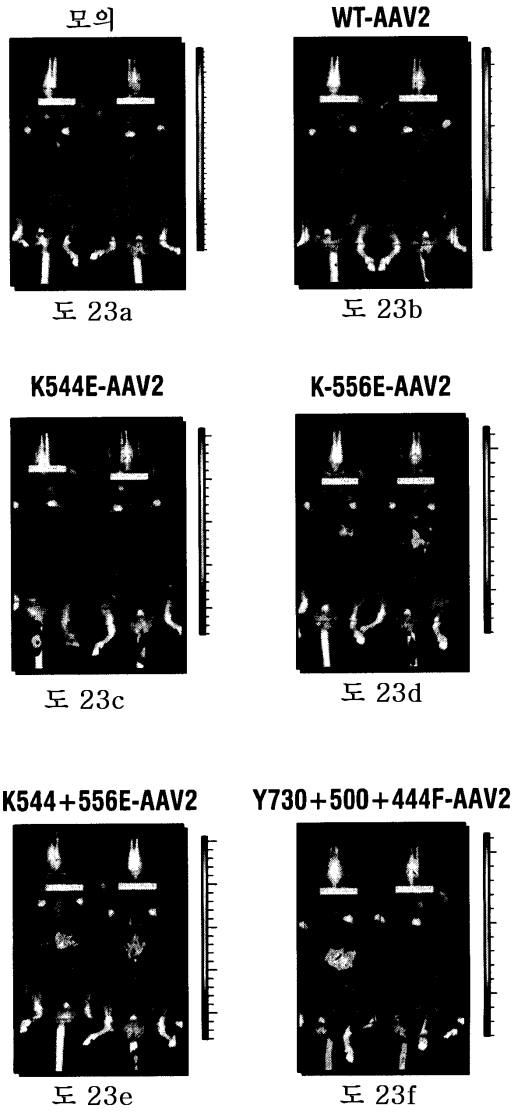


도 22h



도 22i

도면23

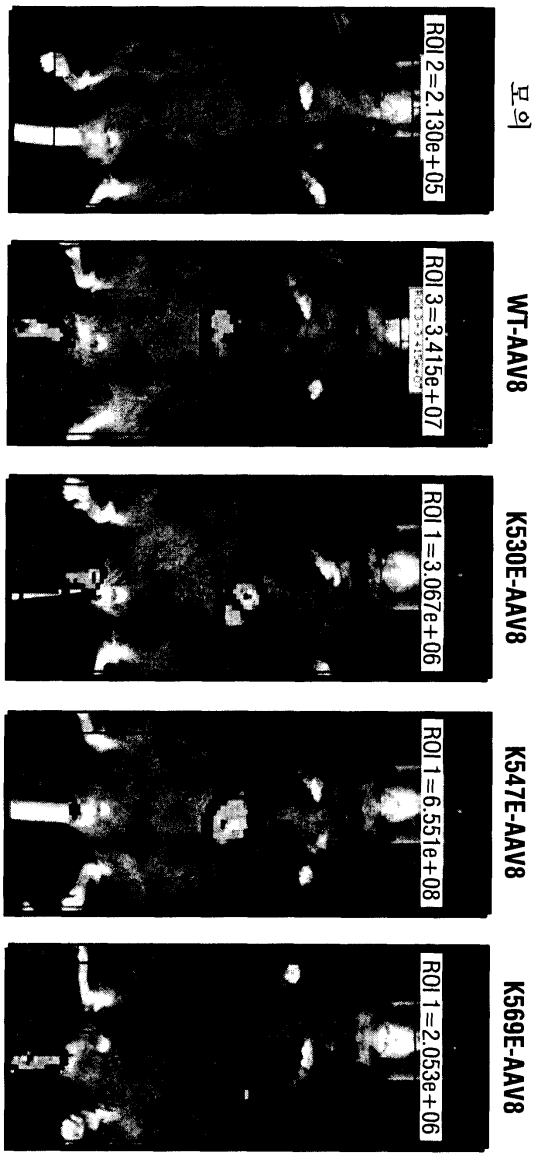


도 23a 도 23b

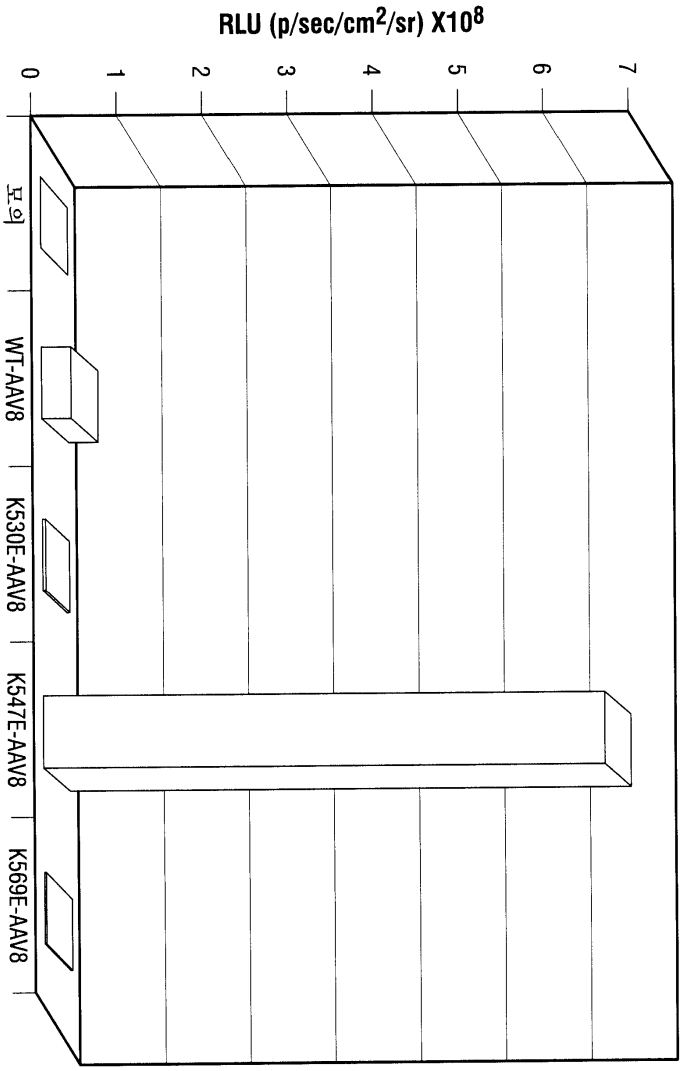
도 23c 도 23d

도 23e 도 23f

도면24


포의
ROI 2=2.130e+05
WT-AAV8
ROI 3=3.415e+07
K530E-AAV8
ROI 1=3.067e+06
K547E-AAV8
ROI 1=6.551e+08
K569E-AAV8
ROI 1=2.053e+06

도면25



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Florida Research Foundation, Inc.

<120> High-Transduction Efficiency rAAV Vectors, Compositions, and Methods of Use

<130> 36689.338

<140> PCT/US2013/041234

<141> 2013-05-15

<150> US 13/840,224

<151> 2013-03-15

<150> US 61/647,318

<151> 2012-05-15

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 1

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

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

530 535 540

Lys Glu Ser Ala Gly Ala Ser Asn Thr Ala Leu Asp Asn Val Met Ile

545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Arg

565 570 575

Phe Gly Thr Val Ala Val Asn Phe Gln Ser Ser Ser Thr Asp Pro Ala

580 585 590

Thr Gly Asp Val His Ala Met Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu

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

<210> 2
<211> 735
<212> PRT
<213> adeno-associated virus 2
<400> 2
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

405 410 415

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

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

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

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

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln
660 665 670

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

<210> 3
<211> 736
<212> PRT
<213> adeno-associated virus 3
<400> 3
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Val Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Arg Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Ile Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Gly
130 135 140
Ala Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Lys Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro Pro

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

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

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser

450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile

545 550 555 560

Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln

565 570 575

Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr

580 585 590

Thr Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 4

<211> 734

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 4

<400> 4

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

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

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

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

Ser Ser Tyr Glu Leu Pro Tyr Val Met Asp Ala Gly Gln Glu Gly Ser

340 345 350

Leu Pro Pro Phe Pro Asn Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr

355 360 365

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

370 375 380

Ala Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly

385 390 395 400

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

405 410 415

Met Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile

420 425 430

Asp Gln Tyr Leu Trp Gly Leu Gln Ser Thr Thr Thr Gly Thr Thr Leu

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Gln Gly Phe Ser Lys Thr Ala Asn Gln Asn Tyr Lys Ile Pro Ala Thr

