(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0007619
(43) 공개일자 2025년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 48/0016 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7039786
(22) 출원일자(국제) 2023년05월04일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월29일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2023/054639
(87) 국제공개번호 WO 2023/214346
국제공개일자 2023년11월09일
(30) 우선권주장
63/364,287 2022년05월06일 미국(US)

(71) 출원인
노파르티스 아게
스위스 체하-4056 바젤 리히트스트라쎄 35
(72) 발명자
치릴로, 아고스티노
스위스 4002 바젤 포스트파호 노바티스 파마 아게
에베르스바흐, 힐마르
스위스 8952 쉴리에렌 바기슈트라세 14 이뮤노스테라퓨틱스 아게
호사인, 미르
미국 02139 매사추세츠 캠브리지 매사추세츠 애비뉴 250 노바티스 인스티튜츠 포 바이오메디칼 리서치, 인크.
(74) 대리인
양영준, 이상영

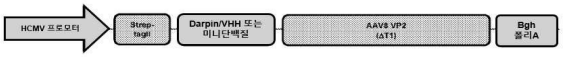
전체 청구항 수 : 총 26 항

(54) 발명의 명칭 **신규 재조합 AAV VP2 융합 폴리펩티드**

(57) 요 약

본 개시는 아데노-연관 바이러스(AAV) VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 관한 것이다. 본 개시는 또한, 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온 및 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 라이브러리, 이러한 rAAV 비리온을 포함하는 약학적 조성물, 그리고 관련 방법 및 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C07K 14/195 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C07K 2318/00 (2013.01)
C07K 2319/00 (2013.01)
C12N 2750/14122 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

아데노-연관 바이러스(AAV) VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며 GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 폴리펩티드 리간드와 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 사이에 펩티드 링커를 추가로 포함하되, 특히, 상기 펩티드 링커는 글리신-세린(GS) 링커 및 알라닌-프롤린-세린(APS) 링커로 이루어진 군으로부터 선택되고, 보다 구체적으로, GS 링커는 식 [GGGGS]n으로 표시되며 APS 링커는 식 [APS]n으로 표시되고, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 특히 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, 보다 구체적으로 n은 GS 링커의 경우 1, 2, 3 또는 4이고 APS 링커의 경우 2, 3, 4 또는 5인, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터, 특히 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형인, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 6

제5항에 있어서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 이의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되, 특히 a) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이며, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, ai) K531E 및 V473D; aii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; aiii) G266A 및 N269Q; aiv) G266A, N269Q 및 D590A; av) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 avi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함하거나; b) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이며, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, bi) G268E 및 N271Q; bii) S387A; biii) G268E, N271Q 및 S387A; biv) A592Q; 또는 bv) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

c) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나

이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, ci) W503A; cii) N562A 및 E563A; ciii) Q590A 및 W503A; 또는 civ) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

d) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이며, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함하거나;

e) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, ei) V473D 및 N500E; eii) R514A; 또는 eiii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, a) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 8

제7항에 있어서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 아미노산 치환 V473D 및 N500E를 추가로 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는, 단리된 핵산.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 제9항의 핵산을 포함하는 세포로서, 특히 곤충 세포(예를 들어, Sf9 세포) 및 HEK293 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

청구항 11

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 12

제11항에 있어서, 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하되, 특히 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 핵산 서열에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일한, rAAV 비리온.

청구항 13

제11항에 있어서, 치료적 핵산, 치료적 단백질, 또는 치료적 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 rAAV 비리온.

청구항 14

제11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 비리온은 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함하되, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터, 특히 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 동일한 AAV 혈청형인, rAAV 비리온.

청구항 15

제14항에 있어서, AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 AAV VP1, VP2 및 VP3 캡시드 폴리펩티드의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되, 특히 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 각각의 AAV 캡시드 폴리펩티드의 공유 VP3 영역에 동일한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하며, 여기에서, 보다 구체적으로, a) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이며, 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, ai) K531E 및 V473D; aii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; aiii) G266A 및 N269Q; aiv) G266A, N269Q 및 D590A; av) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 avi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함하거나;

b) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이며, 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, bi) G268E 및 N271Q; bii) S387A; biii) G268E, N271Q 및 S387A; biv) A592Q; 또는 bv) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

c) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이며, 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, ci) W503A; cii) N562A 및 E563A; ciii) Q590A 및 W503A; 또는 civ) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

d) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이며, 각각, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함하거나;

e) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, ei) V473D 및 N500E; eii) R514A; 또는 eiii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함하는, rAAV 비리온.

청구항 16

제11항 및 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 rAAV 비리온 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약학적 조성물.

청구항 17

의약으로서의 용도를 위한, 제11항 및 제13항 내지 제15항 중 어느 한 항의 rAAV 비리온 또는 제16항의 약학적 조성물.

청구항 18

라이브러리 작제물로서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는, 예를 들어 이들로 이루어진 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리 작제물.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되되, 특히 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서

열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리 작제물.

청구항 20

제18항 또는 제19항에 있어서, 특히, 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^9개의 고유 라이브러리 작제물을 포함하는, 라이브러리.

청구항 21

제20항에 있어서, 각각의 라이브러리 작제물은 rAAV 비리온 내에 존재하되, 특히 상기 rAAV 비리온은 제2항 또는 제3항의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하고, 여기에서 주어진 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 주어진 rAAV 비리온 내에 존재하는 라이브러리 작제물에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일한, 라이브러리.

청구항 22

적어도 하나의 원하는 특성을 갖는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생성하는 방법으로서: b) 제20항 또는 제21항의 라이브러리를 다수의 세포와 접촉시키는 단계, c) 상기 세포의 적어도 일부로부터 핵산 분자를 단리하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 단리된 적어도 하나의 핵산 분자의 폴리펩티드 리간드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 결정하는 단계를 포함하되, 특히, 단계 b)에서의 다수의 세포는 비인간 모델 동물 내에 존재하는, 방법.

청구항 23

AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 24

AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 및/또는 시알산(SIA)에 대한 결합을 폐기하거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

청구항 25

AAV VP2 캡시드 폴리펩티드로서, a) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드.

청구항 26

제25항의 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는, rAAV 비리온.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 개시는 유전자 치료 접근법에 있어서의 AAV의 개선된 표적화를 위한, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV) VP2 융합 폴리펩티드를 제공한다. 본 개시는 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온 및 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 라이브러리, 그리고 관련 조성물, 방법 및 용도를 제공한다.

[0002] **서열 목록**

[0003] 본 출원은 ASCII 형식으로 전자 제출되고, 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2022년 5월 5일자로 생성된 상기 ASCII 사본의 파일명은 PAT059281-US-PSP_SL이며, 그 크기는 54,417 바이트이다.

배 경 기 술

[0004] 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터는 우수한 안전성 및 효능 프로파일로 인해 가장 유망한 유전자 전달 벡터 중 하나이다. AAV 벡터를 다른 벡터들로부터 차별화하는 확립된 특징은 안정적인 장기 발현, 광범위한 숙주 범위, 증식 중인 세포 및 분열 후 세포에 대한 형질도입 능력, 조직 배양에서 생성된 AAV 벡터의 높은 역가, 비병원성 바이러스로부터의 유래, 및 야생형 바이러스와 재조합 벡터 둘 모두의 낮은 면역원성을 포함한다.

[0005] 그러나, 이의 광범위한 향성으로 인해, 다수의 표적 기관에서 형질도입 효율이 낮으며 이에 따라 높은 벡터 투여량이 적용되어야 한다. 이러한 벡터 시스템의 온전한 잠재력은, 개선된 안전 프로파일로 이어지는, 개선된 세포 전이율 및 특이성을 나타내는 변형된 AAV 벡터로만 실현될 수 있다는 점이 점점 더 명확해지고 있다.

[0006] 재표적화 시도는 이의 노출된 위치 및 이의 수용체 결합에서의 기능으로 인해 돌출부의 루프를 형성하는 가변 영역에 집중되어 왔다. 그러나, 이러한 부위는 소형 펩티드의 삽입만을 허용한다. US20180163229는 AAV VP2의 N-말단에 융합된 DARPin을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 폴리펩티드를 개시한다.

[0007] 유전자 치료를 위한 개선된 AAV 특성, 예컨대 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 증가된 형질도입 및/또는 이에 대한 증가된 향성, 개선된 세포 유형 선택성 및/또는 표적화 특이성을 매개할 수 있는 추가의 변이체 AAV 캡시드 폴리펩티드에 대한 충족되지 않은 높은 요구가 여전히 존재한다.

발명의 내용

[0008] 본 개시는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 아데노 연관 바이러스(AAV) VP2 융합 폴리펩티드를 제공하되, 예를 들어, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 직접적으로, 또는 펩티드 링커를 통해 융합된다. 폴리펩티드 링커는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는다. rAAV 비리온 조립체에 사용될 경우, 일반적으로 AAV VP1 및/또는 VP3 캡시드 폴리펩티드와 함께 사용되는 본원에 제공된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 만족스러운 수의 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 rAAV 비리온 내에 통합된다는 것을 의미하는, 양호한 장식(decoration) 수준을 나타낼 수 있다.

[0009] 본원에 기술되는 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않지만 이를 제외하고는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 VP2 캡시드 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에 비해, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 개선된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 매개할 수 있다. 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 개선된 형질도입 및/또는 이에 대한 증가된 향성은 폴리펩티드 리간드에 의해 매개될 수 있으며, 이는 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형 상에서 발현되는 세포 표면 분자에 결합할 수 있는 능력을 가질 수 있다. 따라서, 본원에 제공된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하며 이의 표면 상에 폴리펩티드 리간드를 나타내는 rAAV 비리온은, 높은 세포 유형 선택성 및/또는 표적 특이성을 제공함으로써 제한된 생물분포 및 안전한 유전자 전달을 가능하게 하며, 이에 따라 치료적 응용 및 기초 연구 응용에서의 세포 유형 특이적 유전자 전달에 사용될 수 있다.

[0010] 따라서, 일 양태에서, 본 발명은, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는, 예를 들어 이들로 이루어진 아데노 연관 바이러스(AAV) VP2 융합 폴리펩티드를 제공하며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는다.

[0011] 다른 양태에서, 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 및 이러한 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포가 본원에 제공된다.

[0012] 다른 양태에서, 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온 및 이러한 rAAV 비리온을 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0013] 다른 양태에서, 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 작제물의 라이브러리 및 이러한 라이브러리를 사용하여 원하는 특성을 갖는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생성하는 방법이 본원에 제공된다.

[0014] 다른 양태에서, 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온 및 이러한 rAAV 비리온을 포함하는 약학적 조성물을 사용하는 치료 방법이 본원에 제공된다.

[0015] 또 다른 양태에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기에서 a) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는, AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 구체적으로, bi) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나를 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, bii) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0016] 본 특허 또는 특허 출원 파일은 컬러로 작성된 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 포함하는 본 특허 또는 특허 출원 공개의 사본은 요청 및 필요한 수수료의 납부시에 관청에 의해 제공될 것이다.

도 1은 실시예 1에서 생성된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 발현 플라스미드의 개략도이다.

도 2는 카고 발현 플라스미드 pNN001의 개략도이다.

도 3은 Darpins, VHH 및 미니단백질 장식 AAV8 제제에 대한 SDS-PAGE(변성)를 CTR w.t. AAV8과 비교하여 나타낸다. MS에 의해 확인된 바와 같이, 샘플 4에서 마이너 VP2 w.t. 오염이 관찰되었다(AAV8 트랜스-VP2 생산으로 인한 친화성 정제 유출로 인한 것일 수 있음).

도 4는 장식 AAV8 제제를 사용하는 EGFR 및 TIGIT 재조합 단백질에 대한 AAV 샌드위치 ELISA를 나타낸다.

도 5는 상이한 스캐폴드에 융합된 VP2의 AAV8 장식 수준을 나타낸다.

도 6은 EGFR 과발현 HKB11 세포주에 대한 장식 AAV8의 시험관 내 감염도를 나타낸다. 전체 입자 수 대 감염된(EGFP+) 세포의 비율이 제시된다.

도 7은 GBM 신경구(EGFR 강화 클론 HF-2927)에 대한 항-EGFR Sso7d-AAV8 VP2 융합체의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 8은 수용체 과발현 세포주에 대한 장식 AAV8의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 9는 EGFR 과발현 HKB11 및 HKB11 w.t. 세포주에 대한 장식 AAV6Si12의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 10은 GBM 신경구에 대한 항-EGFR Sso7 VP2 융합 장식 AAV9의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 11는 EGFR 과발현 HKB11 및 HKB11 w.t. 세포주에 대한 장식 AAV1Si11의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 12는 Lib8 Sso7d 파지 플라스미드 라이브러리에 대한 표적화된 위치에서의 아미노산 빈도를 나타낸다. 결과는 500~700 K의 필터링된 판독(Q>30)에 대한 MiSeq NGS 결과물을 나타낸다.

도 13은 제3 선별 라운드 후 Lib8 Sso7d 라이브러리에 대한 발생 분석 결과를 나타낸다.

도 14는 EGFR-과발현 및 EGFR 녹아웃 세포에 대한 6개의 Sso7d 작제물의 FACS 분석 결과를 나타낸다.

도 15는 카고 플라스미드 SK0033의 개략도이다.

도 16은 Lib8 Sso7d-AAV1Si11 플라스미드 라이브러리(SK0037) 내 무작위 위치에서의 아미노산 빈도를 나타낸다.

도 17a는 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11에 대한 발생 분석 결과를 나타낸다.

도 17b는 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Si11 플라스미드 라이브러리에 대한 표적화된 위치에서의 아미노산 빈도를 나타낸다.

도 17c는 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 AAV 라이브러리에 대한 표적화된 위치에서의 아미노산 빈도를 나타낸다.

도 17d는 표적화된 위치에서의 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 AAV 라이브러리 생산 편향을 나타낸다.

도 18은 인간화 마우스의 상이한 조직에서 인간 세포의 백분율을 나타낸다.

도 19는 인간화 마우스에서의 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 및 장식되지 않은 대조군의 생체분포를 나타낸다.

도 20은 RT-PCR 반응의 플래시-겔 분석을 나타낸다(예상 크기: 403 bp).

도 21은 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1이 주사된 마우스로부터의 상이한 기관/세포 내 단일 rcSso7d 변이체 서열의 분포를 나타낸다.

도 22는 상이한 기관 내에서의 농축된 히트 분포를 나타낸다.

도 23은 실시예 8에서 생성된 바코드화 카고 플라스미드의 개략도이다.

도 24a는 단일 바코드화 Sso7d-AAV1Sil1로부터 수득된 전체 입자의 수율 및 백분율을 나타낸다.

도 24b는 단일 바코드화 Sso7d-AAV1Sil1 및 장식되지 않은 대조군에서의 VP2 융합 및 VP1의 비율을 나타낸다.

도 25는 HEK293 현탁 세포에 대한 Sso7d 장식 AAV1Sil1의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 26은 마우스 주사에 사용된 입력물 AAV-471 제제의 라이브러리 분포를 나타낸다.

도 27은 상이한 조직에서의 바코드화 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리의 분포를 나타낸다.

도 28은 RT-PCR 반응의 플래시-겔 분석을 나타낸다(예상 크기: 403 pb).

도 29는 NGS에 대한 앰플리콘 단편의 플래시-겔 분석을 나타낸다(예상 크기: 243 bp).

도 30은 Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리를 사용한 인간화 마우스에 대한 3회의 선별 라운드 후 식별된 LT-HSC 집단에서의 상위 12개 농축 히트의 조직 분포를 나타낸다.

도 31은 실시예 10에서 생성된 수용체 카고 플라스미드의 개략도이다.

도 32는 RT-PCR 반응의 플래시-겔 분석을 나타낸다(예상 크기: 608~668 bp).

도 33은 앰플리콘 PCR 반응의 플래시-겔 분석을 나타낸다(예상 크기: 484~529 pb).

도 34는 V-Exp 라이브러리 선별 계수 분포를 나타낸다.

도 35는 양성 및 음성 선별 후 V-Exp 표적화 위치에 대한 변이 분석을 나타낸다(데이터는 각각의 주어진 위치에서의 w.t. 아미노산의 백분율을 나타냄).

도 36은 양성 선별 후 우선순위화된 VP2 위치에서의 아미노산 분포를 나타낸다(데이터는 상위 9개의 우선순위화된 위치에서의 아미노산의 백분율을 나타냄 - 선별된 AA 돌연변이는 프레임화됨).

도 37은 양성 선별 후 우선순위화된 VP2 위치에서의 링커 및 아미노산 변이를 나타낸다.

도 38은 EGFR 과발현 세포와 녹아웃 세포에서 EGFP 양성 세포의 EC50 값 사이의 배수 변화를 도시하는 막대 그래프를 나타낸다.

도 39는 상이한 항-EGFR Sso7d 장식 AAV1 Sil1 VP2 변이체의 EGFR에 대한 결합을 도시하는 막대 그래프를 나타낸다(5E+11 vp에서 배경이 제거된 ELISA 신호).

도 40은 HKB11 야생형 세포에 대한 항-EGFR Sso7d 장식 ssAAV1Sil1의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

도 41은 수용체 과발현 HKB11 세포에 대한 항-EGFR Sso7d 장식 ssAAVSil1의 시험관 내 감염도를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] **정의**

[0018] 명세서 및 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단수 형태에는 문맥 상 명확히 달리 나타내지 않는 한 복수의 참조물이 포함된다. 예를 들어, 용어 "세포"에는 이의 혼합물을 포함하는 복수의 세포가 포함된다.

[0019] 범위를 포함하는 모든 수치 명명, 예컨대, pH, 온도, 시간, 농도, 및 분자량은 0.1의 증분씩 (+) 또는 (-)로 변

화되는 근사치이다. 항상 명시적으로 언급된 것은 아니지만, 모든 수치 표기에는 "약"이라는 용어가 선행한다는 것을 이해해야 한다. 수치 값 X와 관련하여 용어 "약"은, 예를 들어, X ± 15%를 의미하며, 이 범위 이내의 모든 값을 포함한다. 또한 항상 명시적으로 언급되는 것은 아니지만, 본원에 기술된 시약은 단순히 예이며 이의 균등물이 당업계에 알려져 있음이 이해되어야 한다.

[0020] 문맥이 달리 요구하지 않는 한, 본 명세서 및 다음의 청구범위 전체에 걸쳐, 용어 "포함하다" 및 "포함하고 있다" 및 "포함하는"과 같은 변형은 달리 언급되지 않는 한 개방형의 비제한적 의미로 본원에서 사용된다.

[0021] 본원에서 사용될 경우, "~으로 이루어진"은 해당 양태, 구현예 및/또는 청구항 요소에 명시되지 않은 임의의 요소, 단계 또는 성분을 배제한다. 본원에서 사용될 경우, "~으로 본질적으로 이루어진"은, 해당 양태, 구현예 및/또는 청구항의, 기본적인 그리고 신규한 특성에 실질적으로 영향을 미치지 않는 물질 또는 단계를 배제하지 않는다.

[0022] 용어 "펩티드", "폴리펩티드", 및 "단백질"은 상호 교환가능하게 사용되고, 펩티드 결합에 의해 공유적으로 연결된 아미노산 잔기로 이루어진 화합물을 나타낸다. 단백질 또는 펩티드는 일반적으로 적어도 2개의 아미노산 또는 아미노산 변이체를 함유하고, 단백질 또는 폴리펩티드 서열에 포함될 수 있는 아미노산의 최대 수에는 제한이 없다. 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 2개 이상의 아미노산 또는 변이체를 포함하는 임의의 펩티드 또는 단백질을 포함한다. 이 용어는 특히, 예를 들어 생물학적 활성 단편, 실질적으로 상동성인 폴리펩티드, 올리고펩티드, 동종이량체, 이종이량체, 폴리펩티드의 변이체, 변형된 폴리펩티드, 유도체, 유사체, 융합 단백질 등을 포함한다. 폴리펩티드는 천연 펩티드, 재조합 펩티드, 또는 이들의 조합을 포함한다.

[0023] 용어 "폴리뉴클레오티드"와 "핵산"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 이는 임의의 길이의 뉴클레오티드의 고분자 형태를 나타낸다. 이러한 용어는 리보뉴클레오티드 또는 데옥시리보뉴클레오티드 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 따라서, 해당 용어는 다음을 포함하나 이에 한정되지 않는다: 단일-, 이중-, 또는 다중-가닥 데옥시리보핵산(DNA) 또는 리보핵산(RNA), 게놈 DNA, cDNA, DNA-RNA 하이브리드, 또는 퓨린 및 피리미딘 염기를 포함하는 중합체, 또는 다른 천연, 합성 또는 생화학적으로 변형된, 비-천연 또는 유도체화된 뉴클레오티드 염기, 예를 들어, 기준 핵산과 유사한 결합 특성을 가지고 자연 발생 뉴클레오티드와 유사한 방식으로 대사되는 천연 뉴클레오티드의 유사체, 잠금 핵산(LNA), 펩티드 핵산(PNA). 달리 나타내지 않는 한, 특정한 핵산 서열은 또한 명시적으로 나타낸 서열 뿐만 아니라 이의 보존적으로 변형된 변이체(예를 들어 축퇴성 코돈 치환), 대립유전자, 오르소로그, SNP, 및 상보성 서열을 묵시적으로 포괄한다. 구체적으로, 축퇴성 코돈 치환은 하나 이상의 선택된(또는 모든) 코돈의 제3 위치가 혼합-염기 및/또는 데옥시이노신 잔기로 치환된 서열을 생성함으로써 달성될 수 있다(문헌[Batzer et al., 핵산 Res. 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)]; 및 문헌[Rossolini et al., Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994)]).

[0024] 용어 "서열 동일성" 및 "서열 상동성"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 관련하여 사용되는 바와 같이, 폴리펩티드의 2개의 폴리뉴클레오티드 서열을 비교하거나 정렬할 때, 동일하고 상대 위치가 같은 염기 또는 아미노산의 백분율을 나타낸다. 따라서, 두 분자 모두에서 서브유닛 위치가 동일한 단량체 서브유닛에 의해 점유될 경우, 예를 들어 2개의 DNA 분자 각각에서 하나의 위치가 아데닌에 의해 점유되는 경우, 이들은 해당 위치에서 상동성이거나 동일하다. 두 서열 사이의 상동성은 매칭되거나 상동성인 위치의 수의 직접적인 함수이다; 예를 들어, 두 서열에서의 위치의 절반(예를 들어, 길이가 10개 서브유닛인 중합체에서 5개의 위치)이 상동성일 경우, 두 서열은 50% 상동성이고; 위치의 90%(예를 들어, 10개 중 9개)가 매칭되거나 상동성일 경우, 두 서열은 90% 상동성이다. 서열 동일성은 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 예를 들어, "서열 동일성"의 백분율은 비교창에 걸쳐 최적으로 정렬된 두 서열을 비교함으로써 결정될 수 있으며, 비교창에서의 아미노산 서열의 단편은 두 서열의 최적 정렬을 위해 기준 서열(부가 또는 결실을 포함하지 않음)과 비교하여 부가 또는 결실(예를 들어, 갭 또는 오버행)을 포함할 수 있다. 백분율은 두 서열에서 동일한 아미노산 잔기가 나타나는 위치의 수를 결정하여 매칭된 위치의 수를 산출하고, 매칭된 위치의 수를 비교창의 위치의 총 수로 나누고, 그 결과에 100을 곱하여 서열 동일성 백분율을 산출함으로써 계산될 수 있다. 결과는 쿼리 서열에 대한 대상 서열의 동일성 퍼센트이다. 서열은 다양한 방법 및 컴퓨터 프로그램(예: BLAST, T-COFFEE, MUSCLE, MAFFT 등)을 사용하여 정렬될 수 있다. 예를 들어 문헌[Altschul et al., (1990) J. Mol. Bioi., 215:403-10]을 참조한다.

[0025] 본원에서 사용되는 용어 "자연발생적" 또는 "비변형"은, 예를 들어 핵산, 폴리펩티드, 세포, 또는 유기체에 적용될 경우, 자연에서 발견되는 것이다. 예를 들어, 유기체(예컨대 바이러스)에 존재하는 폴리펩티드 또는 폴리뉴클레오티드 서열은 해당 유기체에 존재하는지 또는 해당 유기체의 하나 이상의 구성요소로부터 단리되었는지

여부에 관계없이 자연발생적이다.

[0026] 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 관련된 "변이체"라는 용어는, 또한 비-변이체 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열로도 지칭되는, 부모 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 적어도 하나의 잔기, 즉 폴리뉴클레오티드의 경우 적어도 하나의 뉴클레오티드, 그리고 폴리펩티드의 경우 적어도 하나의 아미노산이 상이한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 의미한다.

[0027] 본원에서 논의된 핵산, 폴리펩티드 또는 바이러스와 관련되는 "단리된"이라는 용어는 이의 자연 환경에서 일반적으로 핵산, 폴리펩티드 또는 바이러스와 결합된 상태로 발견되는 하나 이상의 성분으로부터 분리된 핵산, 폴리펩티드 또는 바이러스를 지칭한다. 예를 들어, 살아있는 동물에 자연적으로 존재하는 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이 아니지만, 그것의 천연 상태의 공존하는 물질로부터 부분적으로 또는 완전히 분리된 동일한 핵산 또는 펩티드는 "단리된" 것이다. 분리는 더 큰 핵산(예를 들어, 유전자 또는 염색체)으로부터의 제거, 또는 일반적으로 핵산 또는 단백질과 접촉된 다른 단백질 또는 분자로부터의 제거를 포함할 수 있다. 이 용어는 완전한 단리를 포함하지만 이를 필요로 하지는 않는다. 따라서, 단리된 핵산 또는 단백질은 실질적으로 정제된 형태로 존재할 수 있거나, 예를 들어 숙주 세포와 같은 비천연 환경에 존재할 수 있다.

[0028] 본원에서 사용되는 바와 같이, "이종 핵산 서열"을 포함하는 단리된 핵산은 자연 상황에서 단리된 핵산의 하나 이상의 다른 구성요소에 작동 가능하게 연결된 상태로는 보통 발견되지 않는 부분(즉, 이종 핵산 부분)을 포함하는 단리된 핵산을 지칭한다. 예를 들어, 이종 핵산은 단리된 핵산의 다른 구성요소(예: 프로모터)의 자연적 유래원인 세포, 박테리아 세포, 바이러스, 또는 유기체에서 원래 발견되지 않는 핵산 서열, 또는 단리된 핵산의 다른 구성요소(예: 프로모터)가 이러한 세포, 박테리아 세포, 바이러스, 또는 유기체에서 이종 핵산과 작동 가능하게 연결된 상태로는 자연적으로 발견되지 않는 핵산 서열을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 이식유전자를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "이식유전자"는 핵산 분자의 하나 이상의 구성요소와 원래 연관되지 않은 관심 분자(예를 들어, 치료용 단백질, 치료용 RNA 분자, 또는 리포터 단백질)를 암호화하는 핵산 서열이다. 일부 구현예에서, 이종 핵산 서열은 인간 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 이종 핵산 서열은 RNA 서열, 예를 들어 shRNA를 암호화한다.

[0029] 본원에서 사용되는 바와 같이, "리포터 서열"이라는 용어는 리포터 단백질, 예컨대, 이러한 리포터 서열을 포함하는 rAAV 벡터로의 감염을 시각화, 즉 리포터 단백질의 발현을 기반으로 표적 세포 또는 표적 조직의 성공적인 형질도입의 모니터링을 가능하게 하는, 형광 단백질 또는 산화 효소를 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 바람직한 산화 효소는 반딧불이 루시퍼라제이며; 예시적인 형광 단백질은 GFP 및 이의 변이체, 예컨대 eGFP 및 sfCherry를 포함한다. 리포터 서열은 치료적 이식유전자 또는 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산에 더하여 또는 이를 대신하여 rAAV 비리온 내에 패키징될 수 있다.

[0030] 본원에서 사용되는 바와 같이, "바코드 서열"이라는 용어는 특정 서열을 갖는 고유 올리고뉴클레오티드 서열(예를 들어, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 15, 20, 25, 30, 50, 75, 100개 뉴클레오티드)을 지칭하며, 이는 해당 서열이 통합된 핵산 서열을 식별하는 수단으로 사용된다. 예를 들어, 바코드는 라이브러리에서 개별 구성원(예를 들어, 변이체)을 구별하거나 식별하는 수단으로 사용될 수 있다.

[0031] 특정 RNA를 "암호화"하는 DNA 서열 또는 DNA 폴리뉴클레오티드 서열은 RNA로 전사될 수 있는 DNA의 서열이다. DNA 폴리뉴클레오티드는 단백질로 번역되는 RNA(mRNA)를 암호화할 수 있거나, DNA 폴리뉴클레오티드는 단백질로 번역되지 않는 RNA(예를 들어, tRNA, rRNA, 또는 가이드 RNA; "비암호화" RNA 또는 "ncRNA"로도 지칭됨)를 암호화할 수 있다. DNA 서열 또는 DNA 폴리뉴클레오티드 서열은 또한 특정 폴리펩티드 또는 단백질 서열을 "암호화"할 수 있으며, 이때 예를 들어 DNA는 폴리펩티드 또는 단백질 서열로 번역될 수 있는 mRNA를 직접 암호화한다. "단백질 암호화 서열" 또는 특정 단백질 또는 폴리펩티드를 암호화하는 서열은 적절한 조절 서열의 제어 하에 있을 경우, 시험관내 또는 생체내에서 (DNA의 경우) mRNA로 전사되고 (mRNA의 경우) 폴리펩티드로 번역될 수 있는 핵산 서열이다. 암호화 서열의 경계는 5' 말단(N-말단)의 개시 코돈 및 3' 말단(C-말단)의 번역 정지 넌센스 코돈에 의해 결정될 수 있다. 암호화 서열은 원핵생물 또는 진핵생물 mRNA의 cDNA, 원핵생물 또는 진핵생물 DNA의 게놈 DNA 서열, 및 합성 핵산을 포함할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 전사 종결 서열은 일반적으로 암호화 서열의 3'에 위치할 것이다.

[0032] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터" 또는 "프로모터 서열"은 예를 들어 결합 RNA 중합효소를 통해, 예를 들어 암호화 또는 비암호화 서열 하류(3' 방향)의 작동 가능하게 연결된 암호화 또는 비암호화 서열의 전사를 촉진할 수 있는(예를 들어, 검출 가능한 수준의 전사를 유발하고/하거나 프로모터의 부재하에 제공된 수준보다 높게 검출 가능한 전사 수준을 증가시킬 수 있는) DNA 조절 서열이다. 일부 구현예에서, 프로모터 서열은 전사 개시 부

위에 의해 3' 말단에서 결합되고, 업스트림(5' 방향)으로 연장되어 백그라운드보다 높은 검출 가능한 수준으로 전사를 개시하기 위한 염기 또는 요소의 최소 수를 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터 서열은 전사 개시 부위, 뿐만 아니라 RNA 중합효소의 결합을 담당하는 단백질 결합 도메인을 포함할 수 있다. 전사를 개시하기에 충분한 서열 외에도, 프로모터는 또한 전사 조절에 관여하는 다른 조절 요소의 서열을 포함할 수 있다(예: 인핸서, Kozak 서열, 및 인트론). 본원에 개시된 벡터로부터의 발현을 구동하기 위해 유도성 프로모터 및 항시성 프로모터를 포함하는 다양한 프로모터가 사용될 수 있다. 일부 구현예에서, 예를 들어 본원에 개시된 핵산 분자 및 벡터에 사용될 수 있는, 당업계에 공지된 프로모터의 예는 다음을 포함한다: CMV 프로모터, 173CMV 프로모터, HCMV 프로모터, CBh 프로모터, CAG 프로모터, mCCT 프로모터, CBA 프로모터, smCBA 프로모터 및 면역글로불린 유전자, SV40, 또는 다른 조직 특이적 유전자(예: RLBP1, RPE, VMD2)로부터 유래된 프로모터. 또한, 공지된 조절 요소를 혼합하고 매칭시켜 기능적 프로모터를 생성하기 위한 표준 기술은 당업계에 알려져 있다. 프로모터의 단편, 예를 들어 백그라운드보다 높은 검출 가능한 수준으로 전사를 개시하기 위한 염기 또는 요소의 적어도 최소 수를 보유하는 단편이 또한 사용될 수 있다.

[0033] 일부 구현예에서, 프로모터는 항시적으로 활성인 프로모터(즉, 임의의 세포 유형 및/또는 임의의 조건에서 발현을 항시적으로 유도하는 프로모터)일 수 있다. 다른 구현예에서, 프로모터는 특정 조직 맥락에서, 예를 들어, 뉴런, 심장 세포 등에서 구성적으로 활성인 프로모터일 수 있다. 다른 구현예에서, 프로모터는 유도성 프로모터(즉, 활성이 외부 자극, 예를 들어, 특정 온도, 화합물 또는 단백질의 존재에 의해 제어되는 프로모터)일 수 있다. 일부 구현예에서, 프로모터는 프로모터가 발견되는 물리적 상황에 따라 활성을 유도할 수 있거나 그렇지 않을 수 있는 공간적으로 제한된 프로모터일 수 있다. 공간적으로 제한된 프로모터의 비제한적 예는 조직-특이적 프로모터, 세포 유형-특이적 프로모터 등을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 프로모터가 발견되는 시간적 상황에 따라 발현을 유도하는 시간적으로 제한된 프로모터일 수 있다. 예를 들어, 시간적으로 제한된 프로모터는 배아 발달의 특정 단계 또는 생물학적 과정의 특정 단계에서만 발현을 유도할 수 있다. 시간적으로 제한된 프로모터의 비제한적 예는 마우스의 모낭 주기 프로모터를 포함한다.

[0034] 일부 구현예에서, 프로모터는 조직-특이적이어서, 다세포 유기체에서 프로모터는 특정 세포의 하위집합에서만 발현을 유도한다. 예를 들어, 조직 특이적 프로모터는 뉴런 특이적 프로모터, 지방세포 특이적 프로모터, 심근세포 특이적 프로모터, 평활근 특이적 프로모터, 광수용체 특이적 프로모터 등을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 뉴런-특이적 프로모터는 예를 들어 말초적으로, 중추신경계(CNS) 내로 직접 투여되거나 시험관내, 생체외, 또는 생체내를 비롯해 뉴런세포에 전달될 때, 작동 가능하게 연결된 이종 핵산의 발현을 우선적으로 유도하거나 조절하는 프로모터, 예를 들어 비뉴런 세포에서의 발현과 비교하여 뉴런에서 관심 단백질 또는 펩티드 또는 shRNA를 암호화하는 프로모터를 지칭한다.

[0035] 용어 "작동 가능하게 연결된"은 2개 이상의 폴리뉴클레오티드(예를 들어, DNA) 분절들 사이의 기능적 관계를 지칭한다. 일반적으로, 이 용어는 전사 조절 서열과 전사될 서열의 기능적 관계를 나타낸다. 예를 들어, 프로모터 또는 인핸서 서열은 예를 들어 적절한 숙주 세포 또는 다른 발현 시스템에서 암호화 서열의 전사를 자극하거나 조절하는 경우 암호화 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로, 서열에 작동 가능하게 연결되는 프로모터 전사 조절 서열은 해당 서열에 인접해 있거나, 짧은 스페이서 서열에 의해 분리되어 있다(즉, 시스-작용성임). 그러나, 인핸서와 같은 일부 전사 조절 서열은 전사를 강화하는 암호화 서열에 물리적으로 인접해 있거나 매우 근접한 위치에 있을 필요가 없다.

[0036] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 "DNA 조절 서열", "제어 요소", 및 "조절 요소"는 비암호화 서열(예를 들어, 짧은 헤어핀 RNA) 또는 암호화 서열(예를 들어, 이식유전자)의 전사를 제공 및/또는 조절하고/하거나 암호화된 폴리펩티드의 번역을 조절하는, 프로모터, 인핸서, 사일런서, 폴리아데닐화 신호, 터미네이터, 단백질 분해 신호 등과 같은 전사 및 번역 제어 서열을 지칭한다.

[0037] 용어 "폴리아데닐화(폴리A(polyA)) 신호 서열" 및 "폴리아데닐화 서열"은 RNA 전사체의 3' 말단에 아데노신 동종중합체 사슬의 추가 및 전사 종결에 대한 신호를 제공하는 조절 요소를 지칭한다. 폴리아데닐화 신호는 종결 신호(예를 들어, AAUAAA 서열 또는 다른 비표준 서열) 및 임의적 측부 보조 요소(예를 들어, GU-풍부 요소) 및/또는 효율적인 절단 및 폴리아데닐화와 관련된 다른 요소를 포함할 수 있다. 폴리아데닐화 서열은 폴리아데닐화에 의해 mRNA의 3' 말단에 부착된 일련의 아데노신을 포함할 수 있다. 예시적인 polyA 신호 서열은 BGH 및 SV40 polyA 신호 서열이다. 일부 구현예에서, DNA 조절 서열 또는 제어 요소는 조직-특이적 조절 서열이다.

[0038] 용어 "전사후 조절 요소"("PRE")는 mRNA로 전사될 때 mRNA 전사체의 수준에서 유전자 발현을 조절하는 하나 이상의 조절 요소를 지칭한다. 이러한 전사후 조절 요소의 예는 마이크로-RNA 결합 부위, RNA 결합 단백질 결합

부위 등을 암호화하는 서열을 포함할 수 있다. 본원에 개시된 핵산 분자 및 벡터와 함께 사용될 수 있는 전사후 조절 요소의 예는 우드척 간염 전사후 조절 요소(WPRE), 및 간염 전사후 조절 요소(HPRE)를 포함한다.

[0039] 용어 "인트론"은 핵산으로부터 발현된 폴리펩티드 전사체(예를 들어, 관심 단백질)의 하나 이상의 아미노산을 비암호화하는 핵산 서열(들), 예를 들어 개방 판독 프레임 내에 있는 것을 지칭한다. 인트론 서열은 DNA에서 RNA로 전사될 수 있지만(즉, pre-mRNA에 존재할 수 있음), 예를 들어 스플라이싱을 통해 성숙 mRNA로부터 단백질이 발현되기 전에 제거될 수 있다.

[0040] 용어 "엑손"은 핵산으로부터 발현된 전사체(예를 들어, 관심 단백질)의 하나 이상의 아미노산을 암호화하는 핵산 서열(들), 예를 들어 개방 판독 프레임(ORF) 내에 있는 것을 지칭한다. 엑손 서열은 DNA에서 RNA로 전사될 수 있고(즉, pre-mRNA에 존재할 수 있음), 또한 폴리펩티드로 번역되는 성숙한 mRNA(즉, (예를 들어, 스플라이싱 후) RNA의 처리된 형태)에 존재할 수 있다

[0041] 일부 구현예에서, "벡터"는 숙주 세포에서 발현될 수 있는 관심 핵산(예: 이식유전자), 예를 들어 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 바이러스, 비리온 등과 같은, 세포, 조직, 및/또는 유기체에 전달하는 데 적합한 더 큰 핵산 서열 또는 구조 내의 관심 핵산을 포함하는 임의의 유전 요소(예: DNA, RNA, 또는 이들의 혼합물)이다. 예를 들어, 벡터는 삽입물(예를 들어, 발현될 유전자 또는 해당 유전자의 개방 판독 프레임을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 이종 핵산) 및 삽입물의 발현을 전달하거나 제어하는 데 적합한 하나 이상의 추가 요소를 포함할 수 있다. 벡터는 예를 들어 적절한 제어 요소와 관련될 때 복제 및/또는 발현이 가능할 수 있으며, 세포 간에 유전 정보를 전달할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 숙주 세포에서의 발현에 적합한 벡터, 예를 들어 AAV 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 예를 들어 세포 또는 생물반응기에서의, 발현 및/또는 복제에 적합한 플라스미드일 수 있다. 일부 구현예에서, 표적 세포에서 관심 단백질, shRNA 등을 암호화하는 이식유전자와 같은 이종 핵산 서열의 발현을 위해 특이적으로 설계된 벡터는 발현 벡터로 지칭될 수 있으며, 일반적으로 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터 서열을 갖는다. 다른 구현예에서, 벡터, 예를 들어 전사 벡터는 전사될 수 있지만 번역되지 않을 수 있으며, 이는 해당 벡터가 표적 세포에서 복제될 수 있지만 발현되지 않을 수 있음을 의미한다. 전사 벡터는 이들의 삽입물을 증폭하는 데 사용될 수 있다.

[0042] "발현 벡터"라는 용어는 발현될 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결되는 발현 제어 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포함하는 벡터를 지칭한다. 발현 벡터는 단독으로 또는 숙주 세포에 의해 또는 시험관내 발현 시스템에서 공급되는 다른 발현용 요소와 조합하여 발현하기에 충분한 시스-작용 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어 발현 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 코스미드, 플라스미드(예: 네이키드이거나 리포솜에 함유됨), 및 바이러스(예: 렌티바이러스, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 및 아데노 관련 바이러스)를 포함한다.

[0043] "플라스미드"라는 용어는 플라스미드가 숙주 세포에서 복제되도록 온전한 "레플리콘"을 포함하는 비-염색체(및 일반적으로 이중가닥) DNA 서열을 지칭한다. 플라스미드는 원형 핵산일 수 있다. 플라스미드가 단세포 유기체 내에 배치될 경우, 플라스미드 DNA의 결과로서 해당 유기체의 특성이 변경되거나 변형된다. 예를 들어, 테트라사이클린 내성(TcR) 유전자를 갖고 있는 플라스미드는 이전에 테트라사이클린에 민감했던 세포를 테트라사이클린에 내성이 있는 세포로 변형시킨다.

[0044] 본원에서 사용되는 바와 같이, "재조합 바이러스"라는 용어는 이식유전자 또는 다른 이종 핵산을 포함하는 비야생형 및/또는 인공적으로 생성된 재조합 바이러스(예를 들어, 파보바이러스, 아데노바이러스, 렌티바이러스, 또는 아데노 관련 바이러스 등)를 지칭하는 것으로 의도된다. 재조합 바이러스는 바이러스(예를 들어 AAV) 캡시드 내에 패키징된 재조합 바이러스 벡터를 포함할 수 있다(예를 들어, 이식유전자를 포함함). 특정 유형의 재조합 바이러스는 "재조합 아데노 관련 바이러스" 또는 "rAAV"일 수 있다. 바이러스 캡시드에 패키징된 재조합 바이러스 게놈은 바이러스 벡터일 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 재조합 바이러스는 바이러스 벡터를 포함한다(예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은, 예를 들어, 관심 이식유전자를 포함함). 바이러스 벡터의 예는 아데노 연관 바이러스(AAV) 벡터, 키메라 AAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, DNA 바이러스 벡터, 단순 헤르페스 바이러스 벡터, 배큘로바이러스 벡터, 또는 이들의 임의의 돌연변이 또는 유도체를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0045] "AAV"는 아데노 연관 바이러스에 대한 약어이며, 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 나타내기 위해 사용될 수 있다. 해당 용어는 달리 명확하게 언급되지 않는 한, 모든 하위유형 및 자연 발생과 재조합 형태 둘 모두를 포괄한다. “rAAV” 라는 용어는 재조합 아데노 연관 바이러스 또는 재조합 AAV 벡터를 지칭한다.

[0046] 본원에서 사용되는 용어 "AAV 벡터"는 아데노 연관 바이러스 혈청형으로부터 유래된 하나 이상의 핵산 서열으로부터 유래되거나 이를 포함하는 벡터를 지칭하며, 이는 비제한적으로 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5 바이러스 벡터를 포함한다. AAV 벡터는 예를 들어 기능적 측부 역위 말단 반복부("ITR") 서열을 유지하면서 전체 또는 부분, 예를 들어 rep 및/또는 cap 유전자가 결실된 AAV 야생형 유전자 중 하나 이상을 가질 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 벡터 핵산을 표적 세포의 핵에 전달하기 위한 비히클을 제공할 수 있는, 예를 들어 하나 이상의 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 단백질 쉘 또는 "캡시드"에 패키징될 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 하나 이상의 AAV ITR 서열(예: AAV2 ITR 서열)을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 하나 이상의 AAV ITR 서열(예: AAV2 ITR 서열)을 포함하지만, 어떠한 추가적인 바이러스 핵산 서열도 포함하지 않는다. 일부 구현예에서, AAV 벡터 구성요소(예: ITR)는 rAAV 캡시드와는 다른 혈청형 바이러스에서 유래된다(예를 들어, AAV 벡터는 AAV2에서 유래된 ITR을 포함할 수 있고 AAV 벡터는 AAV9 캡시드로 패키징될 수 있다). 이러한 벡터 작제물의 구현예는 예를 들어 WO2019/094253 (PCT/US2018/058744)에 제공되어 있으며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0047] rAAV 벡터는 단일가닥 AAV 벡터 및 자기상보성 AAV 벡터(scAAV)를 포함한다. scAAV는 해당 scAAV의 벡터의 적어도 일부(예를 들어, 암호화 영역의 적어도 일부)가 분자내 이중가닥 DNA를 형성하기 때문에 "자기상보성"이라고 한다. 일부 구현예에서, rAAV는 scAAV이다. 다른 구현예에서, rAAV는 단일가닥 AAV이다. 일부 구현예에서, 바이러스 벡터는 자연 발생 아데노 연관 바이러스(AAV)로부터 조작되어 유전자 요법에 사용하기 위한 scAAV를 제공한다. 이러한 벡터 작제물 및 이들의 제조 및 정제 방법의 구현예는 예를 들어 WO2019/094253 (PCT/US2018/058744)에 제공되어 있으며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0048] 본원에서 사용되는 바와 같이, "바이러스" 또는 "비리온"은 예를 들어, 단독으로 또는 하나 이상의 바이러스 캡시드와 같은 하나 이상의 추가 성분과 조합하여 바이러스 벡터를 포함하는 바이러스 입자를 나타낸다. 예를 들어, AAV 바이러스는 예를 들어 AAV 캡시드 단백질 외피와 관련된 선형, 단일가닥 AAV 핵산 게놈을 포함할 수 있다.

[0049] 일부 구현예에서, "바이러스", "비리온", "AAV 바이러스", "재조합 AAV 비리온", "rAAV 비리온", "AAV 벡터 입자", "전체 캡시드", "전체 입자" 등과 같은 용어는 예를 들어 AAV ITR이 한쪽 또는 양쪽 측부에 있는 바이러스 벡터에서 관심 이종 뉴클레오티드 서열을 캡슐화하는 AAV 단백질 쉘을 포함하는 것과 같은 감염성 복제-결함 바이러스를 나타낸다. rAAV 비리온은 단독으로 또는 예를 들어 동일하거나 추가적인 플라스미드 상에서 (rep 유전자 및 cap 유전자와 같은) AAV 헬퍼 기능 및 보조 기능을 암호화하는 핵산과 조합하여, AAV 벡터를 특정하는 서열(예를 들어, 하나 이상의 플라스미드)을 포함하는 적합한 숙주 세포에서 생성될 수 있다. 일부 구현예에서, 숙주 세포는 (관심 재조합 뉴클레오티드 서열을 포함하는) AAV 벡터를 후속 유전자 전달을 위한 감염성 재조합 비리온 입자로 패키징하는 AAV 폴리펩티드를 암호화할 수 있게 된다.

[0050] "패키징"은 핵산 서열을 캡슐화하는 AAV 비리온 또는 AAV 입자의 조립체를 생성하는 일련의 세포내 이벤트를 지칭한다. 패키징은 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 캡시드 내로의 핵산 서열의 캡슐화를 지칭할 수 있다.

[0051] "감염성" 비리온, 바이러스 또는 바이러스 입자는 바이러스 종에 대한 세포 트로픽으로 전달 가능한 폴리뉴클레오티드 성분을 포함하는 것이다. 해당 용어가 반드시 해당 바이러스의 복제 능력에 대한 어떠한 결론을 내리는 것은 아니다. 본원에서 사용되는 바와 같이, “감염성” 바이러스 또는 바이러스 입자는 표적 세포에 접근 시 표적 세포를 감염시킬 수 있고 표적 세포에서 이종 핵산을 발현시킬 수 있는 입자이다. 따라서, "감염성"은 바이러스 입자가 표적 세포에 접근하여 표적 세포를 감염시키고 표적 세포에서 이종 핵산을 발현시키는 능력을 지칭한다. 감염성은 시험관내 감염성 또는 생체내 감염성을 지칭할 수 있다. 감염성 바이러스 입자의 계수를 위함 검정은 당업계에 공지되어 있다. 바이러스 감염성은 감염성 바이러스 입자 대 총 바이러스 입자의 비율로 표현될 수 있다. 총 바이러스 입자는 바이러스 게놈 카피의 수로 표현될 수 있다. 바이러스 입자가 세포 내에서 이종 핵산을 발현하는 능력은 "형질도입"으로 지칭된다. 바이러스 입자가 세포에서 이종 핵산을 발현시키는 능력은, (예를 들어, 바이러스가 GFP를 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 경우) 녹색 형광 단백질(GFP) 검정(여기에서 GFP는 바이러스 입자로 감염된 세포에서 생성되고 검출 및/또는 측정됨); 또는 예를 들어, 효소 결합 면역흡착 검정(ELISA) 또는 형광 활성화 세포 분류(FACS)에 의한, 생산된 단백질의 측정과 같은, 마커 유전자의 평가를 포함하는 다수의 기술을 사용하여 검정될 수 있다.

[0052] "복제 가능" 비리온 또는 바이러스(예를 들어, 복제 가능 AAV)는 감염된 세포에서(즉, 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼

바이러스 기능의 존재 하에서) 복제 가능한 감염성 바이러스를 지칭한다. AAV의 경우 복제 가능성은 대체적으로 기능성 AAV 패키징 유전자, 즉 cap 및 rep 유전자를 필요로 한다. 일부 구현예에서, 본원에서 기술되는 AAV 벡터는 하나 이상의 AAV 패키징 유전자가 결여되어 있고 포유류 세포(예를 들어, 인간 세포)에서는 복제가 불가능하다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 임의의 AAV 패키징 유전자 서열이 결여되어 있으며, 이로 인해 AAV 패키징 유전자와 유입 AAV 벡터 간의 재조합에 의한 복제 가능 AAV의 생성 가능성은 최소화된다.

[0053] 용어 "역위 말단 반복부" 또는 "ITR"은 예를 들어 아데노 관련 바이러스(AAV) 및/또는 재조합 아데노 관련 바이러스 벡터(rAAV)에서 T형 회문 구조를 형성할 수 있는 뉴클레오티드 서열의 스트레치를 의미한다. 문헌 [Muzyczka et al., (2001) Fields Virology, Chapter 29, Lippincott Williams & Wilkins]. 재조합 AAV 벡터에서, 이러한 서열은 게놈 패키징 및 2차 가닥 합성에서 기능적 역할을 할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 돌연변이되거나 절단된 하나 이상의 ITR을 포함한다.

[0054] "cap 유전자" 또는 "캡시드 유전자"라는 용어는 캡시드, 또는 바이러스의 단백질 쉘을 형성하거나 이의 형성에 기여하는 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. AAV의 경우, 캡시드 단백질은 통상적으로 VP1, VP2, 및 VP3이다. 다른 파보바이러스의 경우, 캡시드 단백질의 명칭 및 수는 상이할 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 “AAV VP1 캡시드 폴리펩티드”, “AAV VP2 캡시드 폴리펩티드” 및 “AAV VP3 캡시드 폴리펩티드”라는 용어는 야생형 AAV 캡시드 폴리펩티드뿐만 아니라 이의 변이체 및 단편, 특히 이의 기능성 변이체 및 단편을 지칭한다. 기능성 AAV 캡시드 폴리펩티드 변이체 및 단편은 AAV 캡시드 조립체에 사용될 수 있다.

[0055] "rep 유전자"라는 용어는 AAV의 복제 및 생산에 요구되는 비-구조적 단백질(rep78, rep68, rep52 및 rep40)을 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다.

[0056] 용어 "AAV 헬퍼 기능"은 생산적인 AAV 복제를 위해 트랜스로 기능하는 것과 같은 AAV 유전자 산물을 제공하도록 발현될 수 있는 AAV-유래 암호화 서열을 지칭한다. 예를 들어, AAV 헬퍼 기능에는 주요 AAV 개방 판독 프레임(ORF), rep, 및 cap이 포함될 수 있다. Rep 발현 산물은 다른 것들 중에서도 다음과 같은 다양한 기능을 보유하는 것으로 밝혀졌다: DNA 복제의 AAV 기점 인식, 결합 및 니킹; DNA 헬리케이스 활성; AAV(또는 다른 이종) 프로모터로부터의 전사 조절. Cap 발현 산물은 필요한 패키징 기능을 제공한다. AAV 헬퍼 기능은 AAV 벡터에서 누락된 트랜스의 AAV 기능을 보완하기 위해 본원에서 사용될 수 있다.

[0057] 용어 "AAV 헬퍼 구성체"는 일반적으로 AAV 벡터, 예를 들어 관심 뉴클레오티드 서열을 표적 세포 또는 조직에 전달하기 위한 벡터에서 결실된 AAV 기능을 제공하는 단백질 또는 핵산을 제공하거나 암호화하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 핵산 분자를 지칭한다. 일반적으로 AAV 헬퍼 구성체는 AAV 복제를 위한 누락된 AAV 기능을 보완하기 위해 AAV rep 및/또는 cap 유전자의 일시적인 발현을 제공하는 데 사용된다. 일반적으로, 헬퍼 구성체는 AAV ITR이 결여되어 있으며, 그 자체로 복제나 패키징할 수 없다. AAV 헬퍼 구성체는 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 바이러스, 또는 비리온의 형태일 수 있다. Rep 및 Cap 발현 산물 둘 다를 암호화하는 일반적으로 사용되는 플라스미드 pAAV/Ad 및 p1M29+45와 같은 다수의 AAV 헬퍼 구성체가 개시되어 있다. 예를 들어, 문헌[Samulski et al., (1989) J. Virol., 63:38223828; McCarty et al., (1991) J. Virol., 65:29362945] 참조. Rep 및/또는 Cap 발현 산물을 암호화하는 다수의 다른 벡터가 개시되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제5,139,941호 및 미국 특허 제6,376,237호 참조. 이러한 벡터 작제물 및 이의 제조 및 정제 방법의 구현예는 예를 들어 WO2019/094253 (PCT/US2018/058744)에 제공되어 있으며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0058] AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 포유류 세포에서의 AAV 복제 및 패키징을 허용하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 백신과 같은 폭스바이러스를 포함하는 이러한 AAV에 대한 다양한 헬퍼 바이러스가 당업계에 공지되어 있다. 아데노바이러스는 다수의 하위군을 포함하지만, 하위군 C의 아데노바이러스 5형이 헬퍼 바이러스로서 가장 통상적으로 사용된다.

[0059] "헬퍼 바이러스 기능"이라는 용어는 포유류 세포에서의 AAV 복제 및 패키징을 허용하는 헬퍼 바이러스 게놈에 암호화된 기능(들)을 지칭한다. 헬퍼 바이러스 기능에는 예를 들어, 아데노바이러스 헬퍼 기능이 포함된다. 이러한 헬퍼 바이러스 기능은, 헬퍼 바이러스의 제공에 의한 방법, 또는 예를 들어, AAV 제조에서 생산자 숙주 세포에 필요한 기능(들)을 암호화하는 핵산 서열의 제공에 의한 방법을 포함하는 다수의 방법으로 제공될 수 있다.

[0060] 용어 "향성" 및 "형질도입"은 서로 관련성을 갖지만 차이점을 갖는다. 본원에서 사용되는 바와 같이, “향성”이라는 용어는 AAV 벡터 또는 비리온이 하나 이상의 특정 세포 유형을 감염시키는 능력을 의미하지만, 벡터가 하나 이상의 특정 세포 유형으로 세포를 형질도입하는 기능을 포함할 수도 있다: 즉, 향성은 AAV 벡터 또는 비

리온의 특정 세포 또는 조직 유형(들) 내로의 우선적인 진입 및/또는 특정 세포 또는 조직 유형 내로의 진입을 용이하게 하는 세포 표면과의 우선적 상호작용을 지칭하며, 선택적으로 그리고 바람직하게는, 세포에서 AAV 벡터 또는 비리온에 의해 운반되는 서열의 발현(예를 들어, 전사 및, 선택적으로 번역), 예를 들어, 재조합 바이러스의 경우, 이종 뉴클레오티드 서열(들)의 발현이 이에 뒤따른다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "형질도입"이라는 용어는 AAV 벡터 또는 비리온이 하나 이상의 특정 세포 유형을 감염시키는 능력을 의미한다: 즉, 형질도입은 AAV 벡터 또는 비리온이 세포 내로 진입하고 AAV 벡터 또는 비리온 내에 함유된 유전 물질이 세포 내로 전달되어 벡터 게놈에 대한 발현을 수득한다는 것을 의미한다. 모든 경우는 아니지만, 일부 경우, 형질도입과 향성은 상관관계를 가질 수 있다.

[0061] 본원에서 사용되는 바와 같이, "향성 프로파일"이라는 용어는 하나 이상의 표적 세포, 조직 및/또는 기관의 형질도입 패턴을 지칭한다. 상이한 AAV 혈청형은 상이한 향성 프로파일은 나타내며, 향성은 예를 들어 캡시드 조작에 의해 변경될 수 있다.

[0062] 용어 "숙주 세포"는 관심 외인성 핵산을 포함하는 세포, 예를 들어 하나 이상의 미생물, 효모 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포를 나타낸다. 예를 들어, 숙주 세포는 AAV 헬퍼 구성체, AAV 벡터 플라스미드, 보조 기능 벡터, 및/또는 기타 전달 DNA를 포함할 수 있다. 이 용어는 형질감염된 원래 세포의 자손을 포함한다. 단일 모세포의 자손은 자연적, 우발적, 또는 의도적 돌연변이로 인해 형태나 게놈 또는 전체 DNA 보체가 원래 모세포와 반드시 완전히 동일하지 않을 수 있다.

[0063] 본원에서 사용되는 용어 "세포주"는 시험관내에서 연속적 또는 연장된 성장 및 분열이 가능한 세포 집단을 지칭한다. 특정 상황에서, 이러한 클론 집단의 저장 또는 이동 중에 핵형에서 자발적 또는 유도된 변화가 발생할 수 있다. 따라서, 언급된 세포주에서 유래된 세포가 조상 세포 또는 배양물과 정확히 동일하지는 않을 수 있으며, 언급된 세포주는 이러한 변이체를 포함한다.

[0064] "형질감염"이라는 용어는 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데 사용되며, 이에 따라, 외인성 DNA가 세포막 내부에 도입될 때 세포는 "형질감염"된다. 예를 들어, 문헌[Graham et al., (1973) Virology, 52:456; Sambrook et al., (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York; Davis et al., (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al., (1981) Gene, 13:197] 참조. 이러한 기술을 이용하여 하나 이상의 외인성 DNA 모이어티를 적합한 숙주 세포에 도입할 수 있다. 일부 구현예에서, "형질도입"이라는 용어는 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데 사용되며, 여기에서 외래 DNA는 바이러스 또는 바이러스 벡터에 의해 제공된다. 따라서, 외인성 DNA가 세포막 내부에 도입되었을 경우, 해당 세포는 "형질도입"된 것이다. 일부 구현예에서, "형질전환"이라는 용어는 박테리아 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하는 데 사용된다.

[0065] 본원에 사용된 바와 같은, "항체"라는 용어는 항원에 특이적으로 결합하는 면역글로불린 분자로부터 유래된 단백질 또는 폴리펩티드 서열을 지칭한다. 항체는 다중클론성 또는 단일클론성, 다중 또는 단일 사슬, 또는 온전한 면역글로불린일 수 있고, 천연 공급원으로부터 또는 재조합 공급원으로부터 유래될 수 있다. 자연 발생 "항체"는 이황화 결합에 의해 상호연결된 적어도 2개의 중쇄(H) 및 2개의 경쇄(L)를 포함하는 당단백질이다. 각각의 중쇄는 중쇄 가변 영역(본원에서 VH로 약칭됨) 및 중쇄 불변 영역으로 구성된다. 중쇄 불변 영역은 3개의 도메인 CH1, CH2, 및 CH3으로 구성된다. 각각의 경쇄는 경쇄 가변 영역(본원에서 VL로 약칭됨) 및 경쇄 불변 영역으로 구성된다. 경쇄 불변 영역은 하나의 도메인 CL로 구성된다. VH 및 VL 영역은 프레임워크 영역(FR)이라고 하는 더 보존된 영역이 산재된, 상보성 결정 영역(CDR)이라고 하는 초가변성 영역으로 더 세분화될 수 있다. 각각의 VH 및 VL은 다음 순서로 아미노-말단으로부터 카르복실-말단으로 배열된 3개의 CDR 및 4개의 FR로 구성된다: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. 중쇄 및 경쇄의 가변 영역은 항원과 상호작용하는 결합 도메인을 함유한다. 항체의 불변 영역은 면역계의 다양한 세포(예를 들어, 이펙터 세포) 및 고전 보체계의 첫 번째 구성요소(C1q)를 포함한, 숙주 조직 또는 인자에 대한 면역글로불린의 결합을 매개할 수 있다. 항체는 단클론 항체, 인간 항체, 인간화 항체, 낙타 항체, 또는 키메라 항체일 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 항체는 임의의 이소형(예컨대, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, 및 IgY), 클래스(예컨대, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, 및 IgA2), 또는 서브클래스의 항체일 수 있다. 본 명세서 전체에서, 용어 "항체" 또는 "항체 분자"는 또한, 문맥상 달리 지시되지 않는 한, 이의 임의의 단편 및 이의 임의의 유도체를 포함한다.

[0066] 용어 "항체 단편" 또는 "항원 결합 단편"은 항원의 에피토프와 (예를 들어, 결합, 입체 장애, 안정화/불안정화, 공간 분포에 의해) 특이적으로 상호작용하는 능력을 보유하는 항체의 적어도 일부분을 지칭한다. 항체 단편의 예는 Fab, Fab', F(ab')2, Fv 단편, scFv 항체 단편, 디술피드-연결 Fv(sdFv), VH 및 CH1 도메인으로 이루어진

Fd 단편, 선형 항체, 단일 도메인 항체, 예컨대 sdAb(VL 또는 VH), 낙타과 VHH 도메인, 힌지 영역에서 디술피드 가교에 의해 연결된 2개의 Fab 단편을 포함하는 2가 단편과 같은 항체 단편으로 형성된 다중특이성 항체, 및 항체의 단리된 CDR 또는 다른 에피토프 결합 단편을 포함하지만 이에 한정되지 않는다. 항원결합 단편은 또한 단일 도메인 항체, 맥시바디, 미니바디, 나노바디, 인트라바디, 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, v-NAR, 및 비스-scFv 내에 통합될 수 있다(예를 들어, 문헌[Hollinger and Hudson, Nature Biotechnology 23:1126-1136, 2005] 참조). 항원 결합 단편은 또한 피브로넥틴 III형(Fn3)과 같은 폴리펩티드를 기반으로 한 스캐폴드에 접목될 수 있다(피브로넥틴 폴리펩티드 미니바디를 기술한 미국 특허 제6,703,199호 참조). 용어 "scFv"는 경쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편 및 중쇄의 가변 영역을 포함하는 적어도 하나의 항체 단편을 포함하는 융합 단백질을 지칭하며, 여기서 경쇄 및 중쇄 가변 영역은 예를 들어 합성 링커, 예를 들어 짧은 유연성 폴리펩티드 링커를 통해 인접하여 연결되고, 단쇄 폴리펩티드로서 발현될 수 있고, scFv는 그것이 유래된 온전한 항체의 특이성을 유지한다. 명시되지 않는 한, 본원에서 사용되는 scFv는 예를 들어 폴리펩티드의 N-말단 및 C-말단과 관련하여, VL 및 VH 가변 영역을 어느 순서로든 가질 수 있고, scFv는 VL-링커-VH 또는 VH-링커-VL을 포함할 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 용어 "상보성 결정 영역" 또는 "CDR"은 항원 특이성 및 결합 친화성을 부여하는 항체 가변 영역 내의 아미노산의 서열을 지칭한다. 예를 들어, 일반적으로 각각의 중쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR(예를 들어, HCDR1, HCDR2, 및 HCDR3)이 존재하고 각각의 경쇄 가변 영역 내에 3개의 CDR(LCDR1, LCDR2, 및 LCDR3)이 존재한다. 주어진 CDR의 정확한 아미노산 서열 경계는 문헌 [Kabat et al. (1991), “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD](“Kabat” 넘버링 체계), 문헌[Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948](“Chothia” 넘버링 체계), 또는 이들의 조합, 및 ImMunoGenTics(IMGT) 넘버링(문헌[Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 5577 (2003)]; 문헌[Lefranc et al., (2015) Nucleic Acids Res. 43, D413-422])("IMGT" 넘버링 체계)에 기재된 것들을 포함하는, 공지된 다수의 체계들 중 임의의 것을 사용하여 결정될 수 있다. 주어진 CDR 영역(예를 들어, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 또는 LCDR3)에 대한 조합된 Kabat 및 Chothia 넘버링 체계에 있어서, 일부 실시형태에서, CDR은 Chothia CDR의 일부로서 정의된 아미노산 잔기와 함께, Kabat CDR의 일부로서 정의된 아미노산 잔기에 상응한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "Chothia" 번호 체계에 따라 정의된 CDR은 때로는 "초가변 루프"로 지칭되기도 한다. IMGT에 하에서, 항체의 CDR 영역은 IMGT/DomainGap Align 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 일반적으로, 특별히 지시되지 않는 한, 항체 분자는 하나 이상의 Kabat CDR 및/또는 Chothia CDR의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0068] 용어 "에피토프"는 면역글로불린에 특이적으로 결합할 수 있거나 달리 분자와 상호작용할 수 있는 임의의 단백질 결정기를 포함한다. 에피토프 결정기는 일반적으로, 분자의 화학적 활성 표면 그룹, 예컨대 아미노산 또는 탄수화물 또는 당 측쇄로 이루어지고, 특이적인 3차원 구조적 특성뿐만 아니라 특이적인 전하 특성도 가질 수 있다. 에피토프는 "선형" 또는 "입체형태적"일 수 있다. 입체형태적 에피토프와 선형 에피토프는 예를 들어 전자에 대한 결합이 변성 용매의 존재하에서 상실되지만 후자는 그렇지 않다는 점에서 구별된다.

[0069] 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "단클론 항체" 또는 "단클론 항체 조성물"은 실질적으로 동일한 아미노산 서열을 갖거나 동일한 유전자원으로부터 유래된 항체, 이중특이성 항체 등을 포함하는 폴리펩티드를 지칭한다. 이 용어는 또한 단일 분자 조성물의 항체 분자의 제제를 포함한다. 단클론 항체 조성물은 특정 에피토프에 대한 단일 결합 특이성 및 친화성을 나타낸다.

