(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0082460
(43) 공개일자 2021년07월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 38/53* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 38/53 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-7012982
(22) 출원일자(국제) 2019년10월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2021년04월29일
(86) 국제출원번호 PCT/US2019/054003
(87) 국제공개번호 WO 2020/072451
국제공개일자 2020년04월09일
(30) 우선권주장
62/739,471 2018년10월01일 미국(US)

(71) 출원인
울트라제닉스 파마수티컬 인코포레이티드
미국, 캘리포니아 94949, 노바토, 60 레베로니 코트
(72) 발명자
풀러, 매튜 스콧
미국 02054 매사추세츠주 밀리스 플레인 스트리트 128
워즈워스, 사무엘
미국 01545 매사추세츠주 슈루즈베리 스트로우 홀로 레인 10
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 이상남

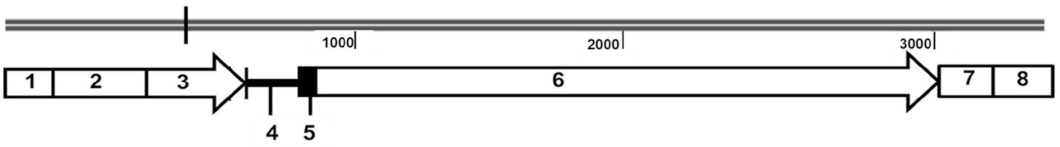
전체 청구항 수 : 총 140 항

(54) 발명의 명칭 **프로피온산혈증을 치료하기 위한 유전자 요법**

(57) 요 약

본 개시내용은 아데노-연관 바이러스 벡터, 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV), 및 프로피온산혈증 (PA)을 치료하기 위한 유전자 요법에서의 그의 사용 방법을 제공한다. 본 발명의 재조합 아데노-연관 바이러스 및 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함하는 제약 조성물이 또한 제공된다. 이러한 제약 조성물은 프로피오닐-CoA 카르복실라제 α-서브유닛 (PCCA)에서의 돌연변이 또는 프로피오닐-CoA 카르복실라제 β-서브유닛 (PCCB)에서의 돌연변이에 의해 야기되는 PA의 치료를 위한 유전자 요법에서 유용할 수 있다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
C12N 9/93 (2013.01)
C12Y 604/01003 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
(72) 발명자
클라크, 켈리 리드
미국 43082 오하이오주 웨스터빌 웨지우드 코트 261
도허티, 션 크리스토퍼
미국 94952 캘리포니아주 페탈루마 재클린 레인 402
크레이그, 스튜어트
미국 02141 매사추세츠주 캠브리지 피프스 스트리트 17

명 세 서

청구범위

청구항 1

재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

(a) 5'-역전 말단 반복부 서열 (5'-ITR) 서열;

(b) 프로모터 서열;

(c) PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및

(d) 3'-역전 말단 반복부 서열 (3'-ITR) 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

청구항 3

제2항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

청구항 4

제2항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8로부터의 것인 rAAV.

청구항 5

제1항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, CAG 프로모터, PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터, 및 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 7

제6항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 프로모터가 서열 식별번호: 34의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터인 rAAV.

청구항 8

제6항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 프로모터가 서열 식별번호: 36의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터인 rAAV.

청구항 9

제6항에 있어서, 프로모터가 CBA 프로모터인 rAAV.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 5'-ITR 및/또는 3'-ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

청구항 11

제10항에 있어서, 5'-ITR 서열 및 3'-ITR 서열이 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 12

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열이 비-AAV2 공급원으로부터의 것인 rAAV.

청구항 13

제1항 내지 제7항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

청구항 14

제13항에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 15

제1항 내지 제7항 및 제9항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

청구항 16

제15항에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 17

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

청구항 18

제17항에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 7을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 19

제1항 내지 제6항 및 제8항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

청구항 20

제19항에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 21

제1항 내지 제7항 및 제9항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 패키징된 게놈이 인간 PCCA 5'-비번역 영역(UTR) 및/또는 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 22

제21항에 있어서, 인간 PCCA 5'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 30을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 23

제21항에 있어서, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 30의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 24

제21항에 있어서, 인간 PCCA 3'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 31을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 25

제21항에 있어서, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 31의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 26

제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제12항 및 제17항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 패키징된 게놈이 인간 PCCB 5'-비번역 영역 (UTR) 및/또는 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 27

제26항에 있어서, 인간 PCCB 5'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 32를 포함하는 것인 rAAV.

청구항 28

제26항에 있어서, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 32의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 29

제26항에 있어서, 인간 PCCB 3'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 33을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 30

제26항에 있어서, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 33의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 31

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 패키징된 게놈이 폴리아데닐화 신호 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 32

제31항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 33

제32항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

청구항 34

제33항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 35

제33항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 36

제1항 내지 제7항, 제9항 내지 제16항, 제21항 내지 제25항, 제31항 및 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-

특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 37

제36항에 있어서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 35의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 38

제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제12항, 제17항 내지 제20항 및 제26항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 39

제38항에 있어서, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 37의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 41

제40항에 있어서, 인핸서가 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 아포지질단백질 E (ApoE) 인핸서로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 42

제41항에 있어서, 인핸서가 CMV 인핸서인 rAAV.

청구항 43

제42항에 있어서, 인핸서가 서열식별번호: 19를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 44

제40항 내지 제43항 중 어느 한 항에 있어서, 인핸서가 프로모터 서열의 상류에 위치하는 것인 rAAV.

청구항 45

제1항 내지 제44항 중 어느 한 항에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 46

제45항에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, 프로메가(Promega) 키메라 인트론, 및 hFIX 인트론으로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 47

제46항에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론 또는 rHBB 인트론인 rAAV.

청구항 48

제47항에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 20을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 49

제47항에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 21을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 50

재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

(a) 5'-ITR 서열;

(b) 인핸서 서열;

(c) 프로모터 서열;

(d) 인트론 서열;

(e) PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열;

(f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

(g) 3'-ITR 서열.

청구항 51

제50항에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

청구항 52

제51항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8 또는 AAV9로부터의 것인 rAAV.

청구항 53

제50항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

청구항 54

제50항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 프로모터가 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, CAG 프로모터, PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터, 및 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 55

제54항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 프로모터가 서열식별번호: 34의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터인 rAAV.

청구항 56

제54항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 프로모터가 서열식별번호: 36의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터인 rAAV.

청구항 57

제54항에 있어서, 프로모터가 CBA 프로모터인 rAAV.

청구항 58

제50항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 5'-ITR 및/또는 3'-ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

청구항 59

제58항에 있어서, 5'-ITR 서열 및 3'-ITR 서열이 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 60

제50항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열이 비-AAV2 공급원으로부터의 것인 rAAV.

청구항 61

제50항 내지 제55항 및 제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

청구항 62

제61항에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 63

제50항 내지 제55항 및 제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

청구항 64

제63항에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 65

제50항 내지 제54항 및 제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

청구항 66

제65항에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 7을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 67

제50항 내지 제54항 및 제56항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

청구항 68

제67항에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 69

제50항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 70

제69항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

청구항 71

제70항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 72

제70항에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

청구항 73

제50항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항 및 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

청구항 74

제73항에 있어서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 35의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 75

제50항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항 및 제65항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

청구항 76

제75항에 있어서, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 37의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 77

제50항 내지 제76항 중 어느 한 항에 있어서, 인핸서가 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 ApoE 인핸서로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 78

제77항에 있어서, 인핸서가 CMV 인핸서인 rAAV.

청구항 79

제50항 내지 제78항 중 어느 한 항에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, 프로메가 키메라 인트론, 또는 hFIX 인트론으로부터 선택되는 것인 rAAV.

청구항 80

제79항에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론 또는 rHBB 인트론인 rAAV.

청구항 81

제50항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항, 제69항 내지 제74항 및 제77항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (d)와 (e) 사이에 위치하는 인간 PCCA 5'-비번역 영역 (UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 82

제81항에 있어서, 인간 PCCA 5'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 30을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 83

제81항에 있어서, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 30의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 84

제50항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항, 제65항 내지 제72항 및 제75항 내지 제80항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소

(d)와 (e) 사이에 위치하는 인간 PCCB 5'-비번역 영역 (UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 85

제84항에 있어서, 인간 PCCB 5'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 32를 포함하는 것인 rAAV.

청구항 86

제84항에 있어서, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 32의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 87

제50항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항, 제69항 내지 제74항 및 제77항 내지 제83항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (f)와 (g) 사이에 위치하는 인간 PCCA 3'-비번역 영역 (UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 88

제87항에 있어서, 인간 PCCA 3'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 31을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 89

제87항에 있어서, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 31의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 90

제50항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항, 제65항 내지 제72항, 제75항 내지 제80항 및 제84항 내지 제86항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (f)와 (g) 사이에 위치하는 인간 PCCB 3'-비번역 영역 (UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 91

제90항에 있어서, 인간 PCCB 3'-UTR의 완전한 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 33을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 92

제90항에 있어서, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열이 서열식별번호: 33의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 93

제50항 내지 제92항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈이 게놈 요소 (e)의 상류의 컨센서스 코작 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 94

제93항에 있어서, 컨센서스 코작 서열이 서열식별번호: 24를 포함하는 것인 rAAV.

청구항 95

프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

(a) 5'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열;

(b) 인핸서 서열;

(c) 프로모터 서열;

(d) 인트론 서열;

(e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열 또는 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열;

(f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

(g) 3'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열.

청구항 96

제95항에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

청구항 97

제96항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

청구항 98

제96항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8로부터의 것인 rAAV.

청구항 99

제95항에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

청구항 100

프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

(a) 5'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열;

(b) 인핸서 서열;

(c) 프로모터 서열;

(d) 인트론 서열;

(e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열 또는 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열;

(f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

(g) 3'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열.

청구항 101

프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

(a) AAV2 5'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열;

(b) CMV 인핸서 서열;

(c) CBA 프로모터 서열;

(d) rHBB 또는 SV40 소형 T 인트론 서열;

(e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열 또는 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에

대한 코딩 서열;

(f) BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열; 및

(g) AAV2 3'-역전 말단 반복부 서열 (ITR) 서열.

청구항 102

제95항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (d)와 (e) 사이에 위치하는 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 103

제95항 내지 제101항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (d)와 (e) 사이에 위치하는 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 104

제95항 내지 제102항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (f)와 (g) 사이에 위치하는 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 105

제95항 내지 제101항 및 제103항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈 내의 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 패키징된 게놈이 벡터 게놈 요소 (f)와 (g) 사이에 위치하는 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

청구항 106

제95항 내지 제105항 중 어느 한 항에 있어서, 벡터 게놈이 게놈 요소 (e)의 상류의 컨센서스 코작 서열을 포함하는 것인 rAAV.

청구항 107

제106항에 있어서, 컨센서스 코작 서열이 서열식별번호: 24를 포함하는 것인 rAAV.