485 490 495

Gly Ser Asp Ser Leu Ile Lys Tyr Glu Thr His Ser Thr Leu Asp Gly

500 505 510

Arg Trp Ser Ala Leu Thr Pro Gly Pro Pro Met Ala Thr Ala Gly Pro

515 520 525

Ala Asp Ser Lys Phe Ser Asn Ser Gln Leu Ile Phe Ala Gly Pro Lys

530 535 540

Gln Asn Gly Asn Thr Ala Thr Val Pro Gly Thr Leu Ile Phe Thr Ser

545 550 555 560

Glu Glu Glu Leu Ala Ala Thr Asn Ala Thr Asp Thr Asp Met Trp Gly

565 570 575

Asn Leu Pro Gly Gly Asp Gln Ser Asn Ser Asn Leu Pro Thr Val Asp

580 585 590

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

Asp Ile Tyr Tyr Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp
610 615 620

Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Ile Gly Gly Phe Gly Leu Lys His
625 630 635 640

Pro Pro Pro Gln Ile Phe Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn Pro
645 650 655

Ala Thr Thr Phe Ser Ser Thr Pro Val Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr
660 665 670

Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Gln Ile Asp Trp Glu Ile Gln Lys Glu
675 680 685

Arg Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Phe Thr Ser Asn Tyr Gly
690 695 700

Gln Gln Asn Ser Leu Leu Trp Ala Pro Asp Ala Ala Gly Lys Tyr Thr
705 710 715 720

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

<210> 5

<211> 724

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 5

<400> 5

Met Ser Phe Val Asp His Pro Pro Asp Trp Leu Glu Glu Val Gly Glu
1 5 10 15

Gly Leu Arg Glu Phe Leu Gly Leu Glu Ala Gly Pro Pro Lys Pro Lys
20 25 30

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

35 40 45

Tyr Asn Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Arg Gly Glu Pro Val
50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp
325 330 335
Asp Asp Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Val Gly Asn Gly Thr Glu Gly Cys
340 345 350
Leu Pro Ala Phe Pro Pro Gln Val Phe Thr Leu Pro Gln Tyr Gly Tyr

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

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

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

545 550 555 560
Val Ala Tyr Asn Val Gly Gly Gln Met Ala Thr Asn Asn Gln Ser Ser

565 570 575

Thr Thr Ala Pro Ala Thr Gly Thr Tyr Asn Leu Gln Glu Ile Val Pro

580 585 590

Gly Ser Val Trp Met Glu Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp

595 600 605

Ala Lys Ile Pro Glu Thr Gly Ala His Phe His Pro Ser Pro Ala Met

610 615 620

Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Met Met Leu Ile Lys Asn

625 630 635 640

Thr Pro Val Pro Gly Asn Ile Thr Ser Phe Ser Asp Val Pro Val Ser

645 650 655

Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Thr Val Glu Met Glu

660 665 670

Trp Glu Leu Lys Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln

675 680 685

Tyr Thr Asn Asn Tyr Asn Asp Pro Gln Phe Val Asp Phe Ala Pro Asp

690 695 700

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

705 710 715 720

Thr Arg Pro Leu

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 6

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro

465 470 475 480

Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Asp Asp Lys Asp Lys Phe Phe Pro Met Ser Gly Val Met Ile Phe Gly

530 535 540

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

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

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

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

<210> 7
<211> 737
<212> PRT
<213> adeno-associated virus 7
<400> 7

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

515 520 525

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

530 535 540

Phe Gly Lys Thr Gly Ala Thr Asn Lys Thr Thr Leu Glu Asn Val Leu

545 550 555 560

Met Thr Asn Glu Glu Glu Ile Arg Pro Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu

565 570 575

Glu Tyr Gly Ile Val Ser Ser Asn Leu Gln Ala Ala Asn Thr Ala Ala

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Leu

<210> 8

<211> 738

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 8

<400> 8

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

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

Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

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

115 120 125

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

Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
145 150 155 160

Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
165 170 175

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

180 185 190

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

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

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Gly
485 490 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Ala Gly Thr Lys Tyr His

500 505 510
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Ala Asn Pro Gly Ile Ala Met Ala Thr
515 520 525
His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Asn Gly Ile Leu Ile
530 535 540
Phe Gly Lys Gln Asn Ala Ala Arg Asp Asn Ala Asp Tyr Ser Asp Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565 570 575
Glu Glu Tyr Gly Ile Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Thr Ala
580 585 590
Pro Gln Ile Gly Thr Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe

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

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

725 730 735

Asn Leu

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 9

<400> 9

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

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

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

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

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

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

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

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

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

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

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

<210> 10
<211> 738
<212> PRT
<213> adeno-associated virus 10
<400> 10

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

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

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

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

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

<210> 11
<211> 21
<212
> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide primer
<400> 11
tcccatagta acgccaatag g 21
<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Oligonucleotide primer
<400> 12
cttggcatat gatacacttg atg 23