[0070] 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "인간 항체"는 프레임워크 영역과 CDR 영역 둘 다가 인간 기원의 서열로부터 유래된 가변 영역을 갖는 항체를 포함한다. 불변 영역도 인간 서열, 예를 들어, 인간 생식세포 계열 서열, 또는 인간 생식세포 계열 서열의 돌연변이 버전, 또는 인간 프레임워크 서열 분석으로부터 유래된 컨센서스 프레임워크 서열을 함유하는 항체로부터 유래되며, 이는 예를 들어, 문헌[Knappik, et al. (2000. J Mol Biol 296, 57-86)]에 기재된 바와 같다. 면역글로불린 가변 도메인, 예를 들어 CDR의 구조 및 위치는 잘 알려진 넘버링 체계, 예를 들어 Kabat 넘버링 체계, Chothia 넘버링 체계, 또는 Kabat와 Chothia의 조합, 및 ImMunoGenTics(IMGT) 넘버링을 이용하여 정의될 수 있다(예를 들어, 문헌[Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services (1991), eds. Kabat et al.; Al Lazikani et al., (1997) J. Mol. Bio. 273:927 948); Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit., NIH Publication no. 91-3242 U.S. Department of Health and Human Services; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al., (1989) Nature 342:877-883; 및 Al-Lazikani et al., (1997) J. Mal. Biol. 273:927948; Lefranc, M.-P., The Immunologist, 7, 132136

(1999); Lefranc, M.-P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27, 5577 (2003); Lefranc et al., (2015) Nucleic Acids Res. 43, D413-422] 참고).

[0071] 인간 항체는 인간 서열에 의해 암호화되지 않는 아미노산 잔기(예를 들어, 시험관내 무작위 또는 부위 특이적 돌연변이유발에 의해 또는 생체내 체세포 돌연변이에 의해 도입된 돌연변이, 또는 안정성 또는 제조의 촉진을 위한 보존적 치환)를 포함할 수 있다. 그러나, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "인간 항체"는 마우스와 같은 또 다른 포유동물 종의 생식세포 계열로부터 유래된 CDR 서열이 인간 프레임워크 서열에 접목된 항체를 포함하는 것으로는 의도되지 않는다.

[0072] 본원에서 사용되는 바와 같이, 어구 "재조합 항체"는 재조합적 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 모든 인간 항체, 및 재조합 인간 항체, 예컨대 인간 면역글로불린 유전자 또는 이로부터 제조된 하이브리도마에 대해 유전자이식 또는 염색체이식된 동물(예를 들어, 마우스)로부터 단리된 항체, 인간 항체를 발현하도록 형질전환된 숙주 세포, 예를 들어 트랜스펙토마(transfectoma)로부터 단리된 항체, 재조합형 조합 인간 항체 라이브러리로부터 단리된 항체, 및 인간 면역글로불린 유전자, 서열의 전부 또는 일부를 다른 DNA 서열로 스플라이싱하는 것을 수반하는 임의의 다른 수단에 의해 제조, 발현, 생성, 또는 단리된 항체를 포함한다. 이러한 재조합 인간 항체는, 프레임워크 영역 및 CDR 영역이 인간 생식세포 계열 면역글로불린 서열로부터 유래된 가변 영역을 가진다. 그러나 특정 실시형태에서 이러한 재조합 인간 항체는 시험관 내 돌연변이유발(또는, 인간 Ig 서열에 대한 유전자이식 동물이 사용될 때, 생체 내 체세포 돌연변이유발) 처리될 수 있고, 따라서 재조합 항체의 VH 및 VL 영역의 아미노산 서열은, 인간 생식세포 계열 VH 및 VL 서열로부터 유래되고 이와 관련되지만, 생체 내 인간 항체 생식세포 계열 레퍼토리 내에 자연적으로 존재하지 않을 수 있는 서열이다.

[0073] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "친화도"는 단일 항원 부위에서의 항체와 항원 사이의 상호작용의 강도를 의미한다. 각각의 항원 부위 내에서, 항체의 가변 영역은 많은 부위에서 약한 비공유적 힘을 통해 항원과 상호작용하며; 상호작용이 많을수록 친화도는 더 강하다. 본원에서 사용되는 바와 같이, IgG 항체 또는 이의 단편(예를 들어, Fab 단편)에 대한 "고친화도"라는 용어는 표적 항원에 대해 10^{-8} M 이하, 10^{-9} M 이하, 또는 10^{-10} M, 또는 10^{-11} M 이하, 또는 10^{-12} M 이하, 또는 10^{-13} M 이하의 친화도를 갖는 항체를 지칭한다. 그러나, 고친화도 결합은 다른 항체 이소형에 있어서 상이할 수 있다. 예를 들어, IgM 이소형에 있어서 고친화도 결합은 10^{-7} M 이하 또는 10^{-8} M 이하의 친화도를 갖는 항체를 지칭한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "결합 특이성" 또는 "특이적으로 결합하는"은 하나의 항원 결정부위와 반응하고 다른 항원 결정부위와는 반응하지 않는 개별 항체 결합 부위의 능력을 지칭한다. 항체의 결합 부위는 이 분자의 Fab 부분에 위치하고, 중쇄 및 경쇄의 초가변 영역으로부터 구축된다. 항체의 결합 친화도는 단일 항원 결정기와 항체 상의 단일 결합 부위 사이의 반응의 강도이다. 이는 항원 결정기와 항체의 결합 부위 사이에 작용하는 인력과 척력의 합이다.

[0075] 용어 "치료하다" 및 "치료"는 치료적 처치를 지칭하며, 여기에서 이의 목적은 원하지 않는 생리적 변화 또는 장애를 둔화시키는 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 유익하거나 요망되는 임상 결과는 검출 가능하건 검출 가능하지 않건, 증상의 경감, 질환 정도의 감소, 질환의 안정화된(즉, 악화되지 않는) 상태, 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(부분적이거나 전체적이거나 무관하게)를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않는 경우의 예상 생존 대비 생존 연장을 의미할 수 있다.

[0076] 임의의 특정 질환 또는 장애의 "예방", "예방하다" 및 "예방하는"이라는 용어는 해당 질환 또는 장애의 임의의 증상이 나타나기 전에 본 발명의 화합물을 대상체에게 투여하는 것과 같은 예방적 또는 방지적 조치를 지칭한다.

[0077] 용어 "대상체"는 본 발명의 방법에 따른 치료가 제공되는 동물, 인간 또는 비-인간을 나타낸다. 수의학적 및 비-수의학적 적용이 고려된다. 용어에는 비제한적으로 포유류, 예컨대, 인간, 다른 영장류, 돼지, 설치류, 예컨대 마우스 및 래트, 토끼, 기니피그, 햄스터, 소, 말, 고양이, 개, 양 및 염소가 포함된다. 전형적인 대상체에는 인간, 농장 동물, 및 가내 애완동물, 예컨대 고양이 및 개가 포함된다. 일부 바람직한 실시형태에서, 대상체는 인간이다.

[0078] 용어 "약학적으로 허용 가능한" 및 "생리학적으로 허용 가능한"은 본원에서 상호교환적으로 사용되며, 생체 내 전달 또는 접촉에 있어서 하나 이상의 투여 경로에 적합한 생물학적으로 허용되는 제형, 기체, 액체 또는 고체를 지칭한다. "약학적으로 허용 가능한" 또는 "생리학적으로 허용 가능한" 조성물은 생물학적으로 또는 달리 바

람직하지 않은 물질이 아니며, 예를 들어, 해당 물질은 실질적으로 바람직하지 않은 생물학적 효과의 유발 없이 대상체에게 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 약학적 조성물은 예를 들어 본원에 개시된 바와 같은 rAAV 비리온의 대상체에 대한 투여에 사용될 수 있다.

[0079] "유효량"은 유익하거나 요망되는 결과를 가져오기에 충분한 양을 나타낸다. 예를 들어, 치료적 양은 원하는 치료 효과를 달성하는 양이다. 상기 양은 질병 또는 질병 증상의 개시를 방지하는 데 필요한 양인 예방 유효량과 동일하거나 상이할 수 있다. 유효량은 하나 이상의 투여, 도포 또는 투여량으로 투여될 수 있다. 치료 화합물의 "치료적 유효량"(즉, 유효 투여량)은 선택되는 치료 화합물에 따라 달라진다. 조성물은 2일 1회를 포함하여, 1일 1회 이상 내지 1주 1회 이상 투여될 수 있다. 당업자는, 대상체의 질환 또는 장애의 중증도, 이전 치료, 일반 건강 및/또는 연령, 및 존재하는 다른 질환을 포함하나 이에 한정되지 않는 특정 요인이 대상체를 효과적으로 치료하기 위해 요구되는 투여량 및 시점에 영향을 미칠 수 있음을 이해할 것이다. 또한, 본원에서 기재되는 치료 화합물의 치료적 유효량을 이용한 대상체의 치료는 단회 치료 또는 일련의 치료를 포함할 수 있다.

[0080] 본원에서 사용되는 바와 같이, "시험관 내"에서 수행되는 과정은 인공 배양 배지의 시험관, 플라스크, 페트리 접시에서 수행되는 연구와 같은 정상적인 생물학적 환경 외부에서 수행되는 과정을 의미한다. "생체 내"에서 수행되는 과정은 세포 배양물 또는 마우스에서 수행되는 연구와 같은 살아있는 유기체 또는 세포 내에서 수행되는 과정을 의미한다. "세포 외"에서 수행되는 연구는 예를 들어 생체 내 실험에서 가능할 수 있는 연구에 비해 보다 제어된 조건 하에서 유기체의 세포 또는 조직을 조작할 수 있는, 예를 들어 자연 조건의 최소한의 변경을 가진 외부 환경에서 유기체로부터의 조직 내에서 또는 조직에 대해 수행되는 연구를 의미한다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "라이브러리"는 다수의, 즉 적어도 두 개의 상이한 변이체 선형 핵산, 플라스미드, 바이러스 입자 또는 바이러스 벡터 등을 지칭한다.

[0082] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술되는 것과 유사하거나 동등한 방법 및 물질이 본 발명의 실시에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 이하에 기술된다. 본원에 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특허 및 기타 참고문헌은 그 전체가 참조로 포함된다. 상충하는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선한다. 또한, 물질, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며, 제한하고자 하는 것이 아니다.

[0083] 본 발명의 하나 이상의 구현예의 세부 사항은 하기의 첨부된 도면 및 설명에 기재되어 있다. 본 발명의 다른 특징, 목적 및 장점은 이러한 설명 및 도면으로부터, 그리고 청구항으로부터 명확해질 것이다.

[0084] **AAV VP2 융합 폴리펩티드**

[0085] N-말단으로부터 C-말단까지, 폴리펩티드 리간드, 선택적으로 펩티드 링커, 및 AAV VP2 캡시드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하며 그 표면에 폴리펩티드 리간드를 나타내는 rAAV 비리온은 높은 세포 유형 선택성 및/또는 높은 표적 특이성을 제공하여 제한된 생물학적 분포 및 안전한 유전자 전달을 허용하기 때문에, 치료적 응용 및 기초 연구 응용 동안 세포 유형 특이적 유전자 전달에 사용될 수 있다.

[0086] rAAV 비리온 조립체에 사용될 경우, 일반적으로 AAV VP1 및/또는 VP3 캡시드 폴리펩티드와 함께 사용되는 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 만족스러운 수의 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 rAAV 비리온 내에 통합된다는 것을 의미하는, 양호한 장식 수준을 나타낼 수 있다. 놀랍게도, 최대 10 kDa의 분자량을 갖는 폴리펩티드 리간드의 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에 대한 N-말단 융합에 의해 양호한 장식 수준이 달성될 수 있다는 것이 밝혀졌다. N-말단에 위치된 10 kDa 초과의 분자량을 갖는 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에서, 장식 수준은 감소한다. N-말단에 위치된15 kDa 초과의 분자량을 갖는 폴리펩티드 리간드, 예컨대 약 18 kDa의 분자량을 갖는 Darpin을 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 장식이 없거나 최소한의 장식만을 나타낸다. 이론에 구속되지 않고, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 캡시드 조립체에 필수적인 것은 아니기 때문에, 바람직하지 않은 구조를 가진 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 예컨대 부피가 큰 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 제공하는 경우, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 캡시드 조립체에 사용되지 않을 수 있으며, 이는 AAV VP1 및 VP3 캡시드 폴리펩티드로만 구성되거나 또는 주로 이들로 구성된, AAV VP2 융합 폴리펩티드 장식이 없거나 매우 적은 rAAV 비리온의 생성을 야기할 수 있다.

[0087] 본원에 기술되는 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않았지만, 이를 제외하고는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 VP2 캡시드 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에 비해 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 개선된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 매개할 수 있다. 적어도 하나의 조직

또는 세포 유형에서의 개선된 형질도입 및/또는 이에 대한 증가된 향성은 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형 상에서 발현된 세포 표면 분자에 결합하는 능력을 가질 수 있는 폴리펩티드 리간드에 의해 매개될 수 있다. 10 kDa 미만의 분자량을 갖는 적합한 폴리펩티드 리간드는 GP2 및 Sso7d 리간드 및 아피바디를 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0088] 본 발명은 부분적으로, 고도로 다양한 폴리펩티드 리간드 라이브러리의 혼입, 예를 들어 고도로 다양한 Sso7d 라이브러리를 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합시킴으로써 이러한 라이브러리를 rAAV 비리온 내에 혼입시키는 것에 기초한다. 캡시드에 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 다수의 rAAV 비리온을 포함하고, 상기 캡시드 내에 캡슐화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 AAV 라이브러리가 생성되었다. AAV 라이브러리는 높은 다양성 및 기능적 역가를 가지며, 원하는 특성을 가진 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 생체 내 선택에 사용될 수 있다. 특정 세포 유형의 높은 형질도입으로 AAV 캡시드를 풍부하게 하는 생체 내 선택에 의해 수득된 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0089] 본원에 제공되는 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 재조합 AAV 벡터의 생성에 사용될 수 있다. 이러한 재조합 AAV 벡터는 치료 이식유전자와 같은 치료 이종 핵산의 표적 세포 내로의 전달에 적합할 수 있다.

[0090] 따라서, 일 양태에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 아데노 연관 바이러스(AAV) VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 폴리펩티드는 직접적으로, 또는 링커를 통해 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합된다. 폴리펩티드는, 최대 9 kDa, 최대 8 kDa, 최대 6 kDa 또는 최대 5 kDa, 예를 들어, 3 내지 10 kDa, 4 내지 8 kDa, 5 내지 7 kDa를 포함하는, 최대 10 kDa의 분자량을 갖는다.

[0091] 일 양태에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되고; AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 및/또는 시알산(SIA)에 대한 결합을 폐기하거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함한다. 일부 구현예에서, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는다.

[0092] "AAV"는 아데노-연관 바이러스에 대한 약어이며, 이는 해당 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. 이 용어는 달리 요구되지 않는 한, 모든 하위유형, 그리고 자연 발생 및 재조합 형태 둘 다를 모두 포괄한다. 용어 "AAV"에는, 예를 들어, AAV 유형 1(AAV1), AAV 유형 2(AAV2), AAV 유형 3(AAV3), AAV 유형 4(AAV4), AAV 유형 5(AAV5), AAV 유형 6(AAV6), AAV 유형 7(AAV7), AAV 유형 8(AAV8), AAV 유형 9(AAV9), AAV 유형 10(AAVrh10을 포함하는 AAV10), AAV 유형 12(AAV12), 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV, 및 양 AAV가 포함된다. "영장류 AAV"는 영장류를 감염시키는 AAV를 나타내며, "비-영장류 AAV"는 비-영장류를 감염시키는 AAV를 나타내고, "소 AAV"는 소 포유류를 감염시키는 AAV를 나타내는 등이다.

[0093] 다양한 혈청형의 AAV의 게놈 서열뿐만 아니라 천연 역위 말단 반복부(ITR), Rep 단백질, 및 캡시드 서브유닛의 서열 또한 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌 또는 공개 데이터베이스, 예컨대 GenBank에서 확인될 수 있다. 예를 들어, GenBank 등록 번호 NC-002077 (AAV1), AF063497 (AAV1), NC-001401 (AAV2), AF043303 (AAV2), NC-001729 (AAV3), NC-001829 (AAV4), U89790 (AAV4), NC-006152 (AAV5), AF513851 (AAV7), AF513852 (AAV8), 및 NC-006261 (AAV8); 또는 그 개시 내용이 본원에 참조로 포함되는 간행물, 예컨대 WO 2005033321 (AAV1-9)를 참조한다. 또한 예를 들어 문헌[Srivistava et al. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini et al. (1998) J. Virology 71 :6823; Chiorini et al. (1999) J. Virology 73: 1309; Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73:939; Xiao et al. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208; Shade et al.,(1986) J. Virol. 58:921; Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854; Moris et al. (2004) Virology 33:375-383]; 국제 공개 제WO 00/28061호, 제WO 99/61601호, 제WO 98/11244호; 및 미국 특허 제6,156,303호를 참조한다.

[0094] 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드 리간드는 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형 상에서 발현된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합한다. 일부 구현예에서, 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 상기 폴리펩티드 리간드를 포함하지 않지만, 이를 제외하고는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 VP2 캡시드 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에 비해 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 매개한다.

[0095] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형의 형질도입은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 또는 1000% 만큼 증가된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 상기 폴리펩티드 리간드를 포함하지 않지만, 이를 제외하고는 AAV VP2

융합 폴리펩티드에 포함된 VP2 캡시드 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에 비해 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 적어도 2-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 15-배, 적어도 20-배, 적어도 25-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배, 적어도 1000-배 또는 1000-배 이상의 증가된 형질도입을 매개한다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 향성은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 또는 1000% 만큼 증가된다.

[0096] 일부 구현예에서, 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐 또는 골수 세포, 또는 다능성 전구체 세포(MPP), 예컨대 다능성 조혈 전구체 세포, 또는 조혈 줄기 세포(HSC), 예컨대 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)의 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 매개한다.

[0097] 일 양태에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 직접적으로, 또는 링커를 통해 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0098] 본원에서 사용되는 바와 같이, "GP2 폴리펩티드"라는 용어는 45-잔기 T7 파지 유전자 2 단백질(Gp2)로부터 유래된 폴리펩티드 스캐폴드를 지칭하는 데 사용된다. 이러한 폴리펩티드는 돌연변이에 적절한 두 개의 인접한 루프가 있는 β-시트 반대편에 α-나선을 함유한다. 이러한 스캐폴드의 돌연변이생성은 높은 친화도의 표적 특이적 결합제를 제공할 수 있다.

[0099] 본원에서 사용되는 바와 같이, "Sso7d 폴리펩티드"라는 용어는 초고온성 고세균 술포로부스 솔파타리쿠스(Sulfolobus solfataricus)의 Sso7d 단백질로부터 유래된 폴리펩티드를 지칭하는 데 사용된다. 이 단백질은 크기가 작고(7 kDa), 열 안정성이 높으며(98℃ Tm), 시스테인 및 글리코실화 부위를 갖지 않기 때문에 결합 스캐폴드로서 매력적이다. 일부 구현예에서, Sso7d는 S. 솔파타리쿠스의 전하 중성 변이체, 특히 문헌[Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/ jbc.M116.741314)]에 기술된 전하 감소 Sso7d(rcSso7d) 변이체로부터 유래된다. 본원에서 사용되는 바와 같이, Sso7d 폴리펩티드는 또한, 전장에 걸쳐, 문헌[Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/ jbc.M116.741314)]에 기술된 야생형 Sso7d 또는 rcSso7d에 대해 적어도 약 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%의 서열 동일성을 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0100] 일부 구현예에서. 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0101] 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 선택적으로 최대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 보유하는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드로부터 선택된다.

[0102] 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0103] 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y, W 및 아미노산 치환으로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드로부터 선택되며, 여기에서 서열번호 1은 선택적으로 최대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 보유한다.

[0104] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 폴리펩티드 리간드와 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 사이에 위치된 펩티드 링커를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 펩티드 링커는 글리신-세린(GS) 링커 및 알라닌-프롤린-세린(APS) 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. GS 링커는 예를 들어, 식 [GGGGS]n으로 표시될 수 있으며, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 예를 들어, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 특히, n은 1, 2, 3 또는 4이다. APS 링커는 예를 들어, 식 [APS]n으로 표시될 수 있으며, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 예를 들어, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 특히, n은 2, 3, 4 또는 5이다.

[0105] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형이다. 특정 구현예에서,AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형이다.

[0106] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드

를 포함하는 AAV 비리온의 표적 세포 상에 존재하는 이의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "자연 수용체"라는 용어는, 예를 들어, 혈청형 2의 AAV에 대한 주요 세포 수용체인 것으로 밝혀진, 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPG); 혈정형 1, 5 및 6의 AAV에 대한 주요 세포 수용체인 것으로 밝혀진, 글리칸을 함유하는 N-연결 시알산; 혈청형 4 및 9의 AAV에 대한 주요 세포 수용체인 것으로 밝혀진, 글리칸을 함유하는 O-연결 시알산; 혈청형 2의 AAV에 대한 이차 수용체 또는 이보다는 공동 수용체로서 작용하는, αVß5 인테그린, α5ß1 인테그린, CD9 및 간세포 성장 인자 수용체; 혈청형 2, 3, 8 및 9의 AAV에 대한 이차 수용체 또는 이보다는 공동 수용체로서 작용하는, 기본 섬유아세포 성장 인자 수용체 및 37/67 kDa 라미닌 수용체(LamR); 및/또는 혈청형 AAV-5에 대한 이차 수용체 또는 이보다는 공동 수용체로 작용하는 혈소판 유래 성장 인자 수용체(PDGFR)를 지칭한다. 일부 구현예에서, 자연 수용체에 대한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 적어도 하나의 필수적인 결합 부위는 돌연변이된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 자연 수용체에 대한 상기 적어도 하나의 결합 부위는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 VP3 영역 내, 즉 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 폴리펩티드 사이에 공유되는 영역 내에 위치된다. VP1 및 VP2 단백질을 암호화하는 영역은 VP3 단백질을 암호화하는 영역의 N-말단 연장을 나타낸다. 따라서, VP3 영역의 돌연변이가 3개의 캡시드 단백질 모두에 존재하도록, VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 영역의 판독 프레임은 중첩된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이고, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이고, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, i) K531E 및 V473D; ii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; iii) G266A 및 N269Q; iv) G266A, N269Q 및 D590A; v) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 vi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0107] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, i) G268E 및 N271Q; ii) S387A; iii) G268E, N271Q 및 S387A; iv) A592Q; 또는 v) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0108] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이고, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이고, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, i) W503A; ii) N562A 및 E563A; iii) Q590A 및 W503A; 또는 iv) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0109] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이고, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0110] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에, V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, i) V473D 및 N500E; ii) R514A; 또는 iii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0111] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 이의 각각의 야생형 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 대비, 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 본 발명자들은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 특정 아미노산 치환이 개선된 수용체 결합, 예를 들어 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 리간드에 대한 수용체에 대한, 돌연변이된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 개선된 결합을 야기할 수 있음을 입증하였다. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 아미노산 치환은 또한 개선된 형질도입을 야기할 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 수용체 결합 및/또는 형질도입을 개선하는 것으로서 본 발명자들에 의해 식별된 아미노산 치환은 AAV 비리온에서 VP2 N-말단의 보다 높은 비율이 바이러스 입자의 외부를 향하게 하는 결과를 야기하는 것으로 사료된다. 자연 상태에서, AAV 비리온에 존재하는 대부분의 VP2 N-말단은 AAV 캡시드의 내부를 향하며, 이에 따라 VP2 N-말단에 융합된 리간드에 대한 AAV 비리온의 장식 수준을 제한한다. AAV 바이러스에서, 바이러스 입자가 외부를 향하는 VP2 N-말단의 부분을 증가시킴으로써, 즉 AAV 비리온의 VP2 노출을 증가시킴으로써, VP2 N-말단에 융합된 리간드를 갖는 장식 수준이 증가하며, 이는 수용체 결합 및 형질도입 수준을 개선시

킨다.

[0112] 따라서, 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하고, 특히, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및 P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0113] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, V473D 및 N500E의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0114] 다른 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D214A, K163R 및 P192N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0115] 이러한 다른 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이고, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 이러한 특정 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하고, 특히 D213A, S162R, 및 P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0116] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 천연 개시 코돈을 포함하지 않는다. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 천연 개시 코돈은, VP2 개방 판독 프레임의 전사를 억제함으로써 천연 VP2 폴리펩티드의 발현을 회피하기 위해, 돌연변이, 예를 들어 결실될 수 있다. 바람직하게는, 이러한 돌연변이는 판독 프레임을 변경시키지 않는다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에는 이의 제1 천연 아미노산, 예를 들어, 이에 상응하는 야생형 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 제1 트레오닌이 누락된다.

[0117] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 폴리펩티드 리간드는 최대 3개의 시스테인 잔기, 최대 2개의 시스테인 잔기, 최대 1개의 시스테인 잔기를 포함하거나, 시스테인 잔기를 포함하지 않는다.

[0118] **AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 AAV 카고 핵산 서열**

[0119] 일 양태에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산이 본원에 기술된다. AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 RNA, 예컨대 mRNA, 또는 DNA, 예컨대 cDNA, 선형 DNA 또는 원형 DNA, 예를 들어, 플라스미드 DNA일 수 있다.

[0120] 또한, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 AAV 캡시드에 의해 캡슐화될 수 있는 핵산 및 해당 핵산을 포함하는 rAAV 비리온이 본원에 기술된다. 본원에서, 이러한 핵산은 "AAV 게놈", "AAV 벡터 게놈", "AAV 벡터", "AAV 벡터 핵산", "AAV 카고", 또는 "카고 플라스미드"로 지칭되며, 이들 용어는 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 이러한 AAV 카고 또는 AAV 벡터 게놈은 일반적으로 2개의 AAV 역위 종결 반복 서열을 포함한다. AAV 카고는 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화할 수 있고/있거나 리포터 서열 및/또는 바코드 서열을 포함할 수 있거나, AAV 카고는 치료 항체 또는 이의 단편을 포함하는 치료 RNA 또는 단백질을 암호화할 수 있다.

[0121] AAV 벡터 게놈은 단일 가닥 또는 자기상보성일 수 있다. "자기상보성 AAV" 또는 "scAAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해 운반되는 코딩 영역이 분자 내 이중-가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 이론에 구속되지 않고, 감염시 제2 가닥의 세포 매개 합성을 기다리지 않고, scAAV의 2개의 상보적인 반쪽이 결합하여 즉각적인 복제 및 전사를 위해 준비된 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 단위를 형성할 수 있다. 예를 들어, 문헌[D M McCarty et al, "Self-complementary Recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 12481254](그 전체가 참고로 포함됨)을 참고한다. 자기상보성 AAV는 예를 들어, 미국 특허 번호 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기재되어 있으며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함

된다. 예를 들어, 5' ITR은 예를 들어, 게놈의 헤어핀 형성을 허용하기 위해 말단 분해 부위를 결실시킴으로써 돌연변이될 수 있다.

[0122] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 rAAV 벡터는 하나 이상의(예를 들어, 모든) AAV rep 및/또는 cap 유전자가 결여되어 있다. AAV 벡터는 임의의 적합한 AAV 혈청형으로부터의 핵산 서열(예: DNA)을 (예를 들어, ITR에) 포함할 수 있다. 적절한 AAV 혈청형은 AAV 혈청형: AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 예를 들어, AAV 벡터(예: scAAV 벡터)는 AAV-2로부터의 핵산 서열, 예를 들어 AAV-2로부터의 ITR 서열을 포함할 수 있다. AAV 벡터(예: scAAV 벡터)는 또한 둘 이상의 혈청형으로부터의 핵산을 포함할 수 있다. AAV 혈청형의 게놈의 뉴클레오티드 서열은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, AAV-1의 완전한 게놈은 GenBank 수탁번호 NC_002077에 제공되어 있고; AAV-2의 완전한 게놈은 GenBank 수탁번호 NC 001401 및 문헌[Srivastava et al., Virol., 45: 555-564 (1983)]에 제공되어 있고: AAV-3의 완전한 게놈은 GenBank 수탁번호 NC_1829에 제공되어 있고; AAV-4의 완전한 게놈은 GenBank 수탁번호 NC_001829에 제공되어 있고; AAV-5 게놈은 GenBank 수탁번호 AF085716에 제공되어 있고; AAV-6의 완전한 게놈은 GenBank 수탁번호 NC_00 1862에 제공되어 있고; AAV-7 및 AAV-8 게놈의 적어도 일부는 GenBank 수탁번호 AX753246 및 AX753249에 각각 제공되어 있고; AAV-9 게놈은 문헌[Gao et al., J. Virol., 78: 6381-6388 (2004)]에 제공되어 있고; AAV-10 게놈은 문헌[Williams, (2006) Mol. Ther., 13(1): 67-76]에 제공되어 있고; AAV-11 게놈은 문헌[Mori et al., (2004) Virology, 330(2): 375-383]에 제공되어 있다.

[0123] 일부 구현예에서, 기능적 역위 말단 반복부(ITR) 서열을 사용하여, 예를 들어 AAV 비리온의 구조, 복제, 및 패키징을 지원할 수 있다. 따라서, 본원에 개시된 AAV 벡터는 바이러스의 복제 및 패키징(예를 들어, 기능적 ITR)을 시스로 제공하는 서열을 포함할 수 있다. ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열일 수 있지만 그럴 필요는 없으며, 서열이 기능적 구조, 복제, 및 패키징을 제공하는 한, 예를 들어 뉴클레오티드의 삽입, 결실, 또는 치환에 의해 변경될 수 있다. ITR은 재조합 바이러스가 유래될 수 있는 임의의 AAV 혈청형(AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5을 포함하나, 이에 한정되지 않음)으로부터 유래될 수 있다.

[0124] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 rAAV 벡터는 이종 핵산(예를 들어, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및/또는 리포터 단백질 또는 치료 RNA 또는 단백질을 암호화하는 핵산) 및/또는 위에서 논의된 다른 핵산 요소의 하나의 상류 및 다른 하나의 하류를 갖는, 하나 이상의 ITR, 예를 들어 2개의 ITR을 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 게시된 핵산, 예를 들어 scAAV 벡터의 핵산은, 다른 벡터 요소의 5'에 배치된 제1 ITR 및 3'에 배치된 제2 ITR을 포함하며, 여기에서 ITR은 독립적으로 다른 요소의 5' 및/또는 3'의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 50, 100, 150, 200, 250개의 뉴클레오티드이다. ITR 서열은 야생형일 수 있거나, 예를 들어 야생형 ITR의 하나 이상의 기능을 보유하는 한, 하나 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 야생형 ITR은 말단 분해 부위의 결실을 포함하도록 변형될 수 있다. 일부 구현예에서, 본원에 개시된 바와 같은 scAAV는 2개의 ITR 서열을 포함할 수 있으며, 이 둘은 독립적으로 야생형, 변이체, 또는 변형된 AAV ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 ITR 서열은 야생형, 변이체, 또는 변형된 AAV ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 2개의 ITR 서열은 둘 다 야생형, 변이체, 또는 변형된 AAV ITR 서열이다. 일부 구현예에서, "좌측" 또는 5'-ITR은 자기상보성 게놈의 생성을 가능하게 하는 변형된 AAV ITR 서열이고, "우측" 또는 3'-ITR은 야생형 AAV ITR 서열이다. 일부 구현예에서, "우측" 또는 3'-ITR은 자기상보성 게놈의 생성을 가능하게 하는 변형된 AAV ITR 서열이고, "좌측" 또는 5'-ITR은 야생형 AAV ITR 서열이다. 일부 구현예에서, 두 ITR은 모두 AAV2 ITR이다(선택적으로, 이 중 하나는 야생형이고 다른 하나는 말단 분해 부위가 제거되도록 변형되거나, 둘 모두 야생형임). 그 전체가 본원에 참조로 포함되는 WO/2019/094253(PCT/US2018/058744)에 제공된 AAV ITR의 구현예 또한 본원에 개시된 임의의 AAV ITR에 대해 사용될 수 있다.

[0125] 폴리뉴클레오티드 서열은 신규 합성(예를 들어, 고상 DNA 합성)에 의해, 또는 기존 서열을 템플릿으로 사용하는 PCR에 의해 생성될 수 있다. 핵산의 직접적인 화학적 합성은 당업계에 공지된 방법, 예컨대 문헌[Narang et al., 1979, Meth. Enzymol. 68:90의 포스포트리에스테르 방법; Brown et al., Meth. Enzymol. 68:109, 1979의 포스포디에스테르 방법; Beaucage et al., Tetra. Lett., 22:1859, 1981의 디에틸포스포르아미다이트 방법]; 및 미국 특허 제4,458,066호의 고체 지지체 방법에 의해 달성될 수 있다. PCR에 의한 폴리뉴클레오티드 서열로의 돌연변이 도입은, 예를 들어, 문헌[PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H. A. Erlich (Ed.), Freeman Press, NY, N.Y., 1992; PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications,

Innis et al. (Ed.), Academic Press, San Diego, Calif., 1990; Mattila et al., Nucleic Acids Res. 19:967, 1991; 및 Eckert et al., PCR Methods and Applications 1:17, 1991]에 기술된 바와 같이 수행될 수 있다.

[0126] 또한, 본원에 기술되고/되거나 리포터 서열을 포함하고/하거나 바코드 서열을 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 또는 치료 RNA 또는 단백질(치료 항체 또는 이의 단편을 포함함)을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)가 본원에 제공된다. 이러한 벡터는, 예를 들어 시험관 내, 생체 외 또는 생체 내 세포에서, 예를 들어 유기체의 조직 또는 관심 조직에서, 관심 RNA 또는 단백질, 예컨대 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 발현시키고/시키거나 생산하는 데 사용될 수 있다. 다양한 발현 벡터를 사용하여 관심 RNA 또는 단백질, 예컨대 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 발현시킬 수 있다. 바이러스 기반 발현 벡터 및 비-바이러스 발현 벡터 둘 모두가, 세포, 예를 들어 포유동물 세포에서 관심 RNA 또는 단백질을 생산하는 데 사용될 수 있다. 비-바이러스 벡터 및 시스템은, 전형적으로 단백질 또는 RNA를 발현시키기 위한 발현 카세트와 함께 플라스미드, 에피솜 벡터, 및 인간 인공 염색체(예를 들어, 문헌[Harrington et al., Nat Genet. 15:345, 1997] 참조)를 포함한다. 이러한 비-바이러스 벡터는 예를 들어 지질(예를 들어, 리포펙타민), 전기천공, 기계적 세포막 왜곡 등을 사용하여 당 업계에 공지된 형질감염 또는 형질도입 방법을 사용하여 관심 세포로 전달될 수 있다. 용어 "발현 벡터"는 요망되는 코딩 서열이 발현될 수 있는 세포 내로의 도입을 위해 삽입될 수 있는 담체 핵산 분자를 나타낸다. 벡터는 DNA 벡터, RNA 벡터, 플라스미드, 코스미드, 또는 바이러스 벡터, 또는 인공 염색체일 수 있다(예컨대, 문헌[Harrington et al., Nat Genet 15:345, 1997] 참조). 예를 들어, 포유동물(예를 들어, 인간) 세포에서, 관심 RNA 및 단백질, 예컨대 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 발현에 유용한 비-바이러스 벡터는 pThioHis A, B 및 C, pcDNA3.1/His, pEBVHis A, B 및 C(Invitrogen, San Diego, Calif.), MPSV 벡터, 및 단백질 발현을 위한 당업계에 공지된 다수의 다른 벡터를 포함한다. 예를 들어, 벡터의 일 부류는 동물 바이러스, 예컨대 소 유두종 바이러스, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, 백시니아 바이러스, 배큘로바이러스, 레트로바이러스(라우스 육종 바이러스, MMTV 또는 MOMLV) 또는 SV40 바이러스로부터 유래되는 DNA 요소를 이용한다. 또 다른 부류의 벡터는 RNA 바이러스, 예컨대 셈리키 포레스트 바이러스, 동부 말 뇌염 바이러스 및 플라비바이러스로부터 유래되는 RNA 요소를 이용한다. 유용한 바이러스 벡터는 아래의 바이러스 중 어느 하나를 기반으로 하는 벡터를 포함한다: 레트로바이러스(예를 들어, 렌티바이러스), 렌티바이러스, 아데노바이러스, 아데노-관련 바이러스, 헤르페스 바이러스(예를 들어, 단순 포진 바이러스(HSV)), SV40을 기반으로 하는 벡터, 유두종 바이러스, HBP 엡스타인 바(Epstein Barr) 바이러스, 백시니아 바이러스, 신비스(Sinbis) 바이러스, 인플루엔자 바이러스, 레오바이러스, 뉴캐슬병 바이러스(NDV), 홍역 바이러스, 수포성 구내염 바이러스(VSV), 파보바이러스, 폴리오바이러스, 폭스바이러스, 세네카 밸리(Seneca Valley) 바이러스, 콕사키바이러스, 엔테로바이러스, 점액종 바이러스, 마라바 바이러스, 또는 셈리키 포레스트 바이러스(SFV). 상기 문헌[Brent et al.]; 문헌[Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995; 및 Rosenfeld et al., Cell 68:143, 1992]을 참조한다. 일부 구현예에서, 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터, 예를 들어, 재조합 AAV(rAAV) 벡터이다.

[0127] 일부 구현예에서, 벡터는, 본원에 기술되고/되거나 리포터 서열을 포함하고/하거나 바코드 서열을 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 또는 치료 RNA 또는 단백질(치료 항체 또는 이의 단편을 포함함)을 암호화하는 핵산을 포함하는 벡터(예를 들어, 발현 벡터)를 포함하는, 재조합 DNA 분자일 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "재조합"은 벡터, 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 세포가 클로닝, 제한효소 처리 또는 결찰 단계(예컨대 내부에 포함된 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 관련됨) 및/또는 자연에서 발견되는 생성물과는 다른 작제물을 생성하는 다른 절차들의 다양한 조합의 생성물임을 의미한다. 재조합 바이러스 또는 벡터는 재조합 폴리뉴클레오티드를 포함하는 바이러스 입자이다. 이 용어에는 각각 원래의 폴리뉴클레오티드 작제물의 복제물 및 원래의 바이러스 작제물의 자손이 포함된다.

[0128] 재조합 벡터는 전형적으로, 발현될 핵산 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 조절 서열이 포함된다. 용어 "조절 서열"은 프로모터, 인핸서, 및 다른 발현 제어 요소(예컨대, 폴리아데닐화 신호)가 포함된다. 당업자는 표적 세포 내 벡터의 하나 이상의 성분의 발현은 조절 서열을 필요로 할 수 있음을 인지할 것이다. 조절 서열은 뉴클레오티드 서열뿐만 아니라 조직-특이적 조절 및/또는 유도성 서열의 구성적 발현을 지시하는 서열을 포함한다. 발현 벡터는 또한 숙주 세포에서 메신저 RNA 안정성 및 번역 가능성을 최적화하기 위해 설계된 요소 및/또는 본원에 기술된 바와 같은 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 발현하는, 지속적이고 안정적인 세포 클론을 확립하기 위한 약물 선택 마커를 포함할 수 있다. 발현 벡터의 설계는 형질전환될 숙주 세포의 선택, 요구되는 단백질의 발현 수준 등과 같은 요인에 의존할 수 있다. 이러한 재조합 발현 벡터의 일반적인 생성 방법은 당업계에 공지된 다른 것들 중에서도, 문헌[Sambrook and Russell eds. (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual,

3rd edition; Ausubel et al. eds. (2007(2010년까지 업데이트됨)) Current Protocols in Molecular Biology 시리즈]에서 찾을 수 있다.

[0129] 또한 코딩 서열의 효율적 번역을 위해 특정 개시 신호가 필요할 수 있다. 이들 신호는 ATG 개시 코돈 및 인접 서열을 포함한다. ATG 개시 코돈을 포함하는 외인성 번역 제어 신호가 제공될 필요가 있을 수 있다. 당업자는 용이하게 이를 결정하고 필요한 신호를 제공할 수 있을 것이다. 전체 삽입물의 번역을 보정하기 위해서는, 개시 코돈이 요망되는 코딩 서열의 해독틀과 "인-프레임" 상태에 있어야 함은 널리 알려져 있다. 외인성 번역 제어 신호 및 개시 코돈은 천연 또는 합성일 수 있다. 발현의 효율은 적절한 전사 인핸서 요소의 포함에 의해 향상될 수 있다.

[0130] 발현은 당업계에 알려진 임의의 적절한 숙주 세포, 예를 들어, 포유류 숙주 세포, 박테리아 숙주 세포, 효모 숙주 세포, 곤충 숙주 세포 등을 이용할 수 있다. 원핵 및 진핵 발현 시스템 둘 다가 널리 이용가능하다. 일부 구현예에서, 발현 시스템은 포유류 세포 발현, 예컨대 HEK293 발현 시스템이다. 일부 구현예에서, 핵산은 요망되는 숙주 세포에서의 발현을 촉진하기 위해 코돈-최적화될 수 있다. 발현을 위해 선택된 세포 유형, 소기관, 및 유기체에서 DNA 분절의 발현을 효과적으로 지시하는 프로모터 및/또는 인핸서를 이용하는 것이 중요할 것이다. 분자 생물학 분야의 당업자는 대체적으로 단백질 발현을 위한 프로모터, 인핸서, 및 세포 유형의 조합의 용도를 인지하고 있으며, 이에 대해서는 예를 들어, 문헌[Sambrook et al. (2001)]을 참조한다.

[0131] 진핵 RNA 분자는 일차 전사체로부터 인트론을 제거하기 위해 RNA 스플라이싱을 거칠 수 있다. 게놈 진핵 서열을 함유하는 벡터는 단백질 발현을 위한 전사체의 적절한 프로세싱을 보장하기 위해 공여자 및/또는 수용자 스플라이스 부위를 필요로 할 수 있다(문헌[Chandler et al., 1997, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94(8):3596-601] 참조).

[0132] 본 개시의 벡터 또는 작제물은 대체적으로 적어도 하나의 종결 신호를 포함하게 된다. "종결 신호" 또는 "종결 인자"는 RNA 중합효소에 의한 RNA 전사체의 특이적 종료에 관여되는 DNA 서열로 이루어진다. 따라서 소정 구현예에서, RNA 전사체의 생산을 종료시키는 종결 신호가 고려된다. 생체 내에서 바람직한 메시지 수준을 달성하기 위해 종결자가 필요할 수 있다. 진핵 시스템에서, 종결자 영역은 폴리아데닐화 부위를 노출시키기 위해 새로운 전사체의 부위-특이적 절단을 허용하는 특정 DNA 서열을 또한 포함할 수 있다. 이는 특화된 내인성 중합효소로 전사체의 3' 말단에 약 200개의 A 잔기(폴리 A) 신장부를 부가하도록 신호를 준다. 상기 폴리A 꼬리로 변형된 RNA 분자는 더 안정한 것으로 나타나며 더 효율적으로 번역된다. 따라서, 진핵생물이 관여되는 다른 구현예에서, 종결자가 RNA 절단을 위한 신호를 포함하는 것이 바람직하며, 종결자 신호가 mRNA의 폴리아데닐화를 촉진하는 것이 보다 바람직하다. 종결자 및/또는 폴리아데닐화 부위 요소는 mRNA 수준을 향상시키고/시키거나 카세트로부터의 다른 서열로의 통독(read through)을 최소화하는 역할을 할 수 있다. 본 개시에서 사용하기 위해 고려되는 종결자에는 예를 들어, 유전자의 종결 서열, 예컨대 소 성장 호르몬 종결자 또는 바이러스 종결 서열, 예컨대 SV40 종결자를 포함하지만 이에 한정되지 않는, 본원에 기술되거나 당업자에게 공지된 임의의 알려진 전사 종결자가 포함된다. 소정의 구현예에서, 종결 신호에는, 서열 절단으로 인한 것과 같은, 전사가능하거나 번역가능한 서열이 없을 수 있다.

[0133] 전형적으로, 발현, 특히 진핵 발현에서는, 전사체의 적절한 폴리아데닐화를 야기하기 위해 폴리아데닐화 신호가 포함될 것이다. 폴리아데닐화 신호의 성질은 본 개시의 성공적인 실시에 중추적인 것으로 여겨지지 않고/않거나 임의의 이러한 서열이 이용될 수 있다. 바람직한 구현예에는, 다양한 표적 세포에서 편리하고/하거나 양호하게 기능하는 것으로 알려진 SV40 폴리아데닐화 신호 및/또는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호가 포함된다. 폴리아데닐화는 전사체의 안정성을 증가시킬 수 있거나 세포질 수송을 촉진할 수 있다.

[0134] 숙주 세포에서 벡터를 증식시키기 위해, 벡터는 복제가 개시되는 특이적 핵산 서열인 하나 이상의 복제 기점 부위(종종 "ori"로 명명됨)를 함유할 수 있다. 대안적으로 숙주 세포가 효모인 경우 자율 복제 서열(ARS)이 이용될 수 있다.

[0135] 본 개시의 소정의 구현예에서, 본 개시의 핵산 작제물을 함유하는 세포는 발현 벡터에 마커를 포함시킴으로써 시험관 내 또는 생체 내에서 확인될 수 있다. 이러한 마커는 세포에 확인가능한 변화를 부여하여 발현 벡터를 함유하는 세포의 용이한 확인을 허용할 것이다. 일반적으로, 선발가능 마커는 선발을 허용하는 특성을 부여하는 것이다. 양성 선발가능 마커는 마커의 존재가 그 선발을 허용하는 것인 반면, 음성 선발가능 마커는 그 존재가 그 선발을 방지하는 것이다. 양성 선발가능 마커의 예로는 약물 내성 마커가 있다.

[0136] 통상적으로, 약물 선별 마커의 포함은 형질전환체의 클로닝 및 확인을 보조하며, 예를 들어, 네오마이신, 퓨로

마이신, 하이그로마이신, DHFR, GPT, 제오신 및 히스티디놀에 대한 내성을 부여하는 유전자가 유용한 선별성 마커이다. 조건의 구현에 기반하여 형질전환체의 구별을 허용하는 표현형을 부여하는 마커에 더하여, 스크리닝가능한 마커, 예컨대 그 기반이 비색 분석인 GFP를 포함하는 다른 유형의 마커가 또한 고려된다. 대안적으로, 스크리닝가능한 효소, 예컨대 단순 포진 바이러스 티미딘 키나아제(HSV-tk) 또는 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라아제(CAT)가 이용될 수 있다. 당업자는 또한 가능하게는 FACS 분석과 함께, 면역학적 마커를 이용하는 방법을 알 것이다. 사용되는 마커는 이것이 유전자 산물을 코딩하는 핵산과 동시적으로 발현될 수 있는 한, 중요한 것으로 여겨지지 않는다. 선발가능한 및 스크리닝가능한 마커의 추가 예는 당업자에게 잘 알려져 있다.

[0137] 발현 벡터의 선택은 벡터의 하나 이상의 성분이 발현되는 의도된 세포에 따라 다르다. 전형적으로, 벡터는 하나 이상의 조절 서열, 예컨대 AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임에 작동 가능하게 연결된 다른 조절 서열(예를 들어, 인핸서)을 함유한다.

[0138] "프로모터"는 전사의 개시 및 속도가 제어되는 핵산 서열 영역인 제어 서열이다. 이는 조절 단백질 및 분자가 결합할 수 있는 유전자 요소, 예컨대 RNA 폴리머라아제 및 다른 전사 인자를 함유할 수 있다. 어구 "작동 가능하게 배치된", "작동 가능하게 연결된", "제어 하의" 및 "전사 제어 하의"는 프로모터가 핵산 서열의 전사 개시 및/또는 발현을 제어하기 위해 해당 서열에 관해 정확한 기능적 위치 및/또는 배향으로 있다는 것을 의미한다. 프로모터는 핵산 서열의 전사 활성화에 관여되는 시스-작용 조절 서열을 지칭하는 "인핸서"와 함께 사용될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다.

[0139] 프로모터는 코딩 분절 및/또는 엑손의 상류에 배치된 5' 비-코딩 서열을 단리함으로써 수득될 수 있으므로, 유전자 또는 서열과 자연적으로 연관된 것일 수 있다. 이러한 프로모터는 "내인성"인 것으로 지칭될 수 있다. 이와 유사하게, 인핸서는 핵산 서열의 하류 또는 상류에 배치된, 해당 서열과 자연적으로 연관된 서열일 수 있다. 대안적으로, 이의 자연 환경에서 핵산 서열과 일반적으로는 연관되지 않는 프로모터를 지칭하는, 재조합 또는 이종 프로모터의 제어 하에 코딩 핵산 분절을 위치시킴으로써, 소정의 장점을 얻을 수 있다. 재조합 또는 이종 인핸서는 또한, 이의 자연 환경에서 핵산 서열과 통상적으로는 연관되지 않는 인핸서를 지칭한다. 이러한 프로모터 또는 인핸서에는 다른 유전자의 프로모터 또는 인핸서, 및 임의의 다른 원핵, 바이러스, 또는 진핵 세포로부터 단리된 프로모터 또는 인핸서, 및 "자연 발생"이 아닌 프로모터 또는 인핸서, 즉 발현을 변경시키는 돌연변이 및/또는 상이한 전사 조절 영역의 상이한 요소를 함유하는 프로모터 또는 인핸서가 포함될 수 있다. 합성적인 프로모터 및 인핸서의 핵산 서열의 생성에 더하여, 서열은, 본원에 개시된 조성물과 관련하여, 재조합 클로닝 및/또는 핵산 증폭 기술, 예를 들어 PCR을 사용하여 생성될 수 있다(미국 특허 제4683202호, 미국 특허 제5928906호 참조). 또한, 비-핵 소기관, 예컨대 미토콘드리아, 엽록체 등 내에 서열의 전사 및/또는 발현을 지시하는 제어 서열 또한 사용될 수 있는 것으로 고려된다.

[0140] 이용되는 프로모터는 구성적, 유도성, 합성, 조직- 또는 세포-특이적, 및/또는 도입된 DNA 분절의 고수준 발현을 지시하기에 적절한 조건 하에 유용한 프로모터, 예컨대 재조합 단백질 및/또는 펩티드의 대규모 생산에서 유리한 것일 수 있다. 추가적으로, 다른 조절 요소, 예컨대 인핸서, 리보솜 결합 부위, 전사 종결 서열 등이 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 발현을 개선하기 위해 포함될 수 있다.

[0141] 일부 구현예에서, 구성적 프로모터는 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 리포터 서열 또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 단백질의 일정한 발현을 제공하기 위해 사용된다. 구성적 프로모터의 예는 극초기 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 시미안 바이러스 40(SV40) 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 인간 면역결핍 바이러스(HIV) 장형 말단 반복(LTR) 프로모터, MoMuLV 프로모터, 조류 백혈병 바이러스 프로모터, 엡스타인-바 바이러스 극초기 프로모터, 라우스 육종 바이러스 프로모터와, 인간 유전자 프로모터, 예컨대 비제한적으로 액틴 프로모터, 미오신 프로모터, 연장 인자-1 프로모터, 헤모글로빈 프로모터, 및 크레아틴 키나아제 프로모터를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다.

[0142] 일부 구현예에서, 유비쿼터스 프로모터가 사용된다. 유비쿼터스 프로모터의 비제한적인 예는 CMV, CBA(유도체 CAG, CBh, 등 포함), EF-1a, PGK, UBC, GUSB (hGBp), 및 UCOE(HNRPA2B1-CBX3의 프로모터)를 포함한다.

[0143] 일부 구현예에서, 유도 조건인 경우를 제외하고는, 삽입된 서열의 발현을 방지하기 위해 유도성 프로모터가 사용된다. 유도성 프로모터의 사용은 발현이 요망되는 경우 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현을 활성화할 수 있거나, 또는 발현이 요망되지 않는 경우 발현을 비활성화할 수 있는 분자 스위치를 제공한다. 유도성 프로모터의 예는, 아라비노스 프로모터, lacZ 프로모터, 테트라사이클린 프로모터, 메탈로티오네인 프로모터, 글루코코르티코이드 프로모터, 프로게스테론 프로모터, 또는 열 충격 프로모터를 포함하지만, 이들로 한정되지 않는다.

[0144] 일부 구현예에서, 조직- 또는 세포-특이적 프로모터는 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 리포터 단백질, 치료 RNA 또는 특정 조직 또는 세포에서만 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 단백질의 발현을 제공하기 위해 사용된다. 조직- 또는 세포-특이적 프로모터 또는 요소의 아이덴티티, 및 이의 활성을 특성화하기 위한 검정은 당업자에게 공지되어 있다. 이의 는 인간 LIMK2 유전자(문헌[Nomoto et al. 1999, Gene, 236(2):259-271]), 소마토스타틴 수용체 2 유전자(문헌[Kraus et al., 1998, FEES Lett., 428(3): 165-170]), 쥣과 부고환 레틴산-결합 유전자(문헌[Lareyre et al., 1999, J. Biol. Chem., 274(12):8282-8290]), 인간 CD4(문헌[Zhao-Emonet et al., 1998, Biochirn. Biophys. Acta, 1442(2-3): 109-119]), 마우스 알파2(XI) 콜라겐(문헌[Tsumaki, et al., 1998, J. Biol. Chem., 273(36):22861-22864]), D1A 도파민 수용체 유전자(문헌[Lee, et al., 1997, J. Auton. Nerv. Syst., 74(2-3):86-90]), 인슐린-유사 성장 인자 II(문헌[Wu et al., 1997, Biochem. Biophys. Res. Commun., 233(1):221-226]), 인간 혈소판 내피 세포 부착 분자-1(문헌[Almendro et al., 1996, J. Immunol., 157(12):5411-5421]), 근육 크레아틴 키나아제(MCK) 프로모터(문헌[Wang et al., Gene Ther. 2008 Nov;15(22):1489-99])를 포함한다.

[0145] 일부 구현예에서, 세포 특이적이 아닌 프로모터가 사용된다. 일부 구현예에서, 강력한 프로모터 또는 약한 프로모터(RNA 중합체화효소 및/또는 시그마 인자에 대한 친화도 및 다른 프로모터의 친화도에 따라 분류됨)가 사용된다.

[0146] 일부 구현예에서, 합성 프로모터는 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 단백질의 발현을 제공하기 위해 사용된다. 합성 프로모터는 천연 프로모터의 전사 효능을 크게 능가할 수 있다. 예를 들어, 내인성 세포 기구 또는 인자에 의해 활성이 제거되지 않거나 감소되지 않는 합성 프로모터가 선택될 수 있다. 트랜스-작용 인자 결합 부위 및 인핸서를 포함하는 다른 요소가 전사 효율을 개선하기 위해 합성 프로모터 내로 삽입될 수 있다. 합성 프로모터는 합성 및 생물학적 프로모터 둘 다의 최상의 특징들을 조합하도록 합리적으로 설계되고 화학적으로 합성될 수 있다. 합성 올리고는 전장의 화학적으로 합성된 프로모터를 생성하기 위한 몇몇 공정을 통해 어닐링되고 결찰된다. 합성 프로모터는 유도성 또는 세포-유형 특이적 프로모터일 수 있다.

[0147] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 ORF에 작동 가능하게 연결되거나, 치료 핵산 또는 단백질을 암호화하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되거나, 리포터 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 173CMV 프로모터, HCMV 프로모터, CBh 프로모터, CAG 프로모터 및 mCCT 프로모터로부터 선택된다.

[0148] 당업자는 종-특이적, 유도성, 조직-특이적, 또는 세포 주기-특이적 프로포터를 포함하나 이에 한정되지 않는 특정 프로모터가 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드, 리포터 서열 또는 치료 RNA 또는 단백질을 표적 세포에서 발현시키는데 특히 적합하다는 것을 쉽게 인지할 것이다(문헌[Parr et al., Nat. Med.3: 1145-9 (1997)]; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0149] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드, 리포터 서열, 또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 단백질에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 1 kb 미만이다. 프로모터는 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800 또는 800 bp 초과의 길이를 가질 수 있다. 프로모터는 200~300, 200~400, 200~500, 200~600, 200~700, 200~800, 300~400, 300~500, 300~600, 300~700, 300~800, 400~500, 400~600, 400~700, 400~800, 500~600, 500~700, 500~800, 600~700, 600~800 또는 700~800 bp의 길이를 가질 수 있다.

[0150] 일 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드, 리포터 서열, 또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 단백질에 작동 가능하게 연결된 프로모터는, CMV 및 CBA와 같으나 이에 한정되지 않는, 동일하거나 상이한 프로모터의 2개 이상의 성분, 영역, 또는 서열의 조합일 수 있다. 각각의 성분은 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800 또는 800 bp 초과의 길이를 가질 수 있다. 각각의 성분은 200~300, 200~400, 200~500, 200~600, 200~700, 200~800, 300~400, 300~500, 300~600, 300~700, 300~800, 400~500, 400~600, 400~700, 400~800, 500~600, 500~700, 500~800, 600~700, 600~800 또는 700~800 bp의 길이를 가질 수 있다.

[0151] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드, 리포터 서열, 또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 단백질에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 CMV-인핸서 서열, 예를 들어 CMV-인핸서 서열, 예를 들어 즉시/초기 CMV 인핸서 서열(예를 들어, 382개-뉴클레오티드 CMV-인핸서 서열) 및 닭 베타-액틴(CBA)-프로모터 서열(예를 들어, 260개 뉴클레오티드 CBA 프로모터 서열)의 조합이다.

[0152] 프로모터 이외에, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 발현 또는 리포터 단백질, 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 핵산에 의해 암호화된 치료 RNA 또는 치료 단백질의 효율적인 발현을 위한 다른 조절 요소가 필요하거나 요구될 수 있다. 이러한 요소는 ATG 개시 코돈 및 인접한 리보솜 결합 부위 또는 다른 서열을 포함한다. 또한, 발현 효율은 사용되는 세포 시스템에 적절한 인핸서를 포함시킴으로써 증강될 수 있다(예를 들어, 문헌[Scharf et al., Results Probl. Cell Differ. 20:125, 1994; 및 Bittner et al., Meth. Enzymol., 153:516, 1987] 참조). 예를 들어, SV40 인핸서 또는 CMV 인핸서가 포유동물 숙주 세포에서의 발현을 증가시키기 위하여 사용될 수 있다.

[0153] 일부 구현예에서, 본원에 제공된 AAV 벡터는 프로모터 요소와 발현될 폴리뉴클레오티드 사이에 임의로 배치된 인트론을 포함한다. 이론에 얽매이지 않고, 5' 인트론을 포함하면 발현된 mRNA의 수준 및 정상 상태를 향상시킬 수 있다. 인트론의 비-제한적인 예는 SV40 유래 인트론, CBA-MVM 유래 인트론, MVM(67~97 bps), FIX 절단된 인트론 1(300 bps), β-글로빈 SD/면역글로불린 중쇄 스플라이스 수용체(250 bps), 아데노바이러스 스플라이스 공여체/면역글로빈 스플라이스 수용체(500 bps), SV40 후기 스플라이스 공여체/스플라이스 수용체(19S/16S)(180 bps) 및 하이브리드 아데노바이러스 스플라이스 공여체/IgG 스플라이스 수용체(230 bps)를 포함한다.

[0154] 일 구현예에서, 인트론 또는 인트론 부분은 100~500개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 인트론은 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 171 , 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 또는 500의 길이를 가질 수 있다. 인트론은 80~100, 80~120, 80~140, 80~160, 80~180, 80~200, 80~250, 80~300, 80~350, 80~400, 80~450, 80~500, 200~300, 200~400, 200~500, 300~400, 300~500, 또는 400~500개 뉴클레오티드의 길이를 가질 수 있다,

[0155] 발현 벡터는 또한 발현될 단백질과 융합 단백질을 형성하기 위해 분비 신호 서열 위치를 제공할 수 있다. 보다 종종, 발현될 단백질을 암호화하는 삽입된 서열은 벡터에 포함되기 이전에 신호 서열에 연결된다.

[0156] 발현 벡터의 생성은 어느 하나가 벡터를 소화시키기 위한 표준 재조합 기술과 함께 이용될 수 있는 다중 제한 효소 부위들을 포함하는 핵산 영역인 다중 클로닝 부위(MCS)를 포함하는 벡터를 이용할 수 있다. 문헌[Carbonelli et al., 1999, Levenson et al., 1998, and Cocea, 1997]을 참조한다. "제한 효소 소화"는 핵산 분자에서 특정 위치에서만 기능하는 효소를 이용하는 핵산 분자의 촉매적 절단을 나타낸다. 다수의 이러한 제한 효소가 상업적으로 이용 가능하다. 이러한 효소의 사용은 당업자에게 널리 이해되어 있다. 빈번하게, 벡터는 외인성 서열이 벡터와 결찰될 수 있도록 MCS 내를 절단하는 제한 효소를 사용하여 선형화되거나 단편화된다. "결찰"은 서로 근접할 수도 있고 근접하지 않을 수도 있는 2개의 핵산 단편 간에 포스포디에스테르 결합을 형성하는 공정을 지칭한다. 제한 효소 및 결찰 반응을 포함하는 기술은 재조합 기술 분야의 당업자에게 공지되어 있다.

[0157] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 조절 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 표적 세포에서의 발현 유도에 효율적인 조절 서열, 특히 프로모터를 포함한다.

[0158] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드의 개방 판독 프레임은 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 프로모터는 HCMV 프로모터, 173CMV 프로모터, CAG 프로모터, CBh 프로모터 및 mCCT 프로모터로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 핵산은 예를 들어 BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호로부터 선택될 수 있는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, 핵산은 서열번호 8의 서열을 포함한다.

[0159] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 리포터 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 프로모터, 예를 들어 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화한다. 다수의 리포터 단백질이 당업계에 공지되어 있으며, 이는 다음을 포함한다: 녹색 형광 단백질(GFP), 녹색 형광 단백질의 변이체(GFP10), 강화 GFP(eGFP), 터보GFP, GFPS66T, TagGFP2, mUKGEmerald GFP, 수퍼폴더 GFP, GFPuv, 불안정화 EGFP(dEGFP), Azami Green, mWasabi,

Clover, mClover3, mNeonGreen, NowGFP, 사파이어, T-사파이어, mAmetrine, 광활성화 GFP(PA-GFP), Kaede, Kikume, mKikGR, tdEos, Dendra2, mEosFP2, Dronpa, 청색 형광 단백질(BFP), eBFP2, 아준트 BFP, mTagBFP, mKalamal, mTagBFP2, shBFP, 시안 형광 단백질(CFP), eCFP, Cerulian CFP, SCFP3A, 불안정화 ECFP (dECFP), CyPet, mTurquoise, mTurquoise2, mTFPI, 광전환성 CFP2 (PS-CFP2), TagCFP, mTFPI, mMidonishi-시안, 아쿠아만, mKeima, mBeRFP, LSS-mKate2, LSS-mKatel, LSS-mOrange, CyOFP I, Sandercyanin, 적색 형광 단백질(RFP), eRFP, mRaspberry, mRuby, mApple, mCardinal, mStable, mMaroonl, mGarnet2, tdTomato, mTangerine, mStrawberry, TagRFP, TagRFP667, TagRFP675, mKate2, HcRed, t-HcRed, HcRed- Tandem, mPlum, mNeptune, NirFP, Kindling, 적외선 형광 단백질, 황색 형광 단백질(YFP), eYFP, 불안정화 EYFP(dEYFP), TagYFP, Topaz, Venus, SYFP2, mCherry, PA-mCherry, sfCherry, sfCherry2, Citrine, mCitrine, Ypet, IANRFP-AS83, mPapayal, mCyRFPI, mHoneydew, mBanana, mOrange, Kusabira Orange, Kusabira Orange 2, mKusabira Orange, mOrange 2, mKOv, mKO2, mGrapel, mGrape2, zsYellow, eqFP611, Sirius, Sandercyanm, shBFP-N168S/L1731, 근적외선 단백질, iFP1.4, iRFP713, iRFP670, iRFP682, iRFP702, iRFP720, iFP2.0, mIFP, TDsmURFP, miRFP670, Brilliant Violet(BV) 421, BV 605, BV 510, BV 711, BV786, PerCP, PerCP/Cy5.5, DsRed, DsRed2, mRFPI, 포실로포린, Renilla GFP, Monster GFP, paGFP, 또는 파이코빈단백질, 또는 이들 중 어느 하나의 생물학적 활성 변이체 또는 단편. 리포터 단백질은, 예를 들어 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제, 특히 EGFP 및 sfCherry2.

[0160] 일부 구현예에서, 벡터, 예를 들어 발현 벡터는 아데노-연관 벡터(AAV)이다. 일부 구현예에서, AAV 벡터는 역위 말단 반복(ITR) 서열에 의해 한쪽 또는 양쪽 측면에 있는 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 포함한다. 핵산은 하나 이상의 추가 요소들, 예컨대, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 하나 이상의 인트론 서열, 폴리(A) 서열, 스터퍼 서열, 예를 들어 HPRT 인트론 유래 스터퍼 서열, 및 이들의 조합을 추가로 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, 벡터는 AAV 캡시드에 캡슐화된, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 폴리뉴클레오티드 AAV 벡터를 포함한다.

[0161] 일부 구현예에서, 벡터는 적어도 하나의 표적 세포 적합성 조절 서열, 예를 들어 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 포함한다. 일부 구현예에서, 프로모터는 173CMV 프로모터, HCMV 프로모터, CBh 프로모터, CAG 프로모터 및 mCCT 프로모터로부터 선택된다.

[0162] 일부 구현예에서, AAV 벡터 내 ITR은 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, AAV 벡터 내 ITR은 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, ITR은 동일하다. 일부 구현예에서, ITR은 상이하다.

[0163] 일부 구현예에서, AAV 벡터 내 ITR은 AAV 캡시드와 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, AAV 벡터 내 ITR은 AAV 캡시드의 것과 상이한 혈청형으로부터 유래된다. 일부 구현예에서, ITR은 AAV2로부터 유래되고, AAV 캡시드는 AAV2 이외의 혈청형, 예를 들어, AAV9로부터 유래된다.

[0164] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임의 상류 및 하류에 위치된 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 2개의 ITR 서열은 핵산 분자의 5' 및 3' 말단에 위치된다. 이들 구현예 중 일부에서, 핵산은 리포터 서열을 추가로 포함한다. 리포터 서열은, 예를 들어 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화할 수 있다. 예를 들어, 리포터 단백질은 다음으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다: EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제 및 나노루시퍼라제, 특히 EGFP 및 sfCherry2. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 전사후 조절 요소, 예를 들어 WPRE 또는 이의 유도체를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은, 예를 들어 BGH 및 SV40 폴리아데닐화 신호로부터 선택되는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함한다. 일 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 서열번호 2의 서열을 포함한다.