청구항 108

제1항 내지 제107항 중 어느 한 항의 rAAV 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

청구항 109

인간 대상체에게 제1항 내지 제107항 중 어느 한 항의 rAAV 또는 제108항의 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

청구항 110

인간 대상체에게 하기를 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법:

1. 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 제1항 내지 제7항, 제9항 내지 제16항, 제21항 내지 제25항, 제31항 내지 제37항, 제40항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항, 제69항 내지 제74항, 제77항 내지 제83항, 제87항 내지 제89항, 제93항 내지 제102항, 제104항, 제106항 및 제107항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량; 및/또는

2. 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴

리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제12항, 제17항 내지 제20항, 제26항 내지 제35항, 제38항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항, 제65항 내지 제72항, 제75항 내지 제80항, 제84항 내지 제86항, 제90항 내지 제101항, 제103항 및 제105항 내지 제107항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량.

청구항 111

제110항에 있어서, (1) 및 (2)의 조성물이 동시에, 순차적으로 또는 별개로 투여되는 것인 방법.

청구항 112

인간 대상체에게 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 제1항 내지 제7항, 제9항 내지 제16항, 제21항 내지 제25항, 제31항 내지 제37항, 제40항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항, 제69항 내지 제74항, 제77항 내지 제83항, 제87항 내지 제89항, 제93항 내지 제102항, 제104항, 제106항 및 제107항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

청구항 113

제112항에 있어서, PCCA 내의 상기 돌연변이가 표 1로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 114

인간 대상체에게 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제12항, 제17항 내지 제20항, 제26항 내지 제35항, 제38항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항, 제65항 내지 제72항, 제75항 내지 제80항, 제84항 내지 제86항, 제90항 내지 제101항, 제103항 및 제105항 내지 제107항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

청구항 115

제114항에 있어서, PCCB 내의 상기 돌연변이가 표 2로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 116

제109항 내지 제115항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV 또는 조성물이 피하로, 근육내로, 피내로, 복강내로 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 117

제116항에 있어서, rAAV 또는 조성물이 정맥내로 투여되는 것인 방법.

청구항 118

제109항 내지 제117항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV가 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{14}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 119

제118항에 있어서, rAAV가 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

청구항 120

제116항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV를 투여하는 것이 하기의 투여를 포함하는 것인 방법:

a.) 단일 용량의 rAAV; 또는

b.) 다중 용량의 rAAV.

청구항 121

서열식별번호: 16의 PCCA 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산으로서, 여기서 핵산 서열이 서열식별번호: 1의 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 것인 재조합 핵산.

청구항 122

제121항에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 123

제122항에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 124

서열식별번호: 17의 PCCB 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산으로서, 여기서 핵산 서열이 서열식별번호: 7의 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 것인 재조합 핵산.

청구항 125

제124항에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 126

제125항에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 127

서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 128

제127항에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 129

제128항에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 130

서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 131

서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 132

제131항에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 133

제132항에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는

것인 재조합 핵산.

청구항 134

서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열을 포함하는 재조합 핵산.

청구항 135

제121항 내지 제134항 중 어느 한 항에 있어서, 핵산 서열이 3' 단부에 TGA, TAA, 및 TAG로부터 선택된 하나 이상의 정지 코돈을 추가로 포함하는 것인 재조합 핵산.

청구항 136

제121항 내지 제135항 중 어느 한 항에 따른 재조합 핵산을 포함하는 rAAV.

청구항 137

제121항 내지 제135항 중 어느 한 항에 따른 재조합 핵산 또는 제136항의 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

청구항 138

제137항에 있어서, 상기 숙주 세포가 HeLa, Cos-7, HEK293, A549, BHK, Vero, RD, HT-1080, ARPE-19, 또는 MRC-5 세포로부터 선택되는 것인 숙주 세포.

청구항 139

제1항 내지 제7항, 제9항 내지 제16항, 제21항 내지 제25항, 제31항 내지 제37항, 제40항 내지 제55항, 제57항 내지 제64항, 제69항 내지 제74항, 제77항 내지 제83항, 제87항 내지 제89항, 제93항 내지 제102항, 제104항, 제106항 및 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 rAAV.

청구항 140

제1항 내지 제6항, 제8항 내지 제12항, 제17항 내지 제20항, 제26항 내지 제35항, 제38항 내지 제54항, 제56항 내지 제60항, 제65항 내지 제72항, 제75항 내지 제80항, 제84항 내지 제86항, 제90항 내지 제101항, 제103항 및 제105항 내지 제107항 중 어느 한 항에 있어서, 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 rAAV.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 관련 출원에 대한 상호 참조

[0002] 본 출원은 2018년 10월 1일에 출원된 미국 특허 가출원 번호 62/739,471을 우선권 주장하며, 그의 전체 개시내용은 이에 의해 모든 목적을 위해 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 양식으로 전자 제출되고 이에 의해 전문이 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2019년 9월 22일에 생성된 상기 ASCII 사본은 파일명이 ULP-001WO_SL_ST25.txt이고, 크기는 98,889 바이트이다.

[0005] 발명의 기술 분야

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 아데노-연관 바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스, 및 프로피온산혈증을 치료하기 위한 유전자 요법에서의 그의 사용 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] 프로피온산혈증 (PA), 일명 프로피온산뇨증은 홀수 쇄 지방산 및 프로피오제닉 아미노산, 특히 이소류신, 트레오닌, 메티오닌 및 발린에 대한 이화 경로에서의 핵심적인 단계인 프로피오닐-CoA를 (D)-메틸말로닐-CoA로전환시키는데 필요한 효소인 활성 프로피오닐-CoA 카르복실라제 (PCC)의 결핍에 의해 야기되는 유기산 대사의 선천적 오류이다. PCC 효소는 각각 PCCA 및 PCCB 유전자에 의해 코딩되는 2개의 동일하지 않은 서브유닛인 α 및 β로 구성된다. 프로피오닐-CoA 카르복실라제 결핍은 PCCA 또는 PCCB에서의 돌연변이로부터 초래될 수 있다. 한 연구에서, 30명의 PA 환자의 돌연변이 분석이 수행되었고, 15명의 환자가 α-서브유닛 결핍이었고 15명의 환자가 β-서브유닛 결핍이었음이 밝혀졌다. 문헌 [Yang *et al.*, 2004, *Mol Genet and Metab.* 81: 335-342]을 참조한다.

[0008] 미국에서 PA 추정 발생률은 1:105,000 내지 1:130,000이다. 이러한 드문 보통염색체 열성 대사 장애는 초기 신생아 기간에 영양공급 불량, 구토, 기면, 발작, 및 근육 긴장 결여를 나타낸다. 치료되지 않고 방치하면, 속발성 고암모니아혈증, 감염, 심근병증, 또는 기저핵 뇌졸중으로 인해 급속하게 사망이 발생할 수 있다. PA는 신생아에서 거의 즉각적으로 진단될 수 있고, 이러한 질환은 미국의 신생아 스크리닝 패널에 포함된다.

[0009] PA는 현재 아미노산 전구체의 식이 제한, 감소된 카르니틴 수준을 다루기 위한 L-카르니틴 보충, 및 장 박테리아에 의한 프로피온산 생산을 감소시키기 위한 항생제의 투여로 관리된다. 환자가 표준 치료에 의해 관리될 수 없는 상황에서 간 이식이 PA 관리에서 역할을 맡고 있다. 그러나, 영양, 보조인자 및 항생제 요법의 복합적인 조합을 통해 질환을 다루려는 공격적인 노력에도 불구하고, PA 환자의 장기 예후는 여전히 불량하다. 문헌 [van der Meer *et al.*, 1996, *Eur. J. Pediatr.* 155: 205-210]을 참조한다. 따라서, 질환의 근원적인 원인, 즉 PCC 결핍을 다루는 개선된 치료 접근법이 요구된다.

[0010] 본 발명은 PA 환자에게 기능성 PCCA 또는 PCCB 유전자를 전달하는 것을 매개하는 아데노-연관 바이러스 벡터의 생성을 통해 이러한 요구를 다룬다. 또한 본 발명은 PA 환자에게 기능성 PCCA 또는 PCCB 유전자를 전달하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)의 생성을 기재한다.

발명의 내용

[0011] 본 발명은 조성물 및 유전자 요법에서의 그의 사용 방법을 제공한다. 더욱 구체적으로, 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드, 및 PA 치료에 유용한 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)가 본원에서 제공된다.

[0012] 한 측면에서, 본 개시내용은 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-역전 말단 반복부 서열 (5'-ITR) 서열; (b) 프로모터 서열; (c) PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및 (d) 3'-역전 말단 반복부 서열 (3'-ITR) 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0013] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0014] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, AAV 5'-ITR 서열, 프로모터 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다.

[0015] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCA 5'-비번역 영역 (5'-UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCA 3'-비번역 영역 (3'-UTR) 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다.

[0016] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 서열식별번호(SEQ ID NO): 30으로 나타내어지는 완전한 인간 PCCA 5'-UTR을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 인간 PCCA 5'-UTR 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 30의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCA

5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 30의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCA 5'-UTR은 인트론 서열과 PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열 사이에 위치한다.

[0017] 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 서열식별번호: 31로 나타내어지는 완전한 인간 PCCA 3'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 인간 PCCA 3'-UTR 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 31의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 31의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCA 3'-UTR은 폴리아데닐화 신호 서열과 3'-ITR 서열 사이에 위치한다.

[0018] 한 실시양태에서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 야생형 코딩 서열이다. 대안적 실시양태에서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 코돈-최적화 코딩 서열이다. 한 예시적 실시양태에서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 인간에서의 발현에 대해 코돈-최적화된다.

[0019] 일부 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 의해 코딩된다. 또 다른 실시양태에서, PCCA의 천연 이소형 또는 변이체를 발현하는 코딩 서열, 예컨대 유니프롯KB(UniProtKB)/스위스-프롯(Swiss-Prot) 수탁 번호 P05165-1 (서열식별번호: 25), P05165-2 (서열식별번호: 26), 및 P05165-3 (서열식별번호: 27)에 제시된 것들이 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, PCCA는 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 예시적 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA는 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현된 PCCA는 서열식별번호: 16의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0020] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 프로모터 서열; (c) PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및 (d) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0021] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0022] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, AAV 5'-ITR 서열, 프로모터 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다.

[0023] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCB 5'-비번역 영역 (5'-UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCB 3'-비번역 영역 (3'-UTR) 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다.

[0024] 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 서열식별번호: 32로 나타내어지는 완전한 인간 PCCB 5'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 말단절단된 인간 PCCB 5'-UTR 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 32의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 32의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 100개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCB 5'-UTR은 인트론 서열과 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열 사이에 위치한다.

[0025] 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 서열식별번호: 33으로 나타내어지는 완전한 인간 PCCB 3'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 말단절단된 인간 PCCB 3'-UTR 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 33의 일부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 뉴클레오티드 서열은 서열식별번호: 33의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCB 3'-UTR은 폴리아데닐화 신호 서열과 3'-ITR 서열 사이에 위치한다.

[0026] 한 실시양태에서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 야생형 코딩 서열이다. 대안적 실시양태에서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 코돈-최적화 코딩 서열이다. 한 예시적 실시양태에서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 인간에서의 발현에 대해 코돈-최적화된다.