[0165] 일 양태에서, 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산을 포함하는 키트가 제공된다.

[0166] **숙주 세포 및 AAV 제조**

[0167] 관심 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 발현 벡터를 도입하는 방법은 세포 숙주의 유형에 따라 상이하다. 예를 들어, 원핵 세포의 경우 염화칼슘 형질감염이 통상적으로 사용되는 반면, 다른 세포 숙주의 경우 인산칼슘 처리 또는 전기천공이 사용될 수 있다(일반적으로, 상기 문헌[Sambrook *et al.*] 참조). 다른 방법은, 예를 들어 전기천공, 인산칼슘 처리, 리포좀-매개 형질전환, 주입 및 미세주입, 발리스틱(ballistic) 방법/유전자 총, 비로좀,

면역리포좀, 다가양이온:핵산 콘쥬게이트, 네이키드(naked) DNA, 인공 비리온, 헤르페스 바이러스 구조 단백질 VP22에 대한 융합, 작용제-증강된 DNA 흡수, 생체 외 형질도입, 원형질체 융합, 레트로바이러스 형질도입, 바이러스 형질감염, 지질 기반 형질감염 또는 기타 통상적인 기술을 포함한다. 원형질체 융합의 경우, 세포가 배지에서 성장되고 적절한 활성에 대해 스크리닝된다. 재조합 단백질을 장기간 고수율로 생성하기 위해서는, 안정적인 발현이 종종 요구될 것이다. 예를 들어, 바이러스 복제 기점 또는 내인성 발현 요소 및 선발가능 마커 유전자를 함유하는 발현 벡터를 사용하여 폴리펩티드를 안정적으로 발현하는 세포주가 제조될 수 있다. 벡터의 도입 후, 세포는, 이들 세포가 선발 배지로 옮겨지기 전에, 농화된 배지 내에서 1 내지 2일 동안 성장하도록 허용될 수 있다. 선발가능 마커의 목적은 선발에 대한 저항성을 부여하는 것이며, 선발가능 마커의 존재는 선발 배지에서 도입 서열을 성공적으로 발현시키는 세포가 성장할 수 있도록 한다. 안정적으로 형질감염된 저항성 세포는 세포 유형에 적절한 조직 배양 기술을 이용하여 증식될 수 있다. 수득된 형질감염 세포를 배양하고 생산된 항체를 회수하기 위한 방법 및 조건은 당업자에게 공지되어 있으며, 이는 본 설명에 기반하여 사용되는 특정 발현 벡터 및 포유류 숙주 세포에 따라, 변경되거나 최적화될 수 있다.

[0168] 일 양태에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 이를 암호화하는 핵산을 포함하는 세포가 본원에 제공된다. 이러한 세포는, 예를 들어 숙주 세포 또는 치료용 세포일 수 있다. 용어 "숙주 세포" 및 "재조합 숙주 세포"는 본원에서 상호 교환적으로 사용되며, 특정 대상체 세포뿐만 아니라 이러한 세포의 자손 또는 잠재적 자손을 나타낸다. 돌연변이 또는 환경적 영향으로 인해 다음 세대에서 소정의 변형이 발생할 수 있기 때문에, 이에 해당하는 자손은 사실상 부모 세포와 동일하지 않을 수 있지만, 본원에서 사용되는 용어의 범위 내에 여전히 포함된다.

[0169] 숙주 세포는 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 생산 또는 발현, 및 선택적으로 이를 포함하는 AAV 비리온의 조립에 사용될 수 있다. 따라서, 본 개시는 또한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생산하는 방법, 및 숙주 세포를 사용하여 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 AAV 비리온을 생산하는 방법을 특징으로 한다. 일부 구현예에서, 방법은 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 생성되도록, 적합한 배지에서 숙주 세포(AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 재조합 발현 벡터가 도입된 숙주 세포)를 배양하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 방법은 배지 또는 숙주 세포로부터 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 이를 포함하는 AAV 비리온을 단리하는 단계를 추가로 포함한다.

[0170] 일 구현예에서, 숙주 세포는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하도록 유전적으로 조작된다. 일 구현예에서, 숙주 세포는 발현 카세트를 사용함으로써 유전적으로 조작된다. 어구 "발현 카세트"는 이러한 서열과 양립 가능한, 숙주에서 유전자의 발현에 영향을 미칠 수 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 이러한 카세트는 프로모터, 인트론이 있거나 인트론이 없는 개방 판독 프레임, 및 종결 신호를 포함할 수 있다. 발현을 야기하는 데 필요하거나 도움이 되는 추가 인자, 예컨대 유도성 프로모터 또한 사용될 수 있다.

[0171] 숙주 세포는, 원핵 세포 또는 진핵 세포, 예컨대 박테리아 세포, 곤충 세포, 또는 포유동물 세포, 예컨대 인간 세포일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 대장균(E. coli)은 폴리뉴클레오티드의 클로닝 및 발현에 유용한 하나의 원핵 숙주이다. 사용하기에 적절한 다른 미생물 숙주는 바실루스(bacillus), 예컨대 바실루스 서브틸리스(Bacillus subtilis) 및 다른 엔테로박테리아세아에(enterobacteriaceae), 예컨대 살모넬라(Salmonella), 세라티아(Serratia) 및 다양한 슈도모나스(Pseudomonas) 종을 포함한다. 이들 원핵 숙주에서, 일반적으로 숙주 세포와 양립 가능한 제어 서열(예를 들어, 복제 기점)을 함유하는 발현 벡터 또한 복제될 수 있다. 또한, 다수의 광범위한 공지된 프로모터, 예컨대 락토스 프로모터 시스템, 트립토판(trp) 프로모터 시스템, 베타-락타마제 프로모터 시스템, 또는 파지 람다로부터의 프로모터 시스템이 존재할 것이다. 프로모터는 전형적으로, 선택적으로 작동자 서열과 함께, 발현을 제어하며, 이는 전사 및 번역의 개시 및 완료를 위한 리보솜 결합 부위 서열 등을 갖는다. 본원에 개시된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 발현시키기 위해 효모와 같은 다른 미생물이 사용될 수도 있다. CHO 세포주, 다양한 Cos 세포주, HeLa 세포, 골수종 세포주, 형질전환된 B 세포 및 하이브리도마를 포함하는, 온전한 이종 단백질을 분비할 수 있는 진핵 숙주 세포가 개발되어 왔다. 적합한 진핵 숙주 세포는 Vero 세포, HeLa 세포, COS 세포, CHO 세포, HEK293 세포, BHK 세포 및 MDCKII 세포를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 폴리펩티드를 발현시키기 위한 포유류 조직 세포 배양물의 사용은 대체적으로 예를 들어, 문헌[Winnacker, From Genes to Clones, VCH Publishers, N.Y., N.Y., 1987]에 논의되어 있다. 포유류 숙주 세포를 위한 발현 벡터는 발현 제어 서열, 예컨대 복제 기점, 프로모터 및 인핸서(예를 들어, 문헌[Queen, et al., Immunol. Rev. 89:49-68, 1986] 참조), 및 필요한 프로세싱 정보 부위, 예컨대 리보솜 결합 부위, RNA 스플라이스 부위, 폴리아데닐화 부위, 및 전사 종결자 서열을 포함할 수 있다. 이러한 발현 벡터들은 통상적으로 포유류 유전자로부터 또는 포유류 바이러스로부터 유래된 프로모터를 함유한다. 적합한 프로모터는 구성적, 세포 유형-특이적, 단계-특이적, 및/또는 조정가능 또는 조절가능한 프로모터일 수 있다. 유용한 프로모터는 메탈로티오네인 프로모터,

구성적 아데노바이러스 주요 후기(major late) 프로모터, 덱사메타손-유도성 MMTV 프로모터, SV40 프로모터, MRP pol III 프로모터, 구성적 MPSV 프로모터, 테트라사이클린-유도성 CMV 프로모터(예컨대 인간 극초기 CMV 프로모터), 구성적 CMV 프로모터 및 당업계에 알려진 프로모터-인핸서 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0172] 일부 구현예에서, 숙주 세포는 AAV 비리온 조립체에 적합하다. 따라서, rAAV 비리온의 생산 방법 또한 본원에 개시된다.

[0173] 자연 발생 AAV는 바이러스 DNA 복제(rep), 캡시드화/패키징 및 숙주 세포 염색체 통합을 유도하는 다양한 서열을 포함한다. 일반적으로, 3개의 AAV 프로모터(상대적인 맵 위치에 대해 p5, p19, 및 p40으로 명명됨)는 야생형 바이러스에서 rep 및 cap 유전자를 암호화하는 2개의 AAV 내부 개방 판독 프레임의 발현을 유도한다. 단일 AAV 인트론(뉴클레오티드 2107 및 2227)의 차별적 스플라이싱으로 결합된 2개의 rep 프로모터(p5 및 p19)는 rep 유전자로부터 4개의 rep 단백질(rep 78, rep 68, rep 52, 및 rep 40)을 생성할 수 있다. Rep 단백질은 궁극적으로 바이러스 게놈 복제를 담당하는 여러 효소적 특성을 가지고 있다. cap 유전자는 일반적으로 p40 프로모터로부터 발현된다. 대체 스플라이싱 및 비공통 번역 시작 부위는 3가지 관련 캡시드 단백질, VP1, VP2, 및 VP3의 생성을 담당한다. 단일 공통 폴리아데닐화 부위는 AAV 게놈의 맵 위치 95에 위치한다. AAV의 수명 주기와 유전학은 문헌[Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbiol. Imm. 158: 97-129]에 검토되어 있다.

[0174] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, 예를 들어 플라스미드는 rAAV 비리온의 생산에 사용된다. 일부 구현예에서, AAV rep 유전자 및/또는 AAV cap 유전자를 포함하는 적어도 하나의 추가 핵산, 예를 들어 플라스미드는 rAAV 비리온의 제조에 사용된다. 일부 구현예에서, cap 유전자 내의 VP2 개시 코돈은 돌연변이화되며, 이에 의해 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 VP2 서브유닛의 유일한 공급원이 되며, 이에 따라, 생성된 rAAV 비리온의 모든 VP2 캡시드 폴리펩티드는 폴리펩티드 리간드에 융합된다. 적어도 하나의 아데노바이러스 헬퍼 기능 유전자를 포함하는 핵산 서열, 예를 들어 플라스미드 또한 본원에 개시된다. 일부 구현예에서, AAV rep, AAV cap, 및/또는 아데노바이러스 헬퍼 유전자를 암호화하는 핵산은 동일한 구조 내에 존재할 수 있거나(예를 들어, 단일 플라스미드), 개별 구조 내에 존재할 수 있다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 플라스미드는 카고 핵산, 즉 rAAV 비리온 내에 양립 가능한 세포 내로 캡슐화될 핵산으로 공동 형질감염되고, 이에 이어서 세포는 배양되어 rAAV 비리온을 생산한다. 일부 경우에, 캡슐화될 핵산 서열을 포함하는 카고 플라스미드("AAV 게놈") 및 AAV rep 및/또는 cap 유전자를 포함하는 플라스미드(들)는 AAV의 헬퍼 바이러스(예를 들어, 아데노바이러스, E1-결실 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스)에 의한 감염이 허용되는 세포로 전달된다. 패키징될 AAV 게놈, rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능이 세포에 제공되는 rAAV 입자를 생산하는 기술은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 예를 들어 전기천공을 포함할 수 있다. 일부 구현예에서, rAAV의 생산은 단일 세포(본원에서 패키징 셀로 명명됨) 내에 존재하는 다음의 성분과 연관된다: rAAV 벡터, rAAV 벡터와 분리된(즉, rAAV 벡터에 포함되지 않은) AAV rep 및 cap 유전자, 및 헬퍼 바이러스 기능. 유사형 rAAV의 생산은 예를 들어 WO 01/83692에 개시되어 있으며, 이는 전체가 본원에 참조로 포함된다. 다양한 구현예에서, AAV 캡시드 단백질은 재조합 벡터의 전달을 향상시키기 위해 변형될 수 있다. 캡시드 단백질에 대한 변형은 대체적으로 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 그 전체 개시내용이 본원에 참조로 포함되는 US 2005/0053922 및 US 2009/0202490를 참조한다.

[0175] 다양한 구현예에서, 바이러스 벡터 생산의 일반 원리는 본원에 개시된 벡터 및 바이러스, 예를 들어 rAAV의 생산에 사용될 수 있다. 문헌[Carter, (1992) Curr. Opinions Biotech., 1533-539; Muzyczka, (1992) Curr. Topics Microbial. Immunol., 158:97-129] 참조. 다양한 접근법이 다음에 개시되어 있다: 문헌[Ratschin et al., Mol. Cell. Biol., 4: 2072; Hennonat et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6466; Tratschin et al., (1985) Mol. Cell. Biol., 5: 3251; McLaughlin et al., (1988) J. Virol., 62: 1963; Lebkowski et al., (1988) Mol. Cell. Biol., 7:349; Samulski et al. (1989) J. Virol., 63:3822-3828]; 미국 특허 제5,173,414호; WO 95/13365 및 이에 해당하는 미국 특허 제5,658,776호; WO 95/13392; WO 96/17947; PCT/US98/18600; WO 97/09441 (PCT/US96/14423); WO 97/08298 (PCT/US96/13872); WO 97/21825 (PCT/US96/20777); WO 97/06243 (PCT/FR96/01064); WO 99/11764; 문헌[Perrin et al., (1995) Vaccine, 13: 1244-1250; Paul et al., (1993) Hum. Gene Ther., 4: 609-615; Clark et al. (1996) Gene Therapy, 3: 1124-1132]; 미국 특허 제5,786,211호; 미국 특허 제5,871,982호; 및 미국 특허 제6,258,595호. 위의 문헌은, rAAV 생산에 관한 문헌의 해당 섹션을 특히 중점적으로 그 전체가 본원에 참조로 포함된다.

[0176] 패키징 세포를 생성하는 예시적인 방법은 AAV 입자 생산에 필요한 일부 또는 모든 성분을 안정적으로 발현하는 세포주를 생성하는 것이다. 예를 들어, AAV rep 및 cap 유전자가 결여된 rAAV 벡터를 암호화하는 플라스미드(또는 다중 플라스미드), rAAV 벡터와 별개인 AAV rep 및 cap 유전자, 및 네오마이신 내성 유전자와 같은 선별 마

커가 세포의 게놈에 통합된다. AAV 게놈은 GC 테일링(문헌[Samulski et al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79: 2077-2081]), 제한 엔도뉴클레아제 절단 부위를 함유하는 합성 링커 첨가(문헌[Laughlin et al., (1983) Gene, 23:65-73])와 같은 절차에 의해, 또는 직접적인, 둔단(blunt-end) 결찰(문헌[Senapathy et al., (1984) J. Biol. Chem., 259:4661-4666])에 의해 박테리아 플라스미드 내로 도입된다. 이어서, 패키징 세포주는 아데노바이러스와 같은 헬퍼 바이러스 및/또는 헬퍼 바이러스를 암호화하는 플라스미드로 감염된다. 이러한 방법의 장점은 세포가 선별 가능하고 rAAV의 대규모 생산에 적합하다는 것이다. 적합한 방법의 다른 예는 플라스미드가 아닌 아데노바이러스 또는 배큘로바이러스를 사용하여 rAAV 벡터 및/또는 rep 및 cap 유전자를 패키징 세포에 도입한다.

[0177] 일부 구현예에서, 재조합 바이러스의 생산 방법은 패키징될 핵산을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 핵산은 플라스미드이다. 다른 구현예에서, 핵산은 제1 AAV 말단 반복부와 제2 AAV 말단 반복부 사이에 삽입된 이종 핵산 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및/또는 리포터 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 치료 항체를 포함하는, 치료 RNA 또는 치료 단백질을 암호화한다. 이종 핵산이 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하지 않는 일부 구현예에서, 재조합 바이러스를 생산하는 방법은 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 추가의 핵산을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스의 생산 방법은 하나 이상의 추가 핵산을 제공하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 AAV rep 유전자 및/또는 AAV cap 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 AAV 혈청형 1, AAV 혈청형 2, AAV 혈청형 3, AAV 혈청형 4, AAV 혈청형 5, AAV 혈청형 6, AAV 혈청형 7, AAV 혈청형 8, 또는 AAV 혈청형 9에서 유래된 AAV rep 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 AAV 혈청형 1, AAV 혈청형 2, AAV 혈청형 3, AAV 혈청형 4, AAV 혈청형 5, AAV 혈청형 6, AAV 혈청형 7, AAV 혈청형 8, 또는 AAV 혈청형 9에서 유래된 AAV cap 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 하나 이상의 아데노바이러스 헬퍼 기능 유전자를 포함한다.

[0178] 일부 구현예에서, 핵산은 적격 세포 또는 패키징 세포 내로 공동형질감염된다. 공동형질감염의 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 리포펙타민, 전기천공, 및 폴리에틸렌이민에 의한 형질감염을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 적격 세포 또는 패키징 세포는 현탁액에서 배양된 비부착 세포이거나 부착 세포일 수 있다. 일 구현예에서, HeLa 세포, HEK 293 세포, 및 PerC.6 세포(동족 293 세포주)와 같은 임의의 적합한 패키징 세포주가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 패키징 세포는 인간 세포이다. 일 구현예에서, 패키징 세포는 HEK 293 세포이다. 일 구현예에서, 패키징 세포는 곤충 세포이다. 일 구현예에서, 패키징 세포는 Sf9 세포이다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 형질감염된 세포를 배양하여 재조합 바이러스를 생성하는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 재조합 바이러스를 회수하는 단계를 포함한다. 재조합 바이러스를 회수하는 방법은 예를 들어 미국 특허 6,143,548호 및 미국 특허 9,408,904호에 개시되어 있는 것들을 포함한다. 일부 구현예에서, 재조합 바이러스는 세포 배양 배지로 분비되고 배지로부터 정제된다. 일부 구현예에서, 패키징 세포를 용해하고, 내용물을 정제하여 재조합 바이러스를 회수한다. 일부 구현예에서, 바이러스는 여과 또는 원심분리에 의해 패키징 세포로부터 회수된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 크로마토그래피에 의해 패키징 세포로부터 회수된다.

[0179] 일부 구현예에서, 포유동물 숙주 세포는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 발현하고, 일반적으로 이를 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드와 함께 AAV 비리온 내로 통합하는데 사용된다. 이러한 목적을 위해, HEK293 또는 이의 유도체, 예컨대 HEK293T/17 또는 AAV293 세포는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 AAV VP1, VP2 및 rep 폴리펩티드를 암호화하는 핵산으로 형질감염될 수 있다. 일부 구현예에서, HEK293 세포는 아데노바이러스 E2, E4 및/또는 VA 유전자 산물과 같은 AAV 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능을 암호화하는 핵산으로 추가로 형질감염된다. 일부 구현예에서, HEK293 세포는, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 하나의 핵산 분자, AAV VP1, VP2 및 rep 폴리펩티드를 암호화하는 하나의 핵산 분자(여기에서, 특히, AAV VP1 및 VP2 폴리펩티드는 AAV cap 유전자에 의해 암호화되며, 보다 구체적으로, AAV cap 유전자의 AAV VP2 개시 코돈은 돌연변이됨), AAV 복제를 위한 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 아데노바이러스 헬퍼 기능을 암호화하는 하나의 핵산 분자(여기에서, 특히 상기 핵산 분자는 아데노바이러스 E2, E4 및 VA 유전자 산물을 암호화함), 및 선택적으로 치료 RNA 또는 단백질을 암호화하는 추가 핵산 분자로 공동형질감염된다. 일부 구현예에서, 치료 RNA 또는 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드로 구성된 AAV 캡시드에 캡슐화된다. 이러한 구현예에서, 치료 RNA 또는 단백질을 암호화하는 핵산 분자는 일반적으로 측면 AAV ITR 서열을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드로 구성된 AAV 캡시드에 캡슐화된다. 이러한 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자는 측면 AAV ITR 서열을 추가로 포함한다. 다른 구현예에서, 바코드 서열 및 측면 AAV ITR 서열을 포함하는 핵산 분자는 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드로 구성된 AAV 캡

시드에 캡슐화된다.

[0180] 일부 구현예에서, rAAV 바이러스의 생산 방법은 곤충 세포를 형질감염시키는 단계를 포함한다. 적합한 곤충 세포는 Sf9 세포를 포함하지만, 이에 한정되지 않는다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 본원에 개시된 바와 같은 핵산을 포함하는 배큘로바이러스로 곤충 세포를 형질감염시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 제1 AAV 말단 반복부와 제2 AAV 말단 반복부 사이에 삽입된 이종 핵산 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 배큘로바이러스로 곤충 세포를 형질감염시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 상기 방법은 하나 이상의 추가 핵산을 포함하는 배큘로바이러스로 곤충 세포를 형질감염시키는 단계를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 AAV rep 유전자 및/또는 AAV cap 유전자를 포함한다. 일부 구현예에서, 하나 이상의 추가 핵산은 하나 이상의 아데노바이러스 헬퍼 기능 유전자를 포함한다. 이종 핵산이 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하지 않는 일부 구현예에서, 상기 방법은 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 추가의 핵산으로 곤충 세포를 형질감염시키는 단계를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 곤충 세포는 재조합 바이러스를 제조하기에 적합한 조건에서 배양된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 곤충 세포로부터 회수된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 여과 또는 원심분리에 의해 곤충 세포로부터 회수된다. 일부 구현예에서, 바이러스는 크로마토그래피에 의해 곤충 세포로부터 회수된다.

[0181] 일부 구현예에서, 세포는 쥣과 세포, 비인간 영장류 세포 또는 인간 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 포유동물 세포로부터 선택된다. 포유동물 세포는 간 세포, 뇌 세포, 비장 세포, 신장 세포, 혈액 세포, 폐 세포, 근육 세포, 심장 세포, 골수 세포, 다능성 전구체 세포(MPP), 예컨대 다능성 조혈 전구체 세포, 및 조혈 줄기 세포(HSC), 예컨대 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0182] **AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온**

[0183] 일 양태에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 비리온이 본원에 제공된다.

[0184] 약어 "rAAV"는 재조합 아데노-연관 바이러스를 지칭한다. 본원에서 사용되는 바와 같은 "rAAV 벡터"는 AAV 기원이 아닌 폴리뉴클레오티드 서열(즉, AAV에 이종인 폴리뉴클레오티드), 전형적으로 세포의 유전적 형질전환을 위한 관심 서열을 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화한다. 일부 구현예에서, 이종 핵산은 치료 핵산, 치료 단백질 또는 치료 항체 또는 항체 단편을 암호화한다. 일부 구현예에서, 이종 폴리뉴클레오티드에는 적어도 하나, 때때로 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열이 측면에 위치할 수 있다. rAAV 벡터라는 용어는 rAAV 벡터 입자 및 rAAV 벡터 핵산 둘 모두를 포괄한다. rAAV 벡터는 단일-가닥(ssAAV) 또는 자가-상보성(scAAV)일 수 있다. "AAV 바이러스" 또는 "AAV 바이러스 입자" 또는 "AAV 비리온"은, 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질(전형적으로 하나 이상의 야생형 AAV의, 또는 이로부터 유래된 모든 캡시드 단백질) 및 캡슐화된 폴리뉴클레오티드 rAAV 벡터로 구성된 바이러스 입자를 지칭한다. 해당 입자가 이종 폴리뉴클레오티드(즉, 야생형 AAV 게놈 이외의 폴리뉴클레오티드, 예컨대 포유류 세포로 전달될 이식유전자)를 포함하는 경우, 이는 일반적으로 "rAAV 벡터 입자", "rAAV 비리온" 또는 단순히 "rAAV 벡터"로 지칭된다.

[0185] 일부 구현예에서, 본원에 개시된 AAV 비리온은 하나 이상의 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 전형적으로, AAV에서, 3개의 캡시드 단백질, 즉 VP1, VP2, 및 VP3은 다량체화되어 캡시드를 형성한다. 본원에 개시된 rAAV 비리온은 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하며, 선택적으로 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 전형적으로, 본원에 개시된 rAAV 비리온의 캡시드는 VP1, VP3 및 VP2 융합 폴리펩티드 서브유닛으로 구성된다. 전형적으로, 본원에 개시된 rAAV 비리온의 캡시드는 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하지 않으며, 이는 전형적으로, 모든 VP2 서브유닛이 본원에 기술된 바와 같은 AAV VP2 융합 폴리펩티드임을 의미한다. 본원에 개시된 rAAV 비리온에 포함된 AAV 캡시드 폴리펩티드는, AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5, 또는 이들의 임의의 변이체, 또는 예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 폴리펩티드의 전장에 걸쳐 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하나 이에 한정되지 않는, 재조합 바이러스가 유래될 수 있는 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다.

[0186] 캡시드 단백질의 폴리펩티드 서열은 당업계에 공지되어 있으며, 이는 또한 AAV의 게놈으로부터 유래될 수 있다. 이들은 본원에 개시된 AAV 바이러스 조성물에서 예시적인 캡시드로서 사용될 수 있다.

[0187] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV1, AAV2, AAV2G9,

AAV3, AAV3a, AAV3b, AAV3-3, AAV4, AAV4-4, AAV5, AAV6, AAV6.1, AAV6.2, AAV6.1.2, AAV7, AAV7.2, AAV8, AAV9, AAV9.11, AAV9.13, AAV9.16, AAV9.24, AAV9.45, AAV9.47, AAV9.61, AAV9.68, AAV9.84, AAV9.9, AAV10, AAV11, AAV 12, AAV16.3, AAV24.1, AAV27.3, AAV42.12, AAV42-1b, AAV42-2, AAV42-3a, AAV42-3b, AAV42-4, AAV42-5a, AAV42-5b, AAV42-6b, AAV42-8, AAV42-10, AAV42-11, AAV42-12, AAV42-13, AAV42-15, AAV42-aa, AAV43-1, AAV43-12, AAV43-20, AAV43- 21, AAV43-23, AAV43-25, AAV43-5, AAV44.1, AAV44.2, AAV44.5, AAV223.1, AAV223.2, AAV223.4, AAV223.5, AAV223.6, AAV223.7, AAV1-7/rh.48, AAV1-8/rh.49, AAV2-15/rh.62, AAV2-3/rh.61, AAV2-4/rh.50, AAV2-5/rh.51, AAV3.1/hu.6, AAV3.1/hu.9, AAV3- 9/rh.52, AAV3-11/rh.53, AAV4-8/r 11.64, AAV4-9/rh.54, AAV4-19/rh.55, AAV5-3/rh.57, AAV5-22/rh.58, AAV7.3/hu.7, AAV16.8/hu.10, AAV16.12/hu.11, AAV29.3/bb.1, AAV29.5/bb.2, AAV106.1/hu.37, AAV114.3/hu.40, AAV127.2/hu.41, AAV127.5/hu.42, AAV128.3/hu.44, AAV130.4/hu.48, AAV145.1/hu.53, AAV145.5/hu.54, AAV145.6/hu.55, AAV161.10/hu.60, AAV161.6/hu.61, AAV33.12/hu.17, AAV33.4/hu.15, AAV33.8/hu.16, AAV52/hu.19, AAV52.1/hu.20, AAV58.2/hu.25, AAV A3.3, AAV A3.4, AAV A3.5, AAV A3.7, AAVC1, AAVC2, AAVC5, AAV-DJ, AAV-DJ8, AAVF3, AAVF5, AAVH2, AAVrh.72, AAVhu.8, AAVrh.68, AAVrh.70, AAVpi.1, AAVpi.3, AAVpi.2, AAVrh.60, AAVrh.44, AAVrh.65, AAVrh.55, AAVrh.47, AAVrh.69, AAVrh.45, AAVrh.59, AAVhu.12, AAVH6, AAVLK03, AAVH-1/hu.1, AAVH-5/hu.3, AAVLG-10/rh.40, AAVLG-4/rh.38, AAVLG- 9/hu.39, AAVN721-8/rh.43, AAVCh.5, AAVCh.5R1, AAVcy.2, AAVcy.3, AAVcy.4, AAVcy.5, AAVCy.5R1, AAVCy.5R2, AAVCy.5R3, AAVCy.5R4, AAVcy.6, AAVhu.1, AAVhu.2, AAVhu.3, AAVhu.4, AAVhu.5, AAVhu.6, AAVhu.7, AAVhu.9, AAVhu.10, AAVhu.11, AAVhu.13, AAVhu.15, AAVhu.16, AAVhu.17, AAVhu.18, AAVhu.20, AAVhu.21, AAVhu.22, AAVhu.23.2, AAVhu.24, AAVhu.25, AAVhu.27, AAVhu.28, AAVhu.29, AAVhu.29R, AAVhu.31, AAVhu.32, AAVhu.34, AAVhu.35, AAVhu.37, AAVhu.39, AAVhu.40, AAVhu.41, AAVhu.42, AAVhu.43, AAVhu.44, AAVhu.44R1, AAVhu.44R2, AAVhu.44R3, AAVhu.45, AAVhu.46, AAVhu.47, AAVhu.48, AAVhu.48R1, AAVhu.48R2, AAVhu.48R3, AAVhu.49, AAVhu.51, AAVhu.52, AAVhu.54, AAVhu.55, AAVhu.56, AAVhu.57, AAVhu.58, AAVhu.60, AAVhu.61, AAVhu.63, AAVhu.64, AAVhu.66, AAVhu.67, AAVhu.14/9, AAVhu.t 19, AAVrh.2, AAVrh.2R, AAVrh.8, AAVrh.8R, AAVrh.10, AAVrh.12, AAVrh.13, AAVrh.13R, AAVrh.14, AAVrh.17, AAVrh.18, AAVrh.19, AAVrh.20, AAVrh.21, AAVrh.22, AAVrh.23, AAVrh.24, AAVrh.25, AAVrh.31, AAVrh.32, AAVrh.33, AAVrh.34, AAVrh.35, AAVrh.36, AAVrh.37, AAVrh.37R2, AAVrh.38, AAVrh.39, AAVrh.40, AAVrh.46, AAVrh.48, AAVrh.48.1, AAVrh.48.1.2, AAVrh.48.2, AAVrh.49, AAVrh.51, AAVrh.52, AAVrh.53, AAVrh.54, AAVrh.56, AAVrh.57, AAVrh.58, AAVrh.61, AAVrh.64, AAVrh.64R1, AAVrh.64R2, AAVrh.67, AAVrh.73, AAVrh.74, AAVrh8R, AAVrh8R A586R 돌연변이체, AAVrh8R R533A 돌연변이체, AAAV, BAAV, 염소 AAV, 소 AAV, AAVhE1.1, AAVhEr1.5, AAVhER1.14, AAVhEr1.8, AAVhEr1.16, AAVhEr1.18, AAVhEr1.35, AAVhEr1.7, AAVhEr1.36, AAVhEr2.29, AAVhEr2.4, AAVhEr2.16, AAVhEr2.30, AAVhEr2.31, AAVhEr2.36, AAVhER1.23, AAVhEr3.1, AAV2.5T , AAV-PAEC, AAV-LK01, AAV-LK02, AAV-LK03, AAV-LK04, AAV-LK05, AAV-LK06, AAV-LK07, AAV-LK08, AAV-LK09, AAV-LK10, AAV-LK11, AAV-LK12, AAV-LK13, AAV-LK14, AAV-LK15, AAV-LK16, AAV-LK17, AAV-LK18, AAV-LK19, AAV-PAEC2, AAV-PAEC4, AAV-PAEC6, AAV-PAEC7, AAV-PAEC8, AAV-PAEC11, AAV-PAEC 12, AAV-2-pre-miRNA-101 , AAV-8h, AAV-8b, AAV-h, AAV-b, AAV SM 10-2 , AAV 셔플 100-1 , AAV 셔플 100-3, AAV 셔플 100-7, AAV 셔플 10-2, AAV 셔플 10-6, AAV 셔플 10-8, AAV 셔플 100-2, AAV SM 10-1, AAV SM 10-8 , AAV SM 100-3, AAV SM 100-10, BNP61 AAV, BNP62 AAV, BNP63 AAV, AAVrh.50, AAVrh.43, AAVrh.62, AAVrh.48, AAVhu.19, AAVhu. 1, AAVhu.53, AAV4-8/rh.64, AAVLG-9/hu.39, AAV54.5/hu.23, AAV54.2/hu.22, AAV54.7/hu.24, AAV54.1/hu.21, AAV54.4R/hu.27, AAV46.2/hu.28, AAV46.6/hu.29, AAV128.1/hu.43, 트루 타입 AAV(ttAAV), UPEN AAV 10 및/또는 재패니즈 AAV 10 캡시드 폴리펩티드, 또는, 예를 들어 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 폴리펩티드의 전장에 걸쳐 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%의 서열 동일성을 갖는 이의 변이체를 포함하나 이에 한정되지 않는 군으로부터 독립적으로 선택되는 자연 발생 또는 돌연변이/변이체 캡시드 폴리펩티드일 수 있다.

[0188] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV1(US20030138772의 서열번호 6 및 64), AAV2(US20030138772의 서열번호 7 및 70), AAV3(US20030138772의 서열번호 8 및 71), AAV4(US20030138772의 서열번호 63), AAV5(US20030138772의 서열번호 114), AAV6(US20030138772의 서열번호 65), AAV7(US20030138772의 서열번호 1~3), AAV 8(US20030138772의 서열번호 4 및 95), AAV9(US20030138772의 서열번호 5 및 100), AAV10(US20030138772의 서열번호 117), AAV11(US20030138772의 서열번호 118), AAV 12(US20030138772의 서열번호 119), AAVrh10(US20030138772의 서열번호 81의 아미노산 1 내지 738), AAV16.3(US20030138772 서열번호 10), AAV29.3/bb. 1(US20030138772 서열번호 11), AAV29.4(US20030138772 서

열번호 12), AAV29.5/bb.2(US20030138772 서열번호 13), AAV1.3(US20030138772 서열번호 14), AAV13.3(US20030138772 서열번호 15), AAV24.1(US20030138772 서열번호 16), AAV27.3(US20030138772 서열번호 17), AAV7.2(US20030138772 서열번호 18), AAVC1(US20030138772 서열번호 19), AAVC3(US20030138772 서열번호 20), AAVC5(US20030138772 서열번호 21), AAVF1(US20030138772 서열번호 22), AAVF3(US20030138772 서열번호 23), AAVF5(US20030138772 서열번호 24), AAVH6(US20030138772 서열번호 25), AAVH2(US20030138772 서열번호 26), AAV42-8(US20030138772 서열번호 27), AAV42-15(US20030138772 서열번호 28), AAV42-5b(US20030138772 서열번호 29), AAV42-1b(US20030138772 서열번호 30), AAV42-13(US20030138772 서열번호 31), AAV42-3a(US20030138772 서열번호 32), AAV42-4(US20030138772 서열번호 33), AAV42-5a(US20030138772 서열번호 34), AAV42-10(US20030138772 서열번호 35), AAV42-3b(US20030138772 서열번호 36), AAV42-11(US20030138772 서열번호 37), AAV42-6b(US20030138772 서열번호 38), AAV43-1(US20030138772 서열번호 39), AAV43-5(US20030138772 서열번호 40), AAV43-12(US20030138772 서열번호 41), AAV43-20(US20030138772 서열번호 42), AAV43-21(US20030138772 서열번호 43), AAV43-23(US20030138772 서열번호 44), AAV43-25(US20030138772 서열번호 45), AAV44.1(US20030138772 서열번호 46), AAV44.5(US20030138772 서열번호 47), AAV223.1(US20030138772 서열번호 48), AAV223.2(US20030138772 서열번호 49), AAV223.4(US20030138772 서열번호 50), AAV223.5(US20030138772 서열번호 51), AAV223.6(US20030138772 서열번호 52), AAV223.7(US20030138772 서열번호 53), AAV A3.4(US20030138772 서열번호 54), AAV A3.5(US20030138772 서열번호 55), AAV A3.7(US20030138772 서열번호 56), AAV A3.3(US20030138772 서열번호 57), AAV42.12(US20030138772 서열번호 58), AAV44.2(US20030138772 서열번호 59), AAV42-2(US20030138772 서열번호 9), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 공개 공보 번호 US20030138772(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0189] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV2(US20150159173의 서열번호 7 및 23), rh20(US20150159173의 서열번호 1), rh32/33(US20150159173의 서열번호 2), rh39(US20150159173의 서열번호 3, 20 및 36), rh46(US20150159173의 서열번호 4 및 22), rh73(US20150159173의 서열번호 5), rh74(US20150159173의 서열번호 6), AAV6.1(US20150159173의 서열번호 29), rh.8(US20150159173의 서열번호 41), rh.48.1(US20150159173의 서열번호 44), hu.44(US20150159173의 서열번호 45), hu.29(US20150159173의 서열번호 42), hu.48(US20150159173의 서열번호 38), rh54(US20150159173의 서열번호 49), AAV2(US20150159173의 서열번호 7), cy.5(US20150159173의 서열번호 8 및 24), rh.10(US20150159173의 서열번호 9 및 25), rh.13(US20150159173의 서열번호 10 및 26), AAV1(US20150159173의 서열번호 11 및 27), AAV3(US20150159173의 서열번호 12 및 28), AAV6(US20150159173의 서열번호 13 및 29), AAV7(US20150159173의 서열번호 14 및 30), AAV 8(US20150159173의 서열번호 15 및 31), hu.13(US20150159173의 서열번호 16 및 32), hu.26(US20150159173의 서열번호 17 및 33), hu.37(US20150159173의 서열번호 18 및 34), hu.53(US20150159173의 서열번호 19 및 35), rh.43(US20150159173의 서열번호 21 및 37), rh2(US20150159173의 서열번호 39), rh.37(US20150159173의 서열번호 40), rh.64(US20150159173의 서열번호 43), rh.48(US20150159173의 서열번호 44), ch.5(US20150159173의 서열번호 46), rh.67(US20150159173의 서열번호 47), rh.58(US20150159173의 서열번호 48), 또는, Cy5R1, Cy5R2, Cy5R3, Cy5R4, rh.13R, rh.37R2, rh.2R, rh.8R, rh.48.1, rh.48.2, rh.48.1.2, hu.44R1, hu.44R2, hu.44R3, hu.29R, ch.5R1, rh64R1, rh64R2, AAV6.2, AAV6.1, AAV6.12, hu.48R1, hu.48R2, 및 hu.48R3와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 공개 공보 번호 US20150159173(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0190] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV9(미국 특허 제7198951호의 서열번호 1~3), AAV2(미국 특허 제7198951호의 서열번호 4), AAV1(미국 특허 제7198951호의 서열번호 5), AAV3(미국 특허 제7198951호의 서열번호 6), 및 AAV 8(미국 특허 제7198951호의 서열번호 7)와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 공개 공보 번호 US 7198951(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0191] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV9.9, AAV9.11, AAV9.13, AAV9.16, AAV9.24, AAV9.45, AAV9.47, AAV9.61, AAV9.68, AAV9.84와 같지만 이에 한정되지 않는, 문헌[N Pulicherla et al., Molecular Therapy 19(6): 1070-1078 (2011)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로

포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV9 혈청형 내의 돌연변이일 수 있거나, 이를 가질 수 있는 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 캡시드는 혈액-뇌 장벽을 가로질러 벡터를 전달하도록 조작된 하나 이상의 서열을 포함한다(예를 들어, 문헌[B.E. Deverman et al, Nature Biotech, Vol. 34, No. 2, p 204-211(2016년 2월 1일 온라인 공개), 및 Caltech press release, A. Wetherston, www.neurology-cenfrd.com/2016/02/10/successfd/brain-barrier] 참조; 또한, WO 2016/0492301 및 미국 특허 제8,734,809호 참조, 이들 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨).

[0192] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV3B(미국 특허 제6156303호의 서열번호 1 및 10), AAV6(미국 특허 제6156303호의 서열번호 2, 7, 및 11), AAV2 (미국 특허 제6156303호의 서열번호 3 및 8), AAV3A(미국 특허 제6156303호의 서열번호 4 및 9), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 공개 공보 번호 US 6156303(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0193] 일부 구현예에서, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV 8(US20140359799의 서열번호 1), AAVDJ(US20140359799의 서열번호 2 및 4), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 공개 번호 US20140359799(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0194] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, 문헌[Grimm et al., Journal of Virology 82(12): 5887-5911 (2008)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은, AAVDJ 또는 이의 변이체, 예컨대 AAVDJ8(또는 AAV-DJ8)로부터 선택되는 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다. AAVDJ8의 아미노산 서열은 헤파린 결합 도메인(HBD)을 제거하기 위해 둘 이상의 돌연변이를 포함할 수 있다. 비제한적인 예로서, 그 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는, 미국 특허 제7,588,772호에 서열번호 1로 기술된 AAV-DJ 서열은 다음과 같은 2개의 돌연변이를 포함할 수 있다: (1) R587Q(여기에서, 아미노산 587의 아르기닌(R; Arg)이 글루타민(Q; Gln)으로 변경됨) 및 (2) R590T(여기에서, 아미노산 590의 아르기닌(R; Arg)이 트레오닌(T; Thr)으로 변경됨). 또 다른 비제한적인 예로서, 다음과 같은 3개의 돌연변이를 포함할 수 있다: (1) K406R(여기에서, 아미노산 406의 라이신(K; Lys)이 아르기닌(R; Arg)으로 변경됨), (2) R587Q(여기에서, 아미노산 587의 아르기닌(R; Arg)이 글루타민(Q; Gln)으로 변경됨) 및 (3) R590T(여기에서, 아미노산 590의 아르기닌(R; Arg)이 트레오닌(T; Thr)으로 변경됨).

[0195] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAV4(WO 1998011244의 서열번호 1~20)과 같지만 이에 한정되지 않는, 국제 공개 번호 WO 1998011244에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0196] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, 국제 공개 번호 WO 2014144229(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은, AAV2G9를 생성하는 AAV2 내의 돌연변이일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0197] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAV3-3(WO 2005033321의 서열번호 217), AAV1(WO 2005033321의 서열번호 219 및 202), AAV106.1/hu.37(WO 2005033321의 서열번호 10), AAV114.3/hu.40(WO 2005033321의 서열번호 11), AAV127.2/hu.41(WO 2005033321의 서열번호 6 및 8), AAV128.3/hu.44(WO 2005033321의 서열번호 81), AAV130.4/hu.48(WO 2005033321의 서열번호 78), AAV145.1/hu.53(WO 2005033321의 서열번호 176 및 177), AAV145.6/hu.56(WO 2005033321의 서열번호 168 및 192), AAV16.12/hu.11(WO 2005033321의 서열번호 153 및 57), AAV16.8/hu.10(WO 2005033321의 서열번호 156 및 56), AAV161.10/hu.60(WO 2005033321의 서열번호 170), AAV161.6/hu.61(WO 2005033321의 서열번호 174), AAV1- 7/rh.48(WO 2005033321의 서열번호 32), AAV1-8/rh.49(WO 2005033321의 서열번호 103 및 25), AAV2(WO 2005033321의 서열번호 211 및 221), AAV2-15/rh.62(WO 2005033321의 서열번호 33 및 114), AAV2-3/rh.61(WO 2005033321의 서열번호 21), AAV2-4/rh.50(WO 2005033321의 서열번호 23 및 108), AAV2-5/rh.51(WO 2005033321

의 서열번호 104 및 22), AAV3.1/hu.6(WO 2005033321의 서열번호 5 및 84), AAV3.1/hu.9(WO 2005033321의 서열번호 155 및 58), AAV3-l l/rh.53(WO 2005033321의 서열번호 186 및 176), AAV3-3(WO 2005033321의 서열번호 200), AAV33.12/hu.17(WO 2005033321의 서열번호 4), AAV33.4/hu.15(WO 2005033321의 서열번호 50), AAV33.8/hu.16(WO 2005033321의 서열번호 51), AAV3-9/rh.52(WO 2005033321의 서열번호 96 및 18), AAV4-19/rh.55(WO 2005033321의 서열번호 117), AAV4-4(WO 2005033321의 서열번호 201 및 218), AAV4-9/rh.54(WO 2005033321의 서열번호 116), AAV5(WO 2005033321의 서열번호 199 및 216), AAV52.1/hu.20(WO 2005033321의 서열번호 63), AAV52/hu. 19(WO 2005033321의 서열번호 133), AAV5-22/rh.58(WO 2005033321의 서열번호 27), AAV5-3/rh.57(WO 2005033321의 서열번호 105), AAV5- 3/rh.57(WO 2005033321의 서열번호 26), AAV58.2/hu.25(WO 2005033321의 서열번호 49), AAV6(WO 2005033321의 서열번호 203 및 220), AAV7(WO 2005033321의 서열번호 222 및 213), AAV7.3/hu.7(WO 2005033321의 서열번호 55), AAV 8(WO 2005033321의 서열번호 223 및 214), AAVH-l/hu.1(WO 2005033321의 서열번호 46), AAVH-5/hu.3(WO 2005033321의 서열번호 44), AAVhu.1(WO 2005033321의 서열번호 144), AAVhu.10(WO 2005033321의 서열번호 156), AAVhu.11(WO 2005033321의 서열번호 153), AAVhu.12(WO 2005033321의 서열번호 59), AAVhu.13(WO 2005033321의 서열번호 129), AAVhu.14/AAV9(WO 2005033321의 서열번호 123 및 3), AAVhu.15(WO 2005033321의 서열번호 147), AAVhu.16(WO 2005033321의 서열번호 148), AAVhu.17(WO 2005033321의 서열번호 83), AAVhu.18(WO 2005033321의 서열번호 149), AAVhu.19(WO 2005033321의 서열번호 133), AAVhu.2(WO 2005033321의 서열번호 143), AAVhu.20(WO 2005033321의 서열번호 134), AAVhu.21(WO 2005033321의 서열번호 135), AAVhu.22(WO 2005033321의 서열번호 138), AAVhu.23.2(WO 2005033321의 서열번호 137), AAVhu.24(WO 2005033321의 서열번호 136), AAVhu.25(WO 2005033321의 서열번호 146), AAVhu.27(WO 2005033321의 서열번호 140), AAVhu.29(WO 2005033321의 서열번호 132), AAVhu.3(WO 2005033321의 서열번호 145), AAVhu.31(WO 2005033321의 서열번호 121), AAVhu.32(WO 2005033321의 서열번호 122), AAVhu.34(WO 2005033321의 서열번호 125), AAVhu.35(WO 2005033321의 서열번호 164), AAVhu.37(WO 2005033321의 서열번호 88), AAVhu.39(WO 2005033321의 서열번호 102), AAVhu.4(WO 2005033321의 서열번호 141), AAVhu.40(WO 2005033321의 서열번호 87), AAVhu.41(WO 2005033321의 서열번호 91), AAVhu.42(WO 2005033321의 서열번호 85), AAVhu.43(WO 2005033321의 서열번호 160), AAVhu.44(WO 2005033321의 서열번호 144), AAVhu.45(WO 2005033321의 서열번호 127), AAVhu.46(WO 2005033321의 서열번호 159), AAVhu.47(WO 2005033321의 서열번호 128), AAVhu.48(WO 2005033321의 서열번호 157), AAVhu.49(WO 2005033321의 서열번호 189), AAVhu.51(WO 2005033321의 서열번호 190), AAVhu.52(WO 2005033321의 서열번호 191), AAVhu.53(WO 2005033321의 서열번호 186), AAVhu.54(WO 2005033321의 서열번호 188), AAVhu.55(WO 2005033321의 서열번호 187), AAVhu.56(WO 2005033321의 서열번호 192), AAVhu.57(WO 2005033321의 서열번호 193), AAVhu.58(WO 2005033321의 서열번호 194), AAVhu.6(WO 2005033321의 서열번호 84), AAVhu.60(WO 2005033321의 서열번호 184), AAVhu.61(WO 2005033321의 서열번호 185), AAVhu.63(WO 2005033321의 서열번호 195), AAVhu.64(WO 2005033321의 서열번호 196), AAVhu.66(WO 2005033321의 서열번호 197), AAVhu.67(WO 2005033321의 서열번호 198), AAVhu.7(WO 2005033321의 서열번호 150), AAVhu.8(WO 2005033321의 서열번호 12), AAVhu.9(WO 2005033321의 서열번호 155), AAVLG- 10/rh.40(WO 2005033321의 서열번호 14), AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321의 서열번호 86), AAVLG-4/rh.38(WO 2005033321의 서열번호 7), AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321의 서열번호 163), AAVN721-8/rh.43(WO 2005033321의 서열번호 43), AAVpi. l(WO 2005033321의 서열번호 28), AAVpi.2(WO 2005033321의 서열번호 30), AAVpi.3(WO 2005033321의 서열번호 29), AAVrh.38(WO 2005033321의 서열번호 86), AAVrh.40(WO 2005033321의 서열번호 92), AAVrh.43(WO 2005033321의 서열번호 163), AAVrh.44(WO 2005033321의 서열번호 34), AAVrh.45(WO 2005033321의 서열번호 41), AAVrh.47(WO 2005033321의 서열번호 38), AAVrh.48(WO 2005033321의 서열번호 115), AAVrh.49(WO 2005033321의 서열번호 103), AAVrh.50(WO 2005033321의 서열번호 108), AAVrh.51(WO 2005033321의 서열번호 104), AAVrh.52(WO 2005033321의 서열번호 96), AAVrh.53(WO 2005033321의 서열번호 97), AAVrh.55(WO 2005033321의 서열번호 37), AAVrh.56(WO 2005033321의 서열번호 152), AAVrh.57(WO 2005033321의 서열번호 105), AAVrh.58(WO 2005033321의 서열번호 106), AAVrh.59(WO 2005033321의 서열번호 42), AAVrh.60(WO 2005033321의 서열번호 31), AAVrh.61(WO 2005033321의 서열번호 107), AAVrh.62(WO 2005033321의 서열번호 114), AAVrh.64(WO 2005033321의 서열번호 99), AAVrh.65(WO 2005033321의 서열번호 35), AAVrh.68(WO 2005033321의 서열번호 16), AAVrh.69(WO 2005033321의 서열번호 39), AAVrh.70(WO 2005033321의 서열번호 20), AAVrh.72(WO 2005033321의 서열번호 9), 또는, AAVcy.2, AAVcy.3, AAVcy.4, AAVcy.5, AAVcy.6, AAVrh.12, AAVrh.17, AAVrh.18, AAVrh.19, AAVrh.21, AAVrh.22, AAVrh.23, AAVrh.24, AAVrh.25, AAVrh.25/42 15, AAVrh.31, AAVrh.32, AAVrh.33, AAVrh.34, AAVrh.35, AAVrh.36, AAVrh.37, AAVrh14를 포함하나 이에 한정되지 않는, 이들의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 국제 공개 번호 WO 2005033321(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로

포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다. 변이체의 비제한적인 예는 WO 2005033321(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)의 서열 번호 13, 15, 17, 19, 24, 36, 40, 45, 47, 48, 51~54, 60~62, 64~77, 79, 80, 82, 89, 90, 93~95, 98, 100, 101, , 109~113, 118~120, 124, 126, 131, 139, 142, 151,154, 158, 161, 162, 165~183, 202, 204~212, 215, 219, 224~236을 포함한다.

[0198] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAVrh8R(WO 2015168666의 서열번호 9), AAVrh8R A586R 돌연변이체(WO 2015168666의 서열번호 10), AAVrh8R R533A 돌연변이체(WO 2015168666의 서열번호 11), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 국제 공개 번호 WO 2015168666(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 , 있다.

[0199] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAVhu68(예를 들어, WO 2018160582의 서열번호 2), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 국제 공개 번호 WO2018/160582(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0200] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAVhE1.1(US9233131의 서열번호 44), AAVhEr1.5(US9233131의 서열번호 45), AAVhER1.14(US9233131의 서열번호 46), AAVhEr1.8(US9233131의 서열번호 47), AAVhEr1.16(US9233131의 서열번호 48), AAVhEr1.18(US9233131의 서열번호 49), AAVhEr1.35(US9233131의 서열번호 50), AAVhEr1.7(US9233131의 서열번호 51), AAVhEr1.36(US9233131의 서열번호 52), AAVhEr2.29(US9233131의 서열번호 53), AAVhEr2.4(US9233131의 서열번호 54), AAVhEr2.16(US9233131의 서열번호 55), AAVhEr2.30(US9233131의 서열번호 56), AAVhEr2.31(US9233131의 서열번호 58), AAVhEr2.36(US9233131의 서열번호 57), AAVhER1.23(US9233131의 서열번호 53), AAVhEr3.1(US9233131의 서열번호 59), AAV2.5T(US9233131의 서열번호 42), 또는 이의 변이체와 같으나 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US9233131(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0201] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAV-PAEC(US20150376607의 서열번호 1), AAV-LK01(US20150376607의 서열번호2), AAV-LK02(US20150376607의 서열번호3), AAV-LK03(US20150376607의 서열번호4), AAV-LK04(US20150376607의 서열번호5), AAV-LK05(US20150376607의 서열번호6), AAV-LK06(US20150376607의 서열번호7), AAV-LK07(US20150376607의 서열번호8), AAV-LK08(US20150376607의 서열번호9), AAV-LK09(US20150376607의 서열번호 10), AAV- LK10(US20150376607의 서열번호 1), AAV-LK11(US20150376607의 서열번호 12), AAV-LK12(US20150376607의 서열번호 13), AAV-LK13(US20150376607의 서열번호 14), AAV-LK14(US20150376607의 서열번호 15), AAV-LK15(US20150376607의 서열번호 16), AAV-LK16(US20150376607의 서열번호 17), AAV-LK17(US20150376607의 서열번호 18), AAV-LK18(US20150376607의 서열번호 19), AAV- LK19(US20150376607의 서열번호20), AAV-PAEC2(US20150376607의 서열번호21), AAV-PAEC 4(US20150376607의 서열번호22), AAV-PAEC6(US20150376607의 서열번호23), AAV-PAEC7(US20150376607의 서열번호24), AAV-PAEC 8(US20150376607의 서열번호25), AAV-PAEC11(US20150376607의 서열번호26), AAV-PAEC 12(US20150376607의 서열번호27), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 공개 번호 US20150376607(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형일 수 있거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0202] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAV-2-pre-miRNA-101(US9163261의 서열번호 1), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US9163261(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형이거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0203] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 폴리펩티드는, AAV-8h(US20150376240의 서열번호 6), AAV-8b(US20150376240의 서열번호 5), AAV-h(US20150376240의 서열번호 2), AAV-b(US20150376240의 서열번호

1), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 공개 번호 US20150376240(이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형이거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0204] 일부 구현예에서, 본 발명의 AAV 입자는 AAV SM 102(US20160017295의 서열번호 22), AAV 셔플(Shuffle) 1001(US20160017295의 서열번호 23), AAV 셔플 1003(US20160017295의 서열번호 24), AAV 셔플 1007(US20160017295의 서열번호 25), AAV 셔플 102(US20160017295의 서열번호 34), AAV 셔플 106(US20160017295의 서열번호 35), AAV 셔플 108(US20160017295의 서열번호 36), AAV 셔플 1002(US20160017295의 서열번호 37), AAV SM 101(US20160017295의 서열번호 38), AAV SM 108(US20160017295의 서열번호 39), AAV SM 1003(US20160017295의 서열번호 40), AAV SM 10010(US20160017295의 서열번호 41), 또는 이의 변이체들과 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 공개 번호 US20160017295(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 서열일 수 있거나 이를 가질 수 있는 AAV 혈청형을 포함하거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0205] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, BNP61 AAV(US20150238550의 서열번호 1), BNP62 AAV(US20150238550의 서열번호 3), BNP63 AAV(US20150238550의 서열번호 4), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 공개 번호 US20150238550(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형이거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0206] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, AAVrh.50(US20150315612의 서열번호 108), AAVrh.43(US20150315612의 서열번호 163), AAVrh.62(US20150315612의 서열번호 114), AAVrh.48(US20150315612의 서열번호 115), AAVhu.19(US20150315612의 서열번호 133), AAVhu. l l(US20150315612의 서열번호 153), AAVhu.53(US20150315612의 서열번호 186), AAV4-8/rh.64(US20150315612의 서열번호 15), AAVLG-9/hu.39(US20150315612의 서열번호 24), AAV54.5/hu.23(US20150315612의 서열번호 60), AAV54.2/hu.22(US20150315612의 서열번호 67), AAV54.7/hu.24(US20150315612의 서열번호 66), AAV54.1/hu.21(US20150315612의 서열번호 65), AAV54.4R/hu.27(US20150315612의 서열번호 64), AAV46.2/hu.28(US20150315612의 서열번호 68), AAV46.6/hu.29(US20150315612의 서열번호 69), AAV128.1/hu.43(US20150315612의 서열번호 80), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 공개 번호 US20150315612(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형이거나, 이로부터 유래될 수 있다.

[0207] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, 트루 유형(true type) AAV (ttAAV)(WO 2015121501의 서열번호 2), "UPenn AAV10"(WO 2015121501의 서열번호 8), "재패니즈 AAV10"(WO 2015121501서열번호 9), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 국제 공개 번호 WO 2015121501(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 AAV 혈청형이거나, 이로부터 유래될 수 , 있다.

[0208] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및/또는 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는, 국제 공개 번호 WO 2015191508(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 개시된 캡시드 폴리펩티드로부터 선택될 수 있다.

[0209] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 관심 특정 세포 유형에서의 향상된 형질도입 또는 향성, 연장된 이식유전자 발현 및/또는 개선된 안전성 프로파일을 갖는 하이브리드 혈청형일 수 있다. 하이브리드 혈청형은 트랜스캡시드화(transcapsidation), 캡시드 표면에 대한 이중-특이적 항체의 흡착, 모자이크 캡시드 및 키메라 캡시드 및/또는 다른 캡시드 단백질 변형에 의해 생성될 수 있다.

[0210] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 캡시드 단백질의 합리적인 돌연변이유발(예를 들어, 문헌 [Pulicherla et al, Mol Ther, 201 1, 19: 1070-1078] 참조), 캡시드에 대한 펩티드 리간드의 통합, 및 새로운 AAV 변이체 생성을 위한 유도된 진화에 의한 특정 치료 응용을 위해 추가로 변형될 수 있다.

[0211] AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 인간, 비인간 영장류, 조류 및 소를 포함하나 이에 한정되지 않는 다양한

종으로부터 선택되거나 유래될 수 있는 AAV 혈청형일 수 있다. 일 구현예에서, AAV는 조류 AAV(AAAV)일 수 있다. AAAV 혈청형은 AAAV(US 9,238,800의 서열번호 1, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 및 14), 또는 이의 변이체와 같지만 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US 9238800(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 서열일 수 있거나, 이를 가질 수 있다.

[0212] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 소 AAV(BAAV)일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있는 AAV 혈청형일 수 있다. BAAV 혈청형은 BAAV(US 9193769의 서열번호 1 및 6), 또는 이의 변이체와 같지만, 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US 9,193,769(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 서열일 수 있거나 이를 가질 수 있다. BAAV 혈청형은 BAAV(US7427396의 서열번호 5 및 6), 또는 이의 변이체와 같지만, 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US7427396(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 서열일 수 있거나 이를 가질 수 있다.

[0213] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 염소 AAV일 수 있거나 이로부터 유래될 수 있는 AAV 혈청형일 수 있다. 염소 AAV 혈청형은 염소 AAV(US7427396의 서열번호 3), 또는 이의 변이체와 같지만, 이에 한정되지 않는, 미국 특허 번호 US7427396(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 서열일 수 있거나 이를 가질 수 있다.

[0214] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 2개 이상의 부모 혈청형으로부터 하이브리드 AAV로서 조작될 수 있는 AAV 혈청형일 수 있다. 일 구현예에서, 혈청형은 AAV2 및 AAV9로부터의 서열을 포함하는 AAV2G9일 수 있다. AAV2G9 AAV 혈청형은 미국 특허 공개 번호 US20160017005(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 서열이거나, 이를 가질 수 있다.

[0215] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 문헌[Pulicherla et al., Molecular Therapy 19(6): 1070-1078 (2011)](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 의해 기술된 바와 같은, 아미노산 390~627(VP1 넘버링)에 돌연변이를 갖는 AAV9 캡시드 라이브러리에 의해 생성될 수 있는 AAV 혈청형일 수 있다. 혈청형 및 상응하는 뉴클레오티드 및 아미노산 치환은, AAV9.1(G1594C; D532H), AAV6.2(T1418A 및 T1436X; V473D 및 I479K), AAV9.3(T1238A; F413Y), AAV9.4(T1250C 및 A1617T; F417S), AAV9.5(A1235G, A1314T, A1642G, C1760T; Q412R, T548A, A587V), AAV9.6(T1231A; F411I), AAV9.9(G1203A, G1785T; W595C), AAV9.10(A1500G, T1676C; M559T), AAV9.11(A1425T, A1702C, A1769T; T568P, Q590L), AAV9.13(A1369C, A1720T; N457H, T574S), AAV9.14(T1340A, T1362C, T1560C, G1713A; L447H), AAV9.16(A1775T; Q592L), AAV9.24(T1507C, T1521G; W503R), AAV9.26(A1337G, A1769C; Y446C, Q590P), AAV9.33(A1667C; D556A), AAV9.34(A1534G, C1794T; N512D), AAV9.35(A1289T, T1450A, C1494T, A1515T, C1794A, G1816A; Q430L, Y484N, N98K, V606I), AAV9.40(A1694T, E565V), AAV9.41(A1348T, T1362C; T450S), AAV9.44(A1684C, A1701T, A1737G; N562H, K567N), AAV9.45(A1492T, C1804T; N498Y, L602F), AAV9.46(G1441C, T1525C, T1549G; G481R, W509R, L517V), 9.47(G1241A, G1358A, A1669G, C1745T; S414N, G453D, K557E, T582I), AAV9.48(C1445T, A1736T; P482L, Q579L), AAV9.50(A1638T, C1683T, T1805A; Q546H, L602H), AAV9.53(G1301A, A1405C, C1664T, G1811T; R134Q, S469R, A555V, G604V), AAV9.54(C1531A, T1609A; L511I, L537M), AAV9.55(T1605A; F535L), AAV9.58(C1475T, C1579A; T492I, H527N), AAV.59(T1336C; Y446H), AAV9.61(A1493T; N498I), AAV9.64(C1531A, A1617T; L511I), AAV9.65(C1335T, T1530C, C1568A; A523D), AAV9.68(C1510A; P504T), AAV9.80(G1441A,;G481R), AAV9.83(C1402A, A1500T; P468T, E500D), AAV9.87(T1464C, T1468C; S490P), AAV9.90(A1196T; Y399F), AAV9.91(T1316G, A1583T, C1782G, T1806C; L439R, K528I), AAV9.93(A1273G, A1421G, A1638C, C1712T, G1732A, A1744T, A1832T; S425G, Q474R, Q546H, P571L, G578R, T582S, D611V), AAV9.94(A1675T; M559L) 및 AAV9.95(T1605A; F535L)일 수 있지만, 이에 한정되지 않는다.

[0216] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 국제 특허 번호 WO 2014160092(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 서열번호 1 및 3의 캡시드 서열을 포함할 수 있다.

[0217] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 국제 특허 번호 WO 2014052789(이의 내용은 그 전체가 본

원에 참조로 포함됨)의 서열번호 1 또는 서열번호 2 내지 4의 AAV 캡시드 서열을 포함할 수 있다.

[0218] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 미국 특허 번호 8,927,514(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은, CNS의 혈액-뇌 관문을 통과하는 증가된 능력을 가질 수 있다. 이러한 캡시드 단백질의 아미노산 서열 및 핵산 서열은 각각, 미국 특허 번호 8,927,514의 서열번호 2~17 및 서열번호 25~33을 포함하나 이에 한정되지 않는다.

[0219] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,056,502(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된, AAV5 캡시드 단백질 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0220] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, AAV6 캡시드 단백질 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0221] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 예를 들어, 미국 특허 번호 8,318,480(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 서열번호 2의 아미노산 서열을 포함하는, AAV8 캡시드 단백질 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0222] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 예를 들어, 미국 특허 번호 7,198,951(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 서열번호 2의 아미노산 서열, 또는 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 US20130224836(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같은 서열번호 2, 4, 또는 6의 서열을 포함하는, AAV9 캡시드 단백질 또는 이의 변이체일 수 있으며, 여기에서 아미노산 서열의 표면-노출 티로신 잔기 중 적어도 하나는 다른 아미노산 잔기로 치환된다.

[0223] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 특정 특성을 얻기 위해 조작된 변이체 캡시드 단백질일 수 있다. 조작된 캡시드를 얻기 위한 이러한 방법은, 예를 들어 특허 공개 WO 2011038187(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다. 이러한 방법 및 벡터는 또한, 예를 들어 특허 공개 WO 2012112832 및 특허 출원 공개 WO 2015054653(이들의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술되어 있다. 이러한 변이체 캡시드는 예를 들어, WO 2015054653의 서열번호 23, 또는 이의 변이체를 포함한다. 추가의 변이체 캡시드는 예를 들어 특허 공개 WO2017/019994(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 캡시드 서열을 포함한다. 구현예에서, AAV 캡시드 폴리펩티드는 Anc80 AAV 캡시드 서열(예를 들어, WO 2017019994의 서열번호 1), 예를 들어, Anc80L65(예를 들어, WO 2017019994의 서열번호 23), 또는, 예를 들어, Anc110(예를 들어, WO 2017019994의 서열번호 42)을 포함할 수 있다.

[0224] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rVVA 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, 예를 들어, EP 특허 번호 2341068(이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)의 서열번호 81의 아미노산 서열을 포함하는, AAVrh10 캡시드 단백질 또는 이의 변이체일 수 있다.

[0225] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드, 및/또는 본원에 기술된 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1 및/또는 VP3 폴리펩티드는, AAVDJ 캡시드 단백질, AAVDJ/8 캡시드 단백질, 또는 이의 변이체일 수 있다. 일 구현예에서, AAVDJ 캡시드 단백질 및/또는 AAVDJ/8 캡시드 단백질은 제1 AAV 혈청형(예를 들어, AAV2)으로부터 유래된 제1 영역, 제2 AAV 혈청형(예를 들어, AAV8)으로부터 유래된 제2 영역, 및 제3 AAV 혈청형(예를 들어, AAV 9)으로부터 유래된 제3 영역을 포함하는 아미노산 서열을 포함할 수 있으며, 여기에서 제1, 제2 및 제3 영역은 본 상세한 설명에 개시된 임의의 아미노산 서열들을 포함할 수 있다.