[0027] 일부 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 의해 코딩된다. 또 다른 실시양태에서, PCCB의 천연 이소형 또는 변이체를 발현하는 코딩 서열, 예컨대 유니프롯KB/스위스-프롯 수탁 번호 P05166-1 (서열식별번호: 28) 및 P05166-2 (서열식별번호: 29)에 제시된 것들이 사용될 수 있다. 대안적 실시양태에서, PCCB는 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 예시적 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB는 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 3' 단부에 정지 코돈(TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 발현된 PCCB는 서열식별번호: 17의 아미노산 서열을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0028] 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 3'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및 3'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열은 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 다른 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열은 비-AAV2 공급원으로부터의 것이다.

[0029] 한 실시양태에서, 프로모터는 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, CAG 프로모터 (CBA 유전자의 CMV 초기 인핸서 요소, 프로모터, 제1 엑손 및 제1 인트론, 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 억셉터를 사용하여 구축됨), PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터, 및 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 프로모터는 CBA 프로모터이다. 한 실시양태에서, CBA 프로모터는 서열식별번호: 18을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 유전자-특이적 내인성 프로모터이다. 한 일부 실시양태에서, 프로모터는 천연 유전자 프로모터 요소를 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 프로모터는 서열식별번호: 34의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이다. 한 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 프로모터는 서열식별번호: 36의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이다.

[0030] 일부 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 인핸서는 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 아포지질단백질 E(ApoE) 인핸서로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 인핸서는 CMV 인핸서이다. 한 실시양태에서, CMV 인핸서는 서열식별번호: 19를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 특정 실시양태에서, 인핸서는 프로모터 서열의 상류에 위치한다.

[0031] 일부 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함한다. 한 실시양태에서, 인트론은 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, β-글로빈/IgG 키메라 인트론 (프로메가(Promega) 키메라 인트론), 또는 hFIX 인트론으로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 인트론은 SV40 소형 T 인트론이다. 한 실시양태에서, SV40 소형 T 인트론 서열은 서열식별번

호: 20을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 인트론은 rHBB 인트론이다. 한 실시양태에서, rHBB 인트론 서열은 서열식별번호: 21을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0032] 일부 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 인트론 서열의 하류에 위치한다. 한 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 GCCGCC (서열식별번호: 24)이다. 특정 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 PCCA에 대한 코딩 서열의 상류에 위치한다. 특정 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 PCCB에 대한 코딩 서열의 상류에 위치한다.

[0033] 일부 실시양태에서, 패키징된 벡터 게놈은 폴리아데닐화 신호 서열을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열이다. 한 실시양태에서, BGH 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 SV40 폴리아데닐화 신호 서열이다. 한 실시양태에서, SV40 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열은 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 35의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열은 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열을 포함한다. 한 실시양태에서, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 37의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0034] 특정 실시양태에서, AAV 캡시드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것이다. 한 예시적 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV9로부터의 것이다. 또 다른 예시적 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV8로부터의 것이다. 또 다른 예시적 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV9 변이체 캡시드이다.

[0035] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 rAAV를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 rAAV를 제공한다.

[0036] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCA를 코딩하는 신규 코돈-최적화 핵산 서열을 제공한다. 한 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 2-6에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일하다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하고, 서열식별번호: 2-6에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 핵산 서열을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 PCCA를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 기능성 PCCA 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열식별번호: 2-6에 제시된 핵산 서열의 단편이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 핵산 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0037] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCB를 코딩하는 신규 코돈-최적화 핵산 서열을 제공한다. 한 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 8-12에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일하다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하고, 서열식별번호: 8-12에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 핵산 서열을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 PCCB를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 기능성 PCCB 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열식별번호: 8-12에 제시된 핵산 서열의 단편이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서,

PCCB를 코딩하는 핵산 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0038] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 PA의 치료에서 유전자 요법용 작용제로서 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 본원에 기재된 바와 같은 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 제공한다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV (즉, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10, 또는 AAVhu37)로부터의 것이다. 한 예시적 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 혈청형 9 (AAV9) 벡터, AAV9 변이체 벡터, AAV 혈청형 8 (AAV8) 벡터, 또는 AAV 혈청형 2 (AAV2) 벡터이다.

[0039] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0040] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0042] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) 5'-ITR 서열; (b) 인핸서 서열; (c) 프로모터 서열; (d) 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열; (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0043] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) AAV2 5'-ITR 서열; (b) CMV 인핸서 서열; (c) CBA 프로모터 서열; (d) rHBB 또는 SV40 소형 T 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열; (f) BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) AAV2 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0044] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 rAAV로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 (a) AAV2 5'-ITR 서열; (b) CMV 인핸서 서열; (c) CBA 프로모터 서열; (d) rHBB 또는 SV40 소형 T 인트론 서열; (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열; (f) BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열; 및 (g) AAV2 3'-ITR 서열을 포함하는 것인 rAAV를 제공한다.

[0045] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 5'-ITR 서열; (b) 프로모터 서열; (c) PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및 (d) 3'-ITR 서열을 포함하는 재조합 핵산 구축물을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 (a) 5'-ITR 서열; (b) 프로모터 서열; (c) PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및 (d) 3'-ITR 서열을 포함하는 재조합 핵산 구축물을 제공한다.

[0046] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PA의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCA에 대한 코딩 서열, BGH 폴리아데닐화 신호 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 일부

실시양태에서, 패키징된 게놈은 인트론 서열의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0047] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PA의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열 (예를 들어, PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터 서열), 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 PCCA 유전자-특이적 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열의 하류 및 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열의 상류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0048] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PA의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 한 예시적 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCB에 대한 코딩 서열, BGH 폴리아데닐화 신호 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 인트론 서열의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0049] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PA의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열 (예를 들어, PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터 서열), 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 PCCB 유전자-특이적 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열의 하류 및 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열의 상류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0050] 추가로 본 개시내용은 본원에 개시된 rAAV를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 피하, 근육내, 피내, 복강내, 또는 정맥내 투여용으로 제형된다. 한 예시적 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 투여용으로 제형된다.

[0051] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다. 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다.

[0052] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 (1) AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV; 및 (2) AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 별개로 투여될 수 있다.

[0053] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 (1) AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV; 및/또는; 및 (2) AAV 캡시드, 및 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 별개로 투여될 수 있다.

[0054] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, PCCA 내의 돌연변이는 표 1로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0055] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, PCCB 내의 돌연변이는 표 2로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0056] 일부 실시양태에서, rAAV는 피하로, 근육내로, 피내로, 복강내로 또는 정맥내로 투여된다. 한 예시적 실시양태에서, rAAV는 정맥내로 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{14}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여된다. 추가 실시양태에서, rAAV는 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, 단일 용량의 rAAV가 투여된다. 다른 실시양태에서, 다중 용량의 rAAV가 투여된다.

[0057] 일부 측면에서, 본원에 개시된 재조합 핵산 분자, AAV 벡터, 또는 rAAV를 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 구체적 실시양태에서, 숙주 세포는 AAV의 증식에 적절할 수 있다. 특정 실시양태에서, 숙주 세포는

HeLa, Cos-7, HEK293, A549, BHK, Vero, RD, HT-1080, ARPE-19, 또는 MRC-5 세포로부터 선택된다.

[0058] 본 발명의 이러한 측면 및 특색 및 다른 측면 및 특색이 본 개시내용의 하기 섹션에서 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0059] 하기 도면을 참조로 본 발명이 더 완전하게 이해될 수 있다

도 1은 한 실시양태에 따른, PCCA를 포함하는 예시적인 패키징된 벡터 게놈 구축물을 나타내는 설명적인 도식이다. 5'-ITR, CMV 인핸서, 닭 β-액틴 프로모터, SV40 소형 T 인트론, 컨센서스 코작 서열, PCCA 코딩 서열, SV40 폴리아데닐화 신호, 및 3'-ITR이 도식에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8로 표현된다.

도 2는 한 실시양태에 따른, PCCB를 포함하는 예시적인 패키징된 벡터 게놈 구축물을 나타내는 설명적인 도식이다. 5'-ITR, CMV 인핸서, 닭 β-액틴 프로모터, SV40 소형 T 인트론, 컨센서스 코작 서열, PCCB 코딩 서열, SV40 폴리아데닐화 신호, 및 3'-ITR이 도식에서 각각 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 및 8로 표현된다.

도 3은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로의 형질감염 후에 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCA RNA 발현에서의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다.

도 4a는 각각 레인 1에서 레인 7까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC365), 또는 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 4b는 각각 레인 1에서 레인 7까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 또는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC365)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (Huh7)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 5는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346)로 또는 그의 부재 하에 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)로부터 단리된 전체 세포 용해물 (WCL); 세포하 분획 (세포질 분획 (세포질); 및 미토콘드리아 분획 (미토콘드리아))에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 PCCA 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. 1X 및 2X는 로딩된 미토콘드리아 분획의 상대 부피를 나타낸다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 6은 좌측에서 우측으로, 연속 신장 세포주 (HEK293)의 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343); 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346); 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로의 삼중 형질감염 후에 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCA AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다; 각각은 AAV9 캡시드-발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현된다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, "처리 없음"으로서 표현된다.

도 7은 각각 좌측에서 우측으로 PCCA 및 PCCB-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC365), PCCA-발현 재조

합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC349, DTC348, DTC347, 또는 DTC346), 또는 eGFP-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC343)를 함유하는 친화력 정제된 AAV9 입자의 DNA 알칼리성 아가로스 겔의 영상이다.

도 8은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC370, DTC368, DTC369, 또는 DTC371)로의 형질감염 후에 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCB RNA 발현에서의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다.

도 9a는 각각 레인 1에서 레인 8까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 9b는 각각 레인 1에서 레인 8까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC369, DTC368, DTC370, 또는 DTC371)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (Huh7)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 10은 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366)로 또는 그의 부재 하에 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)로부터 단리된 전체 세포 용해물 (WCL); 세포하 분획 (세포질 분획 (세포질); 및 미토콘드리아 분획 (미토콘드리아))에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 PCCB 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. 1X 및 2X는 로딩된 미토콘드리아 분획의 상대 부피를 나타낸다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

도 11은 좌측에서 우측으로, 연속 신장 세포주 (HEK293)의 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343); 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366); 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로의 삼중 형질감염 후에 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCB AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다; 각각은 AAV9 캡시드 발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현된다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, "처리 없음"으로서 표현된다.

도 12는 각각 좌측에서 우측으로 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), eGFP-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC343), 또는 PCCB-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC366, DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)를 함유하는 친화력 정제된 AAV9 입자의 DNA 알칼리성 아가로스 겔의 영상이다.

도 13은 인간 PCCA의 완전한 천연 서열 (DTC346) 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)을 코딩하는 rAAV로의 처리 후의 야생형 FVB 마우스에서의 마우스 내인성 PCCA 발현에 대해 상대적인 인간 PCCA 단백질 발현의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 14는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열 (DTC346) 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)을 코딩하는 rAAV로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서 발현된 인간 야생형 PCCA 단백질의 농도 (nmol/g 단백질 단위)를 나타내는 막대 그래프이다. 열거된 백분율 숫자는 야생형 FVB 마우스의 내인성 PCCA 단백질 수준에 대한 백분율로서 계산된 인간 야생형 PCCA 발현을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 15는 평균 분당 카운트 (CPM) 데이터에 의해 측정된 바와 같은, 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 인간 PCCA 활성의 막대 그래

프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 열거된 백분율 숫자는 야생형 FVB 마우스에서 관찰된 것에 대해 상대적인 CPM 데이터를 기재한다. 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 **는 PBS-처리 군에 비교하여 $p<0.01$을 나타낸다.

도 16a-c는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 프로피온산혈증의 공지된 바이오마커의 농도를 나타내는 막대 그래프이다. **도 16a**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 C3 (프로피오닐카르니틴)의 혈장 농도를 나타내는 막대 그래프이다. **도 16b**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 혈장 C3/C2 농도 비 (프로피오닐카르니틴/아세틸카르니틴)의 막대 그래프이다. **도 16c**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 2-메틸시트레이트 (2MC)의 혈장 농도를 나타내는 막대 그래프이다. Pre는 rAAV 주사 0 내지 14일 전을 가리키고, 2W는 rAAV 주사 2주 후를 가리키고, 3W는 rAAV 주사 3주 후를 가리키고, 4W는 rAAV 주사 4주 후를 가리키며, 6W는 rAAV 주사 6주 후를 가리킨다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 **는 PBS-처리 군에 비교하여 $p<0.01$을 나타내고, ***는 PBS-처리 군에 비교하여 $p < 0.001$을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 본 발명은 치료 용도에 사용될 다양한 신규 작용제 및 조성물을 제공한다. 본 발명의 핵산 서열, 벡터, 재조합 바이러스, 및 연관된 조성물은 본원에 기재된 바와 같이 PA를 호전시키거나, 예방하거나 또는 치료하는데 사용될 수 있다.

[0061] 달리 언급되지 않는 한, 통상적인 용법에 따라 기술 용어가 사용된다. 분자 생물학에서의 통상적인 용어의 정의를 문헌 [Benjamin Lewin, *Genes V*, Oxford University Press, 1994] (ISBN 0-19-854287-9); [Kendrew et al. (eds.), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, Blackwell Science Ltd., 1994] (ISBN 0-632-02182-9); 및 [Robert A. Meyers (ed.), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, VCH Publishers, Inc., 1995] (ISBN 1-56081-569-8)에서 확인할 수 있다.

[0062] 본 개시내용의 다양한 실시양태의 검토를 용이하게 하기 위해, 특정 용어에 대한 하기의 설명이 제공된다:

[0063] 아데노-연관 바이러스 (AAV): 인간 및 일부 다른 영장류 종을 감염시키는, 복제-결손성이고 외피가 없는 소형 바이러스. AAV는 질환을 야기하는 것으로 공지되어 있지 않고, 매우 경미한 면역 반응을 유발한다. AAV를 이용하는 유전자 요법 벡터는 분열 중인 세포 및 휴지 세포 둘 다를 감염시킬 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로 통합되지 않으면서 염색체외 상태에서 지속될 수 있다. 이러한 특색은 AAV를 유전자 요법을 위한 매력적인 바이러스 벡터로 만든다. 현재 12가지의 AAV 혈청형이 인정되어 있다 (AAV1 - 12).

[0064] 투여/투여하다: 임의의 효과적인 경로에 의해, 대상체에게 작용제, 예컨대 치료제 (예를 들어, 재조합 AAV)를 제공함. 예시적인 투여 경로는 주사 (예컨대 피하, 근육내, 피내, 복강내, 및 정맥내), 경구, 관내, 설하, 직장, 경피, 비강내, 질 및 흡입 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0065] 코돈-최적화: "코돈-최적화" 핵산은 코돈이 특정한 시스템 (예컨대 특정한 종 또는 종 군)에서의 발현에 대해 최적이도록 변경된 핵산 서열을 지칭한다. 예를 들어, 핵산 서열은 포유동물 세포 또는 특정한 포유동물 종 (예컨대 인간 세포)에서의 발현에 대해 최적화될 수 있다. 코돈 최적화는 코딩된 단백질의 아미노산 서열을 변경시키지 않는다.

[0066] 인핸서: 프로모터의 활성을 증가시키는 것에 의해 전사율을 증가시키는 핵산 서열.

[0067] 인트론: 단백질에 대한 코딩 정보를 함유하지 않는 유전자 내의 DNA의 신장물. 인트론은 메신저 RNA의 번역 전에 제거된다.

[0068] 역전 말단 반복부 (ITR): 효율적인 복제에 요구되는 아데노-연관 바이러스의 게놈 내의 대칭 핵산 서열. ITR 서열은 AAV DNA 게놈의 각각의 단부에 위치한다. ITR은 바이러스 DNA 합성에 대한 복제 기원으로서의 역할을 하고, AAV 통합 벡터를 생성시키기 위한 필수적인 시스 요소이다.

[0069] 단리됨: "단리된" 생물학적 성분 (예컨대 핵산 분자, 단백질, 바이러스 또는 세포)은 이러한 성분이 천연적으로 발생하는 생물의 세포 또는 조직 내의 다른 생물학적 성분 또는 생물 자체, 예컨대 다른 염색체 및 염색체외 DNA 및 RNA, 단백질 및 세포로부터 실질적으로 분리 또는 정제되었다. "단리된" 핵산 분자 및 단백질은 표준

정제 방법에 의해 정제된 것들을 포함한다. 이러한 용어는 숙주 세포에서 재조합 발현에 제조된 핵산 분자 및 단백질, 뿐만 아니라 화학적으로 합성된 핵산 분자 및 단백질을 또한 포함한다.

[0070] 작동가능하게 연결됨: 제1 핵산 서열이 제2 핵산 서열과 기능적인 관계에 놓인 경우에 제1 핵산 서열은 제2 핵산 서열과 작동가능하게 연결된다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 또는 발현에 영향을 미치면 프로모터가 코딩 서열에 작동가능하게 연결된다. 일반적으로, 작동가능하게 연결된 DNA 서열은 연속적이고, 2개의 단백질-코딩 영역을 연결하는 것이 필요한 경우, 동일한 리딩 프레임 내에 있다.

[0071] 제약상 허용되는 담체: 본 개시내용에서 유용한 제약상 허용되는 담체 (비히클)는 통상적이다. 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975)]에 하나 이상의 치료 화합물, 분자 또는 작용제의 제약 전달에 적절한 조성물 및 제형이 기재되어 있다.

[0072] 일반적으로, 담체의 성질은 사용되는 특정한 투여 방식에 좌우될 것이다. 예를 들어, 일반적으로 비경구 제형은 제약상 및 생리학상 허용되는 유체 예컨대 물, 생리식염수, 평형 염 용액, 수성 덱스트로스, 글리세롤 등을 포함하는 주사가능한 유체를 비히클로서 포함한다. 고체 조성물, 예를 들어, 분말, 환제, 정제, 또는 캡슐 형태의 경우, 통상적인 비-독성 고체 담체는, 예를 들어, 제약 등급의 만니톨, 락토스, 전분, 또는 스테아르산마그네슘을 포함할 수 있다. 생물학적으로 중성인 담체에 더하여, 투여될 제약 조성물은 미량의 비-독성 보조 물질, 예컨대 습윤화제 또는 유화제, 방부제, 및 pH 완충제 등, 예를 들어, 아세트산나트륨 또는 소르비탄 모노라우레이트를 함유할 수 있다.

[0073] 질환의 예방, 치료 또는 호전: 질환 (예컨대 PA)을 "예방"하는 것은 질환의 완전한 발달을 억제하는 것을 지칭한다. "치료"는 질환 또는 병리학적 상태 (예컨대 PA)의 징후 또는 증상이 발달되기 시작한 후에 이를 호전시키는 치료적 개입을 지칭한다. "호전"은 질환 (예컨대 PA)의 징후 또는 증상의 수 또는 중증도의 감소를 지칭한다.

[0074] 프로모터: 핵산 (예를 들어, 유전자)의 전사를 지시하는/개시시키는 DNA 영역. 프로모터는 전사 개시 부위 근처에 필요한 핵산 서열을 포함한다. 다수의 프로모터 서열이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있고, 심지어 인공 핵산 분자 내의 상이한 프로모터 서열들의 조합물이 가능하다. 본원에서 사용된 바와 같이, 유전자-특이적 내인성 프로모터는 관심 대상인 내인성 유전자의 발현을 조절하는 천연 프로모터 요소를 지칭한다. 한 예시적 실시양태에서, PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터는 PCCA 유전자의 발현을 조절한다. 또 다른 예시적 실시양태에서, PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터는 PCCB 유전자의 발현을 조절한다.

[0075] 정제됨: 용어 "정제됨"은 절대적인 순도를 필요로 하지 않고, 오히려, 이는 상대적인 용어로 의도된다. 따라서, 예를 들어, 정제된 펩티드, 단백질, 바이러스, 또는 기타 활성 화합물은 천연적으로 연관된 단백질 및 다른 오염물로부터 전체적으로 또는 부분적으로 단리된 것이다. 특정 실시양태에서, 용어 "실질적으로 정제됨"은 초기 제제의 다양한 성분, 예컨대 단백질, 세포 잔해물 및 기타 성분을 제거하도록 세포, 세포 배양 배지 또는 기타 미정제 제제로부터 단리되고 분획화에 적용된 펩티드, 단백질, 바이러스 또는 기타 활성 화합물을 지칭한다.

[0076] 재조합: 재조합 핵산 분자는 천연 발생이 아닌 서열을 갖거나 또는 그렇지 않은 경우에는 분리된 2개의 서열 분절의 인공적인 조합에 의해 재조된 서열을 갖는 것이다. 이러한 인공적인 조합은 화학적 합성에 의해 또는 핵산 분자의 단리된 분절의 인공적인 조작에 의해, 예컨대 유전 공학 기술에 의해 달성될 수 있다.

[0077] 유사하게, 재조합 바이러스는 천연 발생이 아니거나 또는 적어도 2개의 상이한 기원의 서열의 인공적인 조합에 의해 제조된 서열 (예컨대 게놈 서열)을 포함하는 바이러스이다. 용어 "재조합"은 천연 핵산 분자, 단백질 또는 바이러스의 일부분의 부가, 치환, 또는 결실에 의해서만 변경된 핵산, 단백질 및 바이러스를 또한 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "재조합 AAV"는 재조합 핵산 분자 예컨대 PCCA를 코딩하는 재조합 핵산 분자 및/또는 PCCB를 코딩하는 재조합 핵산 분자가 패키징된 AAV 입자를 지칭한다.

[0078] 서열 동일성: 서열 사이의 동일성 또는 유사성의 관점에서 2개 이상의 핵산 서열 또는 2개 이상의 아미노산 서열 사이의 동일성 또는 유사성이 표현된다. 백분율 동일성의 관점에서 서열 동일성이 측정될 수 있다; 백분율이 더 높을수록, 서열이 더 동일하다. 백분율 유사성 (보존적 아미노산 치환을 고려함)의 관점에서 서열 유사성이 측정될 수 있다; 백분율이 더 높을수록, 서열이 더 많이 유사하다. 핵산 또는 아미노산 서열의 호모로그 또는 오르토로그는 표준 방법을 사용하여 정렬되는 경우에 비교적 높은 정도의 서열 동일성/유사성을 갖는다. 더 멀게 관련된 종 (예컨대 인간 및 씨. 엘레강스(*C. elegans*) 서열)에 비교하여, 오르토로그 단백질 또는 cDNA가 더 밀접하게 관련된 종 (예컨대 인간 및 마우스 서열)으로부터 유래되는 경우에 이러한 상동성이 더욱 유의

하다.