[0226] 일 구현예에서, AAV 캡시드 폴리펩티드의 혈청형은 원하는 분포, 원하는 형질도입 효율 및 세포 표적화에 따라 상이할 수 있다. 문헌[Sorrentino et al., comprehensive map of CNS transduction by eight adeno-associated virus serotypes upon cerebrospinal fluid administration in pigs, Molecular Therapy accepted article preview online 07 December 2015; doi: 10.1038/mt.2015.212](이의 내용은 그 전체가 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 바와 같이, AAV 혈청형은 상이한 분포, 형질도입 효율 및 세포 표적화를 제공하였다. 원하는 효능을 제공하기 위해, AAV 혈청형은 표적화할 세포뿐만 아니라 원하는 형질도입 효율 및 분포에 가장 잘 맞는

것을 선택할 필요가 있다.

[0227] 일부 구현예에서, rAAV 비리온은, 동일하지만 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온에 비해, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 나타낸다.

[0228] 일부 구현예에서, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형의 형질도입은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 또는 1000% 만큼 증가된다. 일부 구현예에서, rAAV 비리온은, 동일하지만 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온에 비해, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 적어도 2-배, 적어도 5-배, 적어도 10-배, 적어도 15-배, 적어도 20-배, 적어도 25-배, 적어도 30-배, 적어도 40-배, 적어도 50-배, 적어도 100-배, 적어도 1000-배 또는 1000-배 이상의 증가된 형질도입을 나타낸다. 일부 구현예에서, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 향성은 약 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900% 또는 1000% 만큼 증가된다.

[0229] 일부 구현예에서, 상기 rAAV 비리온에 포함된 모든 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 직접적으로, 또는 링커를 통해 폴리펩티드 리간드에 융합된다.

[0230] 일부 구현예에서, rAAV 비리온은 비-코딩 핵산, 단백질 또는 RNA 코딩 서열, 발현 카세트, 다중 발현 카세트, 상동성 재조합을 위한 서열, 및 게놈 유전자 표적화 카세트를 추가로 포함한다.

[0231] 일부 구현예에서, rAAV 비리온은 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 이들 구현예 중 일부에서, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 rAAV 비리온에 포함된 상기 핵산 서열에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일하다.

[0232] 일부 구현예에서, rAAV 비리온은 치료 핵산, 치료 단백질 또는 치료 항체 또는 항체 단편을 암호화하는 핵산 서열을 포함한다.

[0233] 치료 핵산은 mRNA, siRNA, miRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0234] 항체 단편은, 예를 들어, Fab, Fab', F(ab')2, Fv, 단일 도메인 항체(dAb), 및 단일쇄 가변 단편(scFv)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0235] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온은 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 AAV 혈청형이다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형이다. 이러한 구현예 중 일부에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 동일한 AAV 혈청형이다.

[0236] 일부 구현예에서, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는, 상기 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드로 구성된 AAV 비리온의 표적 세포 상에 존재하는 이들의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 필수 결합 부위는 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드에서 돌연변이된다. 일부 구현예에서, AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 각각의 AAV 캡시드 폴리펩티드의 공유 VP3 영역에 적어도 하나의 동일한 돌연변이를 포함한다. 이러한 구현예 중 일부에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이고, 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, i) K531E 및 V473D; ii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; iii) G266A 및 N269Q; iv) G266A, N269Q 및 D590A; v) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 vi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0237] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이고, 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진

군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, i) G268E 및 N271Q; ii) S387A; iii) G268E, N271Q 및 S387A; iv) A592Q; 또는 v) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0238] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이고, 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, i) W503A; ii) N562A 및 E563A; iii) Q590A 및 W503A; 또는 iv) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0239] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이고, 각각, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0240] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, i) V473D 및 N500E; ii) R514A; 또는 iii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0241] 일 양태에서, 본원에 기술된 rAAV 비리온을 포함하는 세포가 본원에 제공된다.

[0242] 일부 구현예에서, 세포는 숙주 세포이다. 일구 구현예에서, rAAV 비리온은 상기 숙주 세포 내에 조립된다. 숙주 세포는, 곤충 세포(예를 들어, Sf9 세포) 및 HEK293 세포 또는 이의 유도체, 예컨대 HEK293T/17 세포 또는 AAV293 세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0243] 일부 구현예에서, 세포는 쥣과 세포, 비인간 영장류 세포 또는 인간 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 포유동물 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 포유동물 세포는 간 세포, 뇌 세포, 비장 세포, 신장 세포, 혈액 세포, 폐 세포, 근육 세포, 심장 세포, 골수 세포, 다능성 전구체 세포(MPP), 예컨대 다능성 조혈 전구체 세포, 및 조혈 줄기 세포(HSC), 예컨대 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0244] **약학적 조성물 및 사용 방법**

[0245] 일 양태에서, 본원에 기술된 rAAV 비리온 및 약학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다.

[0246] 본원에 기술된 rAAV 비리온은 약학적으로 유용한 조성물의 제조를 위해 제형화될 수 있다. 예시적인 제형화는 예를 들어 미국 특허 9,051,542호 및 미국 특허 6,703,237호에 개시된 것을 포함하고, 그 전체 내용은 참조로 포함된다. 본 발명의 조성물은 포유동물 대상체, 예를 들어 인간에게 투여하기 위해 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 전달 시스템은 근육내, 피내, 점막, 피하, 정맥내, 척추강내, 주사 가능한 데포 유형 장치, 또는 국소 투여용으로 제형화될 수 있다.

[0247] 일부 구현예에서, 전달 시스템이 용액 또는 현탁액으로 제형화되는 경우, 전달 시스템은 허용되는 담체, 예를 들어 수성 담체 내에 있다. 다양한 수성 담체, 예를 들어 물, 완충수, 0.8% 식염수, 0.3% 글리신, 히알루론산 등이 사용될 수 있다. 이러한 조성물은 멸균 및/또는 멸균 여과될 수 있다. 생성된 수용액은 그대로 사용하기 위해 패키징되거나, 동결건조될 수 있다. 일부 구현예에서, 동결건조된 제제는 투여 전에 멸균 용액과 조합된다.

[0248] 일부 구현예에서, 조성물, 예를 들어 제약 조성물은 pH 조절제 및 완충제, 등장성 조절제, 습윤제 등과 같이 생리학적 조건에 근접하도록 하는 제약상 허용되는 보조 물질, 예를 들어 아세트산나트륨, 락트산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 소르비탄 모노라우레이트, 트리에탄올아민 올레에이트 등을 함유할 수 있다. 일부 구현예에서, 제약 조성물은 보존제를 포함한다. 일부 다른 구현예에서, 제약 조성물은 보존제를 포함하지 않는다.

[0249] 제약 조성물은 전형적으로 의도되는 투여 경로에 대해 적합하도록 제형화된다. 투여 경로의 비제한적 예는 비경구, 예를 들어 정맥내, 동맥내, 피하, 복강내, 척수강내, 근육내, 또는 주사 또는 주입 투여를 포함한다. 적합한 약학적 조성물의 제형화 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어 문헌[Remington: The Science and

Practice of Pharmacy, 21st ed, 2005; Drugs and the Pharmaceutical Sciences: a Series of Textbooks and Monographs (Dekker, NY)(해당 시리즈의 출판물)]을 참조한다.

[0250] 또한, 의약으로서의 용도를 위한 rAAV 비리온 또는 이를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 예를 들어, 본원에 개시된 rAAV 비리온은 치료 RNA 또는 단백질을 암호화하는 이종 핵산을 표적 세포에 전달하기 위해 투여될 수 있다. 따라서, 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료적 응용" 또는 "치료"는 질병의 치료 또는 예방을 위한 유전자 요법을 포함하며, 여기에서 "유전자 요법"이라는 용어는, 환자의 임상 상태를 개선하기 위한 목적으로, 결함이 있는 유전자를 교정하기 위한 외래 유전자 물질을 세포, 조직 또는 기관 내로 직접적으로 도입하는 개념으로 광범위하게 정의될 수 있다. 예를 들어, 이종 핵산은 돌연변이화되거나 손실되어 유전자적 질환을 일으키는 표적 세포의 유전자를 대체할 수 있다. 본원에 기술된 rAAV 비리온의 투여는 이러한 유전자적 질환의 치료, 예방, 지연, 둔화 또는 완화를 위한 역할을 할 수 있다. 일부 구현예에서, "유전자 치료"는, 세대에서 세대로 전달되는 유전적 변화를 유도하는 "생식계열 치료"가 아닌 "체세포 치료"만을 의미하며, 여기에서 체세포 치료는 해당 치료 효과를 치료 대상 개체로 제한한다. 본원에 기술된 rAAV 비리온은 생체 내 또는 생체 외로 투여될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 용어 "치료하다" 및 "치료"는, 본원에 개시된 rAAV 비리온을 포함하는 조성물의 유효 용량 또는 유효 다회 용량을 이를 필요로 하는 동물(인간 포함)에게 투여하는 단계를 포함한다. 장애/질환이 발병하기 전에 용량이 투여되는 경우, 해당 투여는 예방적이다. 장애/질환이 발병한 후에 용량을 투여되는 경우, 해당 투여는 치료적이다. 일부 구현예에서, 유효 용량은 치료되는 장애/질환 상태와 연관된 적어도 하나의 증상을 검출 가능하게 완화(제거 또는 감소)시키고/시키거나, 장애/질환 상태로의 진행을 늦추거나 예방하고/하거나, 장애/질환 상태의 진행을 늦추거나 예방하고/하거나, 질환의 정도를 감소시키고/시키거나, 질환의 (부분적 또는 전체적) 관해를 유발하고/하거나, 생존을 연장시키는 용량이다. 해당 용어는 완전한 치료(즉, 치유) 및/또는 예방을 포함하나, 이를 필요로 하지는 않는다.

[0251] 일 양태에서, 이식유전자를 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 해당 방법은 본원에 기술된 rAAV 비리온 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함한다.

[0252] 일 양태에서, 이식유전자를 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 여기에서 세포는 상기 폴리펩티드 리간드가 특이적으로 결합하는 세포 표면 분자를 발현한다.

[0253] 일부 구현예에서, 세포는 살아있는 대상체 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 대상체은 포유동물 대상체, 예를 들어 인간이다.

[0254] 일 양태에서, 치료적 치료 요법에서 또는 백신으로서, 본원에 기술된 rAAV 비리온 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 사용하는 방법이 본원에 제공된다.

[0255] 일 양태에서, 치료 방법에서 대상체에게 투여되는 총 rAAV 비리온의 양을 감소시키는 방법에 있어서의, 본원에 기술된 rAAV 비리온 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 사용하는 방법이 제공되며, 해당 방법은, 동일한 치료 효과를 달성할 수 있는, 동일하지만 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 rAAV의 투여량에 비해, 감소된 양의 총 rAAV 비리온을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0256] 일 양태에서, 치료 방법에서 대상체에게 투여되는 rAAV 비리온의 형질도입 효율을 증가시키는 방법에 있어서의, 본원에 기술된 rAAV 비리온 또는 이를 포함하는 약학적 조성물을 사용하는 방법이 제공되며, 해당 방법은 일정량의 rAAV 비리온을 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기에서 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온은, 동일하지만 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되지 않은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 rAAV에 비해, 보다 높은 속도로 세포 유형 또는 조직을 형질도입시킬 수 있다.

[0257] **AAV VP2 융합 폴리펩티드 라이브러리**

[0258] 일 양태에서, 예를 들어 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는, 예를 들어 이들로 이루어진 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 라이브러리 작제물이 본원에 제공되며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는다.

[0259] 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물에 의해 암호화된 폴리펩티드 리간드는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개의 아미노산 위치에 무작위화된 아미노산을 포함한다.

[0260] 일 양태에서, 예를 들어 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는, 예를 들어 이들로 이루어진 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 라이브러리 작제물이 본원에 제공되며, 여기

에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0261] 일부 구현예에서. 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0262] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 리간드는, 선택적으로 최대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 보유하는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드로부터 선택된다.

[0263] 일부 구현예에서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0264] 일부 구현예에서, 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y, W 및 아미노산 치환으로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드로부터 선택되며, 여기에서 서열번호 1은 선택적으로 최대 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 또는 1개의 아미노산 치환(들)을 보유한다.

[0265] 일부 구현예에서, 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 폴리펩티드 리간드와 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 사이에 펩티드 링커를 추가로 포함한다. 이러한 구현예 중 일부에서, 상기 펩티드 링커는 글리신-세린(GS) 링커 및 알라닌-프롤린-세린(APS) 링커로 이루어진 군으로부터 선택된다. 이러한 구현예 중 일부에서, GS 링커는 식 [GGGGS]n으로 표시되며, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 예를 들어, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 특히, n은 1, 2, 3 또는 4이다. 일부 구현예에서, APS 링커는 식 [APS]n으로 표시되며, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 예를 들어, n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이며, 특히, n은 2, 3, 4 또는 5이다.

[0266] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 천연 개시 코돈을 포함하지 않는다. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 천연 개시 코돈은 돌연변이화, 예를 들어, 결실될 수 있다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에는 이의 제1 천연 아미노산, 예를 들어, 이에 상응하는 야생형 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 제1 트레오닌이 누락된다.

[0267] 일 양태에서, 본원에 기술된 복수의 라이브러리 작제물을 포함하는 라이브러리가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 본원에 기술된 적어도 2개의 상이한 라이브러리 작제물을 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리에 포함된 적어도 2개의 상이한 라이브러리 작제물은 폴리펩티드 리간드를 암호화하는 핵산에서 상이하다.

[0268] 일부 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^9개의 고유 라이브러리 작제물을 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4~10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 또는 10^8~10^9개의 고유 라이브러리 작제물을 포함한다.

[0269] 일부 구현예에서, 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 또는 10^{10}개의 구성원을 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4~10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 10^8~10^9 또는 10^9~10^{10}개의 구성원을 포함한다.

[0270] 일부 구현예에서, 라이브러리는 폴리펩티드 리간드의 모든 가능한 변이체를 암호화하는 라이브러리 작제물을 포함한다.

[0271] 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 RNA 분자, 예를 들어 mRNA 분자, 또는 DNA 분자, 예를 들어 cDNA 분자, 선형 DNA 분자 또는 원형 DNA 분자, 예를 들어 플라스미드 DNA 분자이다. 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드의 개방 판독 프레임은 상기 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0272] 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 상기 핵산 서열을 포함하는 플라스미드 DNA 분자이다. 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 리포터 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 리포터 단백질은 EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0273] 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 바코드 서열을 추가로 포함한다. 이러한 구현예 중 일부에서, 각각의 특정 AAV VP2 융합 폴리펩티드 서열에는 특정 바코드 서열이 할당되며, 이는 각각의 특정 바코드 서열이 하나의 특정 AAV VP2 융합 폴리펩티드 서열에 상응한다는 것을 의미한다.

[0274] 일부 구현예에서, 라이브러리는 AAV 라이브러리이며, 이는 각각의 라이브러리 작제물이 rAAV 비리온 내에 존재한다는 것을 의미한다.

[0275] 일부 구현예에서, rAAV 비리온은, 예를 들어, 이의 캡시드 내에, 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함한다. 일부 구현예에서, 주어진 rAAV에, 예를 들어, 이의 캡시드 내에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 주어진 rAAV 비리온 내에 존재하는 라이브러리 작제물에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일하다. 일부 구현예에서, 대부분의 rAAV 비리온은 주어진 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 라이브러리 작제물을 포함한다. 이는 AAV 라이브러리의 유전자형-표현형 연관 또는 캡시드-게놈 상관관계로 지칭된다.

[0276] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^9개의 고유 AAV 변이체를 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4~10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 또는 10^8~10^9개의 고유 AAV 변이체를 포함한다.

[0277] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 또는 10^{10}개의 AAV 구성원을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4~10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 10^8~10^9 또는 10^9~10^{10}개의 AAV 구성원을 포함한다.

[0278] 본원에 기술된 AAV 라이브러리는 원하는 특성을 갖는 캡시드 폴리펩티드, 예를 들어 AAV VP2 융합 폴리펩티드의 표현형 선택을 위해 사용될 수 있다. AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 게놈 복제로부터 cis로 암호화된다. 이는 표현형 선택 후 캡시드 DNA의 복구를 허용한다. 따라서, 바이러스 라이브러리의 생산 동안 캡소머의 무작위 혼합 및 불일치 바이러스 게놈의 캡시드화를 최소화하는 것이 바람직하다. 이는, 예를 들어, rAAV 비리온 생산을 위한 적절한 조건을 선택함으로써, 예를 들어, rAAV 비리온 생산을 위한 숙주 세포의 형질감염의 위한, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자와 AAV VP1 및 VP3 캡시드 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 분자의 적절한 비율을 사용하여 달성될 수 있다. 전형적으로, VP1 및 VP3 암호화 핵산은 형질감염 반응에서 AAV VP2 융합 폴리펩티드 암호화 핵산에 비해 과량으로 사용된다. AAV VP2 융합 폴리펩티드 암호화 핵산은 평균적으로, 각각의 숙주 세포가 단일 AAV VP2 융합 폴리펩티드 암호화 핵산으로만 형질감염되는 양으로 사용된다.

[0279] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리의 rAAV 비리온에 포함된 모든 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 직접적으로, 또는 링커를 통해 폴리펩티드 리간드에 융합된다.

[0280] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리의 각각의 라이브러리 작제물은 AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임의 상류 및 하류, 예를 들어 라이브러리 작제물의 5' 및 3' 말단에 위치된 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 구현예에서, 라이브러리 작제물은 리포터 서열을 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화한다. 일부 구현예에서, 리포터 단백질은 EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 리포터 서열은 프로모터, 예를 들어 라이브러리 작제물에 포함된 제2 프로모터에 작동 가능하게 연결된다.

[0281] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리의 rAAV 비리온은 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하고, AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 AAV 혈청형이다. 일부 구현예에서, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 AAV 혈청형이다. 일부 구현예에서, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 동일한 AAV 혈청형이다.

[0282] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리의 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는, 상기 AAV VP1,

VP2 및 VP3 폴리펩티드로 구성된 AAV 비리온의 표적 세포 상에 존재하는 이들의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함한다. 특정 구현예에서, 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 필수 결합 부위는 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드에서 돌연변이된다. 일부 구현예에서, AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 각각의 AAV 캡시드 폴리펩티드의 공유 VP3 영역에 적어도 하나의 동일한 돌연변이를 포함한다.

[0283] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이고, 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, i) K531E 및 V473D; ii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; iii) G266A 및 N269Q; iv) G266A, N269Q 및 D590A; v) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 vi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0284] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이고, 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, i) G268E 및 N271Q; ii) S387A; iii) G268E, N271Q 및 S387A; iv) A592Q; 또는 v) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0285] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이고, 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, i) W503A; ii) N562A 및 E563A; iii) Q590A 및 W503A; 또는 iv) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0286] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이고, 각각, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함한다.

[0287] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, i) V473D 및 N500E; ii) R514A; 또는 iii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함한다.

[0288] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리의 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D213A, T162R 및 P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0289] 다른 구현예에서, AAV 라이브러리의 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함한다.

[0290] 이러한 특정 구현예에서, 상기 rAAV 비리온에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D214A, K163R 및 P192N의 3개의 치환 모두를 포함한다.

[0291] 이러한 다른 구현예에서, 상기 rAAV 비리온에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이고, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 융합

폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D213A, S162R 및 P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0292] 일 양태에서, 본원에 기술된 바와 같은 변이체 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 각각 포함하는 복수의 rAAV 비리온을 포함하는 라이브러리가 본원에 제공된다.

[0293] 일부 구현예에서, 라이브러리는 본원에 기술된 바와 같은 변이체 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 각각 포함하는 적어도 2개의 상이한 rAAV 비리온을 포함한다. 일부 구현예에서, 적어도 2개의 상이한 rAAV 비리온은 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 폴리펩티드 리간드가 상이하다.

[0294] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^9개의 고유 rAAV 비리온을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4~10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 또는 10^8~10^9개의 고유 rAAV 비리온을 포함한다.

[0295] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 10^9, 또는 10^{10}개의 rAAV 구성원을 포함한다. 일부 구현예에서, AAV 라이브러리는 10^2~10^3, 10^3~10^4, 10^4-10^5, 10^5~10^6, 10^6~10^7, 10^7~10^8, 10^8~10^9 또는 10^9~10^{10}개의 rAAV 구성원을 포함한다.

[0296] 일부 구현예에서, 상기 라이브러리에 포함된 rAAV 비리온은 바코드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 일부 구현예에서, 각각의 특정 AAV VP2 융합 폴리펩티드에는 특정 바코드 서열이 할당되며, 이는 주어진 아미노산 서열의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온이 상응하는 바코드 서열을 포함하는 핵산을 포함함을 의미한다. 바코드 서열은 예를 들어 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18개, 또는 그 이상의 뉴클레오티드를 포함할 수 있다.

[0297] **AAV VP2 융합 폴리펩티드 변이체의 식별 방법**

[0298] 일 양태에서, 적어도 하나의 원하는 특성을 갖는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생성하는 방법이 본원에 제공되며, 해당 방법은 상기 적어도 하나의 원하는 특징을 갖는 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 대해 본원에 기술된 라이브러리를 스크리닝하는 단계를 포함한다.

[0299] 일부 구현예에서, 상기 적어도 하나의 원하는 특징은, 상기 폴리펩티드 리간드를 포함하지 않지만, 이를 제외하고는 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 포함된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드와 동일한 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 대비, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 의해 매개되는 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성이다.

[0300] 일 양태에서, 적어도 하나의 원하는 특성을 갖는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생성하는 방법이 제공되며, 이는 다음의 단계를 포함한다: b) 본원에 기술된 라이브러리를 다수의 세포와 접촉시키는 단계, c) 상기 세포의 적어도 일부로부터 핵산 분자를 단리하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 단리된 적어도 하나의 핵산 분자의 폴리펩티드 리간드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 결정하는 단계. 일부 구현예에서, 단계 b)에서의 복수의 세포는 비인간 모델 동물, 예를 들어 쥣과 모델 또는 비인간 영장류 모델 내에 존재한다.

[0301] 일부 구현예에서, 방법은 단계 b) 이전에 본원에 기술된 바와 같은 AAV 라이브러리를 제공하는 단계 a)를 추가로 포함한다. 일부 구현예에서, 라이브러리는 HEK293 세포 또는 HEK293 유도체 세포에 패키징되며, 여기에서 헬퍼 기능(예를 들어, E2A, E4, VA, E1A 및 E1B)은 트랜스로 공급된다. 일부 구현예에서, AAV rep 기능은 rep78, rep 68, rep 52 및 rep40 유전자 산물을 포함한다. 일부 구현예에서, rep 유전자는 트랜스로 공급된다. 일부 구현예에서, rep78 및/또는 rep68 개방 판독 프레임의 개시 코돈은 역위 말단 반복부(ITR)를 함유하는 캡시드 라이브러리 작제물의 복제를 증가시키기 위해 ACG로부터 ATG로 변경됨으로써, AAV 라이브러리 제조 수율을 향상시킨다. 일부 구현예에서, cap 유전자는 트랜스로 공급된다. 일부 구현예에서, cap 유전자는 헬퍼 바이러스 기능의 존재 하 HEK293 세포에서의 제조 동안에만 발현되도록 p40 프로모터에 의해 제어된다. 일부 구현예에서, 트랜스로 제공되는 cap 유전자의 VP2 개방 판독 프레임의 개시 코돈은 돌연변이된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 AAV 제조 시 생산 세포주에 페이로드로서 공급된다.

[0302] 일부 구현예에서, AAV 라이브러리를 제공하는 단계 a)는: ai) AAV rep을 암호화하는 핵산, AAV VP1 캡시드 폴리펩티드를 암호화하는 핵산, AAV VP3 캡시드 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 및 본원에 기술된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 라이브러리(여기에서, 각각의 라이브러리 작제물은 5' 및 3' 말단에 2개의 AAV 역

위 말단 반복(ITR) 서열을 추가로 포함함)로 세포를 형질감염시키는 단계, 및 aii) AAV 비리온 형성에 적합한 조건 하에서 세포를 인큐베이션하는 단계를 포함하며, 선택적으로, 여기에서 세포는 포유동물 세포, 특히 HEK293 세포, 또는 곤충 세포, 특히 Sf9 세포이다.

[0303] 일부 구현예에서, 상기 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및 상기 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는 AAV cap 유전자를 포함하는 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되되, 특히 cap 유전자 내 VP2의 개시 코돈은 돌연변이된다.

[0304] 일부 구현예에서, 단계 b)의 복수의 세포는 비인간 모델 동물 내에 존재한다. 일부 구현예에서, 동물은 정맥내, 두개내 또는 척추강내 주사를 통해, 또는 일부 다른 경로(예를 들어, 비강, 간, 뇌실내, 수조내, 유리체내, 달팽이관내 등)에 의한 주사에 의해, AAV 라이브러리로 치료된다. AAV가 원하는 조직 또는 기관으로 이동하는 데 충분한 시간(예를 들어, 7, 10, 14, 18, 21, 24, 28, 30일 또는 그 이상)이 지난 후, 동물을 희생시키고 관심 조직/기관을 채취한다. 일부 구현예에서,채취되는 관심 조직/기관은 CNS, 뇌, 심장, 폐, 기도, 식도, 근육, 뼈, 연골, 골수, 위, 췌장, 장, 간, 비장, 방광, 신장, 요관, 요도, 자궁, 나팔관, 난소, 고환, 전립선, 눈, 혈액, 림프 및 구강 점막으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 채취되는 관심 조직/기관은 전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐 및 골수로부터 선택된다.

[0305] 일부 구현예에서, 조직 내의 세포는 세포의 세포질 또는 관심 세포 소기관에서의 리포터 서열의 발현에 대해 모니터링된다. 일부 구현예에서, 관심 소기관은 핵이다. 일부 구현예에서, 리포터 서열의 발현에 의해 입증되는 AAV 페이로드를 포함하는 소기관은 조직으로부터 단리된다. 일부 구현예에서, 소기관은 핵이다. 일부 구현예에서, 방법은 상기 리포터 서열이 발현되는 세포를 선택하는 단계를 추가로 포함한다.

[0306] 일부 구현예에서, 단계 c)에서, 사전에 정의된 조직 또는 세포 유형의 세포로부터 핵산이 단리된다. 일부 구현예에서, 사전 정의된 조직의 세포는 CNS, 뇌, 심장, 폐, 기도, 식도, 근육, 뼈, 연골, 골수, 위, 췌장, 장, 간, 비장, 방광, 신장, 요관, 요도, 자궁, 나팔관, 난소, 고환, 전립선, 눈, 혈액, 림프 및 구강 점막으로부터의 세포로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 사전 정의된 조직의 세포는 전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐 및 골수로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 사전 정의된 세포 유형의 세포는 다능성 전구체 세포(MPP), 예컨대 다능성 조혈 전구체 세포, 및 조혈 줄기 세포(HSC), 예컨대 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)로부터 선택된다. 일부 구현예에서, 사전 정의된 조직 또는 세포 유형의 상기 세포는 복수의 세포를 상기 라이브러리와 접촉시키는 단계 후 1~21일, 1~14일, 7~21일, 2~10일, 2~5일 후에 단리된다.

[0307] 일부 구현예에서, 핵산은 소기관(예를 들어, 핵)으로부터 추출된다. 일부 구현예에서, 추출된 핵산은 RNA인 한편, 일부 구현예에서, 추출된 핵산은 DNA이다. 일부 구현예에서, 추출된 RNA는 역전사를 거쳐 cDNA를 생성하고, 이어서 이는 증폭된다. 일부 구현예에서, 바코드화된 영역에 특이적인 프라이머가 증폭에 사용된다. 일부 구현예에서, 다양한 폴리펩티드 리간드를 암호화하는 서열의 적어도 일부는 증폭된다. 일부 구현예에서, 증폭된 cDNA는 시퀀싱된다. 일부 구현예에서, 특정 조직/기관에서의 특정 AAV 변이체의 농축이 생체 내 선택 후에 관찰된다.

[0308] 일부 구현예에서, 단계 c)는 상기 세포의 적어도 일부로부터 RNA를 단리하는 단계를 포함하고, 단계 d)는 다음의 하위 단계를 포함한다: di) 상기 단리된 RNA의 역전사 단계, dii) 단계 di)에서 생성된 cDNA로부터 폴리펩티드 리간드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 PCR 증폭하는 단계, 및 diii) 예를 들어 차세대 시퀀싱을 사용하여 폴리펩티드 리간드 서열의 적어도 일부를 시퀀싱하는 단계.

[0309] 일부 구현예에서, 방법은 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 특정 폴리펩티드 리간드 서열의 상대적 발생을, 상기 조직 또는 세포 유형의 폴리펩티드 리간드 서열의 총 수와 비교하여 결정하는 단계 e)를 추가로 포함한다.

[0310] 일부 구현예에서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 변이체의 생체 내 선별은 1, 2, 3, 4, 5회 이상의 라운드로 수행될 수 있으며, 각각의 경우, 이전 라운드로부터 수득된 AAV 변이체의 풀링, 또는 시험관 내 또는 생체 내에서 농축되거나 재-선별된 변이체의 서브세트의 합성이 수행될 수 있다.

[0311] 일부 구현예에서, 방법은, 단계 c)에서 단리된 핵산 분자로부터 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 제2 라이브러리를 생성하고, 상기 제2 라이브러리에 대해, 단계 b), c), d) 및 선택적으로 단계 a) 및 e)를 반복하는 단계 f)를 추가로 포함한다.

[0312] 일부 구현예에서, 원하는 횟수의 선별 라운드 후, 수득된 변이체는 분석된다. 일부 구현예에서, 개별 변이체는 이식유전자, 예컨대 리포터 유전자를 생체 내에서 원하는 세포 또는 기관에 전달하는 데 사용된다. 해당 변이체의 전달 능력에 대한 분석 후, 향후 사용에 대한 가장 적합한 후보가 선별된다.

[0313] 일부 구현예에서, 선별된 후보는 무작위 돌연변이유발 및 개선된 특징, 예컨대 특정 세포 유형 또는 조직의 세포의 개선된 형질도입에 대한 변이체의 생체 내 또는 시험관 내 선별에 의한 기능적 성숙을 거친다.

[0314] 일 양태에서, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0315] 또한, 본원에 기술된 방법에 의해 생성된 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온 및 이를 포함하는 약학적 조성물이 본원에 제공된다. 상기 rAAV 비리온 및 약학적 조성물은 의약으로서 사용될 수 있다.

[0316] **개선된 수용체 결합 및/또는 형질도입 수준을 갖는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드**

[0317] 일 양태에서, AAV 혈청형 AAV1이고, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드가 본원에 제공된다. 일부 구현예에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, T162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하고, 특히 D213A, T162R, 및 P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0318] 또 다른 양태에서, AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드가 본원에 제공된다.

[0319] 일부 구현예에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D214A, K163R 및 P192N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0320] 다른 구현예에서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이고, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함한다. 특히, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하며, 특히, D213A, S162R 및 / P191N의 3개의 아미노산 치환 모두를 포함한다.

[0321] 또한, 위에 열거된 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 중 하나 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드가 본원에 제공되며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합된다.

[0322] **구현예**

[0323] 1. 아데노 연관 바이러스(AAV) VP2 융합 폴리펩티드로서, 예를 들어 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하되, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0324] 2 구현예 1에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형 상에서 발현된 세포 표면 분자에 특이적으로 결합하고/하거나, 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 상기 폴리펩티드 리간드를 포함하지 않는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 대비, 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성을 매개하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0325] 3. 구현예 1 또는 2에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0326] 4. 구현예 3에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0327] 5. 구현예 4에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0328] 6. 구현예 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 폴리펩티드 리간드와 AAV VP2 캡시드

폴리펩티드 사이에 펩티드 링커를 추가로 포함하되, 특히, 상기 펩티드 링커는 글리신-세린(GS) 링커 및 알라닌-프롤린-세린(APS) 링커로 이루어진 군으로부터 선택되고, 보다 구체적으로, GS 링커는 식 [GGGGS]n으로 표시되며 APS 링커는 식 [APS]n으로 표시되고, 여기에서 n은 1 내지 10 범위의 정수이고, 특히 n은 1, 2, 3, 4, 5 또는 6이고, 보다 구체적으로 n은 GS 링커의 경우 1, 2, 3 또는 4이고 APS 링커의 경우 2, 3, 4 또는 5인, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0329] 7. 구현예 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 상기 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터, 특히 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형인, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0330] 8. 구현예 7에 있어서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 이의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되,

[0331] 특히 a) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이며, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, ai) K531E 및 V473D; aii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; aiii) G266A 및 N269Q; aiv) G266A, N269Q 및 D590A; av) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 avi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0332] b) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이며, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, bi) G268E 및 N271Q; bii) S387A; biii) G268E, N271Q 및 S387A; biv) A592Q; 또는 bv) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0333] c) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, ci) W503A; cii) N562A 및 E563A; ciii) Q590A 및 W503A; 또는 civ) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0334] d) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이며, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0335] e) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 이의 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, ei) V473D 및 N500E; eii) R514A; 또는 eiii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0336] 9. 구현예 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, a) AAV VP2 융합 폴리펩티드는, AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 구체적으로, bi) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나를 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, bii) AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하는, AAV VP2

융합 폴리펩티드.

[0337] 10. 구현예 9a)에 있어서, AAV VP2 융합 폴리펩티드는 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 아미노산 치환 V473D 및 N500E를 추가로 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0338] 11. 구현예 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드에는 상응하는 야생형 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 제1 트레오닌이 결여되는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0339] 12. 구현예 1 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 최대 3개의 시스테인 잔기, 특히 최대 2개의 시스테인 잔기, 보다 구체적으로 최대 1개의 시스테인 잔기, 가장 구체적으로 시스테인 잔기를 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0340] 13. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 단리된 핵산.

[0341] 14. 구현예 13에 있어서, 프로모터를 추가로 포함하는, 단리된 핵산.

[0342] 15. 구현예 13 또는 14에 있어서, AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임(ORF)의 상류 및 하류에 위치된 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열을 추가로 포함하고, 선택적으로 리포터 서열을 추가로 포함하되, 특히, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화하며, 보다 구체적으로, 리포터 단백질은 EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 단리된 핵산.

[0343] 16. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나의 AAV VP2 융합 폴리펩티드 또는 구현예 13 내지 15 중 어느 하나의 핵산을 포함하는 세포.

[0344] 17. 구현예 16에 있어서, 세포는 곤충 세포(예를 들어, Sf9 세포) 및 HEK293 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는, 세포.

[0345] 18. 구현예 16에 있어서, 세포는, 간 세포, 뇌 세포, 비장 세포, 신장 세포, 혈액 세포, 폐 세포, 근육 세포, 심장 세포, 골수 세포, 다능성 전구체 세포(MPP), 예컨대 다능성 조혈 전구체 세포, 및 조혈 줄기 세포(HSC), 예컨대 장기 조혈 줄기 세포(LT-HSC)로 이루어진 군으로부터 선택되는, 쥣과 세포, 비인간 영장류 세포 또는 인간 세포를 포함하나 이에 한정되지 않는 포유동물 세포로부터 선택되는, 세포.

[0346] 19. 구현예 1 내지 12 중 어느 하나의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

[0347] 20. 구현예 19에 있어서, 모든 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 상기 폴리펩티드 리간드에 융합되는, rAAV 비리온.

[0348] 21. 구현예 19 또는 20에 있어서, 비-코딩 핵산, 단백질 또는 RNA 코딩 서열, 발현 카세트, 다중 발현 카세트, 상동성 재조합을 위한 서열, 및 게놈 유전자 표적화 카세트를 추가로 포함하는, rAAV 비리온.

[0349] 22. 구현예 21에 있어서, 상기 발현 카세트는 구현예 1 내지 12 중 어느 하나의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하되, 특히, rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 발현 카세트에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일한, rAAV 비리온.

[0350] 23. 구현예 21에 있어서, 상기 발현 카세트는, 치료 RNA, mRNA, siRNA, miRNA, shRNA 및 안티센스 올리고뉴클레오티드를 포함하나 이에 한정되지 않는 치료 핵산, 치료 단백질 또는 치료 항체 또는 항체 단편을 암호화하는, rAAV 비리온.

[0351] 24. 구현예 19 내지 23 중 어느 하나에 있어서, 비리온은 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함하되, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터, 특히 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 동일한 AAV 혈청형인, rAAV 비리온.

[0352] 25. 구현예 24에 있어서, AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 AAV VP1, VP2 및 VP3 캡시드 폴리펩티드의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되, 특히 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 각각의 AAV 캡시드 폴리펩티드의 공유 VP3 영역에 동일한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하며, 여기에서, 보다 구체적으로,

[0353] a) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이며, 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어

진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, ai) K531E 및 V473D; aii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; aiii) G266A 및 N269Q; aiv) G266A, N269Q 및 D590A; av) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 avi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0354] b) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이며, 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, bi) G268E 및 N271Q; bii) S387A; biii) G268E, N271Q 및 S387A; biv) A592Q; 또는 bv) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0355] c) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이며, 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, ci) W503A; cii) N562A 및 E563A; ciii) Q590A 및 W503A; 또는 civ) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0356] d) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이며, 각각, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0357] e) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, ei) V473D 및 N500E; eii) R514A; 또는 eiii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함하는, rAAV 비리온.

[0358] 26. 구현예 19 내지 21 및 23 내지 25 중 어느 하나의 rAAV 비리온을 포함하는 약학적 조성물.

[0359] 27. 의약으로서의 용도를 위한, 구현예 19 내지 21 및 23 내지 25 중 어느 하나의 rAAV 비리온 또는 구현예 26의 약학적 조성물.

[0360] 28. 이식유전자를 세포에 전달하는 방법으로서, 방법은 구현예 19 내지 21 및 23 내지 25 중 어느 하나의 rAAV 비리온 또는 구현예 26의 약학적 조성물을 세포와 접촉시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0361] 29. 구현예 28에 있어서, 세포는 살아있는 대상체 내에 존재하되, 특히, 대상체는 포유류 대상체, 보다 구체적으로 인간인, 방법.

[0362] 30. 치료적 치료 요법 또는 백신으로서, 구현예 19 내지 21 및 23 내지 25 중 어느 하나의 rAAV 비리온 또는 구현예 26의 약학적 조성물을 사용하는, 방법.

[0363] 31. 라이브러리 작제물로서, 예를 들어 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는, 예를 들어 이들로 이루어진 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기에서 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되고, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는, 라이브러리 작제물.

[0364] 32. 구현예 31에 있어서, 폴리펩티드 리간드는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 아미노산 위치에 무작위 아미노산을 포함하는, 라이브러리 작제물.

[0365] 33. 구현예 31 또는 32에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 GP2 폴리펩티드, Sso7d 폴리펩티드 및 아피바디로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리 작제물.

[0366] 34. 구현예 33에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리 작제물.

[0367] 35. 구현예 34에 있어서, 상기 폴리펩티드 리간드는, 위치 21, 23, 25, 28, 30, 32, 40, 42 및 44에서의 아미노산 잔기 X가 D, R, H, N, A, I, Y 및 W로부터 독립적으로 선택되는, 서열번호 1의 Sso7d 폴리펩티드 및 이에 대해 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%의 서열 동일성을 갖는 Sso7d 폴리펩티드로 이루어진 군으로부터

선택되는, 라이브러리 작제물.

[0368] 36. 구현예 31 내지 35 중 어느 하나의 복수의 라이브러리 작제물을 포함하는 라이브러리.

[0369] 37. 구현예 36에 있어서, 라이브러리는 적어도 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7, 10^8, 또는 10^9개의 고유 라이브러리 작제물을 포함하는, 라이브러리.

[0370] 38. 구현예 36 또는 37에 있어서, 라이브러리 작제물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 상기 핵산 서열을 포함하고 추가적으로, 선택적으로 리포터 서열을 추가로 포함하는 플라스미드 DNA 분자이되, 특히, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화하며, 보다 구체적으로, 리포터 단백질은 EGFP, mCherry, sfCherry, sfCherry2, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리.

[0371] 39. 구현예 36 또는 37에 있어서, 각각의 라이브러리 작제물은 rAAV 비리온 내에 존재하되, 특히 상기 rAAV는 구현예 4 또는 5의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하고, 여기에서 주어진 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 주어진 rAAV 비리온 내에 존재하는 라이브러리 작제물에 의해 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 동일한, 라이브러리.

[0372] 40. 구현예 39에 있어서, 각각의 라이브러리 작제물은 프로모터, 프로모터의 상류 및 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 하류에 위치된 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열, 및 선택적으로 리포터 서열을 추가로 포함하되, 특히, 리포터 서열은 형광 또는 발광 리포터 단백질을 암호화하며, 보다 구체적으로, 리포터 단백질은 EGFP, mCherry, sfCherry, mClover3, mRuby3, mApple, iRFP, tdTomato, mVenus, YFP, RFP, 반딧불이 루시퍼라제, 및 나노루시퍼라제로 이루어진 군으로부터 선택되는, 라이브러리.

[0373] 41. 구현예 39 또는 40에 있어서, 상기 rAAV 비리온은 구현예 4 또는 5의 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하고 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드를 추가로 포함하되, 특히 상기 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP2 융합 폴리펩티드와 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.32.33, 소 AAV 또는 조류 AAV.5로 이루어진 군으로부터, 특히 AAV1, AAV6, AAV8 및 AAV9로 이루어진 군으로부터 선택되는 동일한 AAV 혈청형인, 라이브러리.

[0374] 42. 구현예 41에 있어서, 상기 rAAV 비리온에 포함된 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 AAV VP1, VP2 및 VP3 캡시드 폴리펩티드의 자연 수용체에 대한 적어도 하나의 결합 부위에 적어도 하나의 돌연변이를 포함하되, 특히 AAV VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드는 각각의 AAV 캡시드 폴리펩티드의 공유 VP3 영역에 동일한 적어도 하나의 돌연변이를 포함하며, 여기에서, 보다 구체적으로,

[0375] a) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV6이며, 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 K531E, V473D, K459S, N500E, G266A, N269Q, 및 D590A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 3의 VP1 아미노산 서열 대비, ai) K531E 및 V473D; aii) K531E, K459S, V473D 및 N500E; aiii) G266A 및 N269Q; aiv) G266A, N269Q 및 D590A; av) K531E, V473D, G266A 및 N269Q; 또는 avi) K531E, K459S, V473D, N500E, G266A, N269Q 및 D590A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0376] b) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV8이며, 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 G268E, N271Q, S387A, A592Q 및 A592D로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, bi) G268E 및 N271Q; bii) S387A; biii) G268E, N271Q 및 S387A; biv) A592Q; 또는 bv) A592D의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0377] c) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV9이며, 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 Q590A, W503A, N562A 및 E563A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, ci) W503A; cii) N562A 및 E563A; ciii) Q590A 및 W503A; 또는 civ) Q590A, W503A, N562A 및 E563A의 아미노산 치환(들)을 포함하거나;

[0378] d) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV2이며, 각각, 서열번호 6의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 R585A의 아미노산 치환을 포함하거나;

[0379] e) AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 공유 VP3 영역 내에 V473D, N500E 및 R514A로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드 및 상기 AAV VP1 및 VP3 폴리펩티드는 각각, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, ei) V473D 및 N500E; eii) R514A; 또는 eiii) V473D, N500E 및 R514A의 아미노산 치환(들)을 포함하는, 라이브러리.

[0380] 43. 구현예 41에 있어서, a) 상기 rAAV에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) 상기 rAAV에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 구체적으로, bi) 상기 rAAV에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나를 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, bii) 상기 rAAV에 포함된 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 융합 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하는, 라이브러리.

[0381] 44. 적어도 하나의 원하는 특성을 갖는 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 생성하는 방법으로서, 방법은 상기 적어도 하나의 원하는 특징을 갖는 암호화된 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 대해 구현예 36 내지 43 중 어느 하나의 라이브러리를 스크리닝하는 단계를 포함하는, 방법.

[0382] 45. 구현예 44에 있어서, 상기 적어도 하나의 원하는 특징은, 상기 폴리펩티드 리간드를 포함하지 않는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 대비, 상기 AAV VP2 융합 폴리펩티드에 의해 매개되는 적어도 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 증가된 형질도입 및/또는 증가된 향성인, 방법.

[0383] 46. 구현예 44 또는 45에 있어서: b) 구현예 36 내지 43 중 어느 하나의 라이브러리를 다수의 세포와 접촉시키는 단계, c) 상기 세포의 적어도 일부로부터 핵산 분자를 단리하는 단계, 및 d) 단계 b)에서 단리된 적어도 하나의 핵산 분자의 폴리펩티드 리간드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 결정하는 단계를 포함하는, 방법.

[0384] 47. 구현예 46에 있어서, 단계 b) 이전에: ai) AAV rep 유전자를 포함하는 핵산 서열, AAV VP1 캡시드 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, AAV VP3 캡시드 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열, 및 구현예 36의 라이브러리(여기에서, 각각의 라이브러리 작제물은 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 상류 및 하류에 위치된 2개의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 서열을 추가로 포함함)로 세포를 형질감염시키는 단계, 및 aii) AAV 비리온 형성에 적합한 조건 하에서 세포(선택적으로, 여기에서 세포는 포유동물 세포, 특히 HEK293 세포, 또는 곤충 세포, 특히 Sf9 세포임)를 배양하는 단계에 의한, 구현예 39의 라이브러리를 제공하는 단계 a)를 추가로 포함하는, 방법.

[0385] 48. 구현예 47에 있어서, 상기 AAV VP1 캡시드 폴리펩티드 및 상기 AAV VP3 캡시드 폴리펩티드는 AAV cap 유전자를 포함하는 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되되, 특히 cap 유전자 내 VP2의 개시 코돈은 돌연변이되는, 방법.

[0386] 49. 구현예 46 내지 48 중 어느 하나에 있어서, 단계 b)의 복수의 세포는 비인간 모델 동물 내에 존재하는, 방법.

[0387] 50. 구현예 49에 있어서, 단계 c)에서, 사전 정의된 조직 또는 세포 유형의 세포로부터의 핵산은 단리되되, 특히 사전 정의된 조직 또는 세포 유형의 상기 세포는 상기 라이브러리를 복수의 세포와 접촉시키는 단계 후 1~21일, 1~14일, 7~21일, 2~10일, 2~5후에 단리되는, 방법.

[0388] 51. 구현예 44 내지 50 중 어느 하나에 있어서, 상기 리포터 서열이 발현되는 세포를 선별하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

[0389] 52. 구현예 46 내지 51 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)는 상기 세포의 적어도 일부로부터 RNA를 단리하는 단계를 포함하고, 단계 d)는 다음의 하위 단계: di) 상기 단리된 RNA의 역전사 단계, dii) 단계 di)에서 생성된 cDNA로부터 폴리펩티드 리간드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열의 적어도 일부를 PCR 증폭하는 단계, 및 diii) 특히, 차세대 시퀀싱을 사용하여 폴리펩티드 리간드 서열의 적어도 일부를 시퀀싱하는 단계를 포함하는, 방법.

[0390] 53. 구현예 46 내지 52 중 어느 하나에 있어서, 하나의 조직 또는 세포 유형에서의 특정 폴리펩티드 리간드 서열의 상대적 발생을 상기 조직 또는 세포 유형의 폴리펩티드 리간드 서열의 총 수와 비교하여 결정하는 단계 e)를 추가로 포함하는, 방법.

[0391] 54. 구현예 46 내지 53 중 어느 하나에 있어서, 단계 c)에서 단리된 핵산 분자로부터 AAV VP2 융합 폴리펩티드를 암호화하는 핵산 서열의 제2 라이브러리를 생성하고, 상기 제2 라이브러리에 대해, 단계 b), c), d) 및 선택적으로 단계 a) 및 e)를 반복하는 단계 f)를 추가로 포함하는, 방법.

[0392] 55. 구현예 44 내지 구현예 54 중 어느 하나의 방법에 의해 생성된 AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0393] 56. AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 AAV 비리온을 생성하는 방법으로서, 방법은 구현예 14 또는 15의 핵산으로 패키징 세포를 형질도입하는 단계를 포함하되, 상기 방법은 AAV 비리온을 생산하는 패키징 세포를 생성하는, 방법.

[0394] 57. AAV VP2 융합 폴리펩티드를 포함하는 AAV 비리온을 생성하는 방법으로서, 방법은 구현예 16 또는 17의 세포를 배양하는 단계를 포함하되, 상기 방법은 AAV 비리온을 생산하는 패키징 세포를 생성하는, 방법.

[0395] 58. 구현예 56 또는 57의 방법에 의해 생산된 AAV 비리온.

[0396] 59. 구현예 53 또는 58의 AAV 비리온을 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 방법으로서, 방법은 AAV 비리온을 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화하는 단계를 포함하는, 방법.

[0397] 60. 구현예 13 내지 15 중 어느 한 하나의 단리된 핵산을 포함하는 키트.

[0398] 61. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되며, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0399] 62. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 헤파린 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 및/또는 시알산(SIA)에 대한 결합을 폐기하거나 감소시키는 하나 이상의 돌연변이를 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0400] 63. 구현예 62에 있어서, 폴리펩티드 리간드는 최대 10 kDa의 분자량을 갖는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0401] 64. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드 및 폴리펩티드 리간드를 포함하는 AAV VP2 융합 폴리펩티드로서, 폴리펩티드 리간드는 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드의 N-말단에 융합되고, a) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는, AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 구체적으로, bi) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나를 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, bii) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0402] 65. 구현예 64a)에 있어서, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, 아미노산 치환

V473D 및 N500E를 추가로 포함하는, AAV VP2 융합 폴리펩티드.

[0403] 66. AAV VP2 캡시드 폴리펩티드로서, a) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는, AAV 혈청형 AAV1이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, T162R, 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, b) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV1 이외의 AAV 혈청형이며, 서열번호 7의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, M211V, G199R, D213A, T162R, 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나에 상응하는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하고, 구체적으로, bi) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 8이고, 서열번호 4의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P186G, P167R, M212V, G200R, D214A, K163R, 및 P192N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 치환 중 적어도 하나를 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D214A, K163R 및/또는 P192N의 아미노산 치환(들)을 포함하거나, bii) AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 AAV 혈청형 9이며, 서열번호 5의 VP1 아미노산 서열 대비, E147S, P185G, P166R, G199R, D213A, S162R 및 P191N으로 이루어진 군으로부터 선택되는 적어도 하나의 아미노산 치환을 포함하거나 이의 임의의 조합을 포함하고, 특히 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드는 D213A, S162R 및/또는 P191N의 아미노산 치환(들)을 포함하는, AAV VP2 캡시드 폴리펩티드.

[0404] 67. 구현예 66의 AAV VP2 캡시드 폴리펩티드를 포함하는 rAAV 비리온.

[0405] **실시예**

[0406] **실시예 1: VHH, DARPIN 및 VP2 N-말단에 유전자적으로 융합된 미니단백질 스캐폴드를 사용하는, AAV8 캡시드에서의 AAV VP2 융합 폴리펩티드 장식 수준의 초기 평가**

[0407] 문헌[Munch et al., Nat Commun 6, 6246 (2015)]에 기술된 바와 같이, 장식된 AAV를 생성하기 위한 VP2 N-말단 유전자 융합의 타당성을 평가하기 위해, 트레오닌을 암호화하는 개시 코돈이 결여된 VP2 개방 판독 프레임의 N-말단에서 AAV8 VP2 발현 플라스미드 AgC1159 내로 다양한 스캐폴드를 클로닝하였다(VP2 DT1). AAV VP2 융합 폴리펩티드 개방 판독 프레임이 HCMV 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 생성된 AAV VP2 융합 폴리펩티드 발현 플라스미드는 도 1에 개략적으로 도시되어 있다.

[0408] **VP2 발현 플라스미드 내로의 스캐폴드의 클로닝:**

[0409] 표-1에 나열된 스캐폴드 서열은, Gibson 기반 클로닝에 적합한 5' 및 3' 연장부가 추가된 스트링 DNA로서 GeneArt에서 주문되었다. VHH의 경우, 내부 발현 플라스미드를 템플릿으로 사용하는 PCR로 서열을 증폭시켰다. 단편을 HindIII-AgeI 분해 VP2 발현 플라스미드 AgC1159 내로 클로닝하고, Sanger 시퀀싱으로 정확하게 조립되었음을 확인하였다.

[표 1] 실시예 1 에 사용된 스캐폴드 및 링커 목록 모든 작제물에 대해, N-말단에 strep-TagII-GS 서열, 그리고 C-말단에 G4S 링커를 추가함.

스캐폴드 ID	기준	* 최종 스캐폴드 서열	최종 스캐폴드 분자량 (kDa)
항-Her2 Darpin (9_29)	https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGS**DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAHDFYGITPLHLAANFGHLEIVEVLLKHGADVNAFDYDNTPLHLAADAGHLEIVEVLLKYGADVNASDRDGHTPLHLAAREGHLEIVEVLLKNGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQ**GGGGS	18.7
항-EGFR (ErbB1) Darpin (E_01)	https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGS**DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNADDTWGWTPLHLAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNAYDYIGWTPLHLAADGHLEIVEVLLKNGADVNASDYIGDTPLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQ**GGGGS	18.7
항-MBP Darpin (Off7)	https://doi.org/10.1038/nbt962	MRGSAWSHPQFEKGS**DLGRKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNAADNTGTTPLHLAAYSGHLEIVEVLLKHGADVDASDVFGYTPLHLAAYWGHLEIVEVLLKNGADVNAMDSDGMTPLHLAAKWGYLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQ**GGGGS	18.5
항-TIGIT VHH (NEG974)	내부		15.6
항-GPR126 VHH (NEG1713)	내부		15.3
항-HA 마이크로단백질	https://doi.org/10.1038/nature23912	MRGSAWSHPQFEKGS**TSGVRATSKFAALIAAEIAREFGYTVDVQEKNGEWRVVFD**GGGGS	6.4

** 굵은 글씨체 : N- 또는 C-종결 첨가가 없는 원래의 서열*

[0410]

[0411] **장식된 AAV 생산:**

[0412] 생성된 VP2 융합 플라스미드는 rep/cap VP2 KO 플라스미드(VP2 개방 판독 프레임 개시 코돈에 돌연변이를 갖는 AAV2 rep 유전자 및 AAV8 cap 유전자를 포함하며, 이에 따라 AAV8 VP1 및 VP3을 암호화하지만 VP2는 암호화하지 않음), pHelper(아데노바이러스 단백질 E2A, E4 및 VA RNA를 암호화함) 및 카고로서의 HCMVprom-EGFP-SV40pA scAAV(pNN001; HCMV 프로모터의 제어 하에 eGFP를 암호화하고 그 측부에는 AAV2 ITR이 있으며, 도 2에 개략적으로 도시됨)와 함께 현탁 HEK293T/17F 세포 내로 형질감염되었다.

[0413] 요약하면, HEK293T/17F 현탁 세포 100 ml(AAV8 w.t. 생산의 경우 350 ml)를 1.5E+06 세포/ml로 희석하고 1E+06 개 세포당 0.8 μg DNA 혼합물을 포함하는 PEI MAX(PEI:DNA 비율 = 3:1)를 사용하여 형질감염시켰다. 플라스미드 혼합물은 표 2에 기술된 바와 같이 등몰량의 3개 또는 4개 플라스미드로 구성되었다. 형질감염 6일 후, 샘플을 4000 rpm에서 20분 동안 원심분리하고 상청액을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 POROS GoPure AAVX 1 ml 0.5 cml x 5 cml(ThermoFisher #A36652) 상에 4 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 컬럼 부피(CV)의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0.2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고 Float-A-Lyzer 투석 장치 100 kDa(Spectrum™ #G235071)를 사용하여 PBS(pH 7.4) + 0.001% Pluronic F-68에 대해 밤새 투석하였다.

[0414] 전체 입자 농도(vg/ml)를 평가하기 위해 qPCR 방법을 사용하였다. DNAse 전처리된 샘플에 대해, qPCR은 KAPA Probe Fast qPCR 키트 및 표 3에 나열된 SV40pA 올리고 세트를 사용하여, Qiagen RotorGene 기기에서 수행되었다. 표준 곡선 생성에는 플라스미드 pNN001을 사용하였다. 표 4는 해당 qPCR 결과를 요약한다.

[표 2] pHelper 및 pNN001 카고 외에 본 실시예에 사용된 rep/cap VP2 KO 및 VP2 발현 플라스미드의 목록

샘플 ID	Rep/Cap 플라스미드	VP2 발현 플라스미드
AAV8 w.t.	pRep2Cap8	없음
AAV8 VP2 KO	*(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	없음
AAV8 트랜스-VP2	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1159) pR5a_AAV8 VP2 (융합 없음)
AAV8- 항-EGFR Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1168) pR5a_항-ErbB1 (E_01) DARPin_AAV8 VP2
AAV8- 항-MBP Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1169) pR5a_항-MBP Off7 DARPin_AAV8 VP2
AAV8- 항-Her2 Darpin	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1170) pR5a_항 HER2 9_29 Darpin _AAV8 VP2
AAV8- 항-HA 미니단백질	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1171) pR5a_항 HA 미니단백질 _AAV8 VP2
AAV8- 항-TIGIT VHH	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1172) pR5a_항-TIGIT VHH (NEG974) _AAV8 VP2
AAV8- 항-GPR126 VHH	(AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO	(AgC1173) pR5a_항 GPR126 (NEG1731) VHH_AAV8 VP2

** VP2 KO rep2/Cap8 플라스미드(AgC1157)는 VP2 의 제 1 티오닌을 알라닌으로 돌연변이시킴으로써 생성됨(T138A)*

[표 3] qPCR 에 의한 AAV 게놈 농도(vg/ml) 측정에 사용된 올리고 세트

올리고 ID	5'-3' 서열
SV40pA 영역-순방향	AGCAATAGCATCACAAATTTCACAA
SV40pA 영역-역방향	CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT
SV40pA 영역-프로브	FAM- AGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTC-BHQ1

[표 4] 장식 AAV8 에 대한 qPCR 결과

샘플 ID	vg/ml	수율(vg/세포)
AAV8 w.t.	7.10E+13	1.62E+05
AAV8 VP2 KO	1.61E+13	1.29E+05
AAV8 트랜스-VP2	2.39E+13	1.91E+05
AAV8- 항-EGFR Darpin	1.07E+13	8.56E+04
AAV8- 항-MBP Darpin	3.03E+12	2.42E+04
AAV8- 항-Her2 Darpin	4.88E+12	3.90E+04
AAV8- 항-HA 미니단백질	1.12E+13	8.96E+04
AAV8- 항-TIGIT VHH	3.19E+12	2.55E+04
AAV8- 항-GPR126 VHH	6.06E+12	4.85E+04

[0415]

[0416] VP2의 부재(샘플 AAV8 VP2 KO) 및 트랜스에서의 VP2 제공(샘플 AAV8 트랜스-VP2)은 AAV 역가에 미미한 영향만을 미쳤다. VP2 N-말단에 대한 다양한 스캐폴드의 유전자적 융합은 AAV 역가의 2~7배 감소를 야기한다.

[0417] **장식 수준의 평가:**

[0418] 20 μl의 친화도 정제 AAV 제제를 변성 조건 하에서 SDS-PAGE로 분석하여 VP2 융합체의 존재를 평가하였다. 도 3은 SDS 페이지를 도시한다. VP2의 분자량 시프트는 미니단백질 장식 샘플에 대해서만 관찰될 수 있는 반면, 다른 샘플(VHH 및 Darpin 융합)에서는 VP2-융합의 검출 가능한 수준을 나타내지 않았다.

[0419] 또한, CE-SDS 분석(Agilent 2200 Tapestation 시스템, 변성 조건을 사용하는 P200 단백질 키트)을 수행하여, 정제된 샘플 중의 상이한 VP 단백질의 상대적 양을 반-정량적 방식으로 평가하였다. 해당 결과는 AAV8-항-HA 미니단백질 샘플 중 VP2의 분자량 시프트를 확인하고 다른 샘플 중에는 VP2 융합체의 검출 가능한 존재가 없음을 확인한다. AAV8-항-HA 미니단백질 샘플은 AAV8 w.t. 샘플과 같이, 상이한 VP 단백질의 유사한 상대적 양을 나타냈다. AAV8 트랜스-VP2 샘플에서는 다소 증가된 양의 VP2가 관찰되었다. 표 5는 해당 결과를 요약한다.

[표 5] Darpin, VHH 및 미니단백질 장식 AAV8 제제의 분자량 및 추정된 상대적 VP 양(Tapestation)

[표 5a] 관찰된 VP MW(kDa)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
AAV8 w.t.	61	70.4	93.5
AAV8 VP2 KO	61.9		94.2
AAV8 트랜스-VP2	61.5	70.8	94.2
AAV8- 항-EGFR Darpin	61.9		95.1
AAV8- 항-MBP Darpin	61.8		94.7
AAV8- 항-Her2 Darpin	62.3		95.2
AAV8- 항-HA 미니단백질	62.2	78.7	94.2
AAV8- 항-TIGIT VHH	61.6		94.3
AAV8- 항-GPR126 VHH	61.6		93.8

[표 5b] VP 분포(AAV 입자 당 총 60 VP 로 가정됨)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
AAV8 w.t.	50.6	6.1	3.3
AAV8 VP2 KO	56.8		3.2
AAV8 트랜스-VP2	48.3	8.6	3.1
AAV8- 항-EGFR Darpin	56.0		4.0
AAV8- 항-MBP Darpin	55.7		4.3
AAV8- 항-Her2 Darpin	56.6		3.4
AAV8- 항-HA 미니단백질	51.7	6.0	2.2
AAV8- 항-TIGIT VHH	56.6		3.4
AAV8- 항-GPR126 VHH	55.4		4.6

[0420]

[0421] **질량분석기 분석:**

[0422] VHH와 Darpin VP2 융합체가 VP1 밴드와 함께 시프트할 가능성을 고려하여, LC-MS를 사용하여 모든 제제를 분석하였다. 5 μl의 미처리 AAV 샘플을 Synapt G2S(WATERS) 사중극 비행 시간 질량분석기에 커플링된 UPLC-I 클래스에 주입하였다. 컬럼 상에서 샘플을 변성시키고 Waters Bioresolve RP 1 x 50 mm 컬럼 상에서 크로마토그래피로 분리하였다. 컬럼은 0.1 ml/분의 유속으로 40분 동안, 30~38%의 유기 이동상으로 구성된 구배로 80℃에서 유지되었다. 수성 이동상은 물 중 0.1% 포름산으로 구성되었으며, 유기물은 아세토니트릴 중 0.1% 포름산으로 구성되었다.

[0423] 테스트된 모든 샘플에서 VP1 및 VP3 예상 질량이 확인될 수 있었으며, VP2 w.t. 또는 VP2 융합체의 존재는 AAV8 w.t., AAV8 트랜스-VP2 및 AAV8-항-HA 미니단백질 샘플에서만 확인되었고, 이는 SDS 및 CE-SDS 결과를 입증한다.

[0424] **AAV8 샌드위치 ELISA:**

[0425] 장식 효율 및 VP2 융합 스캐폴드의 올바른 노출을 추가로 평가하기 위해, 보다 민감한 샌드위치 ELISA 분석을 수행하였다. hEGFR 및 hTIGIT 세포외 도메인(ECD) 재조합 단백질을 사용하여 96웰 플레이트를 5 μg/ml로 코팅하였다. 밤새 인큐베이션한 후, 3% BSA/TBST 완충액으로 차단한 후, 상이한 양의 장식 AAV vg를 웰에 첨가하고 실온에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 단계(3x) 후, 웰을 항-AAV8 단클론성 mIgG2(Origene AM32478SU-N)와 함께 실온(RT)에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 웰을 재차 세척하고(3x), 결합된 항-마우스 IgG-AP(Sigma-Aldrich A5153)와 함께 인큐베이션하고, 추가로 세척하고(3x) Attophos 기질(Roche 00000011681982001)을 사용하여 신호를 발생시켰다. 도 4는 해당 결과를 나타낸다.

[0426] MS 및 CE-SDS와 달리, AAV8 샌드위치 Elisa는 조립된 AAV의 표면 상에서 Darpin 및 VHH를 검출하였다. 생성된 AAV의 미미한 부분만이, 샌드위치 Elisa로만 검출할 수 있지만 MS 및 CE-SDS로는 검출할 수 없는 이러한 두 스

캐폴드 중 하나에 융합된 VP2를 포함하는 것으로 추정된다.

[0427] **실시예 2: VP2 N-말단에 유전자적으로 융합된 소형 스캐폴드를 사용하는 AAV8 장식 수준 평가**

[0428] 실시예 1에서 관찰된 바와 같이, AAV8-항-HA 미니단백질은 VP2 장식 수준과 같은 야생형을 갖는 유일한 AAV 장식 제제인 것으로 보인다. 이러한 현상이 스캐폴드의 작은 크기로 인한 것인지의 여부를 평가하기 위해, 표 6에 나열된 상이한 항-EGFR 결합 도메인을 AAV8 VP2 발현 플라스미드 AgC1159 내로 클로닝하였다.

[표 6] 본 실시예에 사용된 스캐폴드 ID 및 링커 목록

[0429]

스캐폴드 ID	기준	* 최종 스캐폴드 서열	AAV8-VP2 융합체 발현 플리스미드 ID	최종 스캐폴드 분자량 (kDa)
항-EGFR Darpin (E_01)	https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.07.085	MRGSAWSHPQFEKGS**DLGKKLLEAARAGQDDEVRILMANGADVNADDTWGWTPLHLAAYQGHLEIVEVLLKNGADVNAYDYIGWTPLHLAADGHLEIVEVLLKNGADVNASDYIGDTPLHLAAHNGHLEIVEVLLKHGADVNAQDKFGKTAFDISIDNGNEDLAEILQ**GGGGS	(AgC1168) pR5a_항-ErbB1 (E_01) DARPin_AAV8 VP2	18.5
항-EGFR 피브로넥틴 (E.6.2.6)	doi:10.1016/j.jmb.2010.06.004	**MVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWFDYAVTYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGWISTATISGLKPGVDYTITVYAVTDNSRWPFRSTPISTNYRTEIDKPPQ**GGGGSGGGGSGGGGS	(AgC1275)_pRS5a_항-EGFR_피브로넥틴_G4Sx3_AAV8_VP2	11.9
항-EGFR Sso7d (E.18.4.5)	DOI 10.1074/jbc.M116.741314	**MATVKLTYQGEEKQVDISKITYVDRAGQFIWFEYDEGGGALGTGWVSEKDAPKELLQMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	(AgC1274)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_G4Sx3_AAV8_VP2	7.8
** 항-EGFR 항체 ($Z_{EGFR-1907}$)	doi:10.1016/j.jmb.2007.12.060	**MVDNKFNKEMWAAWEEILHLPNLNGWQMTAFIASLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK**GGGGSGGGGSGGGGS	(AgC1276)_pRS5a_항-EGFR_항체_G4Sx3_AAV8_VP2	7.4
항-EGFR GP2 ($GaEGFR_{2.2.3}$)	http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.06.012	**MKFWATVSRGDSYWFEVPVYAETLDEALELAERQYPMYHIYYVTRVRP**GGGGSGGGGSGGGGS	(AgC1273)_pRS5a_항-EGFR_GP2_G4Sx3_AAV8_VP2	6.7
항-HA 마이크로단백질	https://doi.org/10.1038/nature23912	MRGSAWSHPQFEKGS**TSGVRATSKFAALIAAEIAREFGYTVDVQEKNGEWRVVFDG**GGGS	(AgC1171) pR5a_항 HA 미니단백질 _AAV8 VP2	6.4

** 굵은 글씨체 : N- 또는 C-종결 첨가가 없는 원래의 서열*
*** 항-EGFR 아피바디($Z_{EGFR-1907}$) 샘플은 최종 생산 단계에서 부분적으로 손실됨: 정확한 수율 평가가 불가능하였음. 친화성 정제 동안 피크 높이를 기준으로, 수율은 다른 정제된 제제와 유사할 것으로 예상됨.*

[0430]

[0431] **장식 AAV 생산:**

[0432] 상이한 장식 AAV8 입자 제제의 클로닝, 발현, 정제 및 바이러스 농도 평가는 다음을 제외하고는 실시예 1에 기술된 바와 같이 수행되었다:

[0433] * 각각의 샘플에 대한 형질감염 부피는 300 ml였음

[0434] * 세포 및 상청액은 형질감염 후 4일차에 수집됨

[0435] * 최종 농도 0.5% 트리톤, 2 mM $MgCl_2$ 및 12.5 U/ml 벤조나아제를 벌크 수확물에 첨가함; 37℃에서 2시간 동안 용해시키 후, 0.5 M NaCl을 첨가하고, 3500 g에서 30분 동안 샘플을 원심분리함. 용해물을 여과하고, 정화한 다

음, POROS AAVx 1 ml 수지 상에 로딩함.대조군으로서, AAV8-항-EGFR Darpin 및 AAV8-항 HA 미니단백질의 새로운 제제를 유사한 방식으로 동시에 생성하였다. 실시예 1에 기술된 바와 같은 qPCR을 사용하여 전체 입자 농도(vg/ml)를 평가하였다. 표 7c는 해당 결과를 요약한다.

[0436] **장식 수준 및 총 AAV 수율 평가:**정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율을 평가하기 위해, CE-SDS 분석(변성 조건 하 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템 및 Protein 230 키트를 사용함)을 수행하였다.

[0437] 총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산

[0438] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0439] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0440] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0441] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0442] 표 7 및 도 5는 해당 결과를 요약한다.

[표 7] AAV8 장식 샘플에 대한 Bioanalyzer 결과

[표 7a] 관찰된 VP MW(kDa)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
항-EGFR Darpin (E_01)	76.5		108.8
항-EGFR 피브로넥틴 (E.6.2.6)	76.8	105.8	109.2
항-EGFR Sso7d (E.18.4.5)	76.7	99.6	109.4
항-EGFR Affibody (Z_{EGFR}-1907)	77.3	99.4	109.5
항-EGFR GP2 ($GaEGFR_{2.2.3}$)	76.5	98.5	109.2
항-HA 마이크로단백질	77.3	97.9	109.4
AAV8 w.t.	77.0	91.6	109.8

[표 7b] VP 분포(AAV 입자 당 총 60 VP 로 가정됨)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
항-EGFR Darpin (E_01)	53.1	*(1)	* 6.9
항-EGFR 피브로넥틴 (E.6.2.6)	50.6	3.5	6.0
항-EGFR Sso7d (E.18.4.5)	49.6	5.8	4.6
항-EGFR 아피바디 (Z_{EGFR}-1907)	49.0	5.9	5.1
항-EGFR GP2 ($GaEGFR_{2.2.3}$)	44.5	10.7	4.7
항-HA 마이크로단백질	45.8	9.1	5.1
AAV8 w.t.	46.0	9.1	4.9

** Darpin 샘플의 경우, VP1 및 VP2 융합체는 잠재적으로 함께 이동할 수 있으며, 이에 따라 VP2 유닛 수치에 대한 정확한 값이 할당될 수 없음.*
VP1 값의 약간의 증가를 기반으로, AAV 당 1 개의 VP2 융합체로 임의의 값이 할당됨.

[표 7c] 형질감염된 세포당 바이러스 게놈(vg) 및 바이러스 입자(vp) 수율

샘플 ID	vg/세포	vp/세포
항-EGFR Darpin (E_01)	2.32E+04	4.04E+04
항-EGFR 피브로넥틴 (E.6.2.6)	2.96E+04	1.20E+05
항-EGFR Sso7d (E.18.4.5)	2.29E+04	8.54E+04
항-EGFR GP2 ($GaEGFR_{2.2.3}$)	2.77E+04	1.49E+05
항-HA 마이크로단백질	1.34E+04	8.20E+04
AAV8 w.t.	3.69E+04	1.20E+05

[0443]

[0444] AAV 캡시드에서의 VP2 융합 폴리펩티드의 성공적인 혼입은 VP2 폴리펩티드에 융합된 스캐폴드의 분자량과 상관관계가 있는 것으로 보인다. 만족스러운 장식 수준(w.t. VP2 수준의 >60%)은 10 kDa 미만의 스캐폴드를 사용하여 수득되었다. 해당 임계값 이상에서는 VP2 융합체 혼입의 감소가 관찰되었으며, 특히 18 kDa Darpin의 경우

심각한 수준이었다. 본 실험에 사용된 모든 테스트된 항-EGFR 스캐폴드에서 수율에 대한 한계 하락이 관찰되었다(w.t. 대비 < 2배).

[0445] **EGFR 과발현 세포주에 대한 장식 AAV8의 시험관 내 감염도:**

[0446] 항-EGFR AAV8 장식 제제의 상이한 장식 수준의 효과를 평가하기 위해, hEGFR(HKB11_EGFR)을 안정적으로 과발현시키는 HKB11 세포에 대해 감염도 분석을 수행하였다. 감염 당일, 세포를 DMEM 중에 5E+05 세포/ml로 재현탁하고, 50 μl/웰로 96 웰 플레이트에 시딩하였다(2.5E+04 세포/웰). AAV8 장식 제제를 DMEM 배지에 희석하고, 총 vp를 기준 2E+06~1.56E+04 moi 범위의 상이한 농도로 시딩된 세포에 도말하였다(최종 부피 100 μl). 형질도입 후 4일차에 세포를 분리하고 FACS 분석을 수행하여 EGFP 양성 세포의 백분율을 계산하였다. 전체 입자(vg)를 역-계산하였다. 도 6은 전체 입자 수 대 감염된(EGFP+) 세포의 비율을 나타낸다.

[0447] 장식 수준이 높은 항-EGFR VP2 융합 폴리펩티드는 HKB11_EGFR 세포에서 증가된 흡수를 나타냈다(Sso7d > 아피바디 > GP2). 대조적으로, 항-EGFR DARPin 및 피브로넥틴 스캐폴드 융합체는 장식되지 않은 AAV8 w.t. 대조군과 비교하여 감염도의 증가를 나타내지 않았으며, 이는 이들 두 가지 스캐폴드로 수득된 장식 수준이 낮기 때문일 가능성이 높다.

[0448] **다형 교모세포종(GBM) 신경구에 대한 장식 AAV8의 시험관 내 감염도:**

[0449] GBM 신경구 배양물을 Henri Ford Health System으로부터 수득하고, 5% CO_2 하 37℃에서, Gibco N2 보충제(100x; #17202-048), BSA(Sigma #A4919; 최종 농도 0.5 mg/ml), Gentamicin(Gibco #15710-064; 최종 농도 0.025 mg/ml), Antibiotic-Antimycotic(100x)(Invitrogen #15240-062), EGF(Peprotech #100-15, 최종 농도 20 ng/ml) 및 FGF(Peprotech #100-18B, 최종 농도 20 ng/ml)가 보충된 DMEM/HamF12(Gibco #11039-021) 중에서 성장시켰다. EGFR 과발현 HKB11 세포주에서 얻은 감염도 결과를 검증하기 위해, 항-EGFR Sso7d(E.18.4.5)-AAV8을 사용하여 EGFR 발현이 향상된 GBM 신경구 세포주(HF-2927)를 감염시켰다. GBM 세포는, 신경구를 파괴하지 않으면서 96웰 플레이트에서 대략적으로 40,000개 세포/웰로 시딩되었다(세포 수는 세포 농도를 추정하기 위해 200 μl의 세포 트레인을 취하고 구체를 파괴하여 측정됨). 시딩된 신경구를 1E+06 및 1E+05 moi의 항-EGFR Sso7d 장식 AAV8로 감염시키고, 이를 동일한 EGFP 카고를 함유하는 장식되지 않은 AAV8 및 AAV9 w.t의 경우와 비교하였다. 형질도입 후 3일차에 ZOE Fluorescent Cell Imager(Bio-Rad)를 사용하여 EGFP 신호를 모니터링하였다. 도 7은 대표적인 신경구의 사진을 나타낸다.

[0450] 항-EGFR Sso7d VP2 융합 폴리펩티드를 나타내는 AAV 입자는, 장식되지 않은 AAV8 및 AAV9 제제와 비교 시, EGFR 과발현 세포주 HF-2927의 GBM 신경구 배양물에서 유의미한 세포 흡수의 증가를 나타냈다.

[0451] **실시예 3: VP2 N-말단에 유전자적으로 융합된 추가적인 GP2 및 아피바디 결합제를 사용하는 AAV8 장식 수준 평가**

[0452] **개요:**

[0453] 추가의 예시적인 GP2 및 아피바디 서열을 문헌으로부터 뽑아내고 실시예 1에 기술된 바와 같이 AAV8 VP2 발현 플라스미드 내에 클로닝하였다.

[표 8] 본 실시예에 사용된 스캐폴드 ID 및 링커 목록

스캐폴드 ID	기준	* 최종 스캐폴드 서열	AAV8-VP2 융합 발현 플라스미드 ID	스캐폴드 분자량(kDa)
항-Her2 아피바디($Z_{HER2:342}$)	DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-05-3521	**MVDNKFNKEMRNAYWEIALLPNLNNQQKRAFIRSLYDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK**GGGSGGGSGGGS	(SK0046) pR5a_항-PDGFR_아피바디_3xG4S-AAV8_VP2	7.6
항- PDGFRb 아피바디(*Z02483*)	DOI: 10.1016/j.jmb.2011.01.033	**MVDNKFNKELVKAAAEIDALPNLNRRQWNAFIKSLVDDPSQSANLLAEAKKLNDAQAPK**GGGSGGGSGGGS	(SK0047) pR5a_항-HER2_아피바디_3xG4S-AAV8_VP2	7.3
항- InsR GP2 (#1)	doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0685	**MKFWATVCSGHDGYCFEVPVYAETLDEALELAEWQYDSTYYDYAVTRVRP**GGGSGGGSGGGS	(SK0048) pR5a_GP2_Cl1_3xG4S_AAV8_VP2	6.7
항- InsR GP2 (#5)	doi: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0685	**MKFWATVDCLYNDTAFEVPVYAETLDEALELAEWQYDPNYCIVTRVRP**GGGSGGGSGGGS	(SK0049) pR5a_GP2_Cl5_3xG4S_AAV8_VP2	6.5

** 굵은 글씨체 : N- 또는 C-종결 첨가가 없는 원래의 서열*

[0454]

[0455] **장식 AAV8 생산:**

[0456] 위에 기술된 pHelper, (DL144) CAG-EGFP-NOX 단일 가닥 카고, (AgC1157) pAAV rep2_cap8 VP2 KO 및 AAV8 VP2 융합체 발현 플라스미드를 등몰비로 함유하는 DNA 혼합물을 제조하고, FectoVIR-AAV 형질감염 시약(Polyplus #101000022); DNA:FectoVIR = 1 μg : 1 μl을 사용하여, 2E+06 vc/ml(1.1 μg 총 DNA/1E+06개 세포)의 농도로 200 ml의 HEK293 현탁 세포에 형질감염시켰다. 형질감염 후 최종 농도 2 g/l로 포도당을 형질감염 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO2에서 인큐베이션하였다. 또한, 이에 상응하는 바코드화 카고 플라스미드(A02)와 함께, 장식되지 않은 AAV1Sil1을 사용하는 2회의 추가 형질감염을 수행하였다. 형질감염 후 3일차에, 최종 농도가 0.1 U/μl까지의 벤조나제 및 20 ml의 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$)을 형질감염 반응물에 첨가하고 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 24 ml의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하고, 0.22 μM 필터를 사용하여 상청액을 여과하고, EDTA를 최종 농도 5 mM로 보충하고, AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)(PBS(pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68)에 대해 밤새)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다.

[0457] **역가 및 장식 수준 결정:**

[0458] 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하여, QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 AAV 벡터의 역가를 결정하였다. 정제된 제제는 다음과 같이 전처리되었다: 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 제제의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다.

[0459] 액적은 다음과 같이 생성되었다: 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머, 125 nM SV40 pA 프로브 및 프로브용 2 x ddPCR 슈퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 최종 부피 22 μl로 혼합하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 각각의 ddPCR 검정 혼합물 20 μl를 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(BioRad #1863005)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 이에 이어서, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적

생성이 완료된 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 40 μl 부피를 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0460] 플레이트를 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 추가로 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱하여 이를 변환시켰다.

[0461] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율을 평가하기 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0462] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산*

[0463] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0464] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0465] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0466] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0467] 표 9는 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 9] 아피바디 및 GP2 장식 AAV8 제제에 대한 QC

[0468]

샘플 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/세포	vp/세포
(AAV-701) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-항-PDGFRb-아피바디	15.7	1.04E+04	2.72E+05
(AAV-702) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-항-HER2-아피바디	12.2	2.85E+03	5.65E+04
(AAV-703) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_Cl1	18.5	7.88E+03	7.77E+04
(AAV-704) ssAAV8-CAG-eGFP-NOX-VP2-GP2_Cl5	14.1	9.65E+03	1.19E+05

[0469] **수용체 과발현 세포주에 대한 장식 AAV8의 시험관 내 감염도:**

[0470] 장식 AAV8 제제의 수용체 특이성을 평가하기 위해, 인간 PDGFRb 또는 인간 HER2를 과발현하는 HKB11 세포(각각, HKB11 PDGFR+ 또는 HKB11 Her2+) 및 인간 인슐린 수용체를 과발현하는 NIH3T3 세포(NiH3T3 InsR+)에 대해 감염도 분석을 수행하였다. 감염 당일, 세포를 DMEM 중에 5E+05 세포/ml로 재현탁하고, 50 μl/웰로 96 웰 플레이트에 시딩하였다(2.5E+04 세포/웰). 동일한 카고 및 방법을 사용하는 별도의 실험에서 생산된 AAV8 장식 제제 및 장식되지 않은 AAV8 대조군을 DMEM 배지에 희석하고, 바이러스 게놈 농도 기준 1E+06 내지 4.57E+02 moi 범위의 상이한 농도를 시딩된 세포에 도말하였다(최종 부피 100 μl). 형질도입 후 4일차에 세포를 분리하고 FACS 분석을 수행하여 EGFP 양성 세포 및 EGFP MFI의 백분율을 계산하였다. 도 8은 전체 입자 수 대 감염된(EGFP+) 세포 또는 EGFP MFI의 비율을 나타낸다.

[0471] AAV8 VP2에 융합된 모든 테스트된 아피바디 및 GP2 서열은 장식되지 않은 대조군과 비교 시 수용체 과발현 세포주에 대한 형질도입의 향상을 나타냈다.

[0472] **실시예 4: 상이한 AAV 백본에 대한 VP2 융합체로서의 Sso7d 스캐폴드 평가**

[0473] 본 실험의 목적은 N-말단 VP2 융합을 사용하여 리간드 스캐폴드를 상이한 AAV 혈청형 내로 이식할 수 있는지의 가능성을 평가하는 것이었다. 본 실시예에서, 리간드 스캐폴드로서 기능성 항-EGFR Sso7d 서열을 사용하였다.

[0474] **Sso7d-AAV6Si12 평가:**

[0475] 우선적으로, AAV6Si12를 사용하였다. 이러한 백본은 AAV6에 대한 주요 부착 부위 역할을 하는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸(HSPG) 및 시알산(SIA)에 대한 결합을 폐기하거나 감소시키기 위한, 표 10에 요약된 돌연변이 세트를 함유한다. 나열된 돌연변이는, 표 10 및 11에 기술된 바와 같이, rep2/cap6 VP2 KO 플라스미드(T138A) 및 항-EGFR Sso7d(E.18.4.5) VP2 융합 발현 플라스미드(G4S를 통해 VP2 N-말단에 융합된 항-EGFR Sso7d 또는 (G4S)3) 둘 모두에 혼입되었다. 상이한 제제의 클로닝, 발현, 정제 및 바이러스 농도 평가는 다음을 제외하고는

실시예 2에 기술된 바와 같이 수행되었다:

[0476] * CAG-EGFP-NOX 단일 가닥 카고(DL144)가 사용됨

[0477] * 형질감염 후 3일차에 샘플을 수확함

[0478] 장식 AAV6Sil2 제제의 기능성을 평가하기 위해, 실시예 2에 기술된 동일한 프로토콜(vg 중 시작 moi로서 1E+05)을 사용하여 HKB11 야생형(w.t.) 및 HKB11_EGFR 과발현 세포주에 대해 감염도 분석을 수행하였다. 도 9는 해당 결과를 제시한다.

[표 10] AAV6Sil2 돌연변이 세트 개요

[0479]

혈청형	침묵화된 ID	침묵화 돌연변이	예측된 차단 경로	기준
AAV6	AAV6_Sil2	K531E, K459S, V473D, N500E	HSPG 및 SIA	DOI: 10.1128/JVI.00161-16 및 https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.08.011

[표 11] pHelper 및 DL144 카고 외에 본 실시예(AAV6_Sil2)에 사용된 rep/cap VP2 KO 및 VP2 발현 플라스미드의 목록

[0480]

샘플 ID	Rep/Cap 플라스미드	VP2 발현 플라스미드
AAV6 w.t.	pRep2Cap6	없음
AAV6 Sil2	(AgC1227) pR2_C6_Sil2	없음
AAV6 Sil2- 항-EGFR Sso7d G_4S	(AgC1248) pR2_C6_VP2KO_ Sil2	*(AgC1281)_pRS5a_항-EGFR_Ssod7_ G4Sx1_AAV6_VP2_Sil2_D590A
AAV6 Sil2- 항-EGFR Sso7d $(G_4S)_3$	(AgC1248) pR2_C6_VP2KO_ Sil2	*(AgC1278)_pRS5a_항-EGFR_Ssod7_ G4Sx3_AAV6_VP2_Sil2_D590A

** D590A 돌연변이는 VP2 발현 플라스미드에 의도치 않게 존재했으며, VP2 전용 단백질의 해당 돌연변이는 도 9 에 나타낸 HKB11 w.t. 감염도 프로파일에서 확인된 바와 같이 형질도입에 영향을 미치지 않음.*

[0481] AAV6 백본(AAV6_Sil2 돌연변이 세트)에 대한 HSPG와 시알산 상호작용의 제거는 부모 서열과 비교 시 시험관 내 바이러스 흡수를 대략 100배 감소시킨다. 항-EGFR Sso7d 스캐폴드를 사용하는 AAV6_Sil2 백본의 장식은 EGFR 과발현 세포주에 대한 AAV6 w.t. 감염도를 복원시킨다. 본 실험에서 테스트된 Sso7d와 VP2 사이의 두 링커는 감염도에 영향을 미치지 않는 것으로 보인다.

[0482] **Sso7d-AAV9 평가:**

[0483] 두번째로 평가된 백본은 AAV9였다. 다시, 표 12에 요약된 바와 같이, 2개의 상이한 캡시드 발현 플라스미드, 즉 rep2/Cap9 VP2 KO(T138A) 및 항-EGFR Sso7d(E.18.4.5) AAV9 VP2 융합 발현 플라스미드((G4S)3에 의해 연결된 AAV9 VP2의 N-말단에서의 항-EGFR Sso7d의 융합체)를 생성하였다. AAV6Sil2에 대해 본 실시예에서 기술된 바와 같이, 상이한 제제의 바이러스 농도에 대한 클로닝, 발현, 정제 및 평가를 수행하였다(수확 시간: 형질감염 후 2일차). 장식 AAV 제제의 기능성을 평가하기 위해, GBM 세포에 대한 감염도 분석(실시예 2에 기술됨)을 수행하였다. 본 실험에서, 각각 EGFR 향상 발현(HF-2927) 및 기본 EGFR 수준(HF-2561)을 갖는 2개의 서로 상이한 클론을 각각 사용하였다. 감염도 분석을 위해, 384-웰 플레이트(Corning, #3830)에 웰당 350개의 HF-2561 세포 또는 500개의 HF-2927 세포를 시딩하였다. 상이한 신경구 세포주 간의 성장 차이를 조정하기 위해, 세포주당 16개의 추가 웰을 시딩하여 구형 형성 시, 시딩 후 2일차에 배양물당 평균 세포 수를 측정하였다. 웰당 세포를 정량화하기 위해, 배양 후 2일차에 Hoechst 33342로 이들 웰을 염색하였다(10 μg/ml로 1시간; Sigma B2261). Opera Phenix High-Content Screening System(PerkinElmer)을 사용하여 세포 수를 측정하고, 바이러스 제제를 염색되지 않은 구체의 배지에 첨가하여 세포주당 원하는 MOI(바이러스 없음, MOI 10E4, 10E5, 10E6)에 도달시켰다. 감염 후 5일차에, Hoechst로 구체를 1시간 동안 염색하고, Hoechst(세포 수) 및 GFP(바이러스 감염)에 대해 Opera Phenix로 이미지화하였다. Z(18개 평면) 방향으로 10 mm를 커버하는 공초점 모드로 10x 공기 대물렌즈를 사용하여 이미징을 수행하였다. 최대 투영에 대해 Harmony 소프트웨어를 사용하여 이미지 분석을 실행했으며, 핵 분화 후 GFP 양성 세포의 비율을 측정하였다(핵 GFP 신호가 >1500인 GFP+ 세포). 도 10는 해당 결과를 제시한다.

[표 12] pHelper 및 DL144 카고 외에 본 실시예(AAV9)에 사용된 rep/cap VP2 KO 및 VP2 발현 플라스미드의 목록

샘플 ID	Rep/Cap 플라스미드	VP2 발현 플라스미드
AAV9 w.t.	pRep2Cap9	없음
AAV9 - 항-EGFR Sso7d $(G_4S)_3$	(NC036) pRep2_p5_Cap9_VP2 KO	(NC043) pRS5a_G4Sx3_항-EGFR_Sso7d_AAV9-VP2

[0484]

[0485] AAV9의 VP2 N-말단에서의 항-EGFR Sso7d의 융합은 EGFR 발현이 높은 GBM 신경구(HF-2927)에서 감염도를 증가시키지만 기본 EGFR 발현을 갖는 클론(HF-2561)을 사용하는 경우 개선이 나타나지 않는다.

[0486] **Sso7d-AAV1Sil1 평가:**

[0487] 마지막으로, VP2 N-말단 융합에 의한 리간드 장식을 위한 백본으로서 AAV1Sil1을 테스트하였다. 이러한 백본은 AAV1에 대한 주요 부착 부위 역할을 하는 시알산(SIA)에 대한 결합을 폐기하거나 감소시키기 위한 표 13에 기술된 바와 같은 돌연변이 세트를 함유한다. 나열된 돌연변이는 본 실험에 사용되고 표 14 및 15에 나열된 상이한 항-EGFR Sso7d-VP2 융합 발현 플라스미드((G4S)3)에 의해 연결된 AAV1 VP2 N-말단에 융합된 상이한 항-EGFR Sso7d 서열)뿐만 아니라 rep2/cap1 VP2 KO 발현 플라스미드(T138A) 둘 모두에 혼입되었다. 상이한 제제의 클로닝, 발현, 정제 및 바이러스 농도 평가를 실시예 2에 기술된 바와 같이 수행하였다. 장식된 AAV1Sil1 제제의 기능성을 평가하기 위해, 실시예 2에 기술된 동일한 프로토콜을 사용하여 HKB11 w.t. 및 HKB11_EGFR 과발현 세포주에 대해 감염도 분석을 수행하였다. 도 11은 해당 결과를 도식적으로 나타낸다.

[표 13] AAV1Sil1 돌연변이 세트 개요

혈청형	침묵화된 ID	침묵화 돌연변이	예측된 차단 경로	기준
AAV1	AAV1_Sil1	V473D, N500E	SIA	DOI: 10.1128/JVI.00161-16

[표 14] 본 실시예에 사용된 항-EGFR Sso7d 서열의 에피토프/친화도 특성; 서열, 에피토프 및 친화도 데이터는 문헌[Traxlmayr et al. (DOI 10.1074/jbc.M116.741314) 및 Salzer et al. (doi.org/10.1038/s41467-020-17970-3)]으로부터의 데이터임:

클론 ID	에피토프	AAV1Sil1 VP2 N-말단에 융합된 최종 서열	A431 에 대한 Kd	Jurkat 에 대한 Kd
*E18.4.5	세툭시맙(D3 결합제)와 경쟁함	**MATVKLTYQGEEKQVDISKITYVDRAGQ FIWFEYDEGGGALGTGWVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	19 nM	n.a
E11.8	세툭시맙 및 E18.6 과 경쟁하지 않음	**MATVKFTYQGEEKQVDISKIKRVDRYGQ SIHFNYDEGGGAYGWGWVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	67 nM	n.a
E18.6	세툭시맙 및 E11.8 과 경쟁하지 않음	**MATVKFTYQGEEKQVDISKIKNVLRYGQ QIVFSYDEGGGAGGNGFVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	73 nM	n.a
E11.4.1	세툭시맙(D3 결합제)와 경쟁함	**MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRGGQ RIAFGYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	17 nM	13 nM
E11.4.1 G25A	세툭시맙(D3 결합제)와 경쟁함	**MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRAGQ RIAFGYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	n.a	125 nM
E11.4.1 G32A	세툭시맙(D3 결합제)와 경쟁함	**MATVKFTYQGEEKQVDISKIMYVIRGGQ RIAFAYDEGDGAWGDGIVSEKDAPKELL QMLEKQ**GGGGSGGGGSGGGGS	n.a	877 nM

[0488] ** 본 실험에 사용되지 않음*

[표 15] pHelper 및 DL144 카고 외에 본 실시예(AAV1Sil1)에 사용된 rep/cap VP2 KO 및 VP2 발현 플라스미드의 목록

[0489]

샘플 ID	Rep/Cap 플라스미드	VP2 발현 플라스미드
AAV1 Sil1	(NC056)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_V473D_N500E	없음
AAV1 Sil1 항-EGFR Sso7d E11.8	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0004) pRS5a_항-EGFR Sso7d E11.8_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2
AAV1 Sil1 항-EGFR Sso7d E18.6	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0005) pRS5a_항-EGFR Sso7d E18.6_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2

[0490]

AAV1 Sil1 항-EGFR Sso7d E11.4.1	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0001) pRS5a_항-EGFR Sso7d E11.4.1_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP2
AAV1 Sil1 항-EGFR Sso7d E11.4.1 G25A	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0002) pRS5a_항-EGFR Sso7d E11.4.1 G25A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP
AAV1 Sil1 항-EGFR Sso7d E11.4.1 G32A	(NC057)\pRep2_Cap1_AAV1\Sil1_VP2\KO	(HS0003) pRS5a_항-EGFR Sso7d E11.4.1 G32A_(G4S3)_AAV1 Sil1 VP

[0491] AAV1Sil1 VP2에 융합된 모든 테스트된 항-EGFR Sso7d 스캐폴드 변이체는 장식되지 않은 부모 세포와 비교 시 EGFR 과발현 세포주의 증가된 형질도입을 나타냈다.

[0492] **실시예 5: 인간 EGFR에 대한 Sso7d 파지 라이브러리 및 파지 디스플레이의 생성:**

[0493] **실시예 5.1. 라이브러리 제조:**

[0494] 파지 디스플레이 벡터로서, 앰버 정지부 및 암피실린 내성을 갖는 pPD7-1_ompA_Sso7d_APP를 선택하였다.

[0495] Sso7d 라이브러리(Lib8)는 다음과 같이 설계되었다: 첫 번째 메티오닌을 포함하는 rcSso7d 폴리펩티드 서열에 대한 rcSso7d 위치 22, 24, 26, 29, 31, 33, 41, 43 및 45는 각각의 위치에서 동일하게 나타나는 8개의 아미노산(D, R, H, N, A, I, Y 및 W)으로 무작위화되었다. 추가적으로, 추정 글리코실화(NxS NxT - P가 아닌 x), 인테그린 결합(RGD, RYD, KGD, NGR, LDV, DGE) 및 CD11c/CD18 결합(GPR) 모티프를 회피하여 번역 후 변형 이벤트 및 비특이적 결합을 감소시키고, AgeI, BamHI 및 BsaI 제한 부위는 클로닝의 이유로 해당 설계에서 제거되었다. 무작위화에 사용된 rcSso7d 백본은 다음과 같다:

[0496] (M)ATVKFTYQGEEKQVDISKIKXVXRXGQXIXFXYDEGGGAXGXGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

밑줄이 쳐진 위치: 문헌[Traxlmayr et al. ((DOI 10.1074/jbc.M116.741314)]에 기술된 w.t. Sso7d 서열 대비, rcSso7d 치환 K7T, K9Q, K28Q, Q40A 및 KK C-말단 절단 X 는 무작위화된 위치를 나타냄.

[0497] 라이브러리 삽입물은 Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase(NEB, M0493L)를 사용하여, NruI 및 EcoRI 제한 부위를 도입하는 PCR로 증폭되었다.

[0498] PCR 반응은 반응 부피 25 µl당, 5 x Q5 반응 완충액 5 µl, 50 mM dNTP 0.5 µl, Sso7d 라이브러리의 템플릿 DNA 250 pg, 각각의 프라이머 10 pmol 및 Q5 Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase 0.25 µl을 함유한다. 265 bp 단편은 다음의 시이클링 프로토콜을 사용하여 증폭되었다: 98℃에서 30초 동안 초기 변성 단계; 98℃에서 7초 동안 변성, 62℃에서 15초 동안 어닐링, 72℃에서 15초 동안 25주기 신장; 72℃에서 2분간 최종 신장. 잠재적으로 남아 있는 템플릿 DNA 및 프라이머를 제거하기 위해, PCR 반응물을 2% TAE 아가로스 겔에 로딩하였다. 올바른 밴드를 잘라내고 Wizard® SV Gel 및 PCR Clean-Up System, Promega, A9281을 사용하여 정제하였다.

[0499] 증폭된 Sso7d 라이브러리를 제한 효소 NruI-HF((NEB R3192L) 및 EcoRI-HF(NEB R3101L)로 37℃에서 3시간 동안 분해하였다. 분해된 돌출부를 제거하기 위해, 위에서 언급한 Wizard 키트를 사용하여 또 다른 클린업 단계를 수행하였다.

[0500] 앰버 정지부를 갖는 파지 디스플레이 벡터인 pPD7-1_ompA_Sso7d_APP를 제조하기 위해, 벡터 DNA를 EcoRI-HF/NruI-HF로 37℃에서 3시간 동안 분해하였다. 벡터와 삽입체 단편의 분리를 위해, 분해된 벡터를 1% TAE 아가

로스 겔에 로딩하고, 전기영동 후 정확한 크기인 4482 bp의 벡터 밴드를 잘라냈다. 전술한 바와 같이 용융 및 클린업을 수행하였다.

[0501] 2 μg의 분해된 벡터 DNA 및 434 ng의 분해된 삽입체 DNA를 Vector-DNA의 μg당 1.6 U의 T4 DNA 리가아제(ThermoFisher Scientific, No. 15224041)(삽입체 DNA의 4배 몰 과량에 해당함)를 사용하여 결찰시켰다. 16℃에서 16시간 동안 결찰을 수행한 후, 65℃에서 10분간 열 불활성화 단계를 거쳤다.

[0502] 글리코겐(Ultrapure Glycogen, ThermoFisher, No 10814-010) 및 2-부탄올(Sigma, No. 19440) 침전을 수행하여 결찰된 라이브러리를 탈염시키고 70% 에탄올로 세척 단계를 수행하였다. 이어서, 결찰된 DNA를 ddH2O에 용해시켰다.

[0503] Electrocompetent TG1([F' traD36 proAB lacIqZ ΔM15] supE thi-1 Δ(lac-proAB) Δ(mcrB-hsdSM)5(rK - mK -), Lucigen, No. 60502-2)을 사용하는 30개의 형질전환 반응이 Gene Pulser/MicroPulser 전기천공 큐벳(0.1 cm 갭, No. 1652089, BioRad)에서 형질전환당 66.7 ng의 결찰 벡터 및 25 μl의 세포를 사용하여, BioRad Genepulser Xcell 기기(1.8 kV, 600 Ohm, 10 μF로 설정됨)에서 수행되었다. 형질전환 후, 세포를, 각각의 형질전환에 대해, 사전에 가온된 Terrific Broth Recovery 배지(TB 변형, 1.2% BactoTryptone, 2.4% 효모 추출물, 54 mM K_2HPO_4, 16 mM KH_2PO_4, 0.4% 글리세롤 함유) 2.5 ml 중에 재현탁시켰다. 회복 시간은 진탕 인큐베이터 내 37℃에서 1시간이었다. 라이브러리를 100 μg/ml 카르베니실린 및 1% 포도당을 함유한 1.5 μl LB 배지에서, 220 rpm으로 진탕시키면서 21℃에서 15시간 동안 증폭시켰다. 밤새 배양의 시작 OD600 nm는 0.23이었고; 최종 수확은 15시간 후 1.86의 OD600 nm에서 수행되었다.

[0504] 품질 관리로서, 삽입 단편 없이 벡터 단편을 리가아제와 함께 결찰시키고, 형질전환시켜 벡터 백그라운드를 결정하였다.

[0505] 라이브러리 크기 및 벡터 백그라운드는 LB/100 μg/ml Carb/Gluc 한천 플레이트 상에 플레이팅하여 1시간의 회복 시간을 거친 후 일련의 희석을 수행하여 확인되었다. 최종 라이브러리 크기는 2.67 x 10E9개 구성원으로 결정되었으며, 이는 1.34 x 10E8 구성원을 갖는, 해당 라이브러리의 이론적 다양성을 20배 오버샘플링하는 것에 해당한다. 0.08%의 매우 낮은 벡터 백그라운드가 결정되었다.

[0506] 라이브러리의 94개 클론에 대한 Sanger 시퀀싱 결과는 94개의 상이한 Sso7d 서열을 나타났고, 벡터 백본 서열은 나타나지 않았다.

[0507] 원심분리 단계로 라이브러리를 수확하고 펠렛을 LB/100 μg/ml 탄수화물/1% 포도당/20% 글리세롤에 재현탁하였다. 이어서, 분취물(라이브러리 다양성의 ~8배 포함)을 액체 질소에서 급속 냉동시킨 다음 -80℃에서 보관하였다.

[0508] 라이브러리을 Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다. 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 및 길이(120~130 bp)를 기준으로 필터링하였다. 품질 트리밍 후, Sso7d의 특정 경계(DISK에서 DAPK까지)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하였다. 최종 필터링된 서열에 대해 표적화 위치에서의 아미노산 분포를 평가하였다: 대략 500~700K의 판독치가 평가되었다. 도 12는 해당 결과를 나타낸다.

[0509] 무작위 위치에서의 아미노산 분포는 무작위화에 사용된 8개 아미노산 각각에 대해 약 12.5%의 빈도로 예상한 바와 같았다.

[0510] **실시예 5.2 Sso7d 플라스미드 라이브러리를 사용한 파지 제조:**

[0511] 라이브러리의 다양성을 약 8배로 함유하는 글리세롤 스톡을, 0.24의 시작 OD600 nm에서, 200 ml의 2 YT/100 μg/ml 카르베니실린/1% 포도당으로 접종하였다. OD600이 0.59가 될 때까지 세포를 37℃ 및 220 rpm에서 성장시켰다. MOI(감염 다중도)가 20인, 하이퍼파지, M13 K07ΔpIII, Progen, PRHYPE를, 우선적으로 37℃ 수조에서 진탕 없이 첨가한 다음, 37℃에서 220 rpm으로 진탕하여 헬퍼 파지 감염을 수행하였다. 감염 대조군으로서 희석 시리즈를 제조하고(하이퍼파지는 감염된 대장균 세포에 카나마이신 저항성을 부여함), 두 한천 플레이트 LB/100 μg/ml 카르베니실린/1% 포도당 및 LB/50 μg/ml 카나마이신/1% 포도당 상에 상이한 희석액을 도말한 후, 배양물을 원심분리하여 남은 하이퍼파지를 제거하고 헬퍼파지에 감염된 대장균을 함유하는 펠렛을 1 l의 2xYT/100 μg/ml카르베니실린/50 μg/ml 카나마이신/0.25 mM IPTG에 재현탁하고, 22℃의 진탕기 내에서 밤새 인큐베이션하였다.

[0512] 다음날, 대조군 한천 플레이트는 두 항생제 내성 모두에서 거의 동일한 수의 콜로니를 나타냈으며, 이는 헬퍼파지 감염이 효율적임을 입증한다.

[0513] 배양물을 원심분리하고 1/4 부피의 얼음 냉각 20% PEG6000/2.5 M NaCl(폴리에틸렌 글리콜/NaCl)을 사용하는 3시간 인큐베이션 단계, 원심분리로 상청액으로부터 파지를 침전시키고, 4℃에서 밤새 PBS로 재현탁 및 용해시킨 후 두 번째 침전 단계를 통해 침전시켰다. 모든 파지를 완전히 용해시키기 위해, PBS에서 두 번째 재현탁 단계를 실온에서 2시간 동안 수행하였다. 아직 남아 있는 세포 잔해를 제거하기 위해 4℃에서 또 다른 원심분리 단계를 수행하였다.

[0514] 파지 역가는 TG1F`의 감염에 의해 결정되었다. 일반적으로, 역가 측정을 위해, TG1F' 세포를 M9 한천 플레이트(5 x M9-최소 염 200 ml, 박토 한천 용액 780 ml, 1 M $MgSO_4$ 2 ml, 1 M $CaCl_2$ 0.1 ml, 20% 포도당 20 ml, 1% 티아민염산염 400 µl 함유)에서 감염하시키 전에 성장시켜 파지 감염에 필요한 F-필리를 성장시켜야 한다. 그런 다음, 역가 측정을 위해 기하급수적으로(0.6~0.8의 OD600 nm까지) 성장해야 하기 때문에, 2 x YT 배지 중 이들 세포의 액체 배양물을 M9 플레이트에서 접종하였다. 일련의 희석 파지 제조 후, 성장한 TG1F'를 첨가하고, 37℃에서 30분의 감염 시간 후, 희석액을 LB/30 µg/ml 카르베니실린/1% 포도당 플레이트에 플레이팅한다.

[0515] 다음날, 상이한 희석액의 콜로니를 계수하고 역가를 계산히였다. 동결을 위해 20% 글리세롤을 첨가한 후, 3.5 x 10E12 파지/ml의 파지 역가가 결정되었다. 분취액을 -80℃에서 보관하였다.

[0516] **실시예 5.3 인간 EGFR 상에서의 파지 디스플레이:**

[0517] 라이브러리 품질을 평가하기 위해 파지 디스플레이 캠페인이 수행되었다. 표적으로서 인간 EGFR을 선택하였다. 3회의 차등 세포 패닝이 수행되었다. 생존율 >98%로 인간 EGFR로 안정적으로 형질감염된 HKB11 현탁 세포를 제1 및 제3 패닝 라운드에 사용하였다. 제2 라운드에서는 Fc에 융합된 비오티닐화 인간 EGFR 단백질을 사용하였다. 세포 배양은 200 µg/ml의 제오신 및 1% FBS이 첨가된 적절한 배지에서 수행되었으며, 주당 3회씩 3 x 10E5 세포/ml로 분할하였다.

[0518] 세포 패닝 라운드 1 및 3의 경우, 사전 냉각된 PBS/5% FBS를 사용하는 3회 세척 및 원심분리 단계를 통해 1x10E7 세포를 제조하였다. 동일한 완충액을 사용하는 파지 및 표적 세포에 대한 2시간 동안의 차단 후, 세포를 원심분리하고 파지와 함께 재현탁하고 추가로 2시간 동안 배양하였다. 입력 파지의 양은 라이브러리의 다양성 또는 이전 패닝 라운드의 출력의 최소 500배에 달했다. 파지 인큐베이션 후, 제1 세포 패닝 라운드에서 인큐베이션 시간 없이 세포를 2회 세척하고 원심분리했으며, 제3 라운드에서는 각각 5분의 인큐베이션 시간으로 3회의 세척 단계를 수행하였다. 두 경우 모두, 100 mM 글리신-HCl/500 mM NaCl, pH 2.2 및 100 mM 트리에틸아민, pH 11.5를 사용하여 낮은 pH와 높은 pH에서 용출을 수행하였다. 각각의 단계 후, 직접 중화를 수행하였다. 실온에서 수행된 파지의 최종 용출을 제외하고, 세포 패닝을 위한 모든 단계는 4℃에서 수행되었다.

[0519] Fc 태그에 융합된 비오티닐화된 인간 EGFR 단백질을 사용하여 제2 패닝 라운드를 수행하였다. 사전 차단된 파지를 500 nM 비오티닐화 단백질과 함께 1시간 동안 직접 인큐베이션하였다. 이어서, 결합된 파지를 갖는 비오티닐화된 hEGFR-Fc 단백질을 뉴트라비딘 코팅된 플레이트에 추가로 한 시간 동안 포획하였다. 임의의 인큐베이션 기간 없이, 웰을 PBS + 0.05% Tween 20으로 3회 세척한 후 3x PBS로 세척하였다. 세포 패닝과 동일한 방법으로 용리를 수행하였다.

[0520] 파지 제조에 대해 위에서 기술된 바와 같이 출력의 파지 역가를 측장히였다. 표 16는 해당 결과를 요약한다.

[표 16] 패닝 라운드에서의 파지 역가

	제 1 라운드		제 2 라운드		제 3 라운드	
	입력물	출력물	입력물	출력물	입력물	출력물
EGFR	WCP (HKB11-EGFR 형질감염)		LP (Neutr.+hsEGFR_hFc1P)		WCP (HKB11-EGFR 형질감염)	
파지 역가	6.9E+10	**5.6E+06**	1.6E+10	**5.4E+06**	4.5E+10	**3.2E+09**
파지 사전차단			뉴트라비딘			
세척 조건	저 엄격성		저 엄격성		표준	
	2x FACS 완충액, 신속		3x PBST, 신속 3x PBS, 신속		3x FACS 완충액, 5 분	

[0521]

[0522] **후속 패닝 라운드를 위한 출력물 및 제제의 파지 감염:**

[0523] 파지의 추가 증폭을 위해, 0.6~0.8의 OD600 nm에서 기하급수적으로 성장시킨 TG1F'를 용출 부피에 대해 수조에

서 37℃에서 45분 동안 10~20배 과량의 TG1F' 부피로 파지 출력물에 감염시켰다. TG1F'의 펠렛화를 위한 원심분리 단계 후, 감염된 박테리아를 포함하는 펠렛을 100 μg/ml 카르베니실린 및 1% 포도당을 함유하는 100 ml의 2 x YT 배지로 옮기고, 진탕 플라스크 중 220 rpm의 진탕 하 25℃에서 밤새 성장시켰다. 다음날, 원심분리 단계 후, 추가 20% 글리세롤을 함유한 새로운 배양 배지에 펠렛을 재현탁시켜 글리세롤 스톡을 제조하고, 글리세롤 스톡으로부터 새로운 파지 제조를 시작하였다.

[0524] 이를 위해, 2YT/100 μg/ml 탄수화물/1% 포도당을 함유한 새로운 10 ml 배양물에 글리세롤 스톡을 0.2~0.3의 OD600 nm로 접종하였다. 배양물을 진탕 인큐베이터에서 220 rpm으로, 37℃에서 30~60분 동안 성장시켰다. 하이퍼파지 감염은 moi 20의 배양액 5 ml에서, 진탕 없이 37℃ 수조에서 30분 동안 수행한 후, 37℃ 및 220 rpm의 진탕기에서 추가로 30분 동안 수행하였다. 이 과정은 감염된 용액 50 μl를 LB/50 μg/ml 카나마이신/1% 포도당 한천 플레이트에 플레이팅하여 제어하였다. 하이퍼파지 제거를 위한 원심분리 단계 후, 생성된 펠렛을 10 ml 2xYT/100μg/ml 카르베니실린/50 μg/ml 카나마이신/0.25 mM IPTG 배지에 옮기고, 파지 생산을 위해 22℃ 및 220 rpm으로 밤새 진탕하면서 배양하였다.

[0525] 다음날, 한천 플레이트 위의 잔디 모양의 균막으로 성공적인 감염을 확인하였다. 파지 함유 배양 상청액을 원심분리 단계를 통해 대장균 세포로부터 분리하고 Sso7d를 운반하는 파지를 약 1/4 부피의 얼음 냉각 20% PEG6000/NaCl로 얼음 위에서 30분 동안 침전시켰다. 현탁액을 사전 냉각된 원심분리기에서 16000 x g, 4℃에서 30분간 원심분리하고, 상청액을 폐기하고 침전된 파지를 PBS에 재현탁시켰다. 남은 세포 잔해를 Eppendorf 원심분리기에서 16000 rpm로 5분 동안의 또 다른 원심분리 단계로 제거하였다. 역가 결정은 전술한 바와 같이 수행되었다.

[0526] 제3 패닝 라운드 및 출력의 밤새 증폭 후, Qiagen Minikit, No. 27106를 권장 프로토콜에 따라 사용하여 DNA-Miniprep을 수행하였다.

[0527] **실시예 5.4: NGS에 의한 Sso7d 라이브러리 조성물 평가.**

[0528] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0529] Illumina의 어댑터가 포함된 프라이머를 사용하는 한 번의 단일 PCR 반응에서의 3회의 패닝 라운드 후 출력물의 DNA 제제로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인덱스가 포함된 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 17은 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다.

[표 17] 본 실시예에 사용된 프라이머 목록

[0530]

샘플 ID	프라이머 서열 5'~3'
LC0034 (순방향 프라이머)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGAC GCTCTTCCGATCTcaggtggacatcagcaagatcaag
LC0086 (역방향 프라이머)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATCGTACGGTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC

[0531] PCR 반응물은, 총 반응 부피 25 μl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol, 제3 패닝 라운드 후 DNA 제제 100 ng를 사용하여 제조하였다. PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 98℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 15회 사이클; 이어서 72℃에서 2분 동안의 최종 증폭, 이에 이어서 4℃에서의 유지. PCR 산물은 Sybr-Safe 사전염색된 1.5% 아가로스 겔(120V에서 30분 실행) 상에서의 아가로스 겔 전기영동으로 분리되었다. 이어서, 예상된 크기의 밴드를 절단하고, Qiaquick Gel Extraction Kit(Qiagen # 28704)를 사용하여 정제하고 50 μl의 물로 용리하였다. Qubit 기기로 DNA 농도를 측정하였으며, Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent DNA1000 키트)을 사용하여 산물의 순도 및 크기를 평가하였다, 정량 후, 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다.

[0532] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0533] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 및 길이(120~130 bp)를 기준으로 필터링하였다. 품질 트리밍 후, Sso7d의 특정 경계(DISK에서 DAPK까지)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하였다. 최종 필터링된 서열에 대해 표적화된 위치에서의 단일 서열 발생 및 AA 분포를 평가하였다. 결과는 도 13에 예시되어 있다.

[0534] NGS는 몇몇 라이브러리 작제물의 높은 농축을 나타냈으며, 가장 풍부한 것은 4.56%의 발생률을 나타냈다. NGS는 또한 9개의 무작위 위치의 아미노산 잔기가 특히 일부 위치(제1 메티오닌을 포함하는 Sso7d 펩티드 서열의 위치 22, 26, 33, 43 및 45에 상응하는, 위치 1, 3, 6, 8 및 9의 돌연변이 위치)에서 비교적 보존되어 있음을 입증하였다.

[0535] **실시예 5.5: FACS 스크리닝**

[0536] Agilent, No. 200131(유전자형 대장균 B F- dcm ompT hsdS(rB - mB -) gal λ(DE3)) 로부터의 BL21(DE3) 세포에서 IPTG 유도를 사용하여 소규모 단백질 발현을 수행하였다.

[0537] DNA는 사용자 프로토콜에 따라, 열 펄스를 사용하여 화학적 능력이 있는 BL21(DE3) 세포로 형질전환되었다. 세포를 해당 LB/100 μg/ml 카르베니실린/1% 포도당 한천 플레이트 상에서 밤새 성장시켰다. 다음날, 4 x 96개의 단일 콜로니를 골라 마스터플레이트의 2 x YT/100 μg/ml 탄수화물/1% 포도당으로 옮기고 37℃의 플레이트 진탕기에서 밤새 성장시켰다. 다음 날, 30% 글리세롤을 추가로 포함하는 동일한 배지를 추가하여 보관하고 마스터플레이트를 -80℃에서 보관하였다.

[0538] FACS 스크리닝을 위한 단백질 발현을 100 μl 규모로 수행하였다. 2xYT/100 μg/ml 탄수화물/0.1% 포도당을 함유한 배양 플레이트를 해동 마스터플레이트로부터의 복제물로 접종하고 OD600 nm가 ~0.6이 될 때까지 37℃의 플레이트 진탕기에서 성장시켰다. 0.25 mM IPTG의 최종 농도로 유도한 후, 플레이트를 22℃(실온)의 플레이트 진탕기에서 추가로 밤새 인큐베이션하였다. 다음날 2 x BBS/EDTA, Teknova, No. B0205, 및 리소자임, Merck, No. 10837059001로 구성된 BEL 완충액을 사용하여 용해를 수행하였다. 웰 중 최종 농도는 200 mM 보론산, 150 mM NaCl, 2.5 mM EDTA 및 2.5 mg/ml 리소자임이었다. 진탕기에서 1시간 동안 인큐베이션한 후, 플레이트를 원심분리하고 분비된 가용성 Sso7d 단백질을 함유한 BEL 추출물을 세포 결합에 대해 테스트하였다.

[0539] FACS 분석을 위해, 선택된 클론을 EGFR 양성 및 음성 세포주에 대해 테스트하였다. 양성 세포주는 세포 패닝에 대해 기술된 것과 동일하였다(즉, 인간 EGFR로 안정적으로 형질감염된 HKB11 세포). 음성 대조군으로서, (EGFR은 HKB11 야생형 세포 상에서 내인성으로 발현되므로) HKB11-세포에 대한 교차 반응성을 배제할 수 있도록, 자가 제조 HKB11 EGFR 녹아웃 세포주를 사용하였다. FACS 분석은 96-웰 포맷의 고처리량 샘플러(BD Biosciences)를 갖춘 FACS Calibur 기기에서 수행되었다. FACS 완충액으로서, 5% FBS 및 0.04% NaN_3를 함유한 PBS를 모든 세척 및 배양 단계에 사용하였다. 세포 생존율은 >98%이었다. 5 x 10E5 세포/웰을 3회 세척 및 원심분리 단계를 통한 패닝에 대해 기술된 바와 같이 제조하였다. 모든 단계는 4℃에서 수행되었다.

[0540] 제1 염색 단계에서, BEL 추출물 50 μl를 자체 생산된 마우스 항-APP-항체와 함께 최종 농도 24 μg/ml로 플레이트 진탕기에서 1시간 동안 사전 배양하였다. 제2 단계에서, 5 x 10E5 세포/웰을 첨가하고 추가로 한 시간 동안 배양하였다. 냉각된 FACS 완충액을 사용하는 2회의 세척 단계 후, 세포를 염소-항-마우스-IgG-RPE-항체 R-Phycoerythrin AffiniPure $F(ab')_2$ 단편 염소 항-마우스 IgG, $F(ab')_2$ 단편 특이체(min X Hu, Bov, Hrs Sr Prot), Jackson ImmunoResearch, No. 115-116-072의 1:100 희석물에 재현탁시키고, 플레이트 진탕기에서 추가로 30분 동안 배양하였다. 2회의 최종 세척 단계 후, 염색된 세포를 냉각된 PBS 중에 재현탁하고, 웰당 5000개 세포를 FACS Calibur 기기로 측정하였다.

[0541] 384개의 테스트된 클론 중 81개의 주요 히트는 대조군 EGFR 녹아웃 세포주와 비교 시 EGFR 과발현 세포에 대해 중앙값 >10을 나타냈다(중앙값이 10~30인 55개, 중앙값이 30~60인 17개, 및 중앙값이 60~887인 9개). 서열 분석은 일부 서열이 최대 10배까지 농축되었음을 나타냈다. 결과적으로, 41개의 상이한 신규 서열이 식별될 수 있었다. 이들 중 약 절반에 대해, 다른 FACS 또는 ELISA를 통해, 비오티닐화된 단백질에 대한 결합을 확인할 수 있었다.

[0542] EGFR-형질감염 HKB11-세포에 대한 선별된 Sso7d 변이체의 특이적 결합을 확인하기 위해, 소규모 대장균 단백질 발현 및 6개의 EGFR-결합 Sso7d 작제물의 정제를 수행하였다. 발현은 20 ml 배양물 중 새로 형질전환된 BL21(DE3)에서 수행되었다. 37℃의 진탕 인큐베이터 중에서 세포를 성장시키고, 0.25 mM IPTG로 유도한 후 22℃에서 밤새 진탕하면서 추가로 인큐베이션하였다. 다음날, 배양물을 원심분리하고, 펠렛을 -80℃에서 2일 동안 동결시킨 후, 펠렛으로부터 가용성 분획만을 정제하였다.

[0543] 단백질 정제를 위해, 항-APP-컬럼(Sepharose 수지에 커플링된 항-APP-항체, Novartis 자체 생산)을 컬럼당 0.5 ml 컬럼 부피인 Poly-Prep 크로마토그래피 컬럼(BioRad, No. 731-1550)에서 제조하였다.

[0544] 완전한 무-EDTA 프로테아제 억제제 칵테일(Roche, 11873580001), 벤조나아제(Novagen, No. 70746) 및

DNAse(Roche, No. No. 04 536 282 001)를 함유하는 3.5 ml Bugbuster Mastermix(Millipore, No. 71456-3)를 사용하여, 실온의 회전 장치 상에서 30분 동안 용해를 수행하였다. 세포 잔해를 분리하고 원심분리 및 멸균 여과 단계를 통해 Sso7d를 발현시킨 후, APP 컬럼에 대한 Bugbuster의 잠재적 손상 효과를 방지하기 위해, 컬럼에 로딩하기 전 샘플을 PBS로 1:10으로 희석하였다.

[0545] PBS pH 7.4를 사용하여 평형화 및 세척 단계를 수행하고, 1~1.5 ml의 100 mM 글리신, pH 3을 사용하여 용출하였다. Amicon® Ultra-4 원심분리 필터 장치, 3 kDa MWCO, No. UFC800324를 사용하여 완충제 교환 및 정제된 단백질의 농축을 수행하였다. 단백질 겔을 사용하여 정제된 단백질의 품질을 분석하였다.

[0546] FACS 분석을 통해 6개의 정제된 Ss07d 작제물 모두의 특이적 세포 결합을 확인할 수 있었다. 도 14는 해당 결과를 나타낸다. 선택된 클론은 표 18에 특성화되어 있다.

[0547] 6개의 Sso7d 작제물 모두에 대한 FACS 분석에서, 특이적 세포 결합을 확인할 수 있었다.

[표 18] FACS 분석을 위해 선별된 Sso7d 작제물. 제 6 열의 아미노산 위치는 제 1 메티오닌이 없는 Ss07d 의 AS 위치를 나타냄.

정제 No.	샘플 명칭	히트 명칭 (MP 상 위치)	플레이트 상에서 검출된 클론	NGS 에서의 검출 (상위 30)	5	20	21	23	25	28	30	32	40	42	44
1	EGFR	4.1A02	1x	없음	F	K	I	D	Y	W	H	N	Y	W	W
2	EGFR	4.1A03	4x	히트 NO. 3 2.18%	F	K	I	D	Y	Y	H	R	N	W	W
4	EGFR	4.1H02	2x	없음	F	K	I	D	Y	W	H	R	D	W	W
5	EGFR	4.2A08	4x	히트 1 NGS 4.56%	F	K	I	D	Y	N	H	Y	N	W	W
6	EGFR	4.2B11	10x	히트 No. 24 0.89%	F	K	I	D	Y	N	H	N	W	W	W
7	EGFR	4.4E10	3x	없음	F	K	I	D	Y	Y	H	Y	D	W	W
10 PC	C2013	pPD7-1_Sso7d-EGFR_APP			L	T	Y	D	A	F	W	E	L	T	W
11 NC	C2014	pPD7-1_Sso7d-wt-libr.8_APP			F	K	K	W	V	M	S	T	T	R	A

[0548]

[0549] **실시예 6: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리 생성**

[0550] **실시예 6.1: Lib8 Sso7d-AAV1Sil1 플라스미드 라이브러리 생성**

[0551] VP2 N-말단에 대한 Sso7d 스캐폴드의 유전자 융합은 생체 내 및 시험관 내 선별에 사용될 수 있는 AAV 라이브러리를 생성할 수 있다. 최종 Sso7d 라이브러리를 생성하기 전, 카고 작제물 SK033이 생성되었다. SK033은 G4S 링커를 통해 AAV1Sil1 VP2의 N-말단에 융합된 항-EGFR Sso7d(E.18.4.5.)를 포함한다. 세포 발현에서 VP2 융합을 향상시키기 위해, 소형 버전의 WPRE 요소(WPRE3)가 CDS 뒤에 추가되었다. 융합 폴리펩티드는 소형 173CMV 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 또한, 소형 173CMV 프로모터 및 짧은 SV40 폴리A(SV40L)의 제어 하에 sfCherry2 카세트를 해당 작제물에 추가하여, FACS를 사용하는 직접 선별/검증을 수행할 수 있다. SK033 카고 설계는 다른 카고 설계와 비교 시 우수한 수율, 충진 AAV 입자 백분율 및 향상된 감염도 프로파일을 기반으로 선택되었다. AAV1Sil1은 HEK293T/17 세포에서 높은 바이러스 수율 및 시알산 결합의 부재/감소로 인한 생체 내 표적외 활성의 잠재적 감소를 위해 우선적으로 선택되었다. 도 15는 SK033 카고 설계를 개략적으로 나타낸다.

[0552] 수용체 플라스미드 SK0036은 전체 항-EGFR Sso7d(E.18.4.5) 서열과 SK0033에 존재하는 AAV1 Sil1 VP2의 초기 서열을 반대 방향에 배치된 이중 BsaI 제한 부위로 대체하여 생성되었다. 35 pb 상동성 아암이 아래에 설명된 라이브러리 단편 삽입물의 양쪽 말단에 추가되었다.

[0553] Sso7(Lib8) 단편은 Twist Bioscience에서 주문되었다. 이는 35 bp 5'UTR 영역, 무작위화 rcSSo7d 스캐폴드(인간 코돈 사용 최적화), G4S 링커 및 AAV1 VP2의 첫번째 182 bp를 포함한다(DT1, 즉 트레오닌을 코딩하는 VP2 개시 코돈이 삭제됨).

[0554] Sso7d 라이브러리(Lib8)는 다음과 같이 설계되었다: (절단된 제1 메티오닌을 포함하는 rcSso7d 폴리펩티드 서열에 대한) rcSso7d 위치 22, 24, 26, 29, 31, 33, 41, 43 및 45는, 각각의 위치에서 동등하게 나타나는 8개의 아미노산(D, R, H, N, A, I, Y 및 W)으로 무작위화되었고, 추가적으로, 번역 후 변형 이벤트 및 비특이적 결합을 감소시키기 위해 추정 글리코실화(NxS NxT - P가 아닌 x), 인테그린 결합(RGD, RYD, KGD, NGR, LDV, DGE) 및 CD11c/CD18 결합(GPR) 모티프를 제외시켰으며, AgeI, BamHI 및 BsaI 제한 사이트는 복제 이유로 해당 설계에서 제거되었다. 무작위화에 사용된 rcSso7d 백본은 아래와 같다.

라이브러리 생성에 사용된 rcSso7d 백본 서열

(M)ATVKFTYQGEEKQVDISKIKXVXRXGQXIXFXYDEGGGAXGXGXVSEKDAPKELLQMLEKQ

밑줄이 쳐진 위치: 문헌[Traxlmayr et al. ((DOI 10.1074/jbc.M116.741314)] 에 기술된 w.t. Sso7d 서열 대비, rcSso7d 치환 K7T, K9Q, K28Q, Q40A 및 KK C-말단 절단 X 는 무작위화된 위치를 나타냄. 제1 메티오닌은 절단됨

[0555]

[0556] 각각의 무작위 위치에 TGA 정지 코돈을 포함하는 단편은 라이브러리 합성을 위한 템플릿으로 사용되어 최종 복잡도 1.34E+08의 변이체인 451 bp의 단편을 생성하였다. 단편의 각각의 말단에서 Twist 측부 서열을 제거하기 위해, LC0052(5' CCCGGGGAACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC 3') 및 LC0053(5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG 3') 프라이머를 사용하여 라이브러리를 PCR 증폭시켰다. 4x PCR 반응물을 총 반응 부피 25 µl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol 및 10 ng의 TWIST 단편을 사용하여, 다음의 사이클링 프로토콜에 따라 제조하였다: 95℃에서 2분; 10회 사이클의 98℃에서 10초; 65℃에서 15초; 72℃에서 30초, 이어서 72℃에서 2분. Lib8 Sso7d-AAV1Sil1 플라스미드 라이브러리를 생성하기 위해, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB, E2621)를 사용하여 520 ng의 PCR 산물(403 bp) 및 4 µg의 BsaI 분해 SK0036 수용체 플라스미드를 최종 부피 400 µl로 조립하였다. 이어서, 반응 생성물을 Plasmid Safe(PS) DNase(Epicentre; E3105K)로 처리하여 조립되지 않은 단편을 분해하고 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-up System(Promega #A9280)을 사용하여 정제하였다. 이러한 반응을 통해 570 ng의 조립된 플라스미드를 수득하였다(PS DNase 분해 단계 후에 남아 있는 DNA의 양으로 정의됨). 조립된 플라스미드 라이브러리로 One Shot TOP10 electrocompetent 대장균(ThermoFisher; C4040-52)를 42 x 50 µl 바이알(약 10 ng DNA/바이알)에서 형질전환시켰다. 100 µl의 형질전환 풀을 플라스크로부터 제거하고 상이한 희석물을 LB + 카나마이신 플레이트에 플레이팅하였다. 플레이트를 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 한천 플레이트 상의 CFU 수에 따라 결정된 라이브러리의 실제 크기는 4.12E+08인 것으로 나타났다. 이어서, NucleoSpin 96 Plasmid 키트(Macherey-Nagel #740625.4)를 사용하여, 플라스미드 DNA(n = 192)를 콜로니를 사용하여 추출하고 VP2 영역의 시작 부분에서 역방향 올리고 매핑을 사용하는 Sanger 시퀀싱으로 분석하였다. 표 19 및 도 16는 해당 결과를 요약한다. 나머지 TopTen 형질전환 샘플을 500 ml의 TB + 카나마이신 배지에 직접 접종하고 Maxiprep Kit(QIAGEN #12163)를 사용하여 37℃에서 밤새 성장시킨 후 플라스미드 DNA를 추출하여 (SK0037) pCargo_173CMV_SSo7d_ lib8_ AAV1sil1-VP2_173CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리를 생성하였다.

[표 19] Lib8 Sso7d-AAV1Sil1 플라스미드 라이브러리(SK0037)에 대한 Sanger QC 및 AA 빈도

파라미터	클론 수(%)
판독가능 서열	181
프레임-내/예측된 서열	173 (95.6%)
SK0036 백본	0 (0%)
정지부/프레임시프트를 갖는 서열	8 (4.4%)
고유 서열	181 (100%)

[0557]

[0558] Sanger 시퀀싱은 높은 정도의 프레임-내 서열(95.6%), 라이브러리의 비-중복성 및 무작위 위치에서의 선택된 8개의 아미노산의 양호한 분포를 나타냈다. 실시예 5.4에서는 NGS 시퀀싱을 사용하여 심층적인 분석을 수행하였다.

[0559] **실시예 6.2: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리 생성 및 QC**

[0560] 16리터의 HEK293T/17 현탁 세포(1.6E + 10개 총 생존 세포)를, PEI Max 시약(3:1 PEI:DNA)을 사용하여, pHelper(약 30 K 플라스미드/세포), (NC057) pRep2_Cap1_AAV1 Sil1_VP2 KO(약 30 K 플라스미드/세포) 및 SK0037 플라스미드 라이브러리(420개 플라스미드/세포)로, 0.8 µg의 총 DNA/1E+06 세포로 형질감염시켰다. 키메라 현상을 방지하고 표현형-유전자형 연결을 개선하기 위해 소량의 카고 플라스미드를 사용하였다. 내부 경험 및 외부 참조를 바탕으로, 세포당 약 400개의 플라스미드가 AAV 라이브러리의 우수한 품질을 달성하기 위한 최

적의 양으로 확인되었다. 형질감염 후 2일차에(FACS로 측정 시 약 35%의 체리 양성 세포 생성), 세포를 펠렛화하고 5 l의 50 mM Tris(pH 7.5), 0.5% Triton, 0.01% Pluronic F-68, 2 mM $MgCl_2$ 및 12.5 U/ml의 뉴클레아제(ThermoFisher #88702) 중에 용해시켰다. 37℃에서 2시간 후, NaCl을 최종 농도 0.5 M이 되도록 첨가하고, 용해물을 추가로 30분간 인큐베이션한 후 3500 에서 30분간 원심분리하였다. 정화된 용해물을 0.22 μM 필터 장치를 사용하여 여과하고 AKTA Pure 기기 상에 장착된 POROS™ GoPure™ AAVX 사전 포장 컬럼, 0.8 x 10 cm, 5 ml(ThermoFisher #A36651) 상에 10 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0.2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. 첫번째 친화성 정제 후에서의 높은 수율로 인해, 유출물을 2회 재로딩하고 추가의 분획을 수집하였다. AAV 입자를 포함하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고(Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1_풀), 충진 입자 및 미충진(empty) 입자를 아이오딕사놀 초원심분리 구배로 분리하고, Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 필터 장치(Merck #UFC910008)를 사용하여 농축/완충액을 PBS(pH 7.4) + 0.001% Pluronic F-68 중에서 교환한 다음, 0.22 μm 필터 장치에 통과시켰다(최종 부피 = 1 ml).