[0079] 비교를 위해 서열을 정렬하는 방법이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 다양한 프로그램 및 정렬 알고리즘이 문헌 [Smith & Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981]; [Needleman & Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443, 1970]; [Pearson & Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444, 1988]; [Higgins & Sharp, *Gene,* 73:237-44, 1988]; [Higgins & Sharp, *CABIOS*5:151-3, 1989]; [Corpet et al., *Nuc. Acids Res.* 16:10881-90, 1988]; [Huang et al. *Computer Appls. in the Biosciences* 8, 155-65, 1992]: 및 [Pearson et al., *Meth. Mol. Rio.* 24:307-31, 1994]에 기재되어 있다. 문헌 [Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990]은 서열 정렬 방법 및 상동성 계산의 상세한 고려사항을 제시한다.

[0080] 서열 분석 프로그램 blastp, blastn, blastx, tblastn 및 tblastx와 함께 사용하기 위해, NCBI의 베이직 로컬 얼라인먼트 서치 툴(Basic Local Alignment Search Tool) (BLAST) (Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10, 1990)가 국립 생물 정보 센터(National Center for Biological Information) (NCBI)를 포함하는 여러 출처로부터, 그리고 인터넷 상에서 입수가능하다. 추가적인 정보를 NCBI 웹 사이트에서 확인할 수 있다.

[0081] 혈청형: 특징적인 항원 세트에 의해 구별되는 일군의 밀접하게 관련된 미생물 (예컨대 바이러스).

[0082] 스터퍼 서열: 2개의 핵산 특색물 사이에서 (예컨대 프로모터와 코딩 서열 사이에서) 원하는 간격을 생성시키기 위해, 또는 핵산 분자를 원하는 길이의 것이도록 연장시키기 위해 전형적으로 사용되는, 대형 핵산 분자 (예컨대 벡터) 내에 함유된 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. 스터퍼 서열은 단백질 코딩 정보를 함유하지 않고, 미지의/합성 기원의 것일 수 있고/거나 대형 핵산 분자 내의 다른 핵산 서열에 관련되지 않을 수 있다.

[0083] 대상체: 살아 있는 다세포 척추동물 생물로, 인간 및 비-인간 포유동물을 포함하는 카테고리.

[0084] 합성: 실험실에서 인공 수단에 의해 생산되고, 예를 들어, 합성 핵산이 실험실에서 화학적으로 합성될 수 있다.

[0085] 비번역 영역 (UTR): 전형적인 mRNA는 각각 코딩 영역의 상류 및 하류에 5' 비번역 영역 ("5' UTR") 및 3' 비번역 영역 (3' UTR)을 함유한다 (문헌 [Mignone F. et al., (2002) *Genome Biol* 3:REVIEWS0004]을 참조한다).

[0086] 치료 유효량: 작용제로 치료 중인 대상체 또는 세포에서 원하는 효과를 달성하는데 충분한 특정 약제 또는 치료제 (예를 들어, 재조합 AAV)의 양. 작용제의 유효량은 치료 중인 대상체 또는 세포, 및 치료 조성물의 투여 방식을 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 요인에 좌우될 것이다.

[0087] 벡터: 벡터는 숙주 세포에서 복제되고/거나 통합되는 벡터의 능력을 파괴하지 않으면서 외래 핵산의 삽입을 허용하는 핵산 분자이다. 벡터는 이를 숙주 세포에서 복제되도록 허용하는 핵산 서열, 예컨대 복제 기원을 포함할 수 있다. 벡터는 하나 이상의 선별가능한 마커 유전자 및 기타 유전 요소를 또한 포함할 수 있다. 발현 벡터는 삽입된 유전자 또는 유전자들의 전사 및 번역을 허용하도록 필요한 조절 서열을 함유하는 벡터이다. 본원에서의 일부 실시양태에서, 벡터는 AAV 벡터이다.

[0088] 달리 설명되지 않는 한, 본원에서 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 개시내용이 속하는 분야의 통상의 기술자가 통상적으로 이해하는 바와 동일한 의미를 갖는다. 단수형 용어는 문맥적으로 명백하게 달리 지시되지 않는 한 복수의 지시대상을 포함한다. "A 또는 B를 포함함"은 A, 또는 B, 또는 A 및 B를 포함하는 것을 의미한다. 핵산 또는 폴리펩티드에 제공된 모든 염기 크기 또는 아미노산 크기, 및 모든 분자량 또는 분자 질량 값은 근사값이고, 설명을 위해 제공된다는 것을 추가로 이해하여야 한다. 본원에 기재된 것과 유사하거나 등가인 방법 및 물질이 본 개시내용의 실행 또는 테스트에서 사용될 수 있지만, 적절한 방법 및 물질이 하기에 기재된다. 본원에서 언급된 모든 간행물, 특허 출원, 특히, 및 기타 참고문헌은 전문이 참고로 포함된다. 상충되는 경우, 용어 설명을 포함하는 본 명세서가 우선할 것이다. 추가적으로, 물질, 방법 및 예는 예시적일 뿐이고, 제한적인 것으로 의도되지 않는다.

[0089] <u>바이러스 벡터:</u>

[0090] 일부 측면에서, 본 개시내용은 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터로서, AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 AAV를 제공한다.

[0091] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCA 3'-UTR 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키

징된 게놈을 함유하는 AAV 벡터를 제공한다.

[0092] 일부 측면에서, 본 개시내용은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 AAV 벡터를 제공한다.

[0093] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCB 3'-UTR 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 AAV 벡터를 제공한다.

[0094] 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 본원에 기재된 바와 같은 인핸서, 인트론, 컨센서스 코작 서열, 및/또는 폴리아데닐화 신호를 추가로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 벡터는 하나 이상의 스터퍼 핵산 서열을 추가로 포함할 수 있다. 한 실시양태에서, 스터퍼 핵산 서열은 인트론과 PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열 사이에 위치한다.

[0095] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, 재조합 바이러스 벡터는 AAV 벡터이다. AAV 벡터는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 또는 12의 AAV 벡터 (즉, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 또는 AAV12), 뿐만 아니라 인간 및 비-인간 영장류 조직으로부터 단리된 100개를 초과하는 변이체 중 어느 하나일 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Choi *et al.*, 2005, *Curr Gene Ther.* 5: 299-310, 2005] 및 [Gao *et al.*, 2005, *Curr Gene Ther.* 5: 285-297]을 참조한다. 임의의 혈청형의 AAV 벡터가 본 발명에서 사용될 수 있고, AAV 혈청형의 선택은 유전자 요법을 위해 표적화되는 세포 유형(들)에 부분적으로 좌우될 것이다. PA의 치료를 위해, 간이 관련된 표적 기관 중 하나이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 혈청형 9 (AAV9), 혈청형 8 (AAV8), 또는 그의 변이체로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, AAV 벡터는 혈청형 9 (AAV9) 또는 그의 변이체이다.

[0096] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV 및 아데노바이러스 헬퍼 기능이 트랜스로 제공되는 경우에 벡터 DNA 복제 기원 및 벡터 게놈의 패키징 신호 둘 다로서 기능하는 AAV ITR 서열을 포함한다. 추가적으로, ITR은 대형 Rep 단백질에 의한 단일 가닥 엔도뉴클레아틱 닉킹에 대한 표적으로서의 역할을 하여, 개별적인 게놈을 복제 중간체로부터 분해한다.

[0097] 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 3'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및 3'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열은 AAV2로부터의 것이고, 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 다른 실시양태에서, 5'-ITR 서열 및/또는 3'-ITR 서열은 비-AAV2 공급원으로부터의 것이다.

[0098] 일부 예시적 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 혈청형 9 (AAV9) 벡터이고, 벡터는 본원에 기재된 인핸서, 프로모터, 인트론, PCCA 또는 PCCB에 대한 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV9 벡터는 2개의 AAV2, AAV8, 또는 AAV9 역전 말단 반복부 (ITR) 서열을 추가로 포함한다: 인핸서의 5'의 1개 및 폴리아데닐화 신호의 3'의 1개. 한 예시적 실시양태에서, AAV9 벡터는 2개의 AAV2 역전 말단 반복부 (ITR) 서열을 포함한다: 인핸서의 5'의 1개 및 폴리아데닐화 신호의 3'의 1개. 일부 실시양태에서, AAV2 ITR 서열은 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, AAV9 벡터는 2개의 AAV9 역전 말단 반복부 (ITR) 서열을 포함한다: 인핸서의 5'의 1개 및 폴리아데닐화 신호의 3'의 1개.

[0099] 프로모터:

[0100] 본원에 기재된 다양한 측면에서, 트랜스진 발현, 예를 들어, PCCA 또는 PCCB의 발현을 구동시키고 조절하는 것을 돕는 프로모터 서열을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 바이러스 벡터가 제공된다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, CAG 프로모터, PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터, 및 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터로부터 선택된다. 예시적 실시양태에서, 프로모터 서열은 선택된 5'-ITR 서열과 PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 프로모터 서열은 인핸서 서열의 하류에 위치한다. 일부 실시양태에서, 프로모터 서열은 인트론 서열의 상류에 위치한다. 일부 실시양태에서, 프로모터 서열은 선택된 5'-ITR 서열과 인간 PCCA 또는 인간 PCCB 5'-비번역 영역 (UTR)의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한다.

[0101] 일부 예시적 실시양태에서, 편재성 닭 β-액틴 프로모터 (CBA)가 사용되며, 이는 임의적으로 CMV 극초기 인핸서

(CMV IE)의 하류에 위치할 수 있다. 일부 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 천연 PCCA 또는 PCCB 프로모터 요소를 포함한다. 일부 예시적 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 패키징된 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 서열식별번호: 34의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 서열식별번호: 34의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어 약 30개, 약 45개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개, 약 130개, 약 140개, 약 150개, 약 160개, 약 170개, 약 180개, 약 190개, 약 200개, 약 210개, 약 220개, 약 230개, 약 240개, 약 250개, 약 260개, 약 270개, 약 280개, 약 290개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 400개, 약 425개, 약 450개, 약 475개, 약 500개, 약 525개, 약 550개, 약 575개, 약 600개, 약 625개, 약 650개, 약 675개, 약 700개, 약 725개, 또는 약 750개)의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다. 일부 예시적 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 서열식별번호: 34의 동등 길이 영역에 100% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다.

[0102] 일부 예시적 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 서열식별번호: 36의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 서열식별번호: 36의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어 약 30개, 약 45개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개, 약 130개, 약 140개, 약 150개, 약 160개, 약 170개, 약 180개, 약 190개, 약 200개, 약 210개, 약 220개, 약 230개, 약 240개, 약 250개, 약 260개, 약 270개, 약 280개, 약 290개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 375개, 약 400개, 약 425개, 또는 약 450개)의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다. 일부 예시적 실시양태에서, 본원에 기재된 패키징된 게놈은 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 서열식별번호: 36의 동등 길이 영역에 100% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함하는 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터를 포함한다.

[0103] 일부 실시양태에서, 프로모터는 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 (CMV) 극초기 유전자 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, 및 CAG 프로모터로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 프로모터는 CBA 프로모터이다. 한 실시양태에서, CBA 프로모터는 서열식별번호: 18을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0104] 프로모터에 더하여, 패키징된 게놈은 다른 적합한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 및 효율적인 RNA 프로세싱 신호를 함유할 수 있다. 하기에 추가로 상세하게 기재된 바와 같이, 이같은 서열은 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리 A) 신호, 발현을 강화하는 조절 요소 (즉, WPRE), 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열, 번역 효율을 강화하는 서열 (즉, 코작 컨센서스 서열), 및 단백질 안정성을 강화하는 서열을 포함한다.

[0105] 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 인트론 서열의 하류에 위치한다. 한 실시양태에서, 컨센서스 코작 서열은 GCCGCC (서열식별번호: 24)이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자가 이해할 바와 같이, 컨센서스 코작 서열은 전형적으로 코딩 서열의 바로 상류, 이러한 경우에는 PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열의 바로 상류에 위치한다. 통상의 기술자가 이해할 바와 같이, 컨센서스 코작 서열은 치료 폴리펩티드, 예를 들어, PCCA 또는 PCCB의 개시 코돈에 상응하는 ATG 잔기를 공유하는 것으로 간주될 수 있다. 개시내용의 단순성을 위해, 본원에 기재된 바와 같이, 컨센서스 코작 서열은 치료 폴리펩티드, 예를 들어, PCCA 또는 PCCB와 공유되지 않는 영역에 상응하는 6-뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0106] 비번역 영역 (UTR):

[0107] 번역 개시 인자 및 리보솜에 대해 세포 전사체와 경쟁하고, mRNA 붕괴 또는 전사후 유전자 침묵화를 최소화함으로써 mRNA 반감기를 증가시키며, 조절 단백질 또는 억제성 RNA 2차 구조와의 해로운 상호작용을 방지하는 것에 의해, 내인성 유전자-특이적 mRNA로부터의 5'-비번역 영역 (UTR)이 트랜스진 생산을 최적화하는 것에서 중요한 역할을 하는 것으로 공지되었다 (문헌 [Chiba, Y., and Green, P. (2009). *J. Plant Biol.* 52, 114-124], [Moore, M. J., and Proudfoot, N. J. (2009). *Cell* 136, 688-700], [Jackson, R. J. et al. (2010). *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11, 113-127]을 참조한다). 단백질 코딩 서열의 하류에 위치하는 3'-비번역 영역 (3'-

UTR)은 전사체 절단, 안정성 및 폴리아데닐화, 번역, 및 mRNA 국재화를 포함하는 다수의 조절 프로세스에서 수반되는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 이들은 mRNA의 운명을 결정하는데 결정적이다 (문헌 [Barrett, L.W. et al. (2012). *Cell Mol Life Sci.* Nov; 69(21): 3613-3634]을 참조한다). 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 PCCA 또는 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 rAAV를 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 PCCA 또는 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 rAAV를 제공한다.

[0108] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCA 3'-UTR 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-역전 말단 반복부 서열 (ITR)을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 rAAV를 제공한다.

[0109] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 말단절단된 또는 완전한 인간 PCCB 3'-UTR 뉴클레오티드 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 rAAV를 제공한다.

[0110] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 서열식별번호: 30으로 표현되는 완전한 인간 PCCA 5'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 서열식별번호: 32로 표현되는 완전한 인간 PCCB 5'-UTR을 포함한다.

[0111] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 천연 인간 PCCA 5'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단절단된 인간 PCCA 5'-UTR은 서열식별번호: 30의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 50개의 연속 뉴클레오티드 내지 약 1400개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 75개, 약 100개, 약 125개, 약 150개, 약 175개, 약 200개, 약 250개, 약 275개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 400개, 약 425개, 약 450개, 약 475개, 약 500개, 약 525개, 약 550개, 약 575개, 약 600개, 약 625개, 약 650개, 약 675개, 약 700개, 약 725개, 약 750개, 약 775개, 약 800개, 약 825개, 약 850개, 약 900개, 약 925개, 약 950개, 약 975개, 약 1000개, 약 1025개, 약 1050개, 약 1075개, 약 1100개, 약 1125개, 약 1150개, 약 1175개, 약 1200개, 약 1225개, 약 1250개, 약 1275개, 약 1300개, 약 1325개, 또는 약 1350개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0112] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 천연 인간 PCCB 5'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단절단된 인간 PCCB 5'-UTR은 서열식별번호: 32의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 50개의 연속 뉴클레오티드 내지 약 1400개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 75개, 약 100개, 약 125개, 약 150개, 약 175개, 약 200개, 약 250개, 약 275개, 약 300개, 약 325개, 약 350개, 약 400개, 약 425개, 약 450개, 약 475개, 약 500개, 약 525개, 약 550개, 약 575개, 약 600개, 약 625개, 약 650개, 약 675개, 약 700개, 약 725개, 약 750개, 약 775개, 약 800개, 약 825개, 약 850개, 약 900개, 약 925개, 약 950개, 약 975개, 약 1000개, 약 1025개, 약 1050개, 약 1075개, 약 1100개, 약 1125개, 약 1150개, 약 1175개, 약 1200개, 약 1225개, 약 1250개, 약 1275개, 약 1300개, 약 1325개, 또는 약 1350개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0113] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 서열식별번호: 31에 의해 표현되는 완전한 인간 PCCA 3'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 서열식별번호: 33에 의해 표현되는 완전한 인간 PCCB 3'-UTR을 포함한다.

[0114] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 천연 인간 PCCA 3'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단절단된 인간 PCCA 3'-UTR은 서열식별번호: 31의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 30개, 약 45개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개, 약 130개, 약 140개, 약 150개, 약 160개, 약 170개, 약 180개, 약 190개, 약 200개, 약 210개, 약 220개, 약 230개, 약 240개, 약 250개, 약 260개, 약 270개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 패키징된 게놈은 말단절단된 천연 인간 PCCB 3'-UTR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 말단절단된 인간 PCCB 3'-UTR은 서열식별번호: 33의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 30개, 약 45개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개, 약 130개, 약 140개, 또는 약 150개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0116] PCCA 또는 PCCB 폴리펩티드:

[0117] 본원에 기재된 바와 같이, 본 발명의 측면은 AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 포함하는 재조합 벡터를 제공한다. AAV 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능

성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 AAV 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 포함하는 재조합 벡터가 본원에서 추가로 기재된다.

[0118] 한 실시양태에서, PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 야생형 코딩 서열이다. 본원에서 기재된 바와 같이, 용어 "야생형"은 천연에 존재하는 생체중합체 (예를 들어, 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열)와 동일한 생체중합체 (예를 들어, 폴리펩티드 서열 또는 폴리뉴클레오티드 서열)를 지칭한다.

[0119] 대안적 실시양태에서, PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 코돈-최적화 코딩 서열이다. 한 실시양태에서, PCCA 또는 PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열은 인간에서의 발현에 대해 코돈-최적화된다.

[0120] 본원에 기재된 다양한 실시양태에서, PCCA 또는 PCCB에 대한 코딩 서열을 포함하는 패키징된 게놈을 함유하는 벡터가 제공된다. 본원에 기재된 벡터로 전달되는 폴리펩티드는 인간을 포함하는 포유동물의 치료에서 유용할 수 있는 PCCA 및 PCCB 폴리펩티드를 포함한다.

[0121] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터로 발현되는 폴리펩티드는 PCCA (서열식별번호: 16; 진뱅크(GenBank) 수탁 번호 NP_000273.2; 728개의 아미노산) 또는 그의 기능성 단편, 기능성 변이체 또는 기능성 이소형이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터로 발현되는 폴리펩티드는 PCCA이고, 서열식별번호: 16을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0122] 한 실시양태에서, PCCA 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 의해 코딩된다. 또 다른 실시양태에서, PCCA의 천연 이소형 또는 변이체를 발현하는 코딩 서열, 예컨대 유니프롯KB/스위스-프롯 수탁 번호 P05165-1 (서열식별번호: 25), P05165-2 (서열식별번호: 26), 및 P05165-3 (서열식별번호: 27)에 제시된 것들이 사용될 수 있다. 대안적 실시양태에서, PCCA 폴리펩티드는 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA 폴리펩티드는 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 예시적 실시양태에서, PCCA 폴리펩티드는 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0123] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터로 발현되는 폴리펩티드는 PCCB (서열식별번호: 17; 진뱅크 수탁 번호 NP_000523.2; 539개의 아미노산) 또는 그의 기능성 단편, 기능성 변이체 또는 기능성 이소형이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터로 발현되는 폴리펩티드는 PCCB이고, 서열식별번호: 17을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0124] 한 실시양태에서, PCCB 폴리펩티드는 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 의해 코딩된다. 또 다른 실시양태에서, PCCB의 천연 이소형 또는 변이체를 발현하는 코딩 서열, 예컨대 유니프롯KB/스위스-프롯 수탁 번호 P05166-1 (서열식별번호: 28) 및 P05166-2 (서열식별번호: 29)에 제시된 것들이 사용될 수 있다. 대안적 실시양태에서, PCCB 폴리펩티드는 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB 폴리펩티드는 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 예시적 실시양태에서, PCCB 폴리펩티드는 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코돈-최적화 코딩 서열에 의해 코딩된다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0125] 다양한 측면에서, 본 발명은 본원에 기재된 PCCA 또는 PCCB 폴리펩티드의 단편, 변이체, 이소형, 또는 융합물을 전달하는데 사용될 수 있다.

[0126] 일부 실시양태에서, 본 발명은 PCCA 또는 PCCB 폴리펩티드의 단편을 전달하는데 사용될 수 있으며, 이는 적어도 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 또는 600개의 아미노산 잔기를 포함하고, 전장 폴리펩티드와 연관된 하나 이상의 활성 (예를 들어, 효소의 경우 촉매 활성)을 유지한다. 이같은 단편은 관련 기술분야에서 일상적이고 널리 공지되어 있는 재조합 기술에 의해 수득될 수 있다. 또한, 이같은 단편을 숙련된 기술자에게 공지된 일상적인 시험관 내 검정법에 의해 촉매 활성에 대해 테스트할 수 있다. 예를 들어, (1) 폴리펩티드를 1 mM 2-메르캅토에탄올 및 0.1 mg/ml의 소 혈청 알부민을 함유하는 10 mM 포스페이트 완충제 (pH 7.0)에 희석하고, (2) 50 mM 트리스-HCl pH 8.0, 5 mM 글루타티온, 2 mM ATP, 100 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM [^{14}C]-바이카르보네이트 (비 활성 12.4 mCi/mmol), 3 mM 프로피오닐-CoA를 함유하는 표준 반응 혼합물을 취하고, 효소를 37℃에서 15분 동안 인큐베이션하고, (3) 10% 트리클로로아세트산을 첨가하여 반응을 정지시키

고, (4) 200 x g에서 원심분리하고, (5) 가열 램프 하에 분취량을 건조시키고, (6) 물에 용해시키고, (7) 아쿠아솔(Aquasol)에서 카운팅하는 것에 의해 프로피오닐-CoA 카르복실라제 (PCC) 활성을 검정할 수 있으며, 여기서 1 유닛의 효소 활성은 37℃에서 1 pmol의 바이카르보네이트/분의 고정을 촉매하는 효소의 양으로서 정의된다. PCC 활성 검정법의 설명에 대해 문헌 [Kalousek *et al.*, 1980, *J Biol Chem* 255(1): 60-65] 및 [Hsia *et al.*, 1973 *J. Pediatr.* 83: 625-628]을 참조한다. 본 발명은 상기 기재된 폴리펩티드 단편을 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함한다.