[0561] CE-SDS 및 ddPCR 분석을 사용하여 장식 수준뿐만 아니라 전체 입자 농도 및 충진 입자 농도를 평가하였다. 요약하면, 표 20에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하여, QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 AAV 벡터의 역가를 결정하였다. 정제된 제제는 다음과 같이 전처리되었다: 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 제제의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다.

[0562] 액적은 다음과 같이 생성되었다: 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머, 125 nM SV40 pA 프로브 및 프로브용 2 x ddPCR 슈퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 최종 부피 22 μl로 혼합하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 각각의 ddPCR 검정 혼합물 20 μl를 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(BioRad #1863005)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 이에 이어서, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적 생성이 완료된 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 40 μl를 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0563] 플레이트를 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 추가로 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱하여 이를 변환시켰다.

[0564] 위에 기술된 CE-SDS(Bioanalyzer)를 사용하여 장식 수준 및 총 입자 농도를 평가하였다. 표 21는 해당 결과를 요약한다.

[표 20] ddPCR에 의한 AAV 게놈 농도(vg/ml) 측정에 사용된 올리고 세트

올리고 ID	5'-3' 서열
SV40pA133-순방향	TGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCT
SV40pA133-역방향	CCCTGAACCTGAAACATAAAATGA
SV40pA133-P	FAM-TGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAAGTTAACAACAACA-BHQ1

[0565]

[표 21] Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리의 Bioanalyzer 및 ddPCR 결과

[표 21a] 관찰된 VP MW(kDa)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (풀)	66.2	89.0	99.1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (충진)	66.5	89.7	99.7
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (비 충진)	67.2	90.8	100.8

[표 21b] VP 분포(AAV 입자 당 총 60VPs 로 가정됨)

샘플 ID	VP3	VP2	VP1
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (풀)	54.5	0.5	5.0
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (충진)	53.3	1.5	5.2
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (비 충진)	55.6	0.4	4

[0566]

[표 21c] 형질감염된 세포당 바이러스 게놈(vg) 및 바이러스 입자(vp) 수율

샘플 ID	vg/세포	vp/세포	충진(%)
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (풀)	4.29E+02	6.49E+04	0.7%
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (충진)	3.04E+02	1.41E+03	21.5%
Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (비 충진)	1.33E+01	9.19E+03	0.1%

AAV-260: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 (충진)

농도 = 4.87E+12 vg/ml

장식 수준 = *1.5 Sso7d/AAV

충진(%) = 21.5%

UC 후 바이러스 게놈 회복 = 71%

UC 후 충진 입자 풍부도 = 32.6 배

[0567] * 약 80%의 장식되지 않은 미충진 AAV의 존재로 인해 과소평가될 가능성이 있음

[0568] 충진 입자의 낮은 백분율은 형질감염된 rep/Cap VP2 KO 및 pHelper 플라스미드의 과잉으로 설명된다. 대부분의 세포는 이들 2개의 플라스미드만을 포함하나, 카고 플라스미드를 포함하지 않으며, 이에 따라 장식되지 않은 미충진 입자의 자손을 생성하게 된다. CE-SDS는 장식되지 않은/미충진 AAV의 존재에 대한 고려 없이 평균 장식 수를 추정하며, 이 또한 관찰된 장식에 대한 상대적으로 낮은 수준을 설명한다.

[0569] **실시예 6.3: NGS에 의한 Lib8 Sso7d-AAV1Sil1 미처리 라이브러리 조성물 평가.**

[0570] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0571] Illumina의 어댑터를 함유하는 2개의 상이한 프라이머 세트를 사용하는 단일 PCR 반응으로 Plasmid(SK037) 및 AAV(AAV-260) 라이브러리로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인덱스가 포함된 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 22은 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다.

[표 22] 본 실시예에 사용된 프라이머 목록(굵은 글씨체: 인덱스, 밑줄: 어닐링 영역)

샘플 ID	프라이머 서열 5'~3'
LC0034 (순방향 프라이머)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG
LC0038 (역방향 프라이머/AAV 라이브러리)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGGTCA**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC
LC0042 (역방향 프라이머/플라스미드 라이브러리)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TCAAGT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCAGACAC

[0572]

[0573] PCR 반응물은, 총 반응 부피 25 μl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol, 및 100 ng의 플리스미드 라이브러리 또는 AAV 라이브러리에 대한 5E+10 바이러스 게놈(dsDNA의 약 123 ng에 상응함)을 사용하여 제조하였다. PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 95℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 20회 사이클; 이어서 72℃에서 2분 동안의 최종 증폭, 이에 이어서 4℃에서의 유지. PCR 산물은 Sybr-Safe 사전-염색된 1.5% 아가로스 겔(120V에서 30분 실행) 상에서의 아가로스 겔 전기영동으로 분리되었다. 이어서, 예상된 크기(243 bp)의 밴드를 절단하고, Qiaquick Gel Extraction Kit(Qiagen # 28704)를 사용하여 정제하고 50 μl의 물로 용리하였다. Qubit 기기로 DNA 농도를 측정하였으며, Agilent Bioanalyzer 2100(Agilent DNA1000 키트)을 사용하여 산물의 순도 및 크기를 평가하였다, 정량 후, 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다.

[0574] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0575] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 및 길이(120~130 bp)를 기준으로 필터링하였다. 품질 트리밍 후, Sso7d의 특정 경계(DISK에서 DAPK까지)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하였다. 최종 필터링된 서열에 대해 표적화된 위치에서의 단일 서열 발생 및 아미노산 분포를 평가하였다: 플라스미드 라이브러리에 대해 약 400 K 판독 및 AAV 라이브러리에 대해 약 700 K 판독을 평가하였다. 도 17a~d는 해당 결과를 나타낸다.

[0576] 단일 서열 발생 분석을 통해 서열의 약 90%가 플라스미드 및 AAV 라이브러리 둘 모두에서 고유한 것으로 나타났으며, 이는 양호한 라이브러리 다양성 및 AAV 생산 중 편향이 최소였음을 나타낸다.

[0577] NGS 분석은 플라스미드 라이브러리의 무작위 위치에서 예측된 아미노산 분포를 나타냈다. 예측된 바와 같이, AAV 라이브러리는 플라스미드 라이브러리 대비 약간 더 강한 편향을 나타냈지만, 이는 AAV 라이브러리에 대해 미미한 것으로 간주되었다.

[0578] **실시예 7. Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1에 대한 생체 내 선별**

[0579] 상이한 기관의 농축된 AAV 카고 서열에 대한 식별의 목적으로, Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리를 인간화(hCD34) 마우스에 주입하고, 상이한 조직으로부터 추출된 DNA/RNA에 대해 생체분포/NGS 분석을 수행하였다.

[0580] **실시예 7.1: 동원된 인간화 마우스 주사 및 조직 처리.**

[0581] 생체 내 스크리닝을 위해, 인간 제대혈 유래 CD34+ 세포가 이식된 NSG 마우스를 사용하였다. 이식 후 12주차에 NSG 마우스의 말초 혈액의 유세포 분석을 사용하여 총 CD45+ 세포(마우스 및 인간)에 대해 적어도 30%의 인간 CD45+ 세포를 관찰함으로써 마우스의 인간화를 확인하였다. Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리 또는 장식되지 않은 AAV1Sil1(카고로서의 ssCAG-EGFP-HPRE_NOX: DL144) 바이러스를 투여하기 전, 마우스의 HSC를 5일 용량 요법을 사용하여 동원하였다. 요약하면, G-CSF를 125 μg/kg의 용량으로 4일 연속 하루 2회 피하주사를 통해 투여하였다. 5일차 오전에, AMD3100을 5 mg/kg의 용량으로 1회 피하주사를 통해 투여하였다. AMD3100 주사 후 1시간 이내에, 대조군(장식되지 않은 AAV1Sil1_ssCAG EGFP_NOX; 3마리 마우스) 또는 라이브러리(Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1; 12마리 마우스) 바이러스를 1.2E + 13 vg/kg의 용량으로 꼬리 정맥 주사를 통해 투여하였다.

[0582] 바이러스 주사 후 5일차에, 마우스를 희생시키고 다음의 조직을 채취하였다: 전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐 및 골수. 전혈의 경우, 동일한 군의 모든 마우스로부터의 총 혈액을 풀링하였다(대조군 n =

3, 라이브러리 n = 12). 풀링된 혈액을 실온에서 10분 동안 500 g으로 회전시켜 혈장을 제거하고, 펠렛을 분취량으로 -80℃에 보관하였다. 골수를 제외한 다른 모든 조직의 경우, 각각의 조직의 작은 부분(3 mm)을 잘라내어 군 별로 풀링하였다. 날카로운 면도기를 사용하여 풀링된 조직을 작은 조각으로 자르고, 분취량으로 -80℃에 보관하였다. 풀링된 각각의 냉동 조직(전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐)의 하나의 분취량을 Qiagen TissueLyser II에서 5 mm 스테인리스강 비드를 사용하여 PBS 중에 균질화하였다. QIAmp DNA Mini Kit(Qiagen, 51306)를 사용하여 균질화된 용해물로부터 DNA를 정제하였다. 유사하게, 각각의 조직의 하나의 분취량을 TissueLyser II를 사용하여 RLT 완충액 중에 균질화하고, RNeasy Plus Mini Kit(Qiagen, 74134)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 골수 채취를 위해, 날카로운 면도기를 사용하여 깨끗한 뼈 끝을 자르고 4℃에서 1분간 8000 g로 회전시켰다. 동일한 군의 모든 마우스로부터의 골수를 풀링하고 FACS 완충액(1 x PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) 중 100 μm 스트레이너를 통과시켰다. 풀링된 골수 세포의 분취량(100만 개 세포)을 펠렛화하여 입력물로서 -80℃에 보관하고, 나머지 세포(대조군용 2억 개, Sso7d 라이브러리용 9억 개)를, 자기 비드 접합 항-인간 CD34 항체(Miltenyi, 130-097-047)를 사용하는, 제조업체의 지침에 따라 LS 컬럼을 사용하는 인간 CD34+ 세포의 정제에 사용하였다. 정제된 CD34+ 세포(30만 개 세포)의 분취량을 펠렛화하여 입력물로서 -80℃에 보관하고 나머지 세포(대조군용 360만 개, Sso7d 라이브러리용 6,400만 개)를 다음과 같은 항체의 항체 칵테일로 염색하였다(백만개 세포당): 20 μl의 항-인간 CD34-FITC(BD Pharmagin, 555821), 2.5 μl의 항-마우스 CD45-eFluor610(Thermo, 61045182), 5 μl의 항-인간 CD45-V450(BD Pharmagin, 560367), 5 μl의 항-인간 CD90-APC(BD Pharmagin, 559869), 5 μl의 항-인간 CD38-PE(BD Pharmagin, 555460), 5 μl의 항-인간 CD45RA-BV605(BD Pharmagin, 562886). 자동 분류기(BD FACS ARIA II)를 사용하여 다음의 집단에 대해 세포를 분류하였다: 대조군에 대해 2개의 집단 1) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+ 2) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-; 라이브러리군에 대해 4개의 집단 1) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+ 2) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA- 3) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90- 4) mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+ (LT-HSC). 분류된 집단을 4℃에서 5분간 350 g으로 원심분리하고 건조 펠렛으로 -80℃에서 보관하였다. Allprep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen, 80204)를 사용하는 DNA 및 RNA 정제에 냉동 펠렛을 사용하였다. UV 분광광도계를 사용하여 용출된 DNA/RNA의 농도를 측정하였다. 결과를 표 23에 요약하였다.

[표 23] 인간화 마우스 조직으로부터 추출된 DNA 및 RNA 농도

조직 공급원	조직 설명	세포 수	RNA 용출 (μl)	RNA 농도 (ng/μl)	DNA 용출 (μl)	DNA 농도 (ng/μl)
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	2.00E+06	30	37	50	53
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	1.26E+05	30	4	50	21
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	3.40E+05	30	5	50	21
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	8.00E+03	30	0.4	50	1.7
대조군 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	1.50E+06	30	40	50	21
대조군 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	1.16E+05	30	1.7	50	30

[0583]

라이브러리	hCD34+ 전체 골수로부터 정제됨(BM_hCD34+)	3.00E+05	30	6.7	50	32
대조군	hCD34+ 전체 골수로부터 정제됨(BM_hCD34+)	3.00E+05	30	7.8	50	20
라이브러리	전체 골수	1.00E+06	30	50	50	27
대조군	전체 골수	1.00E+06	30	67	50	28
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 심장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	135	200	43
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 심장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	35	200	31
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 근육 조직	대표적인 풀링된 조직	30	16	200	20
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 근육 조직	대표적인 풀링된 조직	30	4	200	12
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 폐 조직	대표적인 풀링된 조직	30	442	200	44
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 폐 조직	대표적인 풀링된 조직	30	470	200	18
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 전혈	대표적인 풀링된 조직	30	47	200	82
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 전혈	대표적인 풀링된 조직	30	358	200	17
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 신장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	431	200	70
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 신장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	157	200	49
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 비장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	1122	200	132
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 비장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	1251	200	557
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 뇌 조직	대표적인 풀링된 조직	30	96	200	43
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 뇌 조직	대표적인 풀링된 조직	30	443	200	21
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 간 조직	대표적인 풀링된 조직	30	753	200	233
대조군	3 마리 마우스의 풀링된 간 조직	대표적인 풀링된 조직	30	1290	200	100

[0584]

[0585] **실시예 7.2: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 주사 마우스에 대한 생체분포 연구**

[0586] **추출된 DNA 샘플로부터의 ddPCR 멀티플렉스:**

[0587] QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)을 사용하여 추출된 DNA 샘플에 대한 세포당 AAV 게놈 카피 수를 정량화하고, RPP30 유전자에 대해 정규화하였다. 인간 및 마우스 유래 게놈 DNA 둘 모두 존재하기 때문에, 마우스 또는 인간 특정 RPP30 올리고 세트를 사용하여 2가지의 상이한 실험을 수행하였다. AAV 게놈 검출을 위해, 표 20에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하였다. 정규화를 위해, 상업적으로 이용 가능한 hRPP30 및 mRPP30 HEX 분석물을 사용하였다(각각 Bio-Rad #10031243 및 #10042962).

[0588] PCR은 25 ng의 게놈 DNA, 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머, 125 nM의 SV40 pA 프로브, 1 μl의 20 x 마우스 또는 인간 RPP30 HEX 분석물, 10 μl의 2 X 프로브용 ddPCR 수퍼믹스(Bio-Rad) 및 0.5 단위의 SphI-HF(NEB #R3182)를 함유하는 20 μl 부피에서 수행되었다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 실온에서의 15분 인큐베이션 후, 각각의 ddPCR 검정 혼합물을 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(Bio-Rad)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 이에 이어서, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적 생성이 완료된 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 액적을 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0589] 플레이트를 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad)에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호, 및 RPP30 유전자 서열을 표지하는 HEX 형광 신호 계산하고, QuantaSoft 분

석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다.

[0590] **데이터 변환:**

[0591] 각각의 반응에 대해 기술적 복제물(인간 및 마우스 RPP30의 경우 2개, SV40 pA의 경우 4개)의 평균 및 표준 편차를 계산하였다. 마우스와 인간 RPP30 평균 액적을 합하고 이를 2로 나누어 각각의 반응에서의 이배체 세포의 총 수를 계산하였다. 인간 세포의 평균 수(hRPP30)를 총 세포 수의 평균(hRPP30 + mRPP30)으로 나누어 상이한 조직에서의 인간 세포 표현을 계산하였다. 다양한 샘플에서 높은 변동성이 관찰되었으며, 이는 UV 분광광도계에 의한 초기 DNA 정량화가 정확하지 않음을 나타낸다.

[0592] SV40 pA의 평균 액적 수를 해당 반응물의 총 세포 수(hRPP30 + mRPP30)로 나누어 세포당 AAV 게놈의 수를 계산하였다.

[0593] 오류 전파를 고려하기 위해, 온라인 GraphPad 도구(www.graphpad.com/quickcalcs/ErrorProp1.cfm)를 사용하여 각각의 변환된 값에 대한 표준 편차를 계산하였다.

[0594] 도 18 및 19는 해당 결과를 나타낸다.

[0595] ddPCR은 Sso7d 라이브러리 선별에 사용된 마우스의 양호한 인간화 수준을 입증하였다(혈액 및 골수로부터의 데이터를 기준으로 50~60%에 달함).

[0596] 비장에서 관찰된 인간 유래 세포(>10%)는 동원 후 해당 기관으로 이동한 결과일 수 있다.

[0597] 생체분포 분석은 테스트된 모든 기관에서의 AAV 게놈의 존재를 확인하였다. AAV 게놈 수준은 비장 및 뇌에서 낮았고(<1 카피/세포), 신장, 간 및 혈액에서 보다 높았다(세포당 10~30 카피).

[0598] 시알산 KO AAV1(Sil1)에 대해 예측된 바와 같이 간은 AAV 감염의 주요 흡수원이 아닌 것으로 보인다.

[0599] **실시예 7.3: Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 주사 마우스로부터 제조된 cDNA에 대한 NGS 분석**

[0600] **추출된 RNA 샘플로부터의 cDNA 제조:**

[0601] cDNA는 템플릿으로서(표 24 참조), 50 μl의 총 반응 부피로, OneTaq® One-Step RT-PCR 키트(NEB #E5315), 실시예 6.1에 기술된 10 pmol의 LC0052/LC0053 프라이머, 및 10 μl 또는 1 μl(RNA 농도가 >100 μg/인 샘플의 경우) 의 총 RNA를 사용하여 제조되었다. RT-PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 48℃에서 30분, 94℃에서 2분; 94℃에서 15초, 55℃에서 30초, 68℃에서 30초의 40회 사이클; 이어서 68℃에서 2분의 최종 증폭, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. Flash-Gel 시스템(Flash-Gel DNA 카세트, 2.2% Lonza #57031)을 사용하는 1 μl의 RT-PCR 반응으로 산물의 크기를 평가하였다. 도 20는 해당 결과를 나타낸다. Qiaquick PCR 정제 키트(Qiagen # 28104)를 사용하여 반응물을 정제하고 50 μl의 물로 용출시켰다.

[표 24] RT-PCR 반응에 사용된 샘플 설명 및 RNA 양

[0602]

샘플 ID	설명	사용량
L1	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	370 ng
L2	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- (MPP2)	40 ng
L3	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	50 ng
L4	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	4 ng
L5	BM hCD34+	67 ng
L6	골수	500 ng
L7	심장	1 μg
L8	근육	160 ng
L9	폐	1 μg
L10	혈액	1 μg
L11	신장	1 μg
L12	비장	1 μg
L13	뇌	1 μg
L14	간	1 μg

[0603] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0604] Illumina의 어댑터를 함유하는 프라이머 세트를 사용하는 단일 PCR 반응에서 전술한 바와 같은 추출된 RNA로부터 제조된 cDNA로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인

덱스가 포함된 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 25는 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다.

[표 25] 본 실시예에 사용된 프라이머 목록(굵은 글씨체: 인덱스, 및줄: 어닐링 영역)

명칭	프라이머 서열 5'~3'
LC0034 (순방향 프라이머)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACA CGACGCTCTTCCGATCTCAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG
LC0076 (역방향 프라이머/L14)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GTAGCC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0077 (역방향 프라이머/L12)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TACAAG**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0078 (역방향 프라이머/L11)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TTGACT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0079 (역방향 프라이머/L10)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGAACT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0080 (역방향 프라이머/L9)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGACAT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0081 (역방향 프라이머/L8)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGACGG**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0082 (역방향 프라이머/L7)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GCGGAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0083 (역방향 프라이머/L6)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TTTCAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0084 (역방향 프라이머/L5)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGCCAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0085 (역방향 프라이머/L3)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGAAAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0086 (역방향 프라이머/L2)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGTACG**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0087 (역방향 프라이머/L1)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CCACTC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0088 (역방향 프라이머/L13)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**ATCAGT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC
LC0089 (역방향 프라이머/L4)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**AGGAAT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCTCTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC

[0605]

[0606] PCR 반응물을, 총 반응 부피 25 μl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol 및 10 μl 의 정제된 cDNA 샘플을 사용하여 제조하였다. PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 95℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 20회 사이클; 이어서 72℃에서 2분의 인큐베이션, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. 20회 사이클로부터 수득된 낮은 수율로 인해 L8 및 L13 샘플에 대해 추가의 10회 사이클을 추가하였다. SybrSafe 사전-염색된 1.5% 아가로스 겔 상에서의 아가로스 겔 전기영동(100 V에서 30분 실행)으로 PCR 산물을 분리하였다. 이어서, 예상된 크기(243 bp)의 밴드를 절단하고 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-Up System(Promega # 9280)를 사용하여 정제하고 30 μl의 물로 용리하였다. Qubit 기기를 사용한 정량 후(L13 샘플의 경우 1.6 ng/μl를 제외하고 7~11 ng/μl 사이의 모든 샘플), 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다. 표 26은 결과적인 판독 수치를 요약한다.

[0607] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0608] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 및 길이(110~ 130 bp)를 기준으로 필터링하였다. 품질 트리밍 후, Sso7d의 특정 경계(ISKI에서 DAPK까지)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하였다. 표 26은 최종 필터링된 판독치를 제시한다. 상이한 기관의 단일 서열 분포를 최종 필터링된 서열에 대해 평가하였다. 도 21(상위 10,000개 히트) 및 도 22는 해당 결과를 요약한다. 실시예 7에서의 히트 확인에 선택된 서열은 적색으로 표시된다.

[표 26] 초기 및 필터링된 NGS 판독치

명칭	초기 판독	필터링된 판독
L1-MPP1	875435	688058
L2-MPP2	797296	633132
L3-MPP3	790629	607226
L4-LT_HSC	897598	683457
L5- BM_hCD34+	702645	562366
L6-골수	676977	522455
L7-심장	720362	568901
L8-근육	1548187	1271261
L9-폐	1421675	1110392
L10-혈액	1167265	895851
L11-신장	1122478	868355
L12-비장	994747	633132
L13-뇌	1059484	862151
L14-간	778890	606519

[0609]

[0610] 생체 내 선별의 제1 라운드 후 뇌, 근육, LT-HSC 및 MPP1에서는 명확한 서열 농축이 관찰될 수 있었지만, 다른 조직에서는 관찰되지 않았다. 뇌, 근육, LT-HSC 및 MPP1에서 풍부한 서열은 특이적인 것으로 보이지만 다른 테스트 샘플에서는 풍부하지 않았다.

[0611] 뇌에서의 특이적 서열의 농축은 아마도 해당 기관의 AAV에 대한 낮은 투과성에 의해 촉진되었을 수 있다. HSC에서는, 분류된 세포의 양이 적고(8 K) 세포당 게놈 수가 적기 때문에(약 1 게놈/세포) 복잡도가 낮을 것으로 예상되었다. 근육에서는, 약 2개의 게놈/세포라는 중간 범위인 게놈 수에도 불구하고 cDNA를 증폭하는 데 어려움이 있음을 관찰하였으며, 이는 이러한 세포에서 AAV의 핵 내 이동이 최적이 아닐 가능성을 나타낸다.

[0612] **실시예 8. 바코드화 라이브러리 접근법을 사용하여 제1 선별 라운드에서 선택된 히트에 대한 생체 내 확인**

[0613] 실시예 7에 기술된 인간화 마우스에서의 제1 선별 라운드로부터의 농축된 Sso7d-AAV1Si11 변이체의 확인은 다중화된 차세대 시퀀싱을 사용한 바코드 RNA를 결합함으로써 동일한 동물에서 높은 처리량의 카고 바코드 서열을 함유하는 변형된 AAV 캡시드를 직접적으로 나란히 비교함으로써 수행되었다. 요약하면, 구분되는 9량체 바코드는 유비퀴터스식으로 활성화된 CAG 프로모터에 의해 구동되는 적색 형광 단백질(sfCherry2) 리포터의 3' 미번역 영역에 클로닝되며, 이에 대해 전사 후 조절 요소 HPRE(NOX)가 뒤따른다. 단일 가닥 AAV 게놈은 스터퍼 서열(HPRT 인트론)으로 충진되어 최대 AAV 용량에 가까운 4476개 염기 크기를 갖는다. 도 23은 본 실시예에 사용된 바코드화 카고 플라스미드를 도식적으로 나타낸다. LT-HSC(n=9), MPP1(n=2), 뇌(n=2) 및 근육(n=2)으로부터의 최고로 농축된 Sso7d 변이체를 AAV1Si11 VP2의 N-말단에서 별도의 플라스미드로 클로닝하고, 표 27에 나열된 선별된 고유 바코드화 카고 플라스미드와 조합된 AAV 조립체에 사용하였다. AAV 조립 및 정제 후, 상이한 AAV 제제를 등몰량으로 혼합하여 바코드화된 AAV1Si11 라이브러리를 생성하였다. 이어서, 바코드화된 라이브러리를 인간화 마우스에 주사하고 상이한 조직으로부터 추출된 DNA/RNA에 대해 생체분포/NGS 분석을 수행하였다. 이러한 바코드화 라이브러리 접근 방식을 사용하여 선별한 히트의 생체 내 확인은 아래에 자세히 설명된다.

[0614] **실시예 8.1 바코드화 플라스미드 설계 및 AAV 생산**

[0615] **바코드화 카고 플라스미드 생성:**

[0616] CAG 프로모터 및 HPRE 요소의 제어 하에 sfCherry2를 포함하는 AgC1295 플라스미드(NOX)(pCargo_CBa_sfcherry2_HPRE_SV40pA)를, sfCherry2 CDS 바로 뒤에 존재하는 AgeI 제한 부위 및 R-ITR 앞에 존재하는 BglII 제한 부위를 활용하는 바코드화 카고 생성을 위한 백본으로 사용하였다. JKU_1_순방향(5'-GAG CCG AGG CCA GAC ACT CTA CAT AAC CGG TNN NNN NNN NAA CAG GCC TAT TGA TTG GAA AGT ATG-3') 및 JKU_2_역방향(5'-GAT TAA CCT GAT AGA TCT CTC GAC TTG GGC AAC AAA AGT GAA ACT CCA TC-3') 올리고뉴클레오티드를 사용하여, HPRE(NOX), SV40pA(L) 및 HPRT1 스터퍼를 포함하는 2634bp 단편을 (AgC1294) p카고_ss_173CMVp_EGFP_HPRE_SV40pA_스터퍼로 지칭되는 내부 플라스미드로부터 증폭시켰다. 순방향 올리고뉴클레오티드는 AgeI 분해 AgC1295에 상동성인 25개의 염기 신장부, AgeI 제한 부위, 9개의 무작위화 뉴클레오티드(N, 바코드)의 신장부를 포함하며, 여기에는 템플릿에 대한 어닐링 영역 역할을 하는 26개의 염기가 이어진다. 역방향 올리고는 BglII 분해 AgC1295와 상동성인 25개의 염기 신장부, BglII 제한 부위를 포함하며, 여기에는 템플릿에 대한 어닐링 영역 역할을 하는 32개의 염기가 이어진다. PCR 반응물을 총 반응 부피 50 μl의 템플릿으로서, Q5

Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol 및 10 ng의 AgC1294 플라스미드 사용하여, 다음의 사이클링 프로토콜로 제조하였다: 98℃에서 30초; 25회 사이클의 98℃에서 10초; 66℃에서 15초; 72℃에서 1분 30초, 이에 이어서 72℃에서 2분 인큐베이션. 바코드화 sfCherry 카고 플라스미드를 생성하기 위해, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB, E2621)를 사용하여 200 ng의 PCR 산물(2634 bp) 및 100 ng의 AgeI-BglII 분해 AgC1295 수용체 플라스미드를 최종 부피 20 μl로 조립하고, 50℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. One Shot TOP10 Chemically Competent 대장균 세포(Thermo-Fisher #C404010)의 하나의 바이알을 2 μl의 조립 반응물로 형질전환시키고 이를 LB + 카나마이신 플레이트에 도말하였다. 이어서, 96개의 콜로니를 NucleoSpin 96 Plasmid 키트(Macherey-Nagel #740625.4)를 사용하는 플라스미드 DNA의 개별적 추출 및 Sanger 시퀀싱을 사용하는 분석에 사용하였다.

[0617] Geneious Prime 소프트웨어를 사용하여 모든 서열의 바코드 영역을 정렬하고, 다음의 파라미터를 사용하는 관심 바코드 영역 필터링으로 표 27에 나열된 41개 바코드를 생성하였다:

[0618] * 3 nt보다 긴 동종중합체를 포함하는 바코드는 제외됨.

[0619] * 최소 3개 위치에서 다른 모든 바코드와 구별되는 바코드는 유지함.

[0620] NucleoBond Xtra Midi plus 키트(Macherey-Nagel #740410)를 사용하여 선별된 41개의 바코드화 카고 플라스미드를 업스케일링하고 정제하였다. Sanger 시퀀싱으로 각각의 플라스미드 제제의 바코드 아이덴티티를 확인하였으며, Srf I(NEB #R0629)을 사용하는 제한 분해로 AAV ITR의 무결성을 확인하였다.

[표 27] 선별된 바코드 목록

ID	바코드	이에 할당됨
A02	ACAGGTCCGA	장식되지 않은 CTR
A04	CTTGCATGT	
A06	GCGTGCGAG	HSC-Sso7dL8-001
A07	AGATCAACT	
A08	GGCGCAGTT	HSC-Sso7dL8-002
A09	GGAGTGCGT	
B02	GCTGAGATA	HSC-Sso7dL8-003
B05	TTAAGTTGG	
B06	GCCTCTACG	HSC-Sso7dL8-004
B07	TGGAGAGGC	
B10	TCAGTGGAT	HSC-Sso7dL8-005
B12	TGAACTAAG	
C01	GGTCTTCGG	HSC-Sso7dL8-006
C03	ATTGCTTGG	
C05	CTGCGCTGG	
C08	ACATGCCTG	HSC-Sso7dL8-007
C09	AGGAGAACG	
D02	TCGCCCACA	
D04	ACCATGTGG	
D10	CGGTGGTGT	
E07	GGATTATAC	
E08	TATAGATCT	
E09	CTGCGGCTA	
E10	TACTCGAGT	
E11	GCTCGAAGG	
F04	AATATTATA	
F06	TAGAATTGA	
F10	GGATGTGAG	
F11	GATCTGCGT	
G03	TTAGGCTTA	HSC-Sso7dL8-008
G04	TTCCTGAGG	MPP1-Sso7dL8-001
G06	CAGAATAAG	HSC-Sso7dL8-009
G07	TATGAGCAG	근육-Sso7dL8-001
G08	TAATAACGA	MPP1-Sso7dL8-002
G10	ACGTTAAGT	
G11	CGTTGTATG	
G12	AGGATGAAT	근육-Sso7dL8-002
H05	TATTGCCAA	뇌-Sso7dL8-001
H07	AGTGCGCCG	뇌-Sso7dL8-002
H09	GTGACAATT	
H11	TTCGCGCGA	

[0621]

[0622] **선별된 Sso7d 서열의 AAV1Sil1 VP2 발현 플라스미드 내로의 클로닝:**

[0623] 제1 생체 내 선별 라운드에서 선별된 15개의 히트 중 (제1 메티오닌을 포함하는 Sso7d 서열에 대한) 위치 22, 24, 26, 29, 31, 33, 41, 43 및 45에서 식별된 돌연변이를 실시예 6.1에 기술된 rcSso7 스캐폴드(C 말단에 G4S 링커를 포함함) 내로 가상적으로 접목시켰다. 돌연변이된 서열은 HindIII-AgeI 분해 AAV1 Sil1 VP2 발현 플라스미드(NC058) 내로의 Gibson 기반 클로닝에 적합한 각각의 말단에 대해 25 bp 상동성을 추가하는 스트링 DNA로서 GeneArt(Thermo-Fisher)에서 주문되었다.

[0624] Sso7d-AAV1Sil1 VP2 발현 플라스미드를 생성하기 위해, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix(NEB, E2621)를 사용하여 10 ng의 등몰비로 혼합된 스트링 DNA 및 100 ng의 AgeI-HindIII 분해 NC058 수용체 플라스미드를 최종 부피 20 μl로 조립하고, 50℃에서 2시간 동안 인큐베이션하였다. One Shot TOP10 Chemically Competent 대장균 세포(Thermo-Fisher #C404010)의 하나의 바이알을 2 μl의 조립 반응물로 형질전환시키고 이를 LB + 카나마이신 플레이트에 도말하였다. 이어서, 96개의 콜로니를 NucleoSpin 96 Plasmid 키트(Macherey-Nagel #740625.4)를 사용하는 플라스미드 DNA의 개별적 추출에 사용하고, Sanger 시퀀싱으로 플라스미드 아이덴티티를

확인하였다.

[0625] NucleoBond Xtra Midi plus 키트(Macherey-Nagel #740410)를 사용하여 선별된 발현 플라스미드를 업스케일시키고 정제하였으며, Sanger 시퀀싱으로 각각의 플라스미드 제제의 아이덴티티를 확인하였다.

[0626] **바코드화 Sso7d-AAV1Sil1 라이브러리 생성:**

[0627] 등몰비의 pHelper, (NC057) pRep2_Cap1_AAV1 Sil1_VP2 KO, 각각의 Sso7d AAV1Sil1 VP2 발현 플라스미드 및 상응하는 바코드화 카고(표 27 참조)를 함유하는, 제1 선별 라운드로부터 선별된 각각의 히트에 대해 별도의 DNA 혼합물을 제조하고, FectoVIR-AAV Transfection 시약(Polyplus #101000022); DNA : FectoVIR = 1 μg : 1 μl을 사용하여 2E+06 vc/ml(1.1 μg의 총 DNA/1E+06 세포) 농도로 200 ml의 HEK293 현탁 세포 내로 형질감염시켰다. 형질감염 후 최종 농도 2 g/l로 포도당을 형질감염 혼합물에 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO2에서 인큐베이션하였다. 또한, 이에 상응하는 바코드화 카고 플라스미드(A02)와 함께, 장식되지 않은 AAV1Sil1을 사용하는 2회의 추가 형질감염을 수행하였다.

[0628] 형질감염 후 3일차에, 최종 농도가 0.1 U/μl까지의 벤조나제 및 20 ml의 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$)을 형질감염 반응물에 첨가하고 혼합물을 37℃에서 교반 하에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 24 ml의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고 샘플을 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하고, 0.22 μM 필터를 사용하여 상청액을 여과하고, EDTA를 최종 농도 5 mM로 보충하고, AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)(PBS(pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68)에 대해 밤새)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다.

[0629] 실시예 6.2에 기술된 바와 같이 CE-SDS 및 ddPCR 분석을 사용하여 장식 수준뿐만 아니라 전체 입자 농도 및 충진 입자 농도를 평가하였다. 도 24a 및 도 24b는 해당 결과를 나타낸다.

[0630] **HEK293 현탁 세포에 대한 Sso7d 장식 AAV1Sil1의 시험관 내 감염도:**

[0631] 상이한 바코드가 mRNA 발현에 영향을 미치지 않는지의 여부를 확인하기 위해 감염도 평가를 수행하였다. 감염 당일, HEK293 현탁 세포를 DMEM 배지 중에 재현탁시키고 96 웰 플레이트에 접종하였다(1.5E+04 세포/웰). AAV1Sil1 장식 제제를 DMEM 배지 중에 희석하고 상이한 농도로 시딩된 세포에 도포하였다. 형질도입 후 3시간차에, 최종 농도 5%로 FBS를 각 웰에 첨가하였다. AAV 농도는 바이러스 게놈 기준 5.0E+05 내지 4.6E+01 moi 범위였다. 형질도입 후 3일차에, 세포를 분리하고 FACS 분석을 수행하여 sfCherry2 양성 세포의 백분율을 계산하였다. 도 25는 전체 입자 수(vg) 대 감염된 세포(sfCherry2+)의 비율을 나타낸다.

[0632] **최종 풀링된 바코드 라이브러리(AAV-471) 생성:**

[0633] 각각의 단일 바코드화 Sso7d-AAV1 Sil1 제제(1.5E+11 vg가 사용된 Sso7dL8-004 및 -005 제외)의 4E+11 vg 및 장식되지 않은 대조군을 혼합하고, Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 필터 장치(Merck #UFC910008)를 사용하여 농축한 다음, 0.22 μm 필터 장치를 통과시켰다(최종 부피 = 1.1 ml).

[0634] 실시예 6.2에 기술된 바와 같이 CE-SDS 및 ddPCR 분석을 사용하여 장식 수준뿐만 아니라 전체 입자 농도 및 충진 입자 농도를 평가하였다. 표 28은 해당 결과를 나타낸다.

[표 28] 바코드 라이브러리 AAV-471 QC

[0635]

라이브러리 ID	부피 (ml)	vg/ml (ddPCR)	vp/ml (Bioanalyzer)	충진 입자(%)	VP3 AAV 당	AAV 당 VP2-융합	VP1 AAV 당
AAV-471	1.1	3.89E+12	3.69E+13	11%	43.9	13.1	3.0

[0636] **실시예 8.2: 동원된 인간화 마우스 주사 및 조직 처리.**

[0637] 바코드화 Sso7d 라이브러리의 생체 내 형질도입 평가를 위해, 인간 제대혈 유래 CD34+ 세포가 이식된 NSG 마우스를 사용하였다. 이식 후 12주차에 NSG 마우스의 말초 혈액의 유세포 분석을 사용하여 총 CD45+ 세포(마우스

및 인간)에 대해 적어도 30%의 인간 CD45+ 세포를 관찰함으로써 마우스의 인간화를 확인하였다. 바코드화 Sso7d AAV1Sil1 라이브러리 바이러스를 투여하기 전, 5일 용량 요법을 사용하여 마우스의 HSC를 동원하였다. 요약하면, G-CSF를 125 μg/kg의 용량으로 4일 연속 하루 2회 피하주사를 통해 투여하였다. 5일차 오전에, AMD3100을 5 mg/kg의 용량으로 1회 피하주사를 통해 투여하였다. AMD3100 주사 후 1시간 이내에 라이브러리 바이러스를 꼬리 정맥 주사를 통해 1.2E+13 vg/kg의 용량으로 투여하였다. 총 10마리의 인간화 NSG 마우스에 바이러스 라이브러리를 주사하였다.

[0638] 바이러스 주사 후 5일차에, 마우스를 희생시키고 다음의 조직을 채취하였다: 전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐 및 골수. 전혈의 경우, 모든 마우스로부터의 혈액을 풀링하였다(n=10). 풀링된 혈액을 실온에서 10분 동안 500 g으로 회전시켜 혈장을 제거하고, 펠렛을 분취량으로 -80℃에 보관하였다. 골수를 제외한 다른 모든 조직의 경우, 각각의 조직의 작은 부분(3 mm)을 잘라내어 풀링하였다. 날카로운 면도기를 사용하여 풀링된 조직을 작은 조각으로 자르고, 분취량으로 -80℃에 보관하였다. 풀링된 각각의 냉동 조직(전혈, 뇌, 간, 비장, 신장, 골격근, 심장, 폐)의 하나의 분취량을 Qiagen TissueLyser II에서 5 mm 스테인리스강 비드를 사용하여 RLT 완충액(Qiagen) 중에 균질화하였다. 균질화된 조직을 1000 g로 2분 동안 회전시키고, 상청액을 새로운 튜브로 옮기고 추가 처리 때까지 -80℃에서 보관하였다. 골수 채취를 위해, 날카로운 면도기를 사용하여 깨끗한 뼈 끝을 자르고 4℃에서 1분간 8000 g로 회전시켰다. 모든 마우스로부터의 골수를 풀링하고 FACS 완충액(1 x PBS, 0.5% BSA, 2 mM EDTA) 중 100 μm 스트레이너를 통과시켰다. 풀링된 골수 세포의 분취량(100만 개 세포)을 펠렛화하여 입력물로서 -80℃에 보관하고, 나머지 세포(2.73억개)를, 자기 비드 접합 항-인간 CD34 항체(Miltenyi, 130-097-047)를 사용하는, 제조업체의 지침에 따라 LS 컬럼을 사용하는 인간 CD34+ 세포의 정제에 사용하였다. 정제된 CD34+ 세포(5만 개 세포)의 분취량을 펠렛화하여 입력물로서 -80℃에 보관하고 나머지 세포(1,200만개)를 다음과 같은 항체의 항체 칵테일로 염색하였다(백만개 세포당): 10 μl의 항-인간 CD34-FITC(BD Pharmagin, 555821), 1 μl의 항-마우스 CD45-BV650(BioLegend, 563410), 1 μl의 항-인간 CD45-PE-Cy7(BD Biosciences, 557748), 2 μl의 항-인간 CD90-APC(R&D Systems, FAB2067A-025), 1 μl의 항-인간 CD38-PE(BD Biosciences, 567146), 1 μl의 항-인간 CD45RA-BV605(BD Biosciences, 562886), 1 ul의 Lin-칵테일-V450(자체 제조), 및 Viability-APC-Cy7(eBioscience, 65-0865-14). 자동 분류기(BD FACS ARIA II)를 사용하여 다음의 4개 새 집단에 대해 세포를 분류하였다: 1) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA+ (MPP1) 2) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90- (MPP2) 3) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38+hCD90- (MPP3) 4) Lin-mCD45-hCD45+hCD34+hCD45RA-hCD38-hCD90+ (LT-HSC). 분류된 집단을 4℃에서 5분 동안 350 g로 원심분리하고, 추가 처리가 이루어질 때까지 -80℃에서 RLT 완충액 중에 보관하였다. 균질화된 조직 용해물로부터 DNA 및 RNA를 정제하고 Allprep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen, 80204)를 사용하여 -80℃에서 보관하였다. UV 분광광도계를 사용하여 용출된 DNA/RNA의 농도를 측정하였다. 표 29는 해당 결과를 요약한다.

[표 29] 인간화 마우스 조직으로부터 추출된 DNA 및 RNA 농도

조직 공급원	조직 설명	세포 수	RNA 용출 (µL)	RNA 농도 (ng/µL)	DNA 용출 (µL)	DNA 농도 (ng/µL)
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA+ (MPP1)	5.50E+06	30	41	50	76
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38-hCD90- (MPP2)	7.76E+03	11	0.5	20	미측정
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38+ hCD90- (MPP3)	2.72E+04	11	1.34	20	미측정
라이브러리 분류 세포	mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD45RA- hCD38- hCD90+ (LT-HSC)	1.13E+03	11	3.89	20	미측정
라이브러리	hCD34+ 전체 골수로부터 정제됨(BM_hCD34+)	5.00E+04	30	16	50	10.2
라이브러리	풀링된 전체 골수	1.00E+06	30	375	50	250
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 심장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	24	50	32
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 근육 조직	대표적인 풀링된 조직	30	3	50	29.4
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 폐 조직	대표적인 풀링된 조직	30	276	50	58
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 견혈	대표적인 풀링된 조직	10	5	40	11
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 신장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	18.3	50	126
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 비장 조직	대표적인 풀링된 조직	30	188	50	488
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 뇌 조직	대표적인 풀링된 조직	30	70	50	57.7
라이브러리	12 마리 마우스의 풀링된 간 조직	대표적인 풀링된 조직	30	418	50	71

미측정: 측정되지 않음.

[0639]

[0640] **실시예 8.3: 바코드화 Sso7d-VP2 AAV1Si11 라이브러리 주사 마우스로부터의 총 DNA에 대한 NGS 분석**

[0641] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0642] Illumina의 어댑터를 함유하는 프라이머 세트를 사용하는 단일 PCR 반응에서 전술한 바와 같은 추출된 총 DNA로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인덱스가 포함된 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 23는 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다.

[표 23] 본 실시예에 사용된 프라이머 목록(굵은 글씨체: 인덱스, 밑줄: 어닐링 영역)

명칭	프라이머 서열 5'~3'
JKU_35_F (순방향 프라이머)	ATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACCGACG CTCTTCCGATCTGGATATCAAGCTGGACATCACC
JKU_11_R1 (역방향 프라이머/근육)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGTGAT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_12_R2 (역방향 프라이머/심장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**ACATCG**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_13_R3 (역방향 프라이머/신장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GCCTAA**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_14_R4 (역방향 프라이머/뇌)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGGTCA**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_15_R5 (역방향 프라이머/비장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CACTGT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_16_R6 (역방향 프라이머/폐)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**ATTGGC**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_17_R7 (역방향 프라이머/간)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GATCTG**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_18_R8 (역방향 프라이머/LT-HSC)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TCAAGT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_19_R9 (역방향 프라이머/CD38+ CD90-)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CTGATC**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_20_R10 (역방향 프라이머/CD38- CD90-)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**AAGCTA**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_21_R11 (역방향 프라이머/CDRA+)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GTAGCC**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_22_R12 (역방향 프라이머/골수)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TACAAG**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_23_R13 (역방향 프라이머/CD34+)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TTGACT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_24_R14 (역방향 프라이머/혈액)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGAACT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC
JKU_25_R15 (역방향 프라이머/AAV-471)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGACAT**GTGACTGGAGTTC AGACGTGTGCTCTTCCGATCTAGACCCACAATTCGTTGACATAC

[0643]

[0644] Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 10 pmol의 각각의 프라이머를 사용하여 PCR 반응물을 제조하고, 템플릿으로서 총 DNA 샘플을 총 반응 부피 25 μl로 추출하였다(사용된 양은 표 31에 제시됨; AAV-471의 경우, 템플릿으로서 5 μl의 정제된 AAV 제제를 사용함). PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 95℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 40회 사이클; 이어서 72℃에서 2분의 인큐베이션, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. 증폭된 산물의 존재를 확인하기 위해 반응물을 아가로스 겔 상에 로딩하였다. 폐 샘플을 제외한 다른 모든 샘플에서 약 267 bp의 예측된 밴드가 관찰되었으며 비특이적 증폭의 징후는 없었다. 폐 샘플의 경우, 사용된 역방향 올리고의 낮은 성능으로 인해 증폭이 부족했던 것으로 추후 밝혀졌다. Qiaquick PCR 정제 키트(# 28104)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 50 μl의 물로 용출시켰다. Qubit 기기를 사용한 정량 후, 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다.

[표 31] PCR 증폭에 사용된 샘플 및 총 DNA 목록

조직 – DNA 샘플	DNA (ng/μl)	사전-희석	PCR에 대한 μl	PCR에 대한 ng
CD34+ CD45+ CDRA+	76	없음	1	76
CD34+ CD45+ CDRA- CD38- CD90-	0.22	없음	5	1.1
CD34+ CD45+ CDRA- CD38+ CD90-	1.07	없음	5	5.4
LT-HSC	0.06	없음	5	0.3
골수	250	10x	1	25
hCD34+	10.2	없음	5	51
혈액	11	없음	5	55
근육	29.4	없음	1	29.4
심장	32	없음	1	32
신장	126	10x	2	25.2
뇌	57.7	없음	1	57.7
비장	488	10x	1	48.8
폐	58	없음	1	58
간	71	없음	1	71

[0645]

[0646] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0647] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 별로 필터링한 다음, 각각의 샘플에 대한 100,000개의 히트에 대해 바코드 특이적 경계를 매핑하는 것을 목표로 이를 처리하였다. 상이한 조직의 고유 바코드 백분율을, 먼저 입력 AAV 라이브러리 AAV-417(도 26 참조)로부터 산출한 백분율로 나눈 다음, 각각의 주어진 조직에 대해 AAV1Sil1미장식 대조군에 해당하는 바코드의 백분율로 나누어 정규화하였다. 도 27는 해당 결과를 나타낸다.

[0648] NGS 분석을 통해 바코드화 Sso7d-VP2 AAV1Sil1 라이브러리(AAV-471)의 생성에 사용된 16개 샘플의 유사한 분포를 확인하였다.

[0649] HSC-Sso7dL8-006은 장식되지 않은 대조군 대비 LT-HSC에서의 15-배 농축을 나타냈다. 동일한 클론이 상이한 2개의 조직(뇌 및 신장)에서 부분적으로 농축되어 있는 것으로 밝혀졌다. 이러한 데이터의 확인을 위해서는 추가의 실험이 필요할 것이다. 테스트된 다른 변이체에서는 특이적 농축이 관찰되지 않았다.

[0650] **실시예 9. Lib8 Sso7d-VP2 AAV1Sil1의 생체 내 선별 (제2 및 제3 라운드)**

[0651] **개요:**

[0652] 제1 선별 라운드 후, 식별된 히트의 대부분은 바코드화 라이브러리 접근 방식을 사용하여 확인할 수 없었으며, 이는 LT-HSC 세포로부터의 적은 양의 초기 RNA 입력물로 인한 RT-PCR 단계 동안의 PCR 편향 및/또는 사용된 RT-PCR 키트의 최적이 아닌 성능으로 인한 것일 수 있다. 2회의 추가적인 선별 라운드를 수행하였다.

[0653] **실시예 9.1: 제1 선별 라운드 후 골수 CD34+ 세포 총 RNA로부터의 향상된 라이브러리 생성**

[0654] LT-HSC 집단으로부터 얻은 낮은 RNA 수율을 고려하여, 제1 선별 라운드로부터 벌크 CD34+ 유래 RNA를 향상된 라이브러리 생성을 위한 템플릿으로서 사용하였다.

[0655] **골수 CD34+ 세포로부터 추출된 RNA에 대한 RT-PCR:**

[0656] LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit(NEB #E1555), 12.5 pmol의 LC0052(5' CCCGGGGAACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC 3') / LC0053(5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG 3') 프라이머 및 약 BM_hCD34+ 샘플로부터의 35 ng의 총 RNA를 사용하여, 50 μl의 총 반응 부피로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 55℃에서 10분, 98℃에서 1분; 98℃에서 10초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초의 40회 사이클; 이어서 72℃에서 5분의 최종 증폭, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. 반응은 아가로스 겔 상에서 진행되었으며, 403 bp에서의 예측된 밴드가 제거되었다. 이어서, Wizard SV Gel 및 PCR Clean-UP 시스템(Promega #A9281)을 사용하여 DNA를 추출하고, 50 μl의 물 중에서 Qubit 측정 기준 1.63 ng/μl의 최종 농도로 용출시켰다. 삽입량을 증가시키기 위해, 템플릿으로서 Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), LC052 및 LC053 프라이머 각각 10 pmol, 5 ng의 겔 추출 RT-PCR 단편을 사용하는, 총 반응 부피 50 μl의 PCR로 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 이를 증폭시켰다: 98℃에서 30초; 15회 사이클의 98℃에서 10초; 55℃에서 20초; 72℃에서 20초, 이어서 72℃에서 2분의, 및 이에 이어서 4℃에서 유지.

Qiaquick PCR 정제 키트(# 28104)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 50 μl의 물로 용출시켰다. Nanodrop 분광광도계 측정 기준 농도는 47 ng/μl로 나타났다.

[0657] **플라스미드 라이브러리 클로닝:**

[0658] 제1 라운드 농축 Sso7d-AAV1Sil1 플라스미드 라이브러리를 생성하기 위해, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix((NC109) NEB, E2621)를 사용하여 129 ng의 PCR 산물(403 bp) 및 1 μg의 BsaI 분해 SK0036 수용체 플라스미드를 최종 부피 100 μl로 어닐링하고, 50℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 반응 생성물을 Plasmid Safe(PS) DNase(Epicentre; E3105K)로 37℃에서 1시간 동안 처리하여 조립되지 않은 단편을 분해하고 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-up System(Promega #A9280)을 사용하여 정제하였다. 이러한 반응을 통해 ~ 250 ng의 조립된 플라스미드를 수득하였다(PS DNase 분해 단계 후에 남아 있는 DNA의 양으로 정의됨). 조립된 플라스미드 라이브러리로 TOP10 Electrocomp 대장균(ThermoFisher; C4040-52)를 5 x 50 μl 바이알(약 20 ng DNA/바이알)에서 형질전환시켰다. 반응물을 풀링하고 200ml의 TB + 카나마이신 배지를 함유하는 1 l 진탕 플라스크로 옮겼다. 이어서, 100 μl를 플라스크로부터 제거하고, 상이한 희석액을 LB + 카나마이신 플레이트 상에 플레이팅하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 한천 플레이트 상의 CFU 수로 측정된 라이브러리 실제 크기는 2.72E+08인 것으로 나타났다. Maxiprep Kit(QIAGEN #12163)를 사용하여 37℃에서 밤새 성장시킨 후 200 ml 배양물로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 (NC109) pCargo_173CMV_SSo7dL8-CD34_ AAV1Sil1-VP2_173CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리를 수득하였다.

[0659] **제1 선별 라운드 AAV 라이브러리 생성 및 QC:**

[0660] 2E+06 vc/ml 농도의 2.8 리터 HEK293 현탁 세포를 FectoVIR-AAV 형질감염 시약(Polyplus #101000022)을 사용하여, 1.1 μg의 총 DNA/1E+06 세포로 pHelper(약 40 K 플리스미드/세포), (NC080) pAAV_Rep2Cap1_Sil1[V473D_N500E] VP2 KO [T138A]_KanR(약 40 K 플라스미드/세포) 및 (NC109) p카고_173CMV_SSo7dL8-CD34_ AAV1Sil1-VP2_173CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리(650 플라스미드/세포)로 형질감염시켰다. DNA:FectoVIR의 비율은 1 μg : 1 μl였다. 형질감염 후 최종 농도 2 g/l로 포도당을 형질감염 혼합물에 첨가하고 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0661] 형질감염 후 2일차에, 형질감염 반응물에 벤조나아제를, 최종 농도가 0.1 U/μl가 되도록, 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) 중 총 부피의 10%에 해당하는 부피를 추가하였다. 37℃에서의 3시간 인큐베이션 후, 총 부피의 10%에 해당하는 양의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 총 부피의 10%와 동일한 부피로 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 첨가하고 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하고, 0.22 μM 필터를 사용하여 상청액을 필터링하고, 최종 농도 5 mM로 EDTA를 보충하였다. 다음으로, 정화된 용해물을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)(PBS(pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68)에 대해 밤새)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다. 충진 입자 및 미충진(empty) 입자를 아이오딕사놀 초원심분리 구배로 분리하고, Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 필터 장치(Merck #UFC910008)를 사용하여 농축/완충액을 PBS(pH 7.4) + 0.001% Pluronic F-68 중에서 교환한 다음, 0.22 μm 필터 장치에 통과시켰다(최종 부피 = 2.2 ml).

[0662] **AAV 라이브러리 역가 및 장식 수준 결정:**

[0663] 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하여, QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 AAV 벡터의 역가를 결정하였다. 정제된 제제는 다음과 같이 전처리되었다: 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 제제의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하

였다.

[0664] 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머를 포함하는 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 125 nM SV40 pA 프로브, 및 프로브용 2 x ddPCR 수퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 22 μl의 최종 부피로 조합하여 ddPCR 반응 혼합물은 제조하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 각각의 ddPCR 반응 혼합물 20 μl를 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(BioRad #1863005)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 다음으로, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적 생성 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 40 μl를 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0665] 플레이트를 천공할 수 있는 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 추가로 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱하여 이를 변환시켰다.

[0666] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율 평가를 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0667] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산:*

[0668] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0669] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0670] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0671] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0672] 표 32는 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 32] 제 1 라운드(BM_ CD34+) 농축 라이브러리 제제에 대한 QC

[0673]

샘플 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/ml	vp/ml	충진 입자(%)
(AAV-583) ssAAV1Sil1_라이브러리_ 173CMV_VP2-Sso7dL8-CD34_173CMV_sfCherry	3.1	7.95E+12	3.65E+13	21.79%

[0674] **실시예 9.2: 동원된 인간화 마우스 주사 및 조직 처리의 제2 라운드**

[0675] (AAV-583) ssAAV1Sil1_라이브러리_ 173CMV_VP2-Sso7dL8-CD34_173CMV_sfCherry를 2.4E+13 vg/kg의 용량으로 사용하여, NSG 마우스(n=15)에 대해 제2 생체 내 선별을 수행하였다. 실시예 7.1에 기술된 것과 동일한 동원화, 주사 및 주직 처리 절차를 사용하였다.

[0676] Qubit 형광계를 사용하여 용출된 RNA의 농도를 측정하였다. 표 33는 해당 결과를 요약한다.

[표 33] 인간화 마우스 조직으로부터 추출된 RNA 농도

조직	설명	Qubit 농도 [ng/μl]
벌크 CD34+	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+	23.5
CD38+ 전구체	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+	35.3
CD38- CD45RA+ CD90- 전구체	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+ hCD90-	43.4
다능성 전구체	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90-	<0.1
LT-HSC	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90+	<0.1
전체 골수	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	12.3
혈액	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	77.0
근육	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	<0.1
폐	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	0.8
간	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	<0.1
신장	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	1.14
심장	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	<0.1
뇌	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	7.84
비장	(AAV-583) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	10.7

[0677]

[0678] **실시예 9.3: 제2 선별 라운드 후 골수 LT-HSC 세포 총 RNA로부터의 향상된 라이브러리 생성**

[0679] **골수 LT-HSC 세포로부터 추출된 RNA에 대한 RT-PCR:**

[0680] LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit(NEB #E1555), 12.5 pmol의 LC0052(5' CCCGGGGAACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC 3') / LC0053(5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG 3') 프라이머 및 BM_LT-HSC 샘플로부터의 5 μl(<0.5 ng)의 총 RNA를 사용하여, 50 μl의 총 반응 부피로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 55℃에서 10분, 98℃에서 1분; 98℃에서 10초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초의 35회 사이클; 이어서 72℃에서 5분의 최종 증폭, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. 반응은 아가로스 겔 상에서 진행되었으며, 403 bp에서의 예측된 밴드가 제거되었다. 이어서, Wizard SV Gel 및 PCR Clean-UP 시스템(Promega #A9281)을 사용하여 DNA를 추출하고, 50 μl의 물 중에서 Qubit 측정 기준 0.41 ng/μl의 최종 농도로 용출시켰다. 삽입량을 증가시키기 위해, 템플릿으로서 Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), LC052 및 LC053 프라이머 각각 10 pmol, 8 ng의 겔 추출 RT-PCR 단편을 사용하는, 총 반응 부피 50 μl의 PCR로 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 이를 증폭시켰다: 98℃에서 30초; 15회 사이클의 98℃에서 10초; 55℃에서 20초; 72℃에서 20초, 이어서 72℃에서 2분, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. Qiaquick PCR 정제 키트(# 28104)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 50 μl의 물로 용출시켰다. Nanodrop 분광광도계 측정 기준 농도는 46 ng/μl로 나타났다.

[0681] **플라스미드 라이브러리 클로닝:**

[0682] 제2 라운드 농축 Sso7d-AAV1Sil1 플라스미드 라이브러리를 생성하기 위해, NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix((NC110) NEB, E2621)를 사용하여 129 ng의 PCR 산물(403 bp) 및 1 μg의 BsaI 분해 SK0036 수용체 플라스미드를 최종 부피 100 μl로 어닐링하고, 50℃에서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 반응 생성물을 Plasmid Safe(PS) DNase(Epicentre; E3105K)로 37℃에서 1시간 동안 처리하여 조립되지 않은 단편을 분해한 다음, Wizard SV Gel 및 PCR Clean-up System(Promega #A9280)을 사용하여 정제하였다. 이러한 반응을 통해 약 200 ng의 조립된 플라스미드를 수득하였다(PS DNase 분해 단계 후에 남아 있는 DNA의 양으로 정의됨). 조립된 플라스미드 라이브러리로 One Shot TOP10 Electrocomp 대장균(ThermoFisher; C4040-52)를 3 x 50 μl 바이알(약 14 ng DNA/바이알)에서 형질전환시켰다. 반응물을 풀링하고 200ml의 TB + 카나마이신 배지를 함유하는 A 1 l 진탕 플라스크로 옮겼다. 이어서, 100 μl를 플라스크로부터 제거하고, 상이한 희석액을 LB + 카나마이신 플레이트 상에 플레이팅하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 한천 플레이트 상의 CFU 수로 측정된 라이브러리 실제 크기는 4.34E+07인 것으로 나타났다. Maxiprep Kit(QIAGEN #12163)를 사용하여 37℃에서 밤새 성장시킨 후 200 ml 배양물로부터 플라스미드 DNA를 추출하여 (NC110) p카고_173CMV_SSo7dL8-LT-HSC-2_ AAV1Sil1-VP2_173CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리를 수득하였다.

[0683] **제2 선별 라운드 AAV 라이브러리 생성 및 QC:**

[0684] 2E+06 vc/ml 농도의 2.8 리터 HEK293 현탁 세포를 FectoVIR-AAV 형질감염 시약(Polyplus #101000022)을 사용하여, 1.1 μg의 총 DNA/1E+06 세포로 pHelper(약 40 K 플리스미드/세포), (NC080) pAAV_Rep2Cap1_Sil1[V473D_N500E] VP2 KO [T138A]_KanR(약 40 K 플라스미드/세포) 및 (NC110) p카고_173CMV_SSo7dL8-LT-HSC-2_ AAV1Sil1-VP2_173CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리(1300 플라스미드/세포)로 형질감염시켰다. DNA:FectoVIR의 비율은 1 μg : 1 μl였다. 형질감염 후, 형질감염 혼합물에 포도당을 최종 농도가 2 g/l가 되도록 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0685] 형질감염 후 2일차에, 형질감염 반응물에 벤조나아제를, 최종 농도가 0.1 U/μl가 되도록, 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) 중 총 부피의 10%에 해당하는 부피를 추가하였다. 37℃에서의 3시간 인큐베이션 후, 총 부피의 10%에 해당하는 양의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 총 부피의 10%와 동일한 부피로 첨가하고, 샘플을 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다.

[0686] 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하고, 0.22 μM 필터를 사용하여 상청액을 필터링하고, 최종 농도 5 mM로 EDTA를 보충하였다. 다음으로, 정화된 용해물을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)(PBS(pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68)에 대해 밤새)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다. 충진 입자 및 미충진(empty) 입자를 아이오딕사놀 초원심분리 구배로 분리하고, Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 필터 장치(Merck #UFC910008)를 사용하여 농축/완충액을 PBS(pH 7.4) + 0.001% Pluronic F-68 중에서 교환한 다음, 0.22 μm 필터 장치에 통과시켰다(최종 부피 = 2.2 ml).

[0687] **AAV 라이브러리 역가 및 장식 수준 결정:**

[0688] 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하여, QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 AAV 벡터의 역가를 결정하였다. 정제된 제제는 다음과 같이 전처리되었다: 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 제제의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다.

[0689] 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머를 포함하는 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 125 nM SV40 pA 프로브, 및 프로브용 2 x ddPCR 수퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 22 μl의 최종 부피로 조합하여 ddPCR 반응 혼합물은 제조하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 각각의 ddPCR 반응 혼합물 20 μl를 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(BioRad #1863005)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 다음으로, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적 생성 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 40 μl를 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0690] 플레이트를 천공할 수 있는 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 추가로 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱함으로써 이를 변환시켰다.

[0691] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율 평가를 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0692] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산:*

[0693] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0694] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0695] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0696] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0697] 표 34는 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 34] 제 2 라운드(BM_ LT-HSC) 농축 라이브러리 제제에 대한 QC

샘플 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/ml	vp/ml	충진 입자(%)
(AAV-682) ssAAV1Sil1_라이브러리_ 173CMV_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2_173CMV_sfCherry	3.3	2.05E+13	4.61E+13	44.55%

[0698]

[0699] **실시예 9.4: 동원된 인간화 마우스 주사 및 조직 처리의 제3 라운드**

[0700] (AAV-682) ssAAV1Sil1_라이브러리_ 173CMV_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2_173CMV_sfCherry를 2.4E+13 vg/kg의 용량으로 사용하여, NSG 마우스(n=15)에 대해 제3 생체 내 선별을 수행하였다. 실시예 7.1에 기술된 것과 동일한 동원화, 주사 및 주직 처리 절차를 사용하였다.

[0701] Qubit 형광계를 사용하여 용출된 RNA의 농도를 측정하였다. 표 35는 해당 결과를 요약한다.

[표 35] 인간화 마우스 조직으로부터 추출된 RNA 농도

조직	설명	Qubit 농도 (ng/μl)
벌크 CD34+	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단(15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+	20
CD38+ 전구체	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38+	41.3
CD38- CD45RA+ 전구체	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA+	7.1
다능성 전구체	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90-	<0.1
LT-HSC	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀) mCD45- hCD45+ hCD34+ hCD38- hCD45RA- hCD90+	<0.1
전체 골수	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	86
혈액	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	128
근육	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	419
폐	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	250
간	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	1370
신장	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	4560
심장	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	890
뇌	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	1930
비장	(AAV-682) Sso7d 라이브러리 분류 집단 (15 마리 마우스의 풀)	2960

[0702]

[0703] **실시예 9.5: 제3 라운드 후 추출된 RNA에 대한 NGS 분석**

[0704] **골수 LT-HSC 세포로부터 추출된 RNA에 대한 RT-PCR:**

[0705] LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR 키트(NEB #E1555), 12.5 pmol의 LC0052(5' CCCGGGGAACTCCTCCCGAGTCGAAATTCGCCACC 3') / LC0053(5' GTTGCTGGAGGTT CTCCGAGAGGTTGTGGGTCGGG 3') 프라이머 및 제3 라운드 후 상이한 조직으로부터 추출된 총 RNA(사용량에 대해 표 36 참조)를 사용하여, 25 μl의 총 반응 부피로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 55℃에서 10분, 98℃에서 1분; 98℃에서 10초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초의 30회 사이클; 이어서 72℃에서 5분의 최종

증폭, 및 이에 이어서 4℃에서 유지.

[표 36] RT-PCR 반응에 사용된 총 RNA 양

샘플 ID	RT-PCR 반응에 사용된 총 RNA의 ng
벌크 CD34+	20
CD38+ 전구체	41.3
CD38- CD45RA+ 전구체	7.1
다능성 전구체	<0.1
LT-HSC	<0.1
전체 골수	86
혈액	128
근육	419
폐	250
간	1370
신장	4560
심장	890
뇌	1930
비장	2960

[0706]

[0707] 도 28에 나타낸 바와 같이, Flash-Gel 시스템(Flash-Gel DNA 카세트, Fast DNA Ladder NEB#N3238S를 사용하는 1.2% Lonza #57031)을 사용하는 2 μl의 RT-PCR 반응으로 산물의 크기를 평가하였다. Qiaquick PCR 정제 키트(# 28104)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 50 μl의 H_2O로 용출시켰다.