[0127] 일부 실시양태에서, 본 발명은 PCCA 또는 PCCB 폴리펩티드의 변이체를 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 폴리펩티드는 야생형 치료 폴리펩티드, 예를 들어, 서열식별번호: 16의 야생형 PCCA 폴리펩티드 또는 서열식별번호: 17의 야생형 PCCB 폴리펩티드에 적어도 80% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100%) 동일할 수 있다. 일부 실시양태에서, 변이체 치료 폴리펩티드는 각각의 야생형 폴리펩티드에 비교하여 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 또는 40개의 상이한 잔기를 가질 수 있다. 이같은 변이체는 관련 기술분야에서 일상적이고 널리 공지되어 있는 재조합 기술에 의해 수득될 수 있다. 또한, 이같은 변이체를 숙련된 기술자에게 공지된 일상적인 시험관 내 검정법에 의해 촉매 활성에 대해 테스트할 수 있다. 예를 들어, 프로피오닐-CoA 카르복실라제 활성 검정법의 설명에 대해 문헌 [Kalousek *et al.*, 1980, *J Biol Chem* 255(1): 60-65] 및 [Hsia *et al.*, 1973 *J. Pediatr.* 83: 625-628]을 참조한다. 본 발명은 상기 기재된 치료 폴리펩티드 변이체를 코딩하는 핵산 분자를 추가로 포함한다.

[0128] 신규 코돈-최적화 서열:

[0129] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCA를 코딩하는 신규 코돈-최적화 핵산 서열을 제공한다. 한 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 2-6에 적어도 80% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100%) 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 100% 동일하다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 1에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하고, 서열식별번호: 2-6에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 핵산 서열을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 PCCA를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 기능성 PCCA 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열식별번호: 2-6에 제시된 핵산 서열의 단편이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, PCCA를 코딩하는 핵산 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0130] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCB를 코딩하는 신규 코돈-최적화 핵산 서열을 제공한다. 한 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 8-12에 적어도 80% (예를 들어, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8%, 99.9%, 또는 100%) 동일하다. 일부 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 코돈-최적화 핵산 서열은 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 100% 동일하다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 7에 제시된 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일하고, 서열식별번호: 8-12에 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 이상 동일한 핵산 서열을 제공한다. 예시적 실시양태에서, 본 개시내용은 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 PCCB를 코딩하는 핵산 서열을 제공한다. 기능성 PCCB 활성을 갖는 폴리펩티드를 코딩하는 서열식별번호: 8-12에 제시된 핵산 서열의 단편이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, PCCB를 코딩하는 핵산 서열은 3' 단부에 정지 코돈 (TGA, TAA, 또는 TAG)을 추가로 포함할 수 있다.

[0131] 벡터 게놈 요소:

[0132] 일부 실시양태에서, rAAV는 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함하는 패키징된 벡터 게놈을 함유한다. 한 실시양태에서, 인핸서는 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 ApoE 인핸서로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 인핸서는 CMV 인핸서이다. 한 실시양태에서, CMV 인핸서는 서열식별번호: 19를 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0133] 일부 실시양태에서, rAAV는 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함하는 패키징된 벡터 게놈을 함유한다. 한 실시양태에서, 인트론은 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈

IVS2 인트론, 프로메가 키메라 인트론, 또는 hFIX 인트론으로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 인트론은 SV40 소형 T 인트론이다. 한 실시양태에서, SV40 소형 T 인트론 서열은 서열식별번호: 20을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 인트론은 rHBB 인트론이다. 한 실시양태에서, rHBB 인트론 서열은 서열식별번호: 21을 포함하거나 또는 그로 이루어진다.

[0134] 일부 실시양태에서, rAAV는 폴리아데닐화 신호 서열을 추가로 포함하는 패키징된 벡터 게놈을 함유한다. 한 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택된다. 한 예시적 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열이다. 한 실시양태에서, BGH 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 SV40 폴리아데닐화 신호 서열이다. 한 실시양태에서, SV40 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어진다. 한 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호 서열은 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 서열이다. 한 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCA에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열은 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이다. 특정 실시양태에서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 35의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 35의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 약 100개, 약 110개, 약 120개, 약 130개, 약 140개, 약 150개, 또는 약 160개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 예시적 실시양태에서, 벡터 게놈 내의 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 PCCB에 대한 것인 경우에 폴리아데닐화 신호 서열은 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이다. 특정 실시양태에서, PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 37의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 적어도 15개의 연속 뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열은 서열식별번호: 37의 동등 길이 영역에 적어도 95% 동일한, 약 15개의 연속 뉴클레오티드 (예를 들어, 약 20개, 약 30개, 약 40개, 약 50개, 약 60개, 약 70개, 약 80개, 약 90개, 또는 약 100개)의 뉴클레오티드 서열을 포함한다.

[0135] AAV 캡시드:

[0136] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 본원에 기재된 바와 같은 벡터 게놈을 포함하는, PA의 치료에서 유전자 요법을 위한 작용제로서 유용한 rAAV를 제공한다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV (즉, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh10, 또는 AAVhu37)로부터의 것이다. 한 예시적 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV 혈청형 9 (AAV9) 벡터, AAV9 변이체 벡터, AAV 혈청형 8 (AAV8) 벡터, 또는 AAV 혈청형 2 (AAV2) 벡터이다.

[0137] AAV9 캡시드는 다중 AAV9 vp 단백질로 구성된 자가-조립 AAV 캡시드이다. 전형적으로 AAV9 vp 단백질은 서열식별번호: 14 (진뱅크 수탁: AAS99264)의 vp1 아미노산 서열을 코딩하는, 서열식별번호: 13의 핵산 서열 또는 이에 대해 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99%인 서열에 의해 코딩되는 별법적인 스플라이스 변이체로서 발현된다. 이러한 스플라이스 변이체들은 서열식별번호: 14의 상이한 길이의 단백질들을 초래한다. 특정 실시양태에서, AAV9 캡시드는 AAS99264에 99% 동일하거나 또는 서열식별번호: 14에 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 AAV를 포함한다. 미국 특허 번호 7,906,111, 및 WO/2005/033321을 또한 참조한다. 본원에서 사용된 바와 같이, AAV9 변이체는, 예를 들어, WO/2016/049230, 미국 특허 번호 8,927,514, 미국 특허 공개 번호 2015/0344911, 및 미국 특허 번호 8,734,809에 기재된 것들을 포함한다.

[0138] 본원에서 지시된 바와 같이, AAV9 서열 및 단백질이 rAAV의 생산에서 유용하다. 그러나, 다른 실시양태에서, 또 다른 AAV 캡시드가 선택된다. 캡시드 유형에 의해 조직 특이성이 결정된다. 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, AAVrh8을 포함하여, 적절한 표적 (예를 들어, 간, 근육, 폐 또는 CNS)에 형질도입되는 AAV 혈청형이 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 공급원으로서 선택될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2007/0036760; 미국 특허 공개 번호 2009/0197338; 및 EP1310571을 참조한다. WO 2003/042397 (AAV7 및 기타 유인원 AAV), 미국 특허 번호 7282199 및 7790449 (AAV8)를 또한 참조한다. 추가적으로, 아직 발견되지 않은 AAV, 또는 그를 기초로 하는 재

조합 AAV가 AAV 캡시드의 공급원으로서 사용될 수 있다. 이러한 문서들은 AAV를 생성시키는데 선택될 수 있는 다른 AAV를 또한 기재하고, 참조로 포함된다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터에서 사용하기 위한 AAV 캡시드는 상기 언급된 AAV 캡시드 또는 그의 코딩 핵산 중 하나의 돌연변이유발에 의해 (즉, 삽입, 결실 또는 치환에 의해) 생성될 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 2개 또는 3개 또는 4개 이상의 상기 언급된 AAV 캡시드 단백질로부터의 도메인을 포함하는 키메라이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 2 또는 3개의 상이한 AAV 또는 재조합 AAV로부터의 Vp1, Vp2, 및 Vp3 단량체의 모자이크이다. 일부 실시양태에서, rAAV 조성물은 1개를 초과하는 상기 언급된 캡시드를 포함한다.

[0139] 재조합 핵산 분자를 포함하는 숙주 세포:

[0140] 일부 측면에서, 본원에 개시된 재조합 핵산 분자, 바이러스 벡터, 예를 들어, AAV 벡터, 또는 rAAV를 포함하는 숙주 세포가 본원에서 제공된다. 구체적 실시양태에서, 숙주 세포는 AAV의 증식에 적절할 수 있다.

[0141] 광범위한 숙주 세포, 예컨대 박테리아, 효모, 곤충, 포유동물 세포 등이 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 재조합 AAV (rAAV)의 생산에 적합한 세포 (또는 세포주), 예를 들어, HeLa, Cos-7, HEK293, A549, BHK, Vero, RD, HT-1080, ARPE-19, 또는 MRC-5 세포일 수 있다.

[0142] 재조합 핵산 분자 또는 벡터는 관련 기술분야에 공지되어 있는 임의의 적합한 방법을 사용하여 숙주 세포 내로 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 재조합 핵산 분자 또는 벡터가 그의 게놈 내로 삽입된 안정적인 숙주 세포주가 생성된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 rAAV 벡터를 함유하는 안정적인 숙주 세포주가 생성된다. rAAV 벡터가 숙주 배양물 내로 형질감염된 후, 숙주 게놈 내로의 rAAV의 통합을 다양한 방법, 항생제 선별, 형광-활성화 세포 분류, 서던 블롯, PCR 기반 검출, 형광 원위치 혼성화 (문헌 [Nakai et al., Nature Genetics (2003) 34, 297-302]; [Philpott et al., Journal of Virology (2002) 76(11):5411-5421], 및 [Howden et al., J Gene Med 2008; 10:42-50]에 기재된 바와 같음)에 의해 검정할 수 있다. 또한, 관련 기술분야에 널리 공지되어 있는 프로토콜, 예컨대 문헌 [Clark, Kidney International Vol 61 (2002):S9-S15], 및 [Yuan et al., Human Gene Therapy 2011 May;22(5):613-24]에 기재된 것들에 따라 안정적인 세포주가 확립될 수 있다.