[0708] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0709] Illumina의 어댑터를 함유하는 프라이머 세트를 사용하는 단일 PCR 반응에서 전술한 바와 같은 추출된 RNA로부터 제조된 cDNA로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인덱스가 포함된 상이한 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 37는 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다. 추가적으로, 제3 선별 라운드의 수행에 사용된 입력 AAV 제제로부터 앰플리콘 라이브러리를 또한 제조하였다: (AAV-682) ssAAV1Sil1_라이브러리_ 173CMV_VP2-Sso7dL8-LT-HSC-2_173CMV_sfCherry.

[표 37] 본 실시예에 사용된 프라이머 목록(굵은 글씨체: 인덱스, 이탤릭: 어닐링 영역)

명칭	프라이머 서열 5'~3'
LC0034 (프러이머 공통)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACG CTCTTCCGATCT*CAGGTGGACATCAGCAAGATCAAG*
LC0074 (역방향 프라이머/전체 골수)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CTGATC**GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0075 (역방향 프라이머/벌크 CD34+)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**AAGCTA**GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0076 (역방향 프라이머/CD38+ 전구체)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GTAGCC**GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0077 (역방향 프라이머/CD38-CD45RA+ 전구체)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TACAAG**GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0078 (역방향 프라이머/다능성 전구체)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TTGACT**GTGACTGGAGTTCAG ACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0079 (역방향 프라이머/**LT-HSC**)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGAACT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0080 (역방향 프라이머/근육)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGACAT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0081 (역방향 프라이머/폐)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGACGG**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0082 (역방향 프라이머/간)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GCGGAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0083 (역방향 프라이머/신장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TTTCAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0084 (역방향 프라이머/심장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GGCCAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0085 (역방향 프라이머/뇌)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGAAAC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0086 (역방향 프라이머/비장)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGTACG**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0087 (역방향 프라이머/혈액)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CCACTC**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*
LC0088 (역방향 프라이머/AAV-682 입력물)	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**ATCAGT**GTGACTGGAGTTCA GACGTGTGCTCTTCCGATCT*CTTTAGGGGCGTCCTTTTCGGACAC*

[0710]

[0711] PCR 반응물을, 총 반응 부피 25 μl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol 및 10 μl 의 정제된 cDNA 샘플을 사용하여 제조하였다. PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 95℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 10회 사이클; 이어서 72℃에서 2분의 인큐베이션, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. 20회 사이클로부터 수득된 낮은 수율로 인해 L8 및 L13 샘플에 대해 추가의 10회 사이클을 추가하였다. Qiaquick PCR 정제 키트(# 28104)를 사용하여 PCR 산물을 정제하고 50 μl의 물로 용출시켰다. 도 29에 나타낸 바와 같이, Flash-Gel 시스템(Flash-Gel DNA 카세트, Fast DNA Ladder NEB#N3238S를 사용하는 1.2% Lonza #57031)을 사용하는 2 μl의 RT-PCR 반응으로 산물의 크기를 평가하였다.

[0712] Qubit 형광계를 사용하여 정량한 후, 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다. 표 38은 결과적인 판독 수치를 요약한다.

[표 38] NGS 판독 계수

명칭	시작 판독
전체 골수	813307
벌크 CD34+	812827
CD38+ 전구체	597680
CD38- CD45RA+ 전구체	716979
다능성 전구체	725102
LT-HSC	548883
근육	799938
폐	832640
간	706881
신장	831601
심장	838244
뇌	922195
비장	866037
혈액	761597
AAV-682 입력물	700553

[0713]

[0714] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0715] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 및 길이(110~130 bp)를 기준으로 필터링하였다. 이러한 품질 조정 후, Sso7d 특정 경계(ISKI에서 DAPK로)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하고, 모든 샘플에 대해 100,000개를 회수하였다. 상이한 기관의 단일 서열 분포를 최종 필터링된 서열에 대해 평가하였으며, 해당 결과는 LT-HSC 샘플에서 식별된 상위 12개 히트에 초점을 맞춰 도 30에 요약되어 있다.

[0716] 대부분의 히트는 LT-HSC에 대해 높은 특이성을 보이는 한편, 이들 중 몇몇(예를 들어, Seq#5, Seq#7, Seq#9 및 Seq#11)는 비-표적 기관/세포에서 비특이적 농축을 나타낸다.

[0717] **실시예 10: N-말단 노출이 증가된 VP2 변이체의 식별**

[0718] **개요:**

[0719] 극저온 전자 현미경을 통해 나타낸 바와 같이, VP1 및 VP2 둘 모두는 미충진 AAV 입자 및 충진 AAV 입자의 캡시드 내부에 소구체를 형성하는 데 관여하는 것으로 제안된다. 캡시드 내부의 소구체의 존재는 캡시드 외부 상의 N-말단 도메인에 대한 낮은 접근성과 연결된다(문헌[Kronenberg et al., Journal of Virology, 2005]). 이러한 관찰을 감안하여, VP2 N-말단이 캡시드 쉘에서 자연적으로 내측을 향한다는 사실이 이에 융합된 Sso7d 스캐폴드의 노출을 감소시킬 수 있다는 가설을 세웠다.

[0720] 본 실시예서는 항-EGFR Sso7d에 대한 상이한 링커 서열과 융합된 AAV1Sil1 VP2의 처음 79개 비구조적 아미노산에 대한 부위 포화 돌연변이 유발을 사용하였다. 수용체 매개 흡수를 특이적으로 향상시키는 돌연변이를 식별하기 위해, AAV 라이브러리에 대해 HKB11 EGFR 과발현 세포의 감염을 통한 양성 선택 및 HKB11 EGFR 녹아웃 세포의 감염을 통한 음성 선택을 수행하였다.

[0721] **실시예 10.1 AAV1Sil1 VP2 N-말단 부위 포화 돌연변이유발(SSM) 라이브러리 생성**

[0722] **수용체 플라스미드 생성:**

[0723] 제1 단계에서, 8개의 상이한 링커 중 하나, 즉 가요성 - G_4S, $(G_4S)_2$, $(G_4S)_3$, $(G_4S)_4$ - 또는 강성 - $(APS)_2$, $(APS)_3$, $(APS)_4$, $(APS)_5$ - 중 하나를 함유하는 수용체 플라스미드를 생성하였다. 이러한 링커 서열은 GeneArt에서 단편 DNA로 주문되었으며, 전술한 바와 같이 AgeI-BsiWI를 사용하고 D270(AAV1 VP1 좌표)까지 VP2의 첫번째 아미노산을 제거하여 백본 SK033_p카고_173_CMV_ Sso7d_ EGFR_AAV1sil VP2_173_CMV_sfCherry 내에 클로닝되었다. 다음 섹션에 기술된 수용체 플라스미드 및 라이브러리 단편 둘 모두는 typeIIS 클로닝을 수용하기 위한 BsaI 제한 부위를 포함한다(도 31 및 표 39 참조).

[표 39] 수용체 플라스미드 ID 및 첨가된 링커

플라스미드 ID	사용된 링커
(HS0012)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x2_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	APSx2
(HS0013)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x3_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	APSx3
(HS0014)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x4_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	APSx4
(HS0015)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(APS)x5_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	APSx5
(HS0016)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	G4S
(HS0017)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x2_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	G4Sx2
(HS0018)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x3_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	G4Sx3
(HS0019)_p카고_173_CMV_Sso7d_EGFR_(G4S)x4_AAV1sil_VP2_173_CMV_sfCherry	G4Sx4

[0724]

[0725] **79AA SSM 라이브러리 클로닝(V-Exp 라이브러리):**

[0726] 79AA SSM 라이브러리 단편은 Twist Bioscience에서 주문되었다. 이는 HS0012~HS0019에 존재하는 상이한 링커에 대한 직접 융합을 위한 5'의 BsaI 사이트, A139에서 G217까지(AAV1 VP1 좌표)의 부위 포화 라이브러리, AAV1의 A218에서 N271까지를 코딩하는 염기의 신장부 및 위에 언급된 수용체 플라스미드 내로의 클로닝을 위한 제2 BsaI 부위를 포함한다. 시스테인을 제외한 모든 아미노산이 SSM에 대해 고려되었다(79개 위치, 각각 단 1개의 코돈에 의해 암호화된 19개 아미노산, 총 1501개의 변이체 복잡성을 생성함).

[0727] V-Exp 플라스미드 라이브러리를 생성하기 위해, 79AA SSM 라이브러리 단편 160 ng 및 등몰비로 풀링된 HS0012 내지 HS0019 수용체 플라스미드 80 ng를, BsaI-HF v2(NEB; E3733) 40 단위, T4 DNA 리가제(NEB; M0202T) 2000 단위, 및 1 x 조립 완충액(1 x CutSmart 완충액 + 1 mM ATP)과 함께, 50 μl의 최종 부피로 혼합하였다. 이어서, 반응 혼합물을 다음과 같이 처리하였다: 37℃에서 30분 인큐베이션; 30 사이클의 37℃에서 5분, 이어서 16℃에서 5분, 및 최종 단계인 37℃에서 1시간. 최종 단계 시작 전, BsaI-HF v2의 추가 20 단위를 혼합물에 첨가하였다. 다음으로, 반응 생성물을 Plasmid Safe(PS) DNase(Epicentre; E3105K)로 처리하여 조립되지 않은 단편을 분해하고 Wizard SV Gel 및 PCR Clean-up System(Promega #A9280)을 사용하여 정제하였다. 이러한 반응을 통해 1.5 ng의 조립된 플라스미드를 수득하였다(PS DNase 분해 단계 후에 남아 있는 DNA의 양으로 정의됨). 2 x 50μl One Shot TOP10 Electrocomp 대장균(ThermoFisher; C4040-52)을 각각 0.1 ng의 조립된 플라스미드 라이브러리로 형질전환시켰다. 반응물을 풀링하고, 1시간 동안의 SOC 인큐베이션 후, TB + 카나마이신 배지 100 ml에 첨가하였다. 이어서, 플라스크로부터 100 μl를 제거하고, 상이한 희석액을 LB + 카나마이신 플레이트 상에 플레이팅하고 37℃에서 밤새 인큐베이션하였다. 한천 플레이트 상의 CFU 수는, 이론적 라이브러리 복잡도 1.2E+04(8 링커 x 1501 SSM 라이브러리 크기)보다 약 10배 더 높은, 1.5E+05로 측정되었다. 37℃에서 Maxiprep Kit(QIAGEN #12163)를 사용하여 원래의 100 ml 배양물로부터 밤새 성장시킨 후 플라스미드 DNA를 추출하여 (HS0026) p카고 LTM V-Exp 라이브러리_173_ CMV_Sso7d_EGFR_AAV1sil₩VP2_173_CMV_sfCherry를 생성하였다.

[0728] **ssAAV1Sil1 V-Exp 라이브러리 생성 및 QC:**

[0729] 2E+06 vc/ml 농도의 1 리터 HEK293 현탁 세포를 FectoVIR-AAV 형질감염 시약(Polyplus #101000022)을 사용하여, 1.1 μg의 총 DNA/1E+06 세포로 pHelper(약 40 K 플리스미드/세포), (NC080) pAAV_Rep2Cap1_Sil1[V473D_N500E] VP2 KO [T138A]_KanR(약 40 K 플라스미드/세포) 및 (HS0026)_p카고 V-Exp lib_CMV_Sso7d_EGFR_AAV1sil₩VP2_CMV_sfCherry 플라스미드 라이브러리(1300 플라스미드/세포)로 형질감염시켰다. DNA:FectoVIR의 비율은 1 μg : 1 μl였다. 형질감염 후, 형질감염 혼합물에 포도당을 최종 농도가 2 g/l가 되도록 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다.

[0730] 형질감염 후 2일차에, 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) 중 벤조나아제를 최종 농도 0.1 U/μl 및 부피가 전체 부피의 10%가 되도록 형질감염 반응물에 첨가하였다. 37℃에서의 3시간 인큐베이션 후, 총 부피의 10%에 해당하는 양의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 총 부피의 10%와 동일한 부피로 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 첨가하고 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 3500 g로 30분 동안 원심분리하고, 0.22 μM 필터를 사용하여 상청액을 필터링하고, 최종 농도 5 mM로 EDTA를 보충하였다. 다음으로, 정화된 용해물을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시

켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)(PBS(pH 7.4 + 0.001% Pluronic F-68)에 대해 밤새)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다. 충진 입자 및 미충진(empty) 입자를 아이오딕사놀 초원심분리 구배로 분리하고, Amicon Ultra-15 MWCO 100,000 필터 장치(Merck #UFC910008)를 사용하여 농축/완충액을 PBS(pH 7.4) + 0.001% Pluronic F-68 중에서 교환한 다음, 0.22 μm 필터 장치에 통과시켰다(최종 부피 = 1 ml).

[0731] **역가 및 장식 수준 결정:**

[0732] 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하여, QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 AAV 벡터의 역가를 결정하였다. 정제된 제제는 다음과 같이 전처리되었다: 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 제제의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다.

[0733] 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머를 포함하는 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 125 nM SV40 pA 프로브, 및 프로브용 2 x ddPCR 수퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 22 μl의 최종 부피로 조합하여 ddPCR 반응 혼합물은 제조하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제를 수행하였다. 각각의 ddPCR 반응 혼합물 20 μl를 일회용 액적 생성기 카트리지(Bio-Rad)에 로딩하였다. 이어서, 70 μL의 프로브용 액적 생성 오일(BioRad #1863005)을 8개의 오일 웰 각각 내에 로딩하였다. 다음으로, QX200 액적 발생기(Bio-Rad) 내부에 카트리지를 배치하였다. 액적 생성 후, 멀티채널 피펫을 사용하여 40 μl를 96웰 PCR 플레이트로 옮겼다.

[0734] 플레이트를 천공할 수 있는 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 추가로 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱함으로써 이를 변환시켰다.

[0735] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율 평가를 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0736] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산:*

[0737] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0738] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0739] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0740] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0741] 표 40는 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 40] UC 후 ssAAV1Sil1 V-Exp 라이브러리에 대한 QC

[0742]

샘플 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/ml	vp/ml	충진 입자(%)
(AAV-540) ssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherry	3.7	6.85E+12	8.65E+12	79%

[0743] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0744] LTM 라이브러리가 삽입된 영역을 커버하는 프라이머 세트를 사용하여, 미처리 플라스미드 및 미처리 라이브러리로부터 앰플리콘 라이브러리을 생성하였다. 이를 위해, 50 ng 플라스미드 DNA 또는 5 μl AAV 샘플을 13 μl 2 x Q5 HiFi Hot Start Ready Mix(NEB #M0494), 10 pmol Sme0001f(5' CAGTGAAGCTGACATACCAGGGC 3') / Sme0002r(5' ATTGTTGTTGATGAGTCGCTGC 3') 프라이머와 함께 50 μl의 총 부피로 혼합하였다. 다음으로, 새로 생성된 앰플리콘 및 Illumina의 어댑터를 함유하는 프라이머 세트를 사용하여 제2 PCR 반응을 수행하였다. 해당

세트에서, 역방향 프라이머에는 또한 개별 샘플을 식별할 수 있는 Illumina TruSeq 인덱스를 포함한다. 본 실시예에 사용된 프라이머 목록은 표 41에서 확인할 수 있다.

[표 41] 인덱스 PCR 을 위해 본 실시예에 사용된 프라이머 목록 PCR(굵은 글씨체: 인덱스, 이탤릭: 어닐링 영역)

표적	프라이머 명칭	서열(5'-3')
HS0026	Sme0009_NGS_f Sme0015_NGS_r (R5)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTA CACGACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CACTGT**GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTC TGTCGC*
AAV-540	Sme0009_NGS_f Sme0017_NGS_r (R4)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTA CACGACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGGTCA**GTGACTGG AGTTCAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTC TGTCGC*

[0745]

[0746] **실시예 10.2 개선된 N-말단 노출에 대한 시험관 내 선별(NGS 결과 사용)**

[0747] **ssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherry 라이브러리 형질도입 및 RNA 추출:**

[0748] HKB11 EGFR 과발현 세포(EGFR+) 및 HKB11 EGFR 녹아웃 세포(KO)를 1% FBS 및 200 g/ml 제오신(EGFR+) 또는 2% FBS(EGFR KO)가 보충된 V3 배지를 사용하여 현탁액에서 배양하고 37℃, 110 pm, 6% CO_2에서 배양하였다. 형질도입 당일, 세포를 125 l 진탕 플라스크(4개 플라스크/세포주) 에서 첨가제가 없는 20 ml V3 배지에 5E+05 세포/ml로 접종하였다. ssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherry(AAV-540) 라이브러리를 두 세포주 모두에 10, 100, 1,000 및 10,000의 감염 다중도로 첨가하고 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다(형질도입 후 3시간 후 보충제를 각각의 플라스크에 첨가함). 형질도입 후 3일차에, 세포를 계수하고 1E+07 세포를 펠렛화하고, PBS로 세척한 다음 Allprep DNA/RNA Mini Kit(Qiagen, 80204)를 사용하여 DNA 및 RNA 둘 모두의 정제에 사용하였다. Qubit 형광계를 사용하여 RNA 농도를 측정하였으며, 샘플당 약 100~200 ug을 수득하였다.

[0749] **추출된 RNA 샘플에 대한 RT-PCR:**

[0750] LunaScript Multiplex One-Step RT-PCR Kit(NEB #E1555), 12.5 pmol의 Sme0001f(5' CAGTGAAGCTGACATACCAGGGC 3') / Sme0002r(5' ATTGTTGTTGATGAGTCGCTGC 3') 프라이머 및 약 100 ng의 총 RNA를 사용하여, 50 µl의 총 반응 부피로 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 55℃에서 10분, 98℃에서 1분; 98℃에서 10초, 55℃에서 20초, 72℃에서 30초의 30회 사이클; 이어서 72℃에서 5분의 최종 증폭, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. MinElute PCR 정제 키트(Qiagen # 28004)를 사용하여 반응물을 정제하고 30 µl의 물로 용출시켰다. 농도는 Nanodrop 분광광도계 측정 기준, 10 ng/ul 내지 30 ng/ul 범위였다. 도 32에 나타낸 바와 같이, Flash-Gel 시스템(Flash-Gel DNA 카세트, 1.2% Lonza #57031)을 사용하는 1 µl의 RT-PCR 반응으로 산물의 크기를 평가하였다.

[0751] **Illumina MiSeq에 대한 라이브러리 제조 및 NGS:**

[0752] Illumina의 어댑터를 함유하는 프라이머 세트를 사용하는 다양한 정제된 RT-PCR 반응으로부터 앰플리콘 라이브러리를 생성하였다. 개별 샘플을 식별할 수 있도록, Illumina TruSeq 인덱스가 포함된 역방향 프라이머와 함께 순방향 프라이머를 사용하였다. 표 42는 본 실시예에 사용된 프라이머의 목록을 나타낸다.

[표 42] 앰플리콘 라이브러리에 사용된 프라이머 목록(굵은 글씨체: 인덱스, 이탤릭: 어닐링 영역)

표적	프라이머 명칭	서열
EGFR+ MOI 10	Sme0009_NGS_f Sme0010_NGS_r(R1)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CGTGAT**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR+ MOI 100	Sme0009_NGS_f Sme0011_NGS_r(R3)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**GCCTAA**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR+ MOI 1000	Sme0009_NGS_f Sme0017_NGS_r(R4)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TGGTCA**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR+ MOI 10000	Sme0009_NGS_f Sme0015_NGS_r(R5)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CACTGT**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR KO MOI 10	Sme0009_NGS_f Sme0012_NGS_r(R8)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**TCAAGT**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR KO MOI 100	Sme0009_NGS_f Sme0013_NGS_r(R9)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**CTGATC**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR KO MOI 1000	Sme0009_NGS_f Sme0016_NGS_r(R6)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**ATTGGC**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*
EGFR KO MOI 10000	Sme0009_NGS_f Sme0014_NGS_r(R10)	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACG ACGCTCTTCCGATCT*TTGGAACAGGATGGGTGTCC*; CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT**AAGCTA**GTGACTGGAGTT CAGACGTGTGCTCTTCCGATCT*GGTGGTGATGACTCTGTCGC*

[0753]

[0754] PCR 반응물을, 총 반응 부피 25 μl의 템플릿으로서, Q5 Hot Start High-Fidelity Master Mix(NEB #M0494), 각각의 프라이머 10 pmol 및 5 ng 의 정제된 RT- PCR 샘플을 조합하여 제조하였다. PCR은 다음의 사이클링 프로토콜을 사용하여 수행되었다: 95℃에서 2분; 98℃에서 10초, 55℃에서 15초, 72℃에서 25초의 15회 사이클; 이어서 72℃에서 2분의 인큐베이션, 및 이에 이어서 4℃에서 유지. Qiaquick PCR 정제 키트(Qiagen # 28004)로 반응물을 정제하고 30 μl의 물로 용출시켰다. 도 33에 나타낸 바와 같이, Flash-Gel 시스템(Flash-Gel DNA 카세트, 1.2% Lonza #57031)을 사용하는 1 μl의 정제된 앰플리콘 PCR 반응으로 산물의 크기 및 품질을 평가하였다.

[0755] Qubit 형광계로 정량한 후(모두 15~30 ng/μl 범위 내), 라이브러리를 최종 농도 8 pM로 등몰로 풀링하고, Illumina MiSeq 시약 키트 v3(150회 사이클, #MS-102-3001)을 사용하는 MiSeq 시스템(Illumina) 상에서 시퀀싱하였다.

[0756] **사용자 정의 스크립트를 사용한 데이터 분석:**

[0757] 생성된 fastq 파일을 우선적으로 품질(Q>30, 여기서 Q는 Phred 품질 점수를 나타냄) 기준으로 필터링하고, 상응하는 순방향 및 역방향 판독을 통합하였다. 이러한 품질 트리밍 후, Sso7d의 특정 경계(MLEK에서 ADGV까지)의 맵핑을 목적으로 하여 서열을 처리하였다. 표 43은 최종 필터링된 판독치를 제시한다.

[표 43] 초기 및 필터링된 NGS 판독치

명칭	필터링된 판독치
EGFR+ MOI 10	162628
EGFR+ MOI 100	166839
EGFR+ MOI 1000	126648
EGFR+ MOI 10000	192245
EGFR KO MOI 10	162596
EGFR KO MOI 100	164315
EGFR KO MOI 1000	149681
EGFR KO MOI 10000	153137

[0758]

[0759] **발생률 분석을 사용한 MOI 선별:**

[0760] EGFR+ 및 EGFR KO 세포에서의 ssAAV1Sil1_V-Exp lib-sfCherry 라이브러리 형질도입 동안 인가된 선택적 압력의

그래픽 표현을 생성하기 위해 각각의 샘플의 발생 분포를 도표화하였다. 도 34에 도시된 바와 같이, 두 세포주 모두에 대해 moi 10에서 관찰된 보다 광범위한 분포는 올바른 선택적 압력이 인가되었다는 잠재적인 표시일 수 있으며, 이에 따라 이는 그 다음의 분석 단계를 위해 선택되었다.

[0761] **세포 형질도입에 영향을 미치는 VP2 N-말단 변이체의 식별 및 우선순위 지정:**

[0762] moi 10(n=87)에서 EGFR + 세포의 V-exp 라이브러리 형질도입에서 적어도 0.1% 빈도를 나타내는 서열 상의 각각의 표적 위치에서 변이 분석을 수행하였다. 각각의 주어진 위치에서, 양성(EGFR+) 및 음성(EGFR KO) 선택 둘 모두에 대해 부모 아미노산의 백분율 및 각각의 단일 변이체의 백분율을 계산하였다(도 35 및 도 36 참조). EGFR+와 EGFR KO 사이에서 관찰된 높은 차이(어두운 상자) 또는 높은 절대 농축도(밝은 상자, 도 37도 참조)를 기준으로 9개의 위치에 대해 우선순위가 지정되었다.

[0763] 우선순위가 지정된 VP2 위치의 상이한 링커에 대해 명확한 농축이 관찰되지 않았지만, 소형 링커(G4Sx1, APSx2 및 APSx3)의 경우 대체적인 선호도가 관찰되었다.

[0764] **실시예 10.3: 식별된 단일 VP2 N-말단 변이체의 시험관 내 검증**

[0765] **개요:**

[0766] N-말단 VP2 노출을 증가시키는 것을 목표로 하는 LTM 라이브러리의 시험관 내 선별을 통해 9개의 단일 점 돌연변이가 식별되었다(섹션 10.2에 기술된 바와 같음). 각각의 점 돌연변이는, 항-EGFR Sso7d E18.4.5 서열을 보존하지만 (G4S)x3 링커를 (APS)x2, (APS)x3 또는 (G4S)x2를 대체하면서 백본 NC070_pRS5a_AAV1 Sil1 VP2_(G4S)x3_항-EGFR Sso7d 내에 클로닝되었다(표 44 참조). VP2 플라스미드의 클로닝 및 업스케일링은 GeneArt에서 외주로 수행되었다. AAV 샘플을 생산하고 EGFR OE 및 KO 세포에서의 감염 가능성을 평가하였다. 해당 양태에 대한 돌연변이의 효과를 연구하기 위해 Sso7d 표적(EGFR)에 대한 결합을 또한 평가하였다.

[표 44] 식별된 점 돌연변이를 갖는 VP2 발현 플라스미드 목록

플라스미드 ID	점 돌연변이
(HS0035)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_N172V_VP2	N172V
(HS0036)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_E147S_VP2	E147S
(HS0037)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P166R_VP2	P166R
(HS0038)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_P185G_VP2	P185G
(HS0039)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_G199R_VP2	G199R
(HS0040)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_M211V_VP2	M211V
(HS0041)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_D213A_VP2	D213A
(HS0042)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(G4S)x2_AAV1Sil1_P191N_VP2	P191N
(HS0043)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x3_AAV1Sil1_T162R_VP2	T162R

[0767]

[0768] **장식 AAV1-Sil1 생산:**

[0769] pHelper, (AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE 단일 가닥 카고, (NC080) pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 KO 및 위의 목록으로부터의 AAV1 VP2 발현 플라스미드의 등몰비로 플라스미드 DNA를 혼합하였다. FectoVIR-AAV Transfection 시약(Polyplus #101000022)을 사용하여 Expi293F 세포 200 ml를 세포 밀도 2E+06 세포/ml로 형질감염시켰다(총 DNA 1.1 µg/1E+06 세포). DNA:FectoVIR의 비율은 1 µg : 1 µl였다. 미변형 VP2가 포함된 Sso7d 장식 대조군 또한 형질감염 단계에 포함되었다. 형질감염 후, 세포 현탄액에 포도당을 최종 농도가 2 g/l가 되도록 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다. 형질감염 후 3일차에, 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) 중 벤조나아제를 최종 농도 0.1 U/µl 및 부피가 전체 부피의 10%가 되도록 형질감염 세포 현탄액에 첨가하였다. 37℃에서의 3시간 인큐베이션 후, 총 부피의 10%에 해당하는 양의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 총 부피의 10%와 동일한 부피로 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 첨가하고 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하였다. 0.22 µM 필터를 통해 상청액을 필터링하고, 최종 농도 5 mM로 EDTA를 보충하였다. 다음으로, 정화된 용해물을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 µl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가

됨)을 풀링하고, 제형 완충액(20 mM Tris 염기, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 0.005% Pluronic F-68, pH 8.1)에 대해 Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다.

[0770] **역가 및 장식 수준 결정:**

[0771] AAV 벡터 역가는 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하는 QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 결정되었다. 정제된 AAV의 전처리는 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하는 것으로 구성되었다. 다음으로, 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 반응 혼합물에 첨가하고 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 샘플의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다. 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머를 포함하는 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 125 nM SV40 pA 프로브, 및 프로브용 2 x ddPCR 수퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 22 μl의 최종 부피로 조합하여 ddPCR 반응 혼합물은 제조하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제물을 포함시켰다. ddPCR 반응 혼합물을 세미-스커트형 96웰 플레이트(Bio-Rad #12001925)에 로딩하고 자동화 액적 생성기(Bio-Rad #1864101)에 배치하였다. Bio-Rad의 독점적인 DG32 Automated Droplet Generator Cartridge(#1864108) 및 Automated Droplet Generation Oil for Probes(Bio-Rad #1864110)을 사용하여 액적을 자동으로 생성하였다. 액적 생성 후, 장치는 생성된 액적을 새로운 세미-스커트형 96웰 플레이트에 자동으로 증착시킨다.

[0772] 플레이트를 천공할 수 있는 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 이어서 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱했다.

[0773] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율 평가를 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0774] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산:*

[0775] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0776] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0777] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0778] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0779] 표 45는 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 45] 장식 ssAAV1Sil1 에 대한 QC

[0780]

샘플 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/세포	vp/세포
(AAV-637) ssAAV1Sil1_ 항-EGFR Sso7d E18.4.5_(G4S)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	7.1	2.92E+04	5.41E+04
(AAV-674) ssAAV1-Sil1_N172V_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	8.3	1.31E+04	9.84E+04
(AAV-639) ssAAV1-Sil1_E147S_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	9.3	3.73E+04	6.34E+04
(AAV-640) ssAAV1-Sil1_P166R_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	9.0	3.14E+04	9.80E+04

(AAV-641) ssAAV1-Sil1_P185G_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	7.1	3.33E+04	9.40E+04
(AAV-647) ssAAV1-Sil1_G199R_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMV_eGFP_HRPE	13.8	2.36E+04	1.36E+05
(AAV-648) ssAAV1-Sil1_M211V_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	11.0	1.58E+04	6.05E+04
(AAV-649) ssAAV1-Sil1_D213A_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	13.8	1.99E+04	7.43E+04
(AAV-650) ssAAV1-Sil1_P191N_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(G4S)x2-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	12.7	1.90E+04	7.99E+04
(AAV-651) ssAAV1-Sil1_T162R_항-EGFR Sso7d E18.4.5_(APS)x3-VP2_173CMVp_eGFP_HRPE	12.2	1.83E+04	9.96E+04

[0781]

[0782] **수용체 과발현 세포주 및 녹아웃 세포주에 대한 장식 AAV1Sil1의 시험관 내 감염도:**

[0783] 단일 돌연변이가 장식 캡시드의 세포 감염 능력을 개선시켰는지의 여부를 평가하기 위해, EGFR 과발현(OE) 및 녹아웃(KO) 세포에 대한 감염도 분석을 수행하였다. V3 배지 중 6.06E+05/mL 농도의 세포를 평평한 바닥 96웰 플레이트(33 μL 세포 현탁액/웰)에 시딩하였다. 장식 AAV를 V3 배지에 희석하고 세포를 1E+06 내지 4.6E+01 범위의 MOI로 감염시켰다. 웰 중 최종 부피 100 μl로, 플레이트를 37℃에서 3시간 동안 배양한 다음, 10% FBS가 포함된 V3 배지 100 μl를 첨가하였다. 형질감염 후 3일차에 세포를 분리하고 FACS로 eGFP 형광을 측정하였다. 과발현 세포 및 녹아웃 세포 둘 모두에서의 각각의 AAV 샘플에 대한 eGFP 양성 세포의 백분율을 기준으로 EC50 값을 계산하였다. 다음으로, EGFR KO 조건으로부터의 EC50 값을 상응하는 EGFR OE 조건으로부터의 EC50 값으로 나누었다. 도 38은 전술한 계산 방법으로터의 배수 변화를 도시한다.

[0784] **ELISA에 의한, 표적 결합에 대한 VP2 점 돌연변이의 효과 평가:**

[0785] 흑색 Maxisorp 384-웰 플레이트(Merck #P6366-1CS)를 5 μg/mL의 hEGFR 세포외 도메인 재조합 단백질 또는 BSA로 코팅하였다. 4℃에서 밤새 인큐베이션한 후, 플레이트를 TBST 완충액(TBS + 0.05% Tween20)으로 세척하고 3% BSA/TBST 완충액으로 차단하였다. 다음 단계에서, 관련되지 않은 생산 라운드에서 생산된, 장식 AAV 및 장식되지 않은 AAV1Sil1 대조군의 연속 희석액을 코팅된 플레이트에 추가하였다. 실온에서의 2시간 인큐베이션 단계 후, 플레이트를 TBST로 3회 세척한 다음, 항-AAVx 비오티닐화 항체(ThermoFisher Scientific #7103522100)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 TBST(4x)로 세척하고, 스트렙타비딘-AP 접합체(Roche #11089161001)와 함께 실온에서 30분 동안 인큐베이션하였다. 플레이트를 다시 4회 세척하고 AttoPhos 기질(Roche #00000011681982001)을 각각의 웰에 첨가하였다. BSA 플레이트 신호는 EGFR 플레이트 신호에서 차감되었다. 도 39는 5E+11 vp AAV 농도를 중심으로 해당 결과를 나타낸다.

[0786] 대부분의 우선순위 단일 VP2 돌연변이체에서 EGFR 과발현 세포 및 단백질 결합에 대한 형질도입의 강화를 관찰할 수 있다. 이론에 구속되지 않고, 이러한 개선은 보다 양호한 Sso7d 노출 및/또는 잠재적으로 이들 샘플에 대해 관찰된 다소 더 높은 양의 Sso7d 융합과 연관되어 있다는 가설이 세워졌다.

[0787] **실시예 10.4 조합된 VP2 N-말단 변이체의 시험관 내 확인**

[0788] **개요:**

[0789] 이전 섹션에서, VP2 M-말단 돌연변이 P191N, T162R 및 D213A가 최상위 후보로 확인되었다. 해당 VP2 점 돌연변이가 캡시드의 형질도입 효능에 부가적인 영향을 미치는지의 여부를 조사하기 위해, 세 가지 돌연변이를 모두 포함하는 새로운 VP2 플라스미드를 설계하였다. 표 46에 기술된 돌연변이를 암호화하는 스트링 DNA는, 항-EGFR Sso7d E18.4.5 서열을 보존하지만 (G4S)x3 링커를 (APS)x2, (APS)x3 또는 (G4S)x2를 대체하면서 백본 NC070_pRS5a_AAV1 Sil1 VP2_(G4S)x3_항-EGFR Sso7d 내에 클로닝되었다(표 46 참조). 추가적으로, 가요성 (G4S)x2 및 (G4S)x3 링커를 보다 강성인 (APS)x2 링커와 비교하여, 감염도 및 표적 결합에 대한 링커의 효과를 조사하였다. AAV 샘플을 생산하고 EGFR OE 및 KO 세포에서의 감염 가능성을 평가하였다. 해당 양태에 대한 돌연변이의 효과를 연구하기 위해 Sso7d 표적(EGFR)에 대한 결합을 또한 평가하였다.

[표 46] 각각 점 돌연변이 및 링커를 갖는 VP2 발현 플라스미드 목록

플라스미드 ID	VP2 돌연변이	링커
(NC079) pAAV_rep2cap1_AAV1-Sil1[V473D,N500E]_KanR	없음	Sso7d 없음
(NC070) pRS5a_AAV1 Sil1 VP2_(G4S)x3_항-EGFR Sso7d	없음	(G4S)x3
(SK0050)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1_Sil1_VP2	없음	(APS)x2
(SK0058)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1Sil1_VP2_P191N	P191N	(APS)x2
(SK0051)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(APS)x2_AAV1_Sil1_Ra_VP2	P191N, T162R, D213A	(APS)x2
(HS0042)_pRS5a_항-EGFR_Sso7d_E18.4.5_(G4S)x2_AAV1Sil1_P191N_VP2	P191N	(G4S)x2

[0790]

[0791] **장식 AAV1-Sil1 생산:**

[0792] pHelper, (AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE 단일 가닥 카고, (NC080) pAAV Rep2Cap1 Sil1 VP2 KO 및 위의 목록으로부터의 AAV1 VP2 발현 플라스미드의 등몰비로 플라스미드 DNA를 혼합하였다. 장식되지 않은 AAV 대조군에 대해 다음의 플라스미드를 사용하였다: pHelper, (AgC1294) 173CMV-EGFP-HPRE 단일 가닥 카고 및 (NC079) pAAV_rep2cap1_AAV1-Sil1[V473D,N500E]_KanR. Expi293F 세포를 새로운 배지 중에서 세포 밀도 2E+06 세포/ml로 현탁시키고, FectoVIR-AAV Transfection 시약(Polyplus #101000022)을 사용하여 형질감염시켰다(총 DNA 1.1μg/1E+06 세포). DNA:FectoVIR의 비율은 1 μg : 1 μl였다. 형질감염 직후, 세포 현탄액에 포도당을 최종 농도가 2 g/l가 되도록 첨가하고, 혼합물을 37℃, 110 rpm, 6% CO_2에서 인큐베이션하였다. 형질감염 후 3일차에, 용해 완충액(500 mM HEPES, 10% Tween 20, 20 mM $MgCl_2$) 중 벤조나아제를

[0793] 최종 농도 0.1 U/μl 및 부피가 전체 부피의 10%가 되도록 형질감염 세포 현탄액에 첨가하였다. 37℃에서의 3시간 인큐베이션 후, 총 부피의 10%에 해당하는 양의 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 용해물에 첨가하고, 혼합물을 37℃에서 교반하면서 3시간 동안 인큐베이션하였다. 이러한 인큐베이션 단계 후, 총 부피의 10%와 동일한 부피로 수크로스 염 용액(5 M NaCl, 7% 수크로스)을 첨가하고 추가로 20분 동안 인큐베이션하였다. 샘플을 3500 g로 15분 동안 원심분리하였다. 0.22 μM 필터를 통해 상청액을 필터링하고, 최종 농도 5 mM로 EDTA를 보충하였다. 다음으로, 정화된 용해물을 AKTA Pure 기기 상에 장착된 AAVX 사전 포장 컬럼, 0.5 x 5 cm, 1 ml(ThermoFisher #A36652) 상에 1 ml/분의 속도로 로딩하였다. 결합된 AAV 입자를 10 CV의 세척 완충액(pH 7.3)(50 mM Tris-Cl, 0.5 M NaCl, 0.01% Pluronic F-68)으로 세척하고 5CV의 글리신 용출 완충액(pH 2.7)(0.1 M 글리신, 0. 2 M NaCl, 0.25 M L-아르기닌)으로 용리하였다. 용리 분획(0.25 ml)을 25 μl의 1 M Tris-Cl(pH 10)로 즉시 중화시켰다. AAV를 함유하는 분획(UV280 신호로 평가됨)을 풀링하고, 제형 완충액(20 mM Tris 염기, 1 mM $MgCl_2$, 200 mM NaCl, 0.005% Pluronic F-68, pH 8.1)에 대해 Float-A-Lyzer 투석 장치 100 KD(Spectrum™ #G235071)를 사용하여 투석한 다음, 0.22 μm 필터 유닛에 통과시켰다.

[0794] **역가 및 장식 수준 결정:**

[0795] AAV 벡터 역가는 표 3에 기술된 SV40 pA 특이적 올리고 세트를 사용하는 QX200 액적 디지털 PCR(ddPCR) 시스템(Bio-Rad)으로 결정되었다. 정제된 AAV의 전처리는 5 μl의 AAV를 1 단위의 DNase 및 1x DNase 완충액(Merck #04716728001)과 함께 20 μl 총 부피로 37℃에서 30분 동안 인큐베이션하는 것으로 구성되었다. 다음으로, 20 mg/ml의 프로테이나제 K(Life Technologies #EO0491) 1 μl를 반응 혼합물에 첨가하고 혼합물을 55℃에서 1시간 동안 배양한 다음, 95℃에서 15분 동안 불활성화 단계를 거쳤다. 처리된 샘플의 상이한 1/10 연속 희석액을 1 x PCR 완충액 II(Life Technologies # N8080010), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.05% Pluronic F-68(Sigma Aldrich #K4894), 2 ng/μl Sheared Salmon Sperm DNA(Invitrogen #15632011) 중에서 제조하고, 이를 PCR 증폭을 위한 템플릿으로 사용하였다. 각각 900 nM의 순방향 및 역방향 SV40 pA 프라이머를 포함하는 전처리된 AAV 희석액 5.5 μl, 125 nM SV40 pA 프로브, 및 프로브용 2 x ddPCR 수퍼믹스(BioRad #1863024) 11 μl를 22 μl의 최종 부피로 조합하여 ddPCR 반응 혼합물은 제조하였다. 각각의 샘플에 대해 기술적 복제물을 포함시켰다. ddPCR 반응 혼합물을 세미-스커트형 96웰 플레이트(Bio-Rad #12001925)에 로딩하고 자동화 액적 생성기(Bio-Rad #1864101)에 배치하였다. Bio-Rad의 독점적인 DG32 Automated Droplet Generator Cartridge(#1864108) 및 Automated Droplet Generation Oil for Probes(Bio-Rad #1864110)을 사용하여 액적을 자동으로 생성하였다. 액적 생성 후, 장치는 생성된 액적을 새로운 세미-스커트형 96웰 플레이트에 자동으로 증착시킨다.

[0796] 플레이트를 천공할 수 있는 호일로 열 밀봉하고, C1000 Touch Thermal Cycler(Bio-Rad) 내에 배치하였다. 열 사이클링 조건은 다음과 같았다: 95℃에서 10분, 이어서 95℃에서 30초 및 60℃에서 1분의 40회 사이클, 이에 이어서 98℃에서의 10분 인큐베이션 및 4℃에서의 무기한 유지. QX200 디지털 액적 판독기를 사용하여 각각의 액적 중의 AAV 게놈 DNA 서열을 표지하는 FAM 형광 신호를 계산하고, QuantaSoft 분석 소프트웨어(Bio-Rad)를 사용하여 분석하였다. AAV 역가 계산을 위해, 액적 수에 각각의 총 희석 인자를 곱하고, 이어서 단일 가닥 게놈의 가능한 재어닐링을 감안하는 2배 인자를 곱했다.

[0797] 정제된 샘플 중 VP 분포 및 총 VP 수율 평가를 위해, CE-SDS 분석(변성 조건을 사용하는 Agilent 2100 Bioanalyzer 시스템, Protein 230 키트)을 수행하였다.

[0798] *총 AAV 입자/ml(vp/ml) 및 VP 비율 계산:*

[0799] * *ng/μl(=μg/ml) 값을 관찰된 MW로 나눈 다음, 1E+06을 곱하여(μg로부터 g으로의 변환) 몰/ml 값을 계산함.*

[0800] * *몰/ml 값에 6.022E+23(아보가드로 수)을 곱하여 분자/ml의 수치를 계산함*

[0801] * ***VP 분포**: 하나의 AAV는 총 60 vp로 이루어진다는 가정 하에 분자/ml 값에 기초하여 계산함*

[0802] * ***AAV 입자/ml (vp/ml)**: VP1+VP2+VP3 분자의 합/ml를 60으로 나눔*

[0803] 표 47은 ddPCR 및 CE-SDS 결과를 제시한다.

[표 47] 장식 ssAAV1Sil1 에 대한 QC

샘플 ID	짧은 ID	AAV 당 VP2 융합체	vg/세포	vp/세포
(PPB-26864) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP	장식되지 않음	0	2.71E+04	4.93E+04
(PPB-26865) ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-항-EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_(G4S)3	w.t. VP2(G4Sx3)	6.9	1.80E+04	4.48E+04
(PPB-26866)_ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-항-EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_(APS)2	w.t. VP2(APSx2)	8.2	1.77E+04	4.82E+04
(PPB-26867)_ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-항-EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_P191N_(APS)2	P191N VP2 (APSx2)	9.5	1.46E+04	4.23E+04
(PPB-26868)_ ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-항-EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_P191N_(G4S)2_	P191N VP2 (G4Sx2)	9.7	1.59E+04	4.05E+04
(PPB-26869)_ssAAV1_Sil1-173CMV-eGFP-NOX-항-EGFR-Sso7d_E18.4.5_VP2_RA_(APS)2	Ra VP2 (APSx2)	10.8	2.04E+04	5.21E+04

[0804]

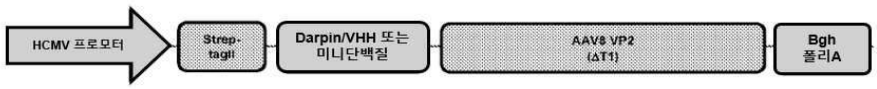
[0805] **수용체 과발현 세포주 및 녹아웃 세포주에 대한 장식 AAV1Sil1의 시험관 내 감염도:**

[0806] 단일 돌연변이가 장식 캡시드의 세포 감염 능력을 개선시켰는지의 여부를 평가하기 위해, EGFR 과발현(OE) 및 녹아웃(KO) 세포에 대한 감염도 분석을 수행하였다. V3 배지 중 6.06E+05/mL 농도의 세포를 평평한 바닥 96웰 플레이트(33μL 세포 현탁액/웰)에 시딩하였다. 장식 AAV를 V3 배지에 희석하고 세포를 1E+06 내지 4.6E+01 범위의 MOI로 감염시켰다. 웰 중 100 μl 최종 부피로, 플레이트를 37℃℃ 3시간 동안 배양한 다음, 10% FBS가 포함된 V3 배지 100 μL를 첨가하였다. 형질감염 후 3일차에 세포를 분리하고 FACS로 eGFP 형광을 측정하였다. 본 실험에서 관찰된 높은 형질도입 수준을 고려하여, 도 40 및 도 41에 나타낸 바와 같은 MFI 수준에서 분석을 수행하였다.

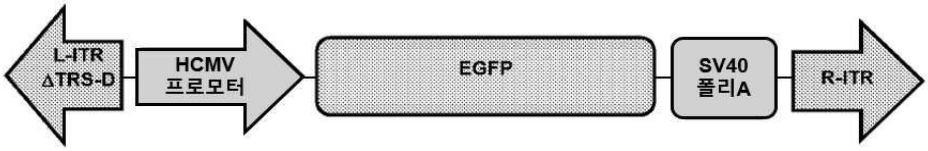
[0807] VP2 서열(P191N, T162R, D213A = Ra)의 조합된 돌연변이는 w.t. VP2 및 단일 P191N 돌연변이체 둘 모두에 비해, 항-EGFR Sso7d 표적화 AAV1Sil1의 형질도입 효율을 향상시킨다. 형질도입에 사용된 상이한 링커에 대한 명확한 효과는 관찰되지 않았다.

도면

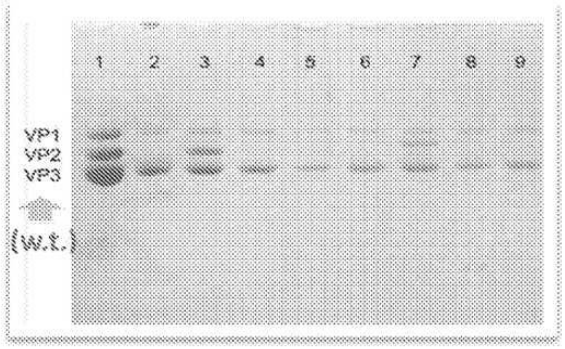
도면1



도면2

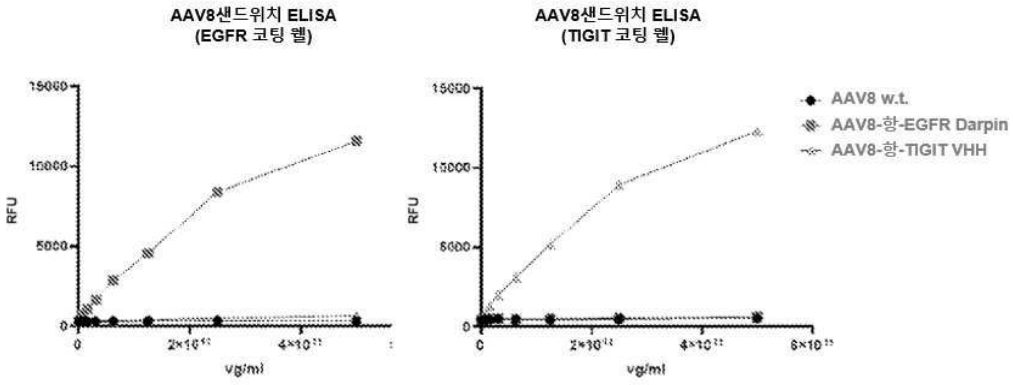


도면3

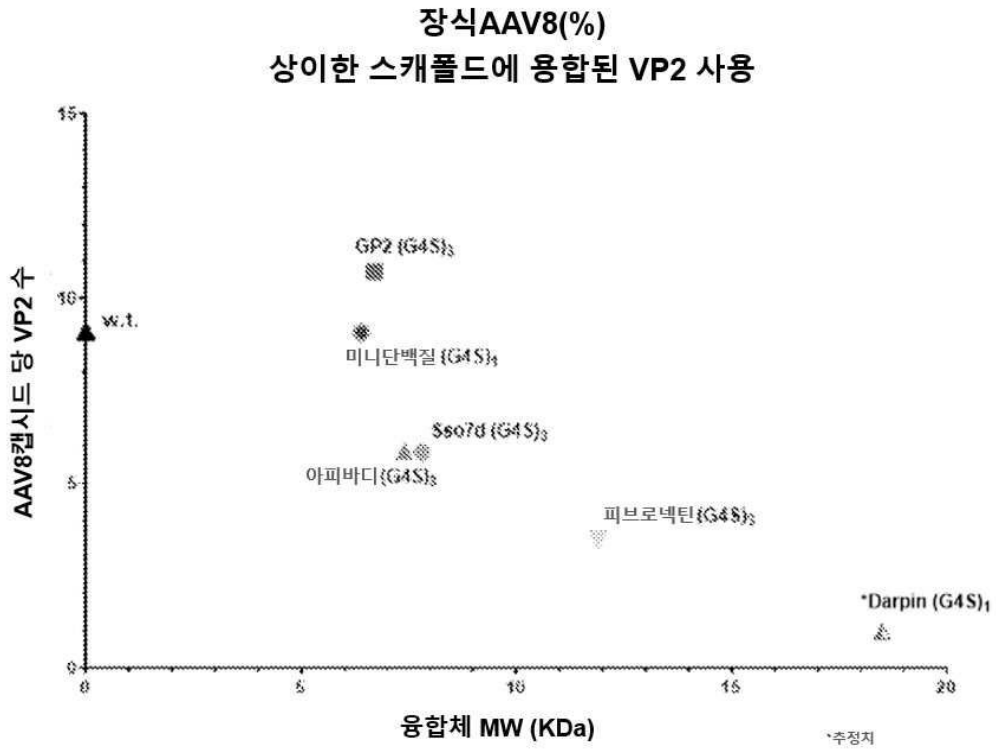


레인	샘플 ID
1	AAV8 w.t.
2	AAV8 VP2 KO
3	AAV8 트랜스-VP2
4	AAV8- 항-EGFR Darpin
5	AAV8- 항-MBP Darpin
6	AAV8- 항-Her2 Darpin
7	AAV8- 항-HA 미니단백질
8	AAV8- 항-TIGIT VHH
9	AAV8- 항-GPR126 VHH

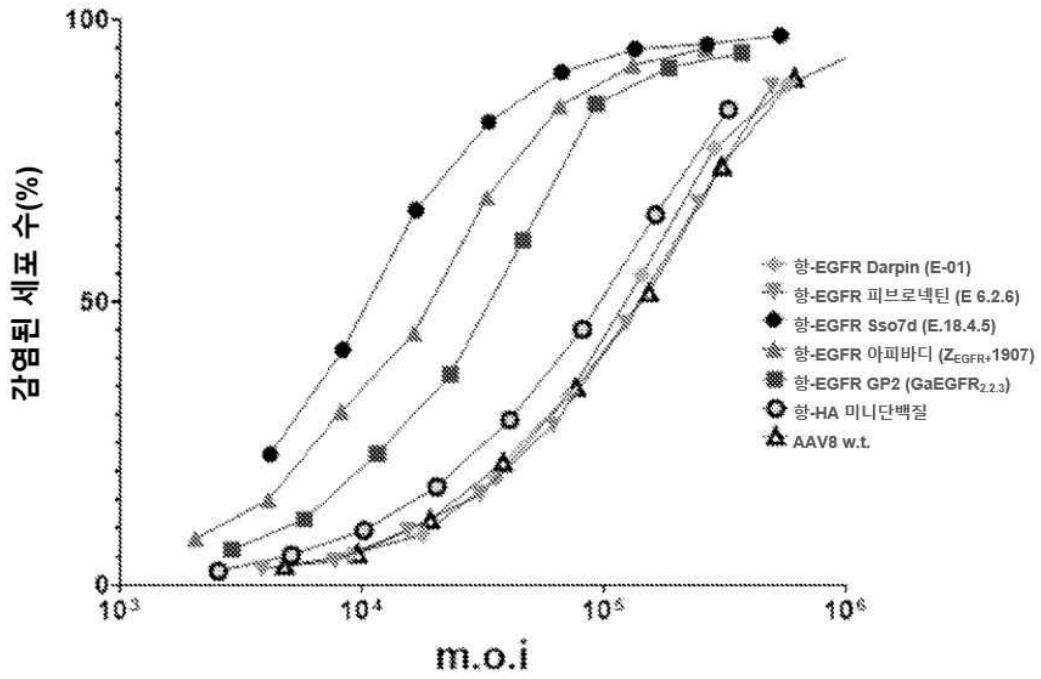
도면4



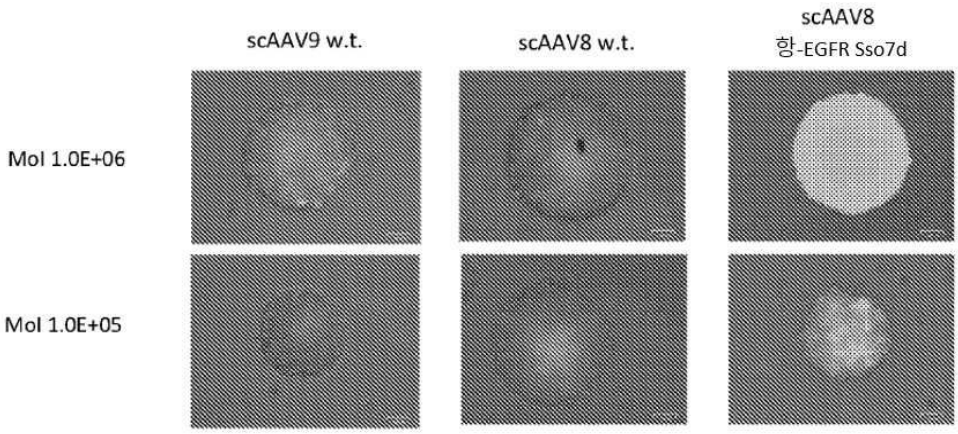
도면5


장식AAV8(%)
상이한 스캐폴드에 융합된 VP2 사용
AAV8캡시드 당 VP2 수
융합체 MW (KDa)
*추정치
w.t.
GP2 (G4S)3
미니단백질 (G4S)3
Sso7d (G4S)3
아피바디(G4S)3
피브로넥틴(G4S)3
*Darpin (G4S)1
0
5
10
15
20

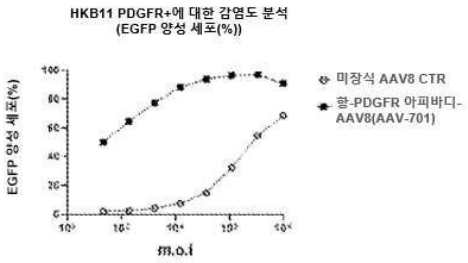
도면6

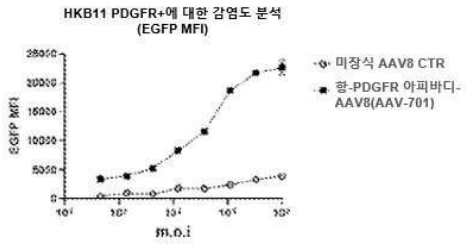

감염된 세포 수(%)
m.o.i
항-EGFR Darpin (E-01)
항-EGFR 피브로넥틴 (E 6.2.6)
항-EGFR Sso7d (E.18.4.5)
항-EGFR 아피바디 (ZEGFR:1907)
항-EGFR GP2 (GaEGFR2.2.3)
항-HA 미니단백질
AAV8 w.t.

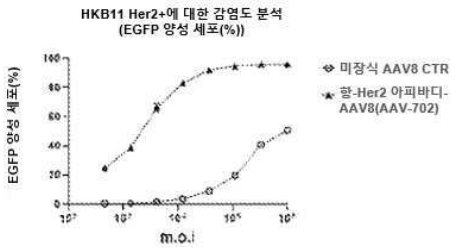
도면7

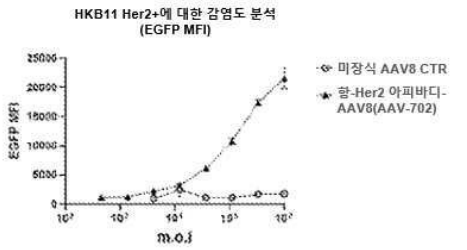

scAAV9 w.t.
scAAV8 w.t.
scAAV8
항-EGFR Sso7d
MoI 1.0E+06
MoI 1.0E+05

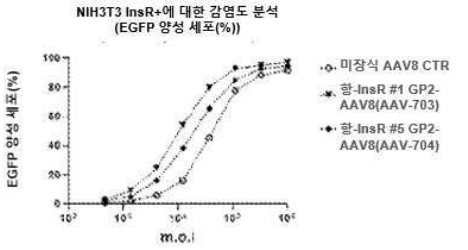
도면8

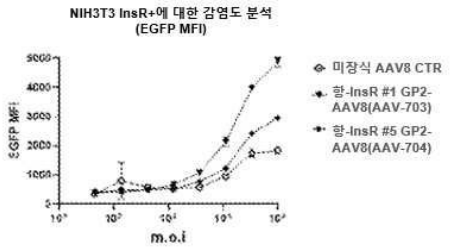

HKB11 PDGFR+에 대한 감염도 분석
(EGFP 양성 세포(%))
EGFP 양성 세포(%)
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-PDGFR 아피바디-AAV8(AAV-701)


HKB11 PDGFR+에 대한 감염도 분석
(EGFP MFI)
EGFP MFI
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-PDGFR 아피바디-AAV8(AAV-701)

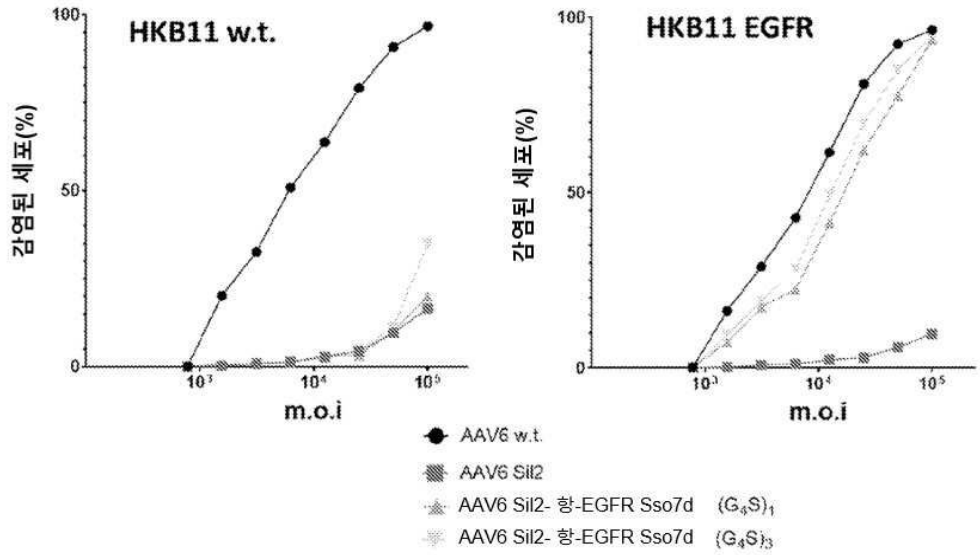

HKB11 Her2+에 대한 감염도 분석
(EGFP 양성 세포(%))
EGFP 양성 세포(%)
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-Her2 아피바디-AAV8(AAV-702)


HKB11 Her2+에 대한 감염도 분석
(EGFP MFI)
EGFP MFI
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-Her2 아피바디-AAV8(AAV-702)

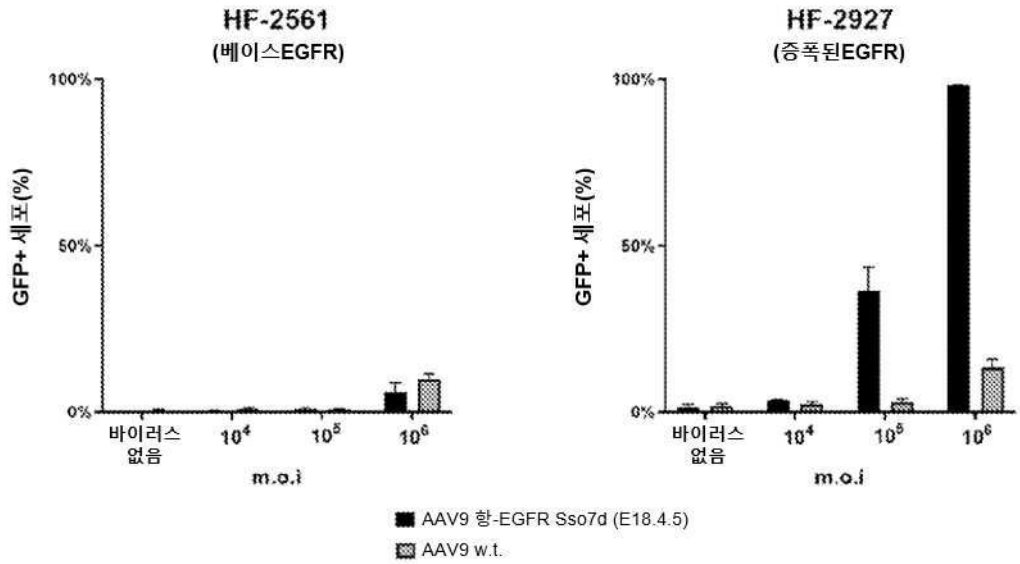

NIH3T3 InsR+에 대한 감염도 분석
(EGFP 양성 세포(%))
EGFP 양성 세포(%)
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-InsR #1 GP2-AAV8(AAV-703)
항-InsR #5 GP2-AAV8(AAV-704)


NIH3T3 InsR+에 대한 감염도 분석
(EGFP MFI)
EGFP MFI
m.o.i
미장식 AAV8 CTR
항-InsR #1 GP2-AAV8(AAV-703)
항-InsR #5 GP2-AAV8(AAV-704)

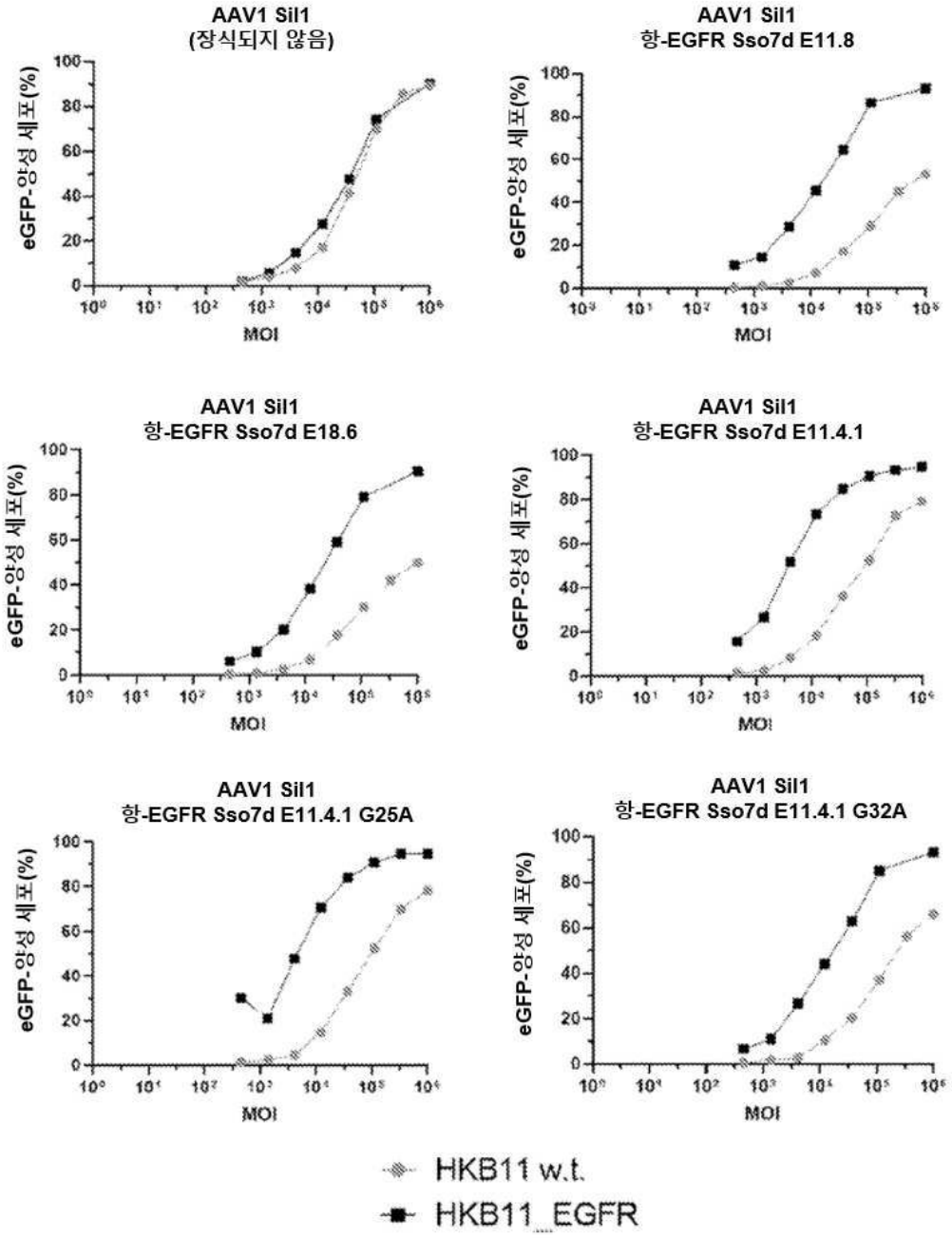
도면9


HKB11 w.t.
HKB11 EGFR
감염된 세포(%)
100
50
0
m.o.i
AAV6 w.t.
AAV6 Sil2
AAV6 Sil2- 항-EGFR Sso7d (G4S)1
AAV6 Sil2- 항-EGFR Sso7d (G4S)3

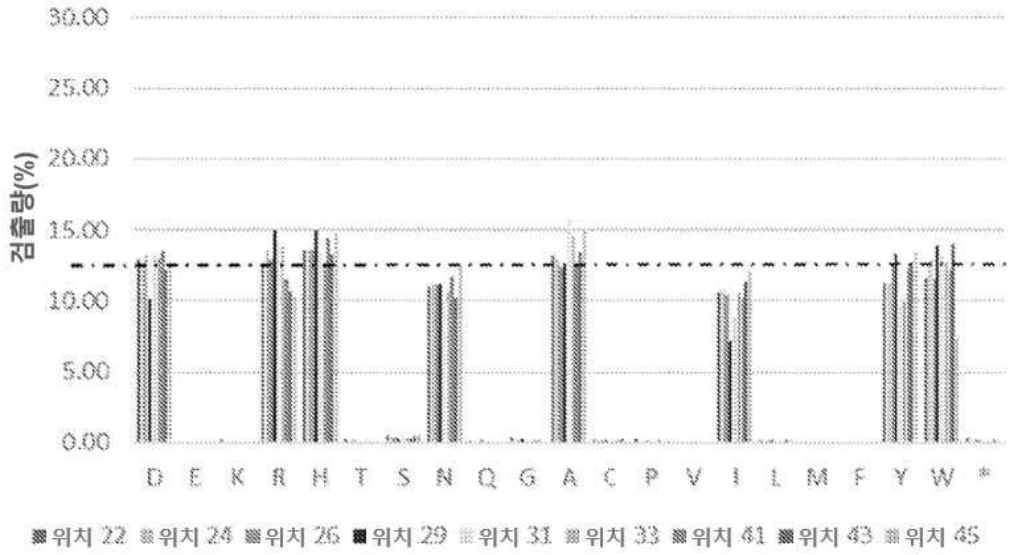
도면10


HF-2561
(베이스EGFR)
HF-2927
(증폭된EGFR)
GFP+ 세포(%)
100%
50%
0%
바이러스 없음
m.o.i
AAV9 항-EGFR Sso7d (E18.4.5)
AAV9 w.t.

도면11


AAV1 Sil1
(장식되지 않음)
AAV1 Sil1
항-EGFR Sso7d E11.8
AAV1 Sil1
항-EGFR Sso7d E18.6
AAV1 Sil1
항-EGFR Sso7d E11.4.1
AAV1 Sil1
항-EGFR Sso7d E11.4.1 G25A
AAV1 Sil1
항-EGFR Sso7d E11.4.1 G32A
eGFP-양성 세포(%)
MOI
HKB11 w.t.
HKB11_EGFR

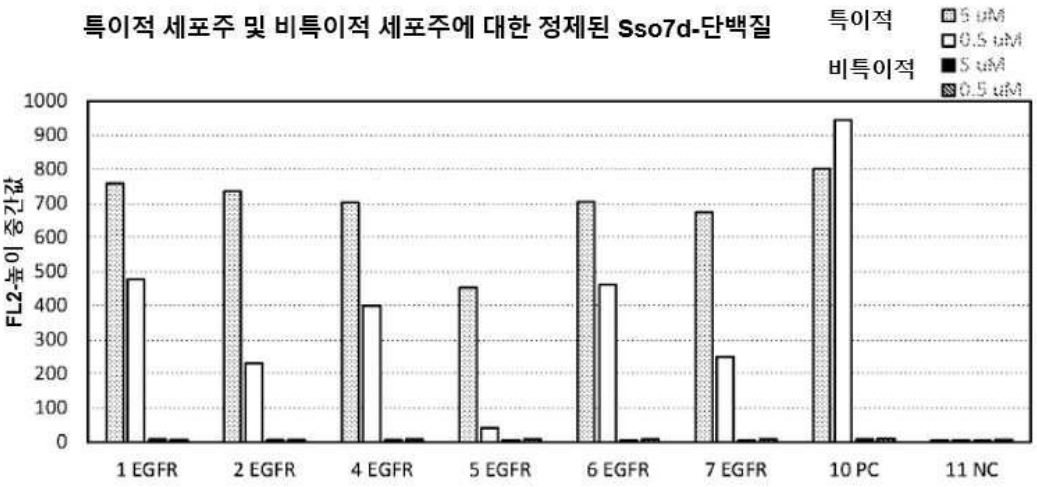
도면12


30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
검출량(%)
D E K R H T S N Q G A C P V I L M F Y W *
위치 22 위치 24 위치 26 위치 29 위치 31 위치 33 위치 41 위치 43 위치 45

도면13

767937 히트 양 (%)	위치 22	위치 24	위치 26	위치 29	위치 31	위치 33	위치 41	위치 43	위치 45
4.56	I	D	Y	N	H	Y	N	W	W
2.59	I	D	Y	Y	H	R	D	W	W
2.18	I	D	Y	Y	H	R	N	W	W
2.10	I	D	Y	A	H	R	D	W	W
1.97	I	D	Y	R	H	N	W	W	W
1.95	I	N	Y	A	H	N	Y	W	Y
1.90	W	N	Y	D	D	W	W	N	I
1.54	I	D	Y	D	H	Y	D	W	W
1.42	I	N	Y	N	H	N	W	W	W
1.39	I	D	Y	W	H	N	Y	W	Y
1.36	I	D	Y	A	H	R	A	W	Y
1.32	I	N	Y	N	H	N	Y	W	W
1.23	I	D	Y	D	H	N	H	W	W
1.07	I	D	Y	N	H	N	I	W	W
1.05	I	N	Y	A	H	H	N	W	Y
1.04	I	D	Y	N	H	R	A	W	W
0.96	I	D	Y	N	H	W	N	W	W
0.96	Y	D	A	F	W	E	L	T	W
0.94	I	D	Y	N	H	N	W	W	Y
0.93	I	D	Y	W	H	R	D	W	W
0.93	I	D	Y	D	H	N	Y	W	Y
0.93	I	D	Y	N	H	N	Y	W	Y
0.92	I	D	Y	N	H	R	D	W	W
0.89	I	D	Y	N	H	N	W	W	W
0.86	I	D	Y	N	H	Y	A	W	W
0.82	W	N	Y	Y	D	W	W	N	Y
0.80	I	D	Y	D	H	N	W	W	W
0.78	R	D	Y	A	H	N	W	W	W
0.77	I	D	Y	N	H	N	D	W	W
0.77	R	D	Y	D	H	N	Y	W	W

도면14



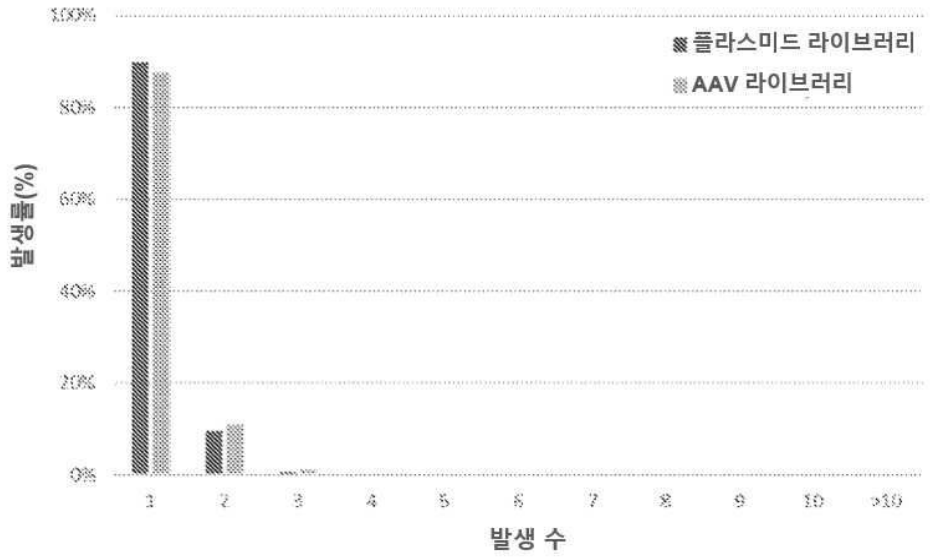
도면15



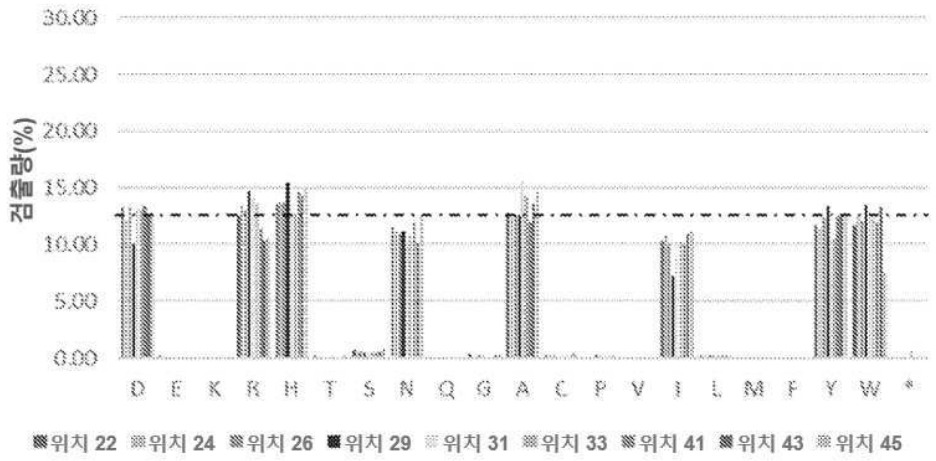
도면16

	위치22	위치24	위치26	위치29	위치31	위치33	위치41	위치43	위치45	대조0
D	13.8	14.5	13.8	11.6	14.5	10.9	10.1	10.1	13.8	12.6
R	13.0	14.5	9.4	15.9	8.7	15.9	15.9	6.5	14.5	12.7
H	12.3	10.9	10.9	11.6	13.8	13.0	11.6	15.2	16.7	12.9
N	15.9	8.7	12.3	13.0	10.9	8.7	5.1	13.0	9.4	10.8
A	7.2	11.6	10.1	12.3	13.0	19.6	21.7	16.7	16.7	14.3
I	9.4	13.8	15.2	7.2	12.3	8.0	8.7	13.0	12.3	11.1
Y	18.1	11.6	13.8	13.0	7.2	10.1	15.2	11.6	10.9	12.4
W	10.1	14.5	14.5	15.2	19.6	13.8	11.6	13.8	5.8	13.2

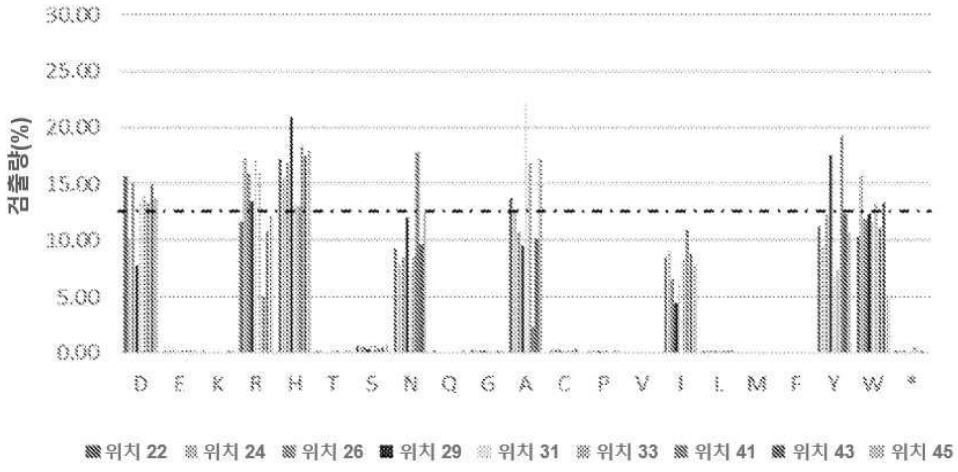
도면17a



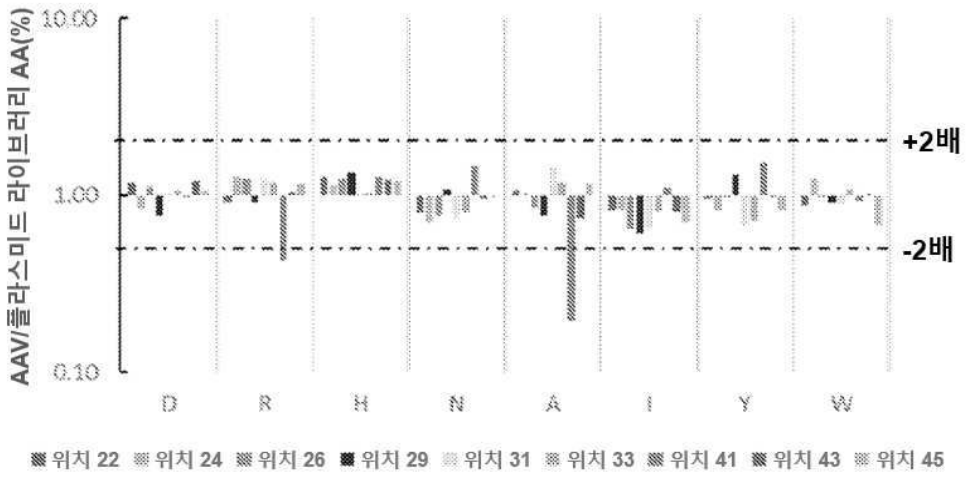
도면17b



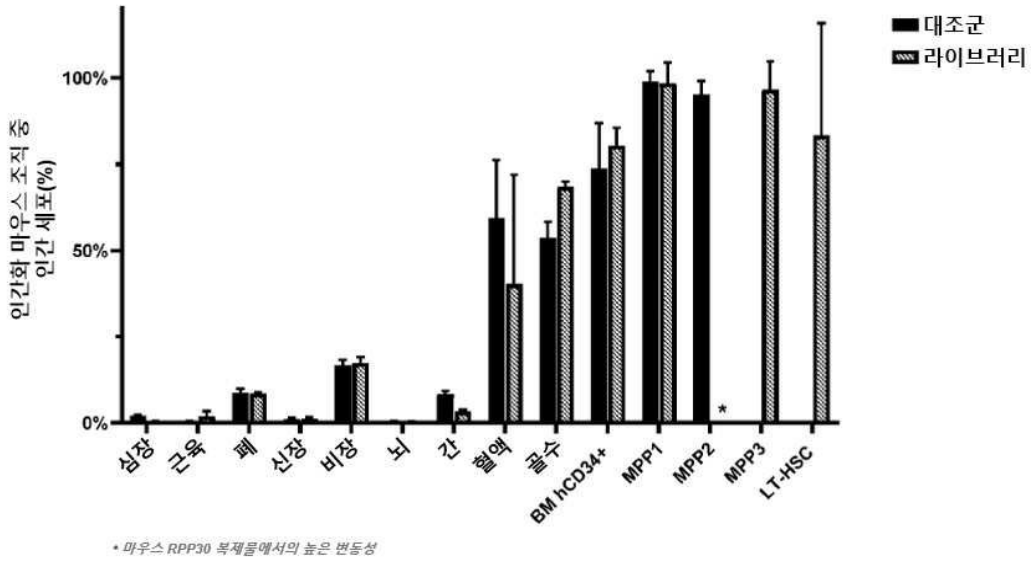
도면17c



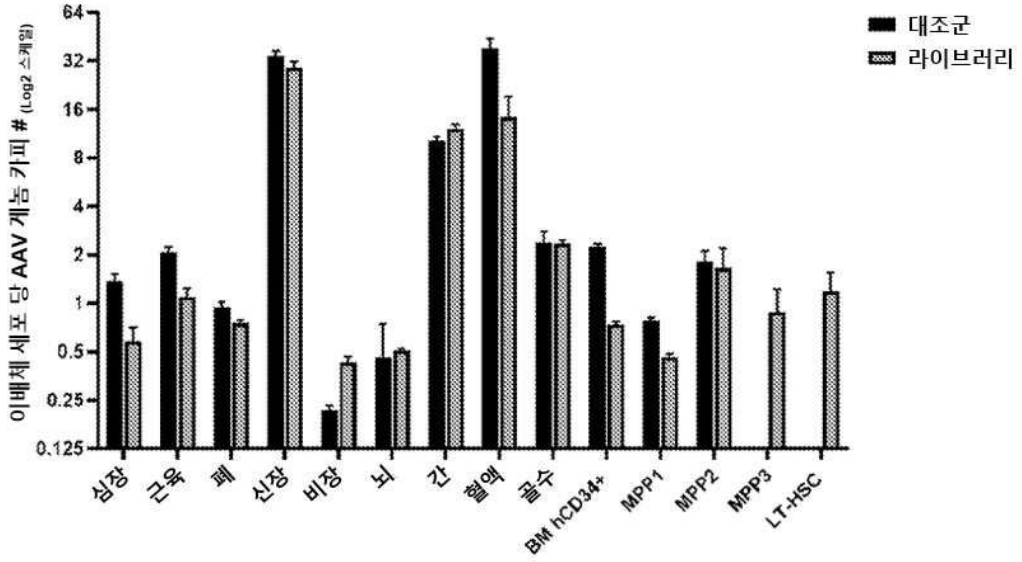
도면17d


AAV/클라스미드 라이브러리 AA(%)
10.00
1.00
0.10
+2배
-2배
D
R
H
N
A
I
Y
W
위치 22
위치 24
위치 26
위치 29
위치 31
위치 33
위치 41
위치 43
위치 45

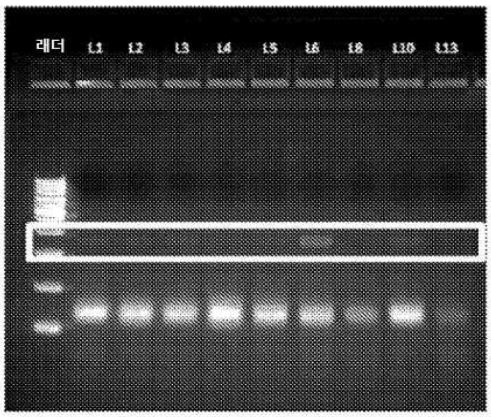
도면18

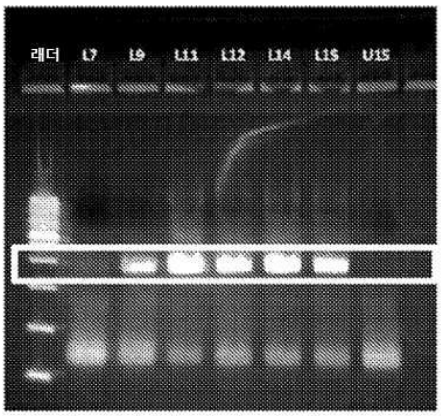

인간화 마우스 조직 중 인간 세포(%)
100%
50%
0%
대조군
라이브러리
심장
근육
폐
신장
비장
뇌
간
혈액
골수
BM hCD34+
MPP1
MPP2
MPP3
LT-HSC
* 마우스 RPP30 복제물에서의 높은 변동성

도면19

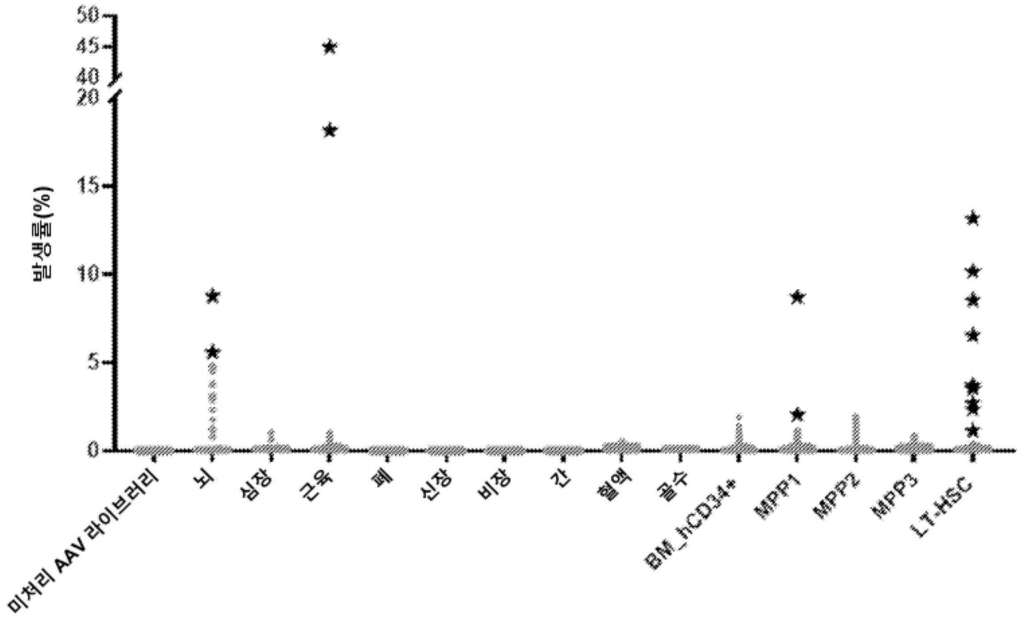

대조군
라이브러리
이배체 세포 당 AAV 게놈 카피 # (Log2 스케일)
64
32
16
8
4
2
1
0.5
0.25
0.125
심장
근육
폐
신장
비장
뇌
간
혈액
골수
BM hCD34+
MPP1
MPP2
MPP3
LT-HSC

도면20


래더
L1
L2
L3
L4
L5
L6
L8
L10
L13


래더
L7
L9
L11
L12
L14
L15
U15

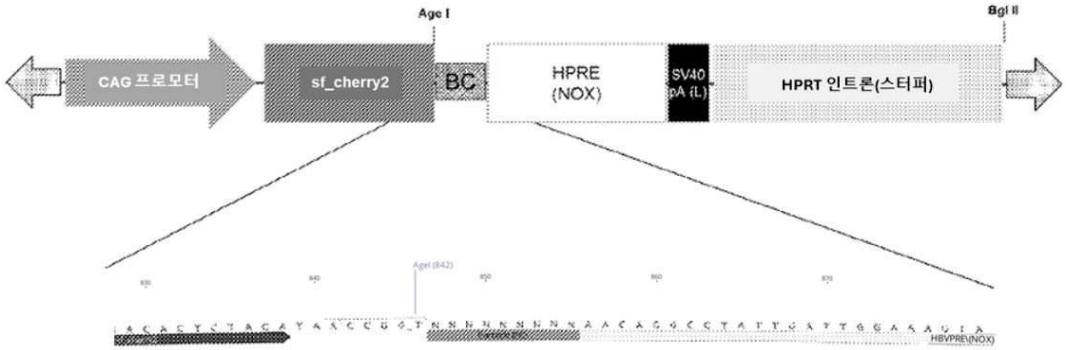
도면21



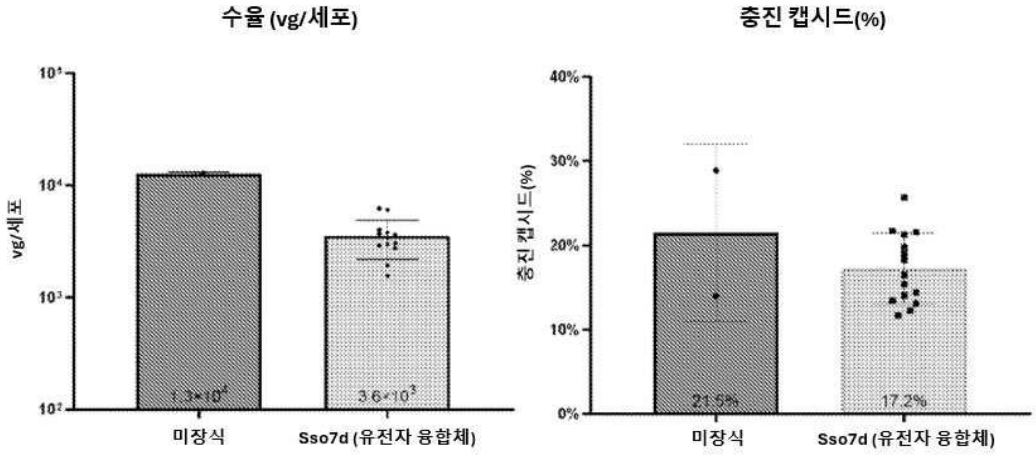
도면22

후보 ID	뇌	심장	근육	폐	신장	비장	간	혈액	골수	BM_ hCD34+	MPP1	MPP2	MPP3	LT-HSC
뇌- Sso7dL8-001	8.77%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
뇌- Sso7dL8-002	5.59%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
뇌- Sso7dL8-003	4.82%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-004	4.81%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
뇌- Sso7dL8-005	4.66%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-006	4.50%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.01%
뇌- Sso7dL8-007	3.82%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-008	3.73%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-009	3.18%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-010	3.11%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-011	3.10%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-012	3.02%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-013	2.87%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-014	2.32%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-015	1.79%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-016	1.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
뇌- Sso7dL8-017	1.29%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
근육- Sso7dL8-001	0.01%	0.09%	45.00%	0.05%	0.03%	0.01%	0.03%	0.06%	0.06%	0.02%	0.03%	0.07%	0.01%	0.01%
근육- Sso7dL8-002	0.00%	0.04%	18.18%	0.02%	0.01%	0.01%	0.01%	0.03%	0.02%	0.01%	0.02%	0.02%	0.00%	0.00%
MPP1-Sso7dL8-001	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.71%	0.00%	0.01%	0.00%
MPP1-Sso7dL8-002	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.06%	0.00%	0.00%	0.00%
HSC-Sso7dL8-001	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	13.18%
HSC-Sso7dL8-002	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	10.18%
HSC-Sso7dL8-003	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	8.56%
HSC-Sso7dL8-004	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	6.55%
HSC-Sso7dL8-005	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.72%
HSC-Sso7dL8-006	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	3.53%
HSC-Sso7dL8-007	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.70%
HSC-Sso7dL8-008	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	2.37%
HSC-Sso7dL8-009	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.15%

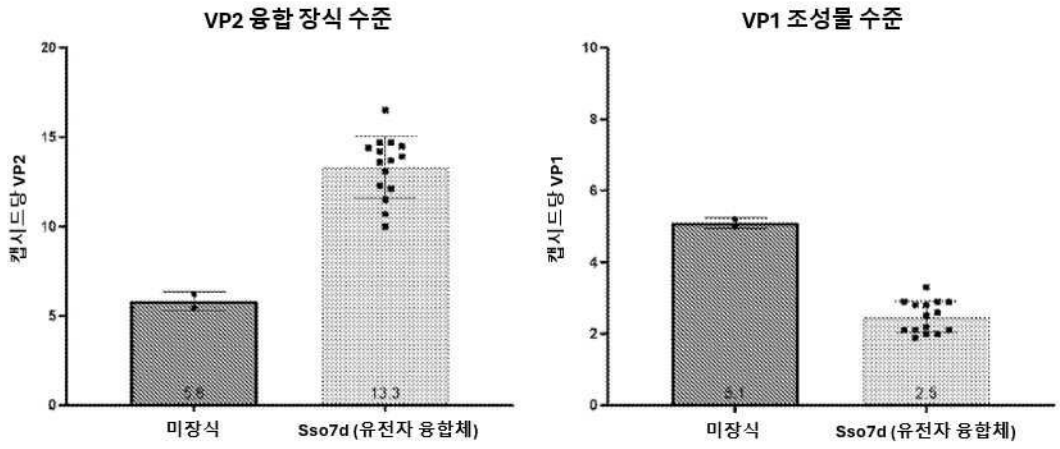
도면23



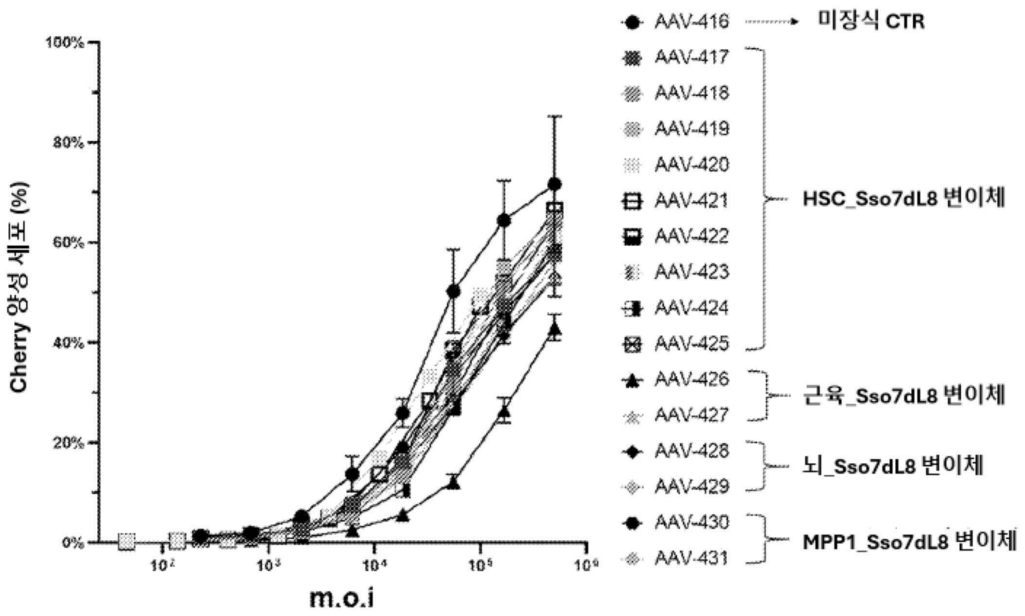
도면24a



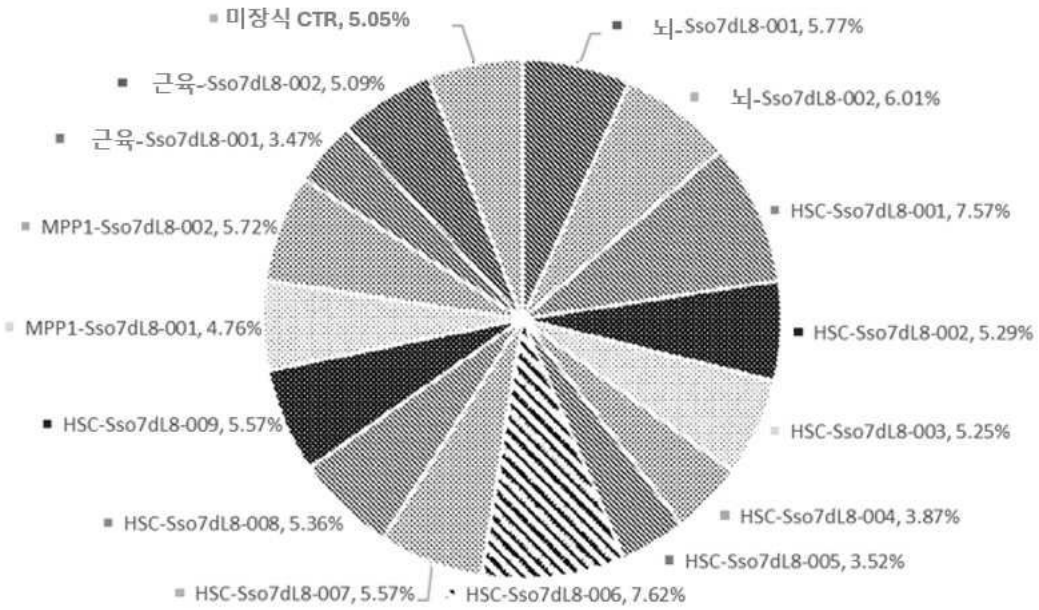
도면24b



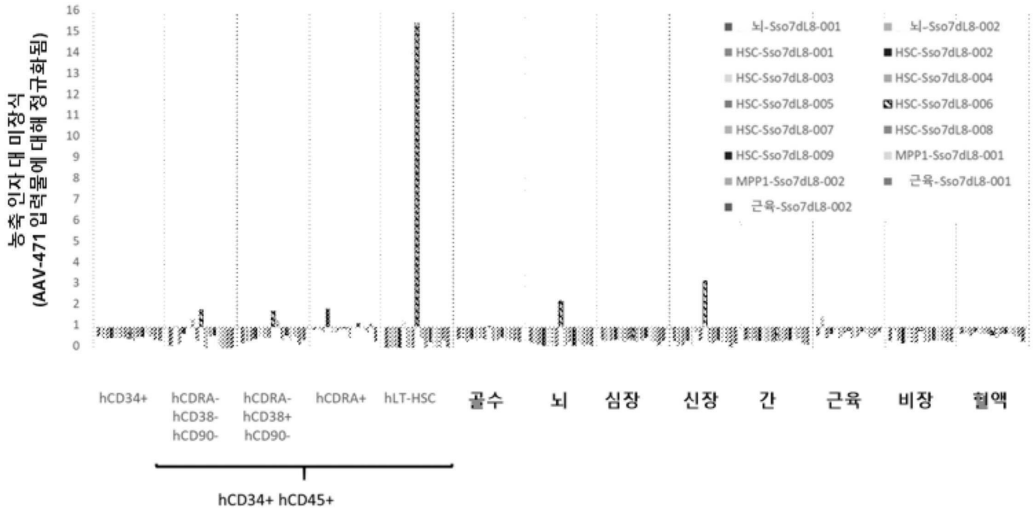
도면25


Cherry 양성 세포 (%)
100%
80%
60%
40%
20%
0%
m.o.i
AAV-416
AAV-417
AAV-418
AAV-419
AAV-420
AAV-421
AAV-422
AAV-423
AAV-424
AAV-425
AAV-426
AAV-427
AAV-428
AAV-429
AAV-430
AAV-431
미장식 CTR
HSC_Sso7dL8 변이체
근육_Sso7dL8 변이체
뇌_Sso7dL8 변이체
MPP1_Sso7dL8 변이체

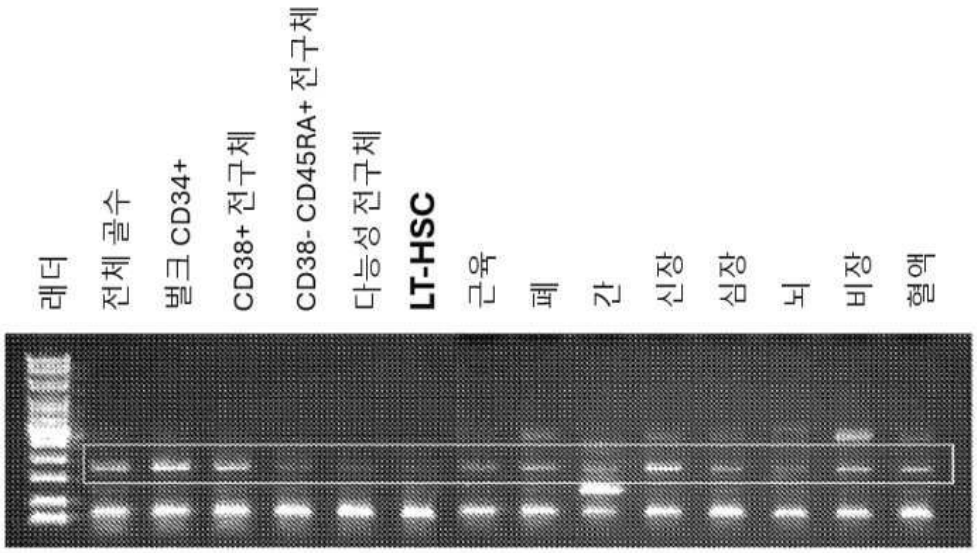
도면26


미장식 CTR, 5.05%
뇌-Sso7dL8-001, 5.77%
뇌-Sso7dL8-002, 6.01%
근육-Sso7dL8-002, 5.09%
근육-Sso7dL8-001, 3.47%
HSC-Sso7dL8-001, 7.57%
MPP1-Sso7dL8-002, 5.72%
HSC-Sso7dL8-002, 5.29%
MPP1-Sso7dL8-001, 4.76%
HSC-Sso7dL8-003, 5.25%
HSC-Sso7dL8-009, 5.57%
HSC-Sso7dL8-004, 3.87%
HSC-Sso7dL8-008, 5.36%
HSC-Sso7dL8-005, 3.52%
HSC-Sso7dL8-007, 5.57%
HSC-Sso7dL8-006, 7.62%

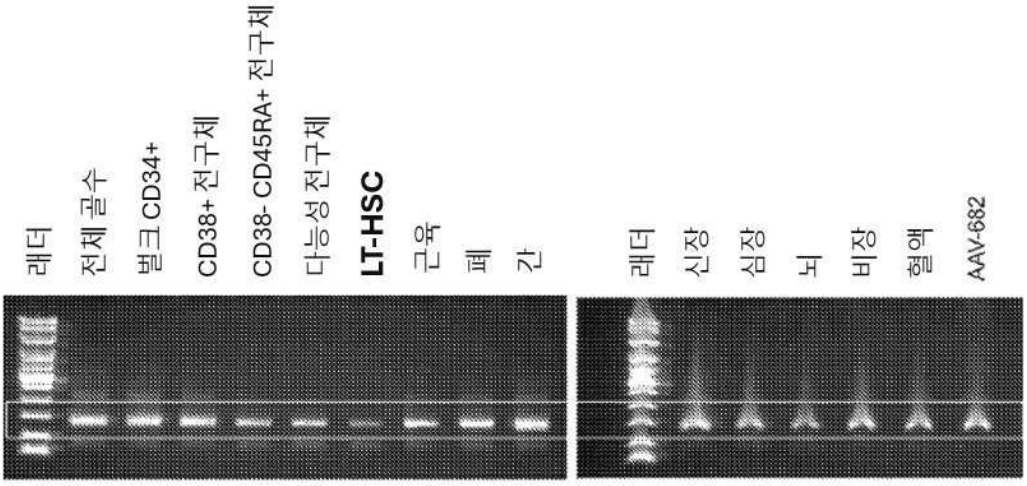
도면27


농축 인자대 미장식
(AAV-471 입력물에 대해 정규화됨)
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
뇌-Sso7dL8-001
뇌-Sso7dL8-002
HSC-Sso7dL8-001
HSC-Sso7dL8-002
HSC-Sso7dL8-003
HSC-Sso7dL8-004
HSC-Sso7dL8-005
HSC-Sso7dL8-006
HSC-Sso7dL8-007
HSC-Sso7dL8-008
HSC-Sso7dL8-009
MPP1-Sso7dL8-001
MPP1-Sso7dL8-002
근육-Sso7dL8-001
근육-Sso7dL8-002
hCD34+
hCDRA-
hCD38-
hCD90-
hCDRA-
hCD38+
hCD90-
hCDRA+
hLT-HSC
골수
뇌
심장
신장
간
근육
비장
혈액
hCD34+ hCD45+

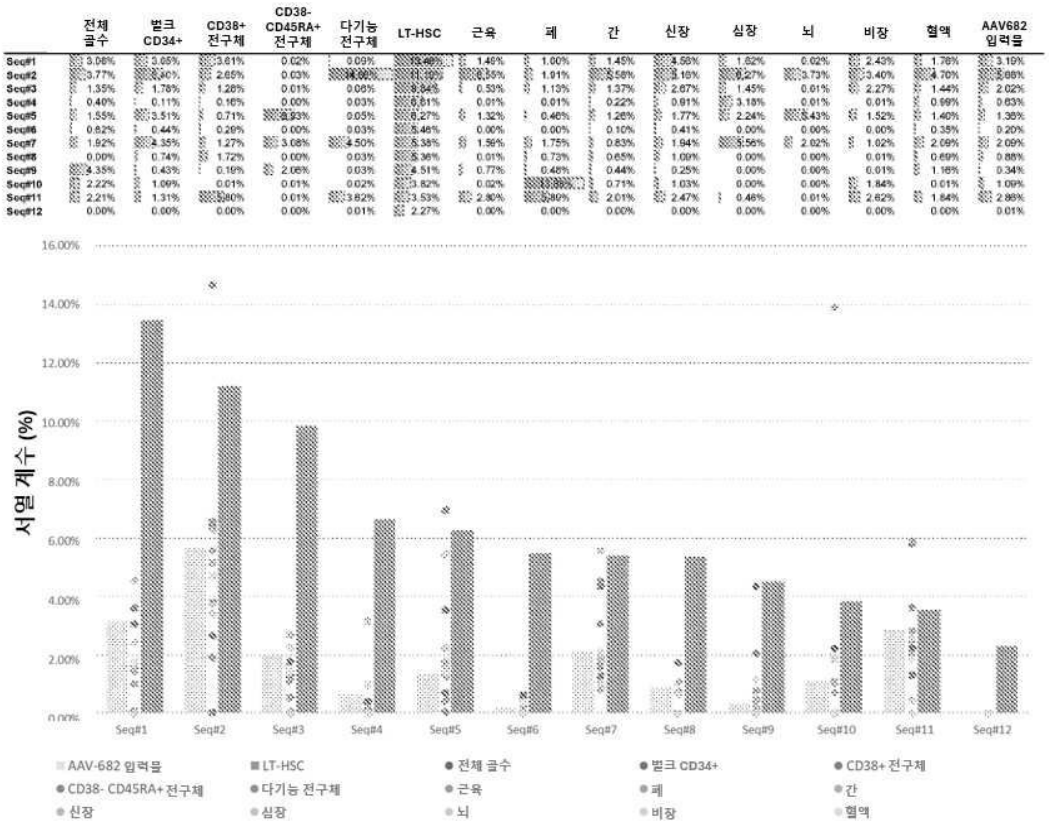
도면28


래더
전체 골수
벌크 CD34+
CD38+ 전구체
CD38- CD45RA+ 전구체
다능성 전구체
LT-HSC
근육
폐
간
신장
심장
뇌
비장
혈액

도면29

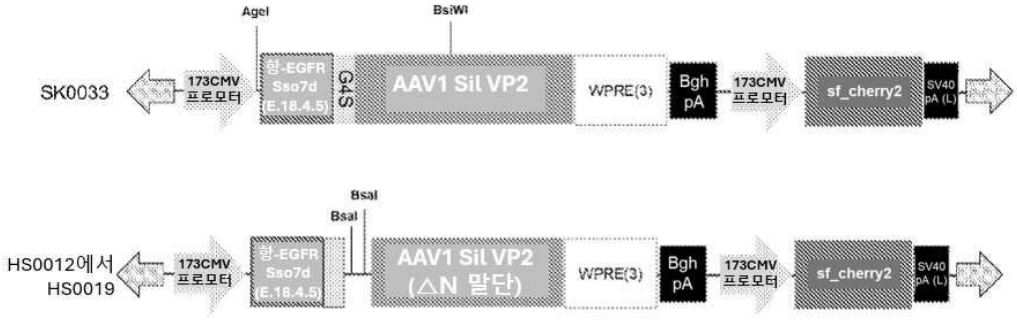


도면30

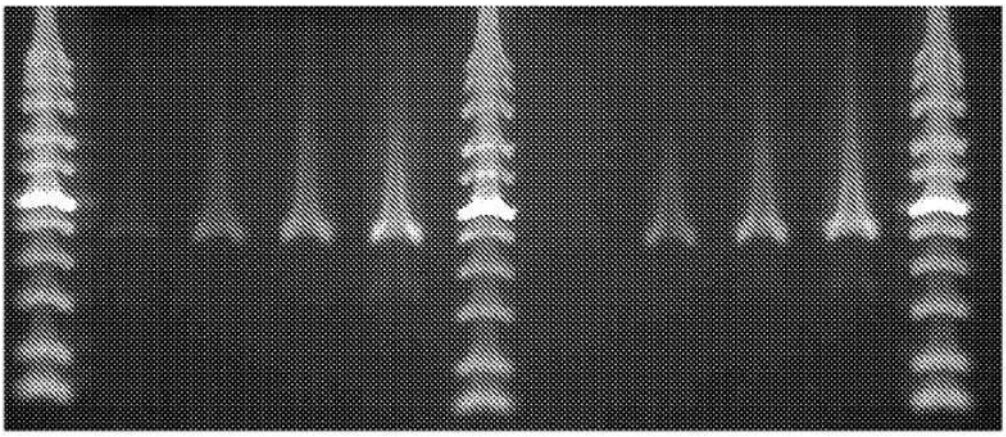


	전체 골수	벌크 CD34+	CD38+ 전구체	CD38- CD45RA+ 전구체	다기능 전구체	LT-HSC	근육	폐	간	신장	심장	뇌	비장	혈액	AAV682 입력물
Seq#1	3.08%	3.05%	3.61%	0.02%	0.09%	13.46%	1.46%	1.00%	1.45%	4.56%	1.62%	0.02%	2.43%	1.78%	3.19%
Seq#2	3.77%	3.40%	2.65%	0.03%	11.09%	11.10%	2.35%	1.91%	5.58%	3.16%	0.27%	3.73%	3.40%	4.70%	3.88%
Seq#3	1.35%	1.78%	1.28%	0.01%	0.06%	9.84%	0.53%	1.13%	1.37%	2.67%	1.45%	0.01%	2.27%	1.44%	2.02%
Seq#4	0.40%	0.11%	0.16%	0.00%	0.03%	6.61%	0.01%	0.01%	0.22%	0.91%	3.18%	0.01%	0.01%	0.69%	0.63%
Seq#5	1.55%	3.51%	0.71%	0.93%	0.05%	6.27%	1.32%	0.46%	1.26%	1.77%	2.24%	0.43%	1.52%	1.40%	1.35%
Seq#6	0.62%	0.44%	0.29%	0.00%	0.03%	5.46%	0.00%	0.00%	0.10%	0.41%	0.00%	0.00%	0.00%	0.35%	0.20%
Seq#7	1.92%	2.35%	1.27%	3.08%	4.50%	5.38%	1.56%	1.75%	0.83%	1.94%	5.56%	2.02%	1.02%	2.09%	2.09%
Seq#8	0.00%	0.74%	1.72%	0.00%	0.03%	5.36%	0.01%	0.73%	0.65%	1.09%	0.00%	0.00%	0.01%	0.69%	0.88%
Seq#9	4.35%	0.43%	0.16%	2.06%	0.03%	4.51%	0.77%	0.48%	0.44%	0.25%	0.00%	0.00%	0.01%	1.16%	0.34%
Seq#10	2.22%	1.09%	0.01%	0.01%	0.02%	3.82%	0.02%	3.88%	0.71%	1.03%	0.00%	0.00%	1.84%	0.01%	1.09%
Seq#11	2.21%	1.31%	5.80%	0.01%	3.82%	3.53%	2.80%	5.80%	2.01%	2.47%	0.46%	0.01%	2.82%	1.84%	2.88%
Seq#12	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	2.27%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%

도면31

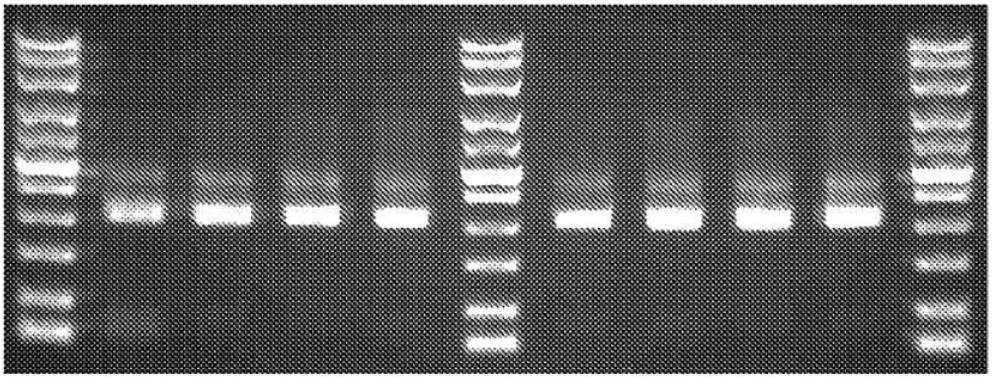


도면32



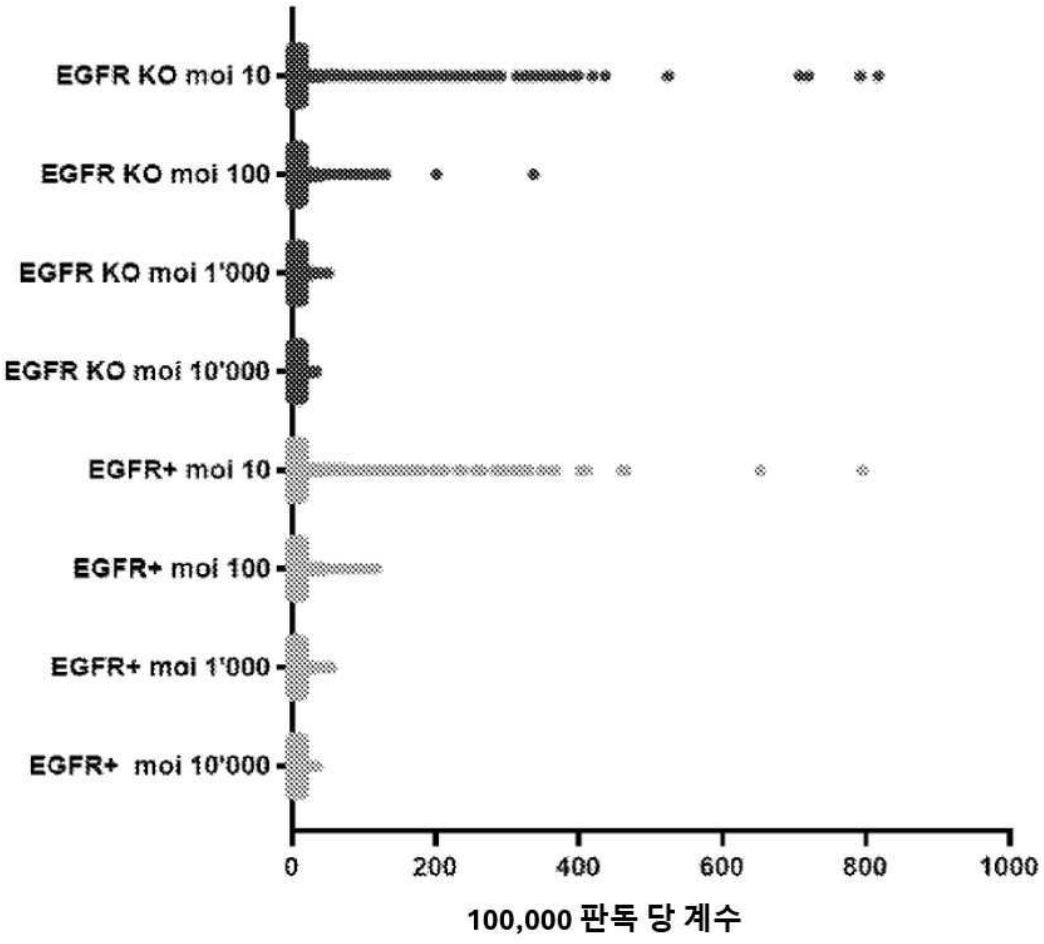
레인	샘플	레인	샘플
1	NEB 고속 DNA 래더	6	NEB 고속 DNA 래더
2	HKB11 EGFR+ MOI 10	7	HKB11 EGFR KO MOI 10
3	HKB11 EGFR+ MOI 100	8	HKB11 EGFR KO MOI 100
4	HKB11 EGFR+ MOI 1000	9	HKB11 EGFR KO MOI 1000
5	HKB11 EGFR+ MOI 10 000	10	HKB11 EGFR KO MOI 10 000

도면33

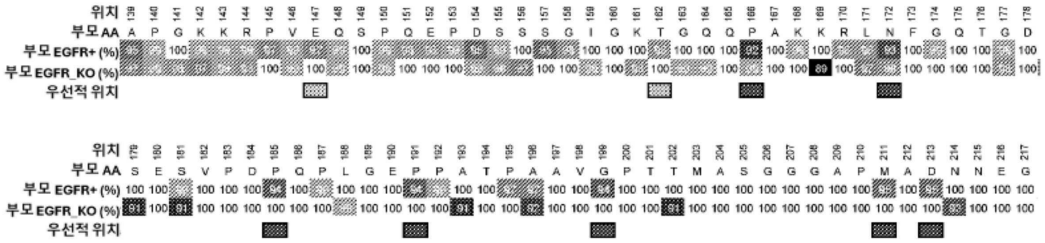


레인	샘플	레인	샘플
1	NEB 고속 DNA 래더	6	NEB 고속 DNA 래더
2	HKB11 EGFR+ MOI 10	7	HKB11 EGFR KO MOI 10
3	HKB11 EGFR+ MOI 100	8	HKB11 EGFR KO MOI 100
4	HKB11 EGFR+ MOI 1000	9	HKB11 EGFR KO MOI 1000
5	HKB11 EGFR+ MOI 10 000	10	HKB11 EGFR KO MOI 10 000

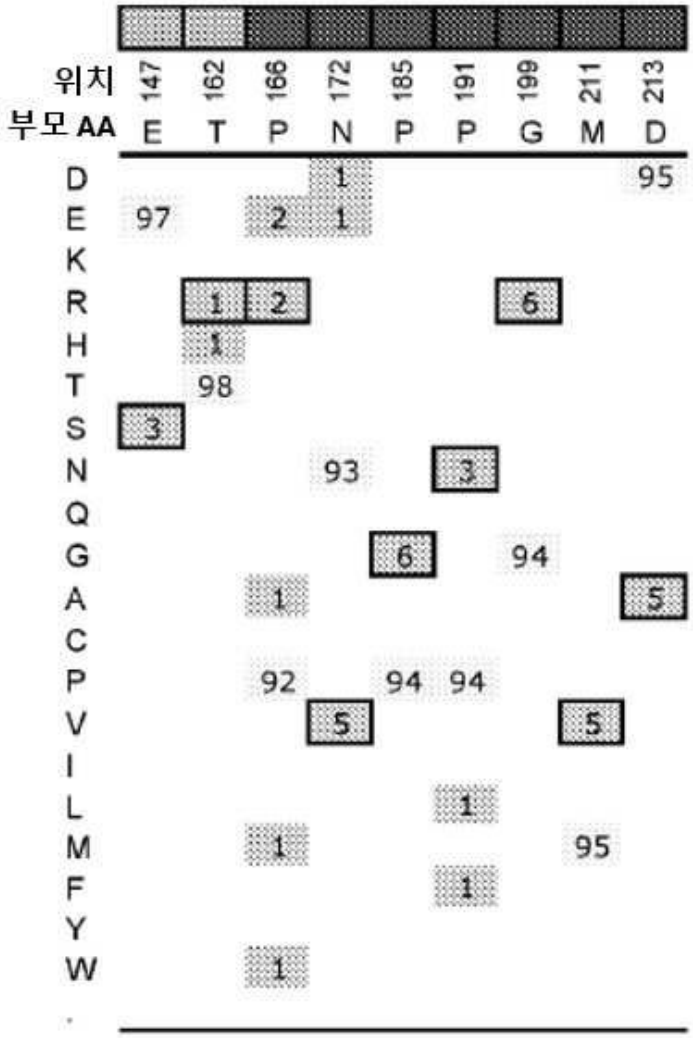
도면34



도면35


위치
부모 AA
부모 EGFR+ (%)
부모 EGFR_KO (%)
우선적 위치

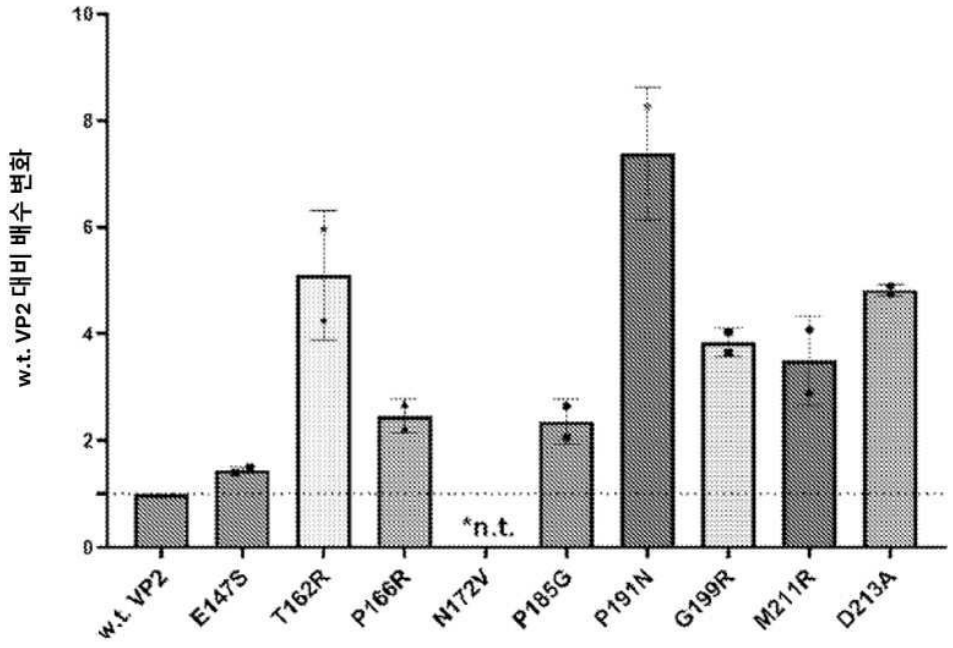
도면36


위치
147 162 166 172 185 191 199 211 213
부모 AA
E T P N P P G M D
D 1 95
E 97 2 1
K
R 1 2 6
H 1
T 98
S 3
N 93 3
Q
G 6 94
A 1 5
C
P 92 94 94
V 5 5
I
L 1
M 1 95
F 1
Y
W 1

도면37

EGFR +	EGFR KO	링커	E147	T162	P166	N172	P185	P191	G199	M211	D213
0.65%	0.00%	(APS)2				V					
0.48%	0.00%	(APS)3		R							
0.41%	0.00%	(APS)2	S								
0.40%	0.00%	(G4S)1	S								
0.35%	0.00%	(APS)2				D					
0.33%	0.00%	(APS)3			R						
0.30%	0.00%	(APS)2				E					
0.29%	0.00%	(APS)3					G				
0.24%	0.01%	(APS)5		H							
0.18%	0.00%	(APS)3							R		
0.18%	0.00%	(G4S)2					G				
0.18%	0.00%	(G4S)3					G				
0.17%	0.00%	(G4S)4	S								
0.16%	0.00%	(G4S)2								V	
0.16%	0.00%	(APS)3								V	
0.15%	0.00%	(G4S)2						N			
0.15%	0.00%	(G4S)2							R		
0.15%	0.00%	(G4S)1					G				
0.15%	0.00%	(G4S)1							R		
0.15%	0.00%	(G4S)1								V	
0.14%	0.00%	(G4S)3							R		
0.14%	0.00%	(APS)2					G				
0.14%	0.00%	(G4S)2				V					
0.14%	0.00%	(G4S)3								V	
0.14%	0.00%	(G4S)2									A
0.14%	0.00%	(G4S)1				V					
0.13%	0.00%	(APS)3									A
0.13%	0.00%	(APS)3						L			
0.13%	0.00%	(APS)2							R		
0.13%	0.00%	(G4S)2			R						
0.12%	0.00%	(G4S)1			M						
0.12%	0.00%	(G4S)2						F			
0.12%	0.00%	(G4S)3				V					
0.12%	0.00%	(G4S)1						N			
0.12%	0.00%	(G4S)1									A
0.12%	0.00%	(G4S)3						N			
0.12%	0.00%	(G4S)3									A
0.11%	0.00%	(G4S)4			A						
0.11%	0.00%	(G4S)4			E						
0.11%	0.00%	(G4S)2			E						
0.10%	0.00%	(G4S)2			W						

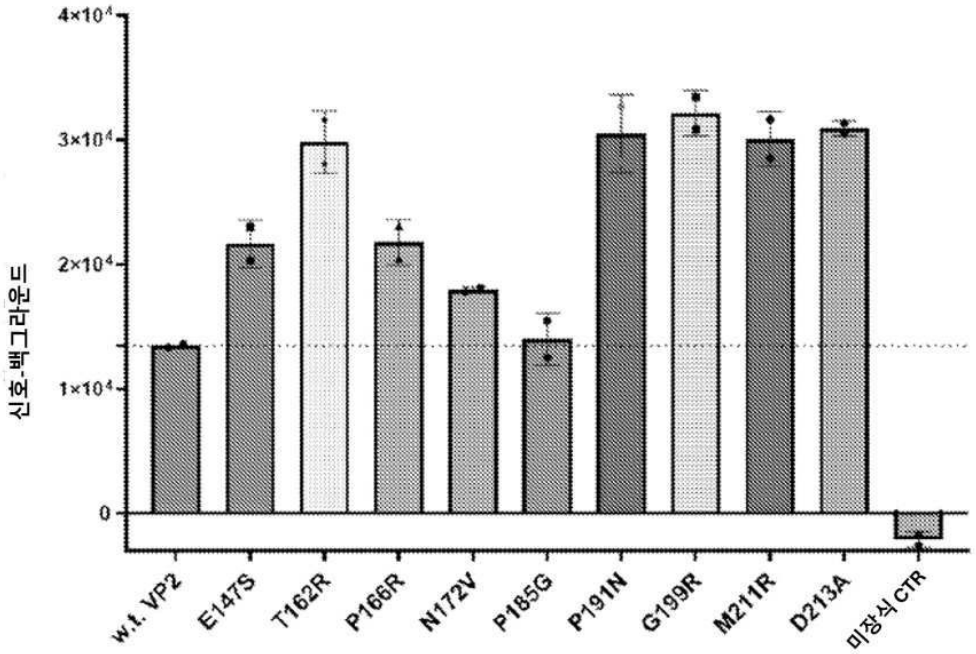
도면38



항-EGFR Sso7d에 융합된 AAV Sil1 VP2 내 돌연변이

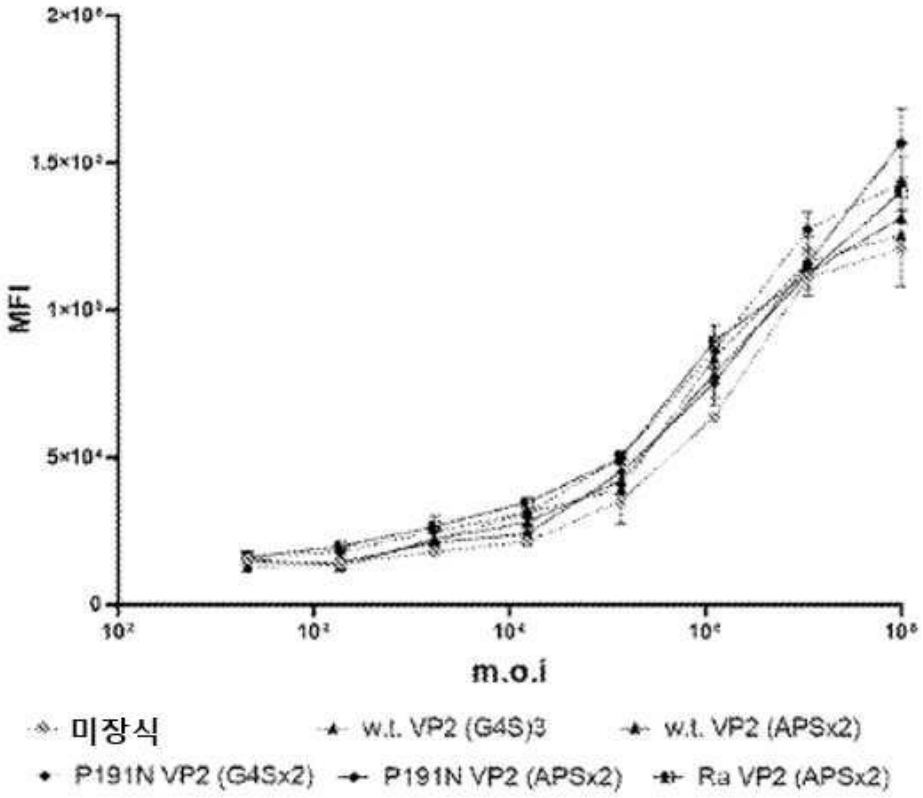
*테스트되지 않음

도면39

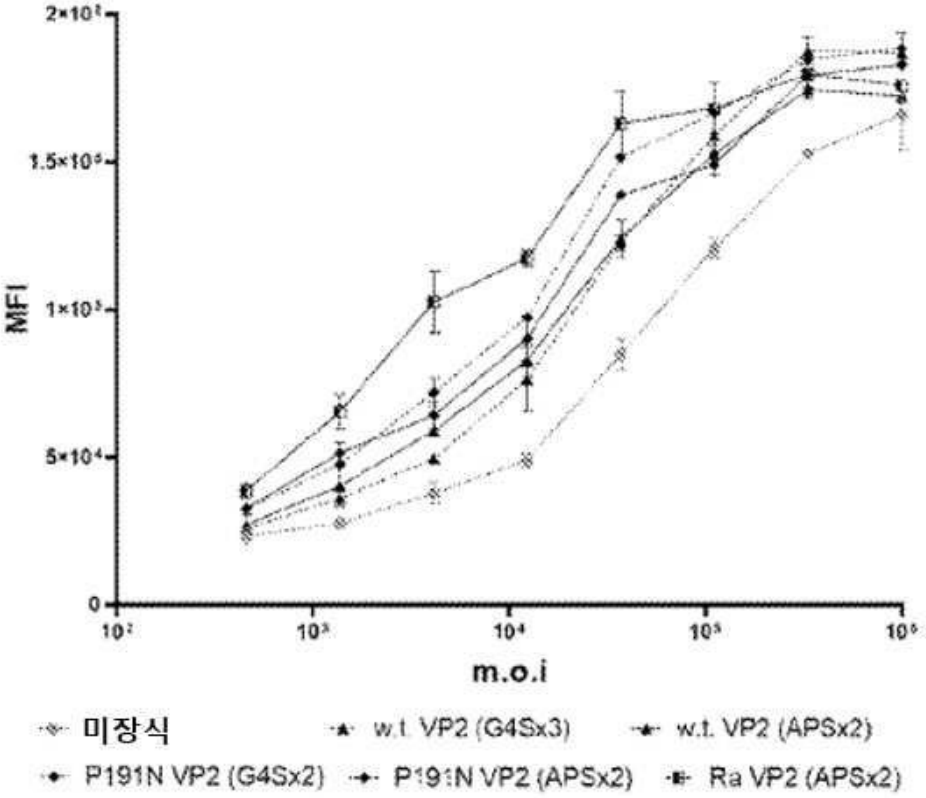


항-EGFR Sso7d에 융합된 AAV Sil1 VP2 내 돌연변이

도면40


MFI
m.o.i
미장식
w.t. VP2 (G4S)3
w.t. VP2 (APSx2)
P191N VP2 (G4Sx2)
P191N VP2 (APSx2)
Ra VP2 (APSx2)

도면41


MFI
m.o.i
미장식
w.t. VP2 (G4Sx3)
w.t. VP2 (APSx2)
P191N VP2 (G4Sx2)
P191N VP2 (APSx2)
Ra VP2 (APSx2)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.