[0143] 유전자 요법용 재조합 AAV:

[0144] AAV는 파보비리다에(Parvoviridae) 과 및 디펜도바이러스(*Dependovirus*) 속에 속한다. AAV는 선형 단일-가닥 DNA 게놈을 패키징하는, 외피가 없는 소형 바이러스이다. AAV DNA의 센스 및 안티센스 가닥 둘 다가 동등 빈도로 AAV 캡시드 내로 패키징된다.

[0145] AAV 게놈은 2개의 오픈 리딩 프레임 (ORB)에 플랭킹된 2개의 역전 말단 반복부 (ITR)을 특징으로 한다. AAV2 게놈에서, 예를 들어, 뉴클레오티드 125개의 제1 ITR은 팔린드롬이며, 이는 염기 쌍형성을 최대화하도록 그 자체 상에서 폴딩되고, T자 모양의 헤어핀 구조를 형성한다. D 서열로 칭해지는, ITR의 다른 20개의 염기는 쌍을 이루지 않고 유지된다. ITR은 AAV DNA 복제에 중요한 시스-작용 서열이다; ITR은 복제 기원이고, DNA 중합효소에 의한 제2 가닥 합성을 위한 프라이머로서의 역할을 한다. 복제-형태 단량체로 칭해지는 이러한 합성 동안 형성된 이중-가닥 DNA는 제2 라운드의 자가-프라이밍 복제에 사용되고, 복제-형태 이량체를 형성한다. 이러한 이중-가닥 중간체는 가닥 전치 메커니즘을 통해 프로세싱되어, 패키징에 사용되는 단일-가닥 DNA 및 전사에 사용되는 이중-가닥 DNA를 초래한다. Rep 결합 요소 및 말단 분할 부위 (TRS)가 ITR 내에 위치한다. 이러한 특색은 이중-가닥 중간체를 프로세싱하도록 AAV 복제 동안 바이러스 조절 단백질 Rep에 의해 사용된다. AAV 복제에서의 역할에 더하여, ITR은 AAV 게놈 패키징, 전사, 비-허용 조건 하에서의 음성 조절, 및 부위-특이적 통합에 또한 필수적이다 (Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

[0146] AAV의 좌측 ORF는 Rep 유전자를 함유하며, 이는 4개의 단백질을 코딩한다 - Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40. 우측 ORF는 Cap 유전자를 함유하며, 이는 3개의 바이러스 캡시드 단백질 (VP1, VP2 및 VP3)을 생산한다. AAV 캡시드는 20면체 대칭으로 배열된 60개의 바이러스 캡시드 단백질을 함유한다. VP1, VP2 및 VP3은 1:1:10 몰비로 존재한다 (Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev* 21(4):583-593, 2008).

[0147] AAV는 현재 유전자 요법을 위해 가장 빈번하게 사용되는 바이러스 중 하나이다. AAV는 인간 및 일부 다른 영장류 종을 감염시키지만, 질환을 야기하는 것으로 공지되어 있지 않고, 매우 경미한 면역 반응을 유발한다. AAV를 이용하는 유전자 요법 벡터는 분열 중인 세포 및 휴지 세포 둘 다를 감염시킬 수 있고, 숙주 세포의 게놈 내로 통합되지 않으면서 염색체외 상태에서 지속될 수 있다. AAV의 유리한 특색으로 인해, 본 개시내용은 본원에 개시된 재조합 핵산 분자 및 방법을 위해 AAV를 사용하는 것을 구상한다.

[0148] AAV는 표적 세포에 결합하여 진입하고, 핵에 진입하는 능력, 장기간 동안 핵에서 발현되는 능력, 및 낮은 독성

을 포함하는, 유전자 요법 벡터에 대한 여러 바람직한 특색을 보유한다. 그러나, AAV 게놈의 작은 크기는 통합될 수 있는 이종 DNA의 크기를 제한한다. 이러한 문제를 최소화하기 위해, Rep 및 통합 효율 요소 (IEE)를 코딩하지 않는 AAV 벡터가 구축되었다. 패키징에 요구되는 시스 신호이기 때문에 ITR은 유지된다 (Daya and Berns, *Clin Microbiol Rev,* 21(4):583-593, 2008).

[0149] 유전자 요법에 적절한 rAAV를 생산하는 방법이 관련 기술분야에 널리 공지되어 있고 (예를 들어, 미국 특허 출원 번호 2012/0100606; 2012/0135515; 2011/0229971; 및 2013/0072548; 및 문헌 [Ghosh et al., *Gene Ther* 13(4):321-329, 2006]을 참조한다), 본원에 개시된 재조합 핵산 분자 및 방법과 함께 사용될 수 있다.

[0150] 일부 측면에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 따라서, 또 다른 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 인트론 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 또 다른 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 인트론 서열, 인간 PCCA 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 인간 PCCA 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 추가의 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCA에 대한 코딩 서열, BGH 폴리아데닐화 신호 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 추가의 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, 천연 PCCA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCA 5'-UTR의 뉴클레오티드 서열, PCCA에 대한 코딩 서열, 천연 PCCA 폴리아데닐화 신호 서열, PCCA 3'-UTR의 뉴클레오티드 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 인트론 서열의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 천연 PCCA 5'-UTR의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0151] PCCA의 발현을 위한 예시적인 패키징된 벡터 게놈 구축물을 나타내는 설명적인 도식이 **도 1**에서 제공되며, 이는 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, 컨센서스 코작 서열, PCCA 코딩 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 및 3'-ITR을 나타낸다.

[0152] 일부 측면에서, 본 개시내용은 프로피온산혈증 (PA)의 치료를 위한 본원에 개시된 rAAV의 용도로서, 여기서 rAAV가 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하고, 패키징된 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 것인 용도를 제공한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 프로모터 서열, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 한 예시적 실시양태에서, 패키징된 게놈은 프로모터 서열의 상류의 인핸서 서열, 프로모터의 하류의 인트론, 및 3'-ITR의 상류의 폴리아데닐화 서열을 또한 포함한다. 따라서, 또 다른 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 인트론 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 또 다른 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순

서로 5'-ITR, 인핸서 서열, 프로모터 서열, 인트론 서열, 인간 PCCB 5'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열, 폴리아데닐화 신호 서열, 인간 PCCB 3'-UTR의 말단절단된 또는 완전한 뉴클레오티드 서열, 및 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 추가의 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCB에 대한 코딩 서열, BGH 폴리아데닐화 신호 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 추가의 예시적 실시양태에서, rAAV는 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 AAV2 5'-ITR 서열, CMV 인핸서, 천연 PCCB 프로모터, SV40 소형 T 인트론, PCCB 5'-UTR의 뉴클레오티드 서열, PCCB에 대한 코딩 서열, 천연 PCCB 폴리아데닐화 신호 서열, PCCB 3'-UTR의 뉴클레오티드 서열, 및 AAV2 3'-ITR을 포함하는 패키징된 게놈을 함유한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 인트론 서열의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 패키징된 게놈은 천연 PCCB 5'-UTR의 하류에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0153] PCCB의 발현을 위한 예시적인 패키징된 벡터 게놈 구축물을 나타내는 설명적인 도식이 **도 2**에서 제공되며, 이는 5'에서 3'으로의 순서로 5'-ITR, CMV 인핸서, CBA 프로모터, SV40 소형 T 인트론, 컨센서스 코작 서열, PCCA 코딩 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 및 3'-ITR을 나타낸다.

[0154] 단백질 국재화:

[0155] 프로피오닐-CoA 카르복실라제는 미토콘드리아 기질에 국재화되는 다량체성 단백질이다 (문헌 [Browner *et al.*, (1989). *Journal of Biological Chemistry.* 264:12680-5]을 참조한다). 따라서, PCCA 및/또는 PCCB 유전자(들)를 전달하는 유전자 요법 벡터가 미토콘드리아에서 기능성이고 이에 국재화되는 단백질을 코딩할 수 있는 것이 필수적이다. 한 측면에서, 하나 이상의 본원에 개시된 바이러스 벡터는 미토콘드리아에 국재화되는 PCCA 및/또는 PCCB 단백질(들)을 코딩하는 유전자의 발현 (예를 들어, PCCA 또는 PCCB의 발현)을 구동시키고 조절한다.

[0156] 제약 조성물:

[0157] 본원에 개시된 rAAV 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물이 본 개시내용에 의해 제공된다. rAAV의 투여를 위한 적절한 제약 제형을, 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 번호 2012/0219528에서 확인할 수 있다. 본 개시내용에서 유용한 제약상 허용되는 담체 (비히클)는 통상적이다. 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences*, E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pa., 15th Edition (1975)]에 하나 이상의 치료 화합물, 분자 또는 작용제의 제약 전달에 적절한 조성물 및 제형이 기재되어 있다.

[0158] 이전 단락에서 강조된 바와 같이, 일부 측면에서 본 개시내용은 본 발명의 rAAV를 포함하는 제약 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체 또는 부형제를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 피하, 근육내, 피내, 복강내 또는 정맥내 투여용으로 제형된다. 한 예시적 실시양태에서, 제약 조성물은 정맥내 투여용으로 제형된다.

[0159] 일부 실시양태에서, rAAV는 인간 대상체에서의 주입에 적절한 완충제/담체 내에 제형된다. 완충제/담체는 rAAV가 주입 튜브에 부착되는 것을 방지하지만 생체 내에서 rAAV 결합 활성을 방해하지 않는 성분을 포함하여야 한다. 다양한 적절한 용액이 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 완충 염수, 계면활성제, 및 약 100 mM 염화나트륨 (NaCl) 내지 약 250 mM 염화나트륨에 등가인 이온 강도로 조정된 생리학적으로 상용성인 염 또는 염 혼합물, 또는 등가의 이온 농도로 조정된 생리학적으로 상용성인 염. pH는 6.5 내지 8.5, 또는 7 내지 8.5, 또는 7.5 내지 8의 범위일 수 있다. 적절한 계면활성제, 또는 계면활성제 혼합물은 폴록사머(Poloxamer), 즉, 폴리옥시에틸렌 (폴리(에틸렌 옥시드))의 2개의 친수성 쇄에 의해 플랭킹된 중앙의 폴리옥시프로필렌 10 (폴리(프로필렌 옥시드))의 소수성 쇄로 구성된 비이온성 삼블록 공중합체, SOLUTOL HS 15 (마크로골(Macrogol)-15 히드록시스테아레이트), LABRASOL (폴리옥시 카프릴산 글리세리드), 폴리옥시 10 에테르, TWEEN (폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택될 수 있다.

[0160] 프로피온산혈증을 치료하는 방법:

[0161] 또 다른 측면에서, 본 개시내용은 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다.

[0162] 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이

PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다.

[0163] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다.

[0164] 또 다른 실시양태에서, 본 개시내용은 (1) AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV; 및 (2) AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 별개로 투여될 수 있다.

[0165] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 (1) AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV; 및/또는; 및 (2) AAV 캡시드, 및 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 동시에 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 순차적으로 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, (1) 및 (2)의 rAAV는 별개로 투여될 수 있다.

[0166] 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCA에 대한 것이며 PCCB에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, PCCA 내의 돌연변이는 표 1로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0167] 일부 측면에서, 본 개시내용은 PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된, 코딩 서열이 PCCB에 대한 것이며 PCCA에 대한 것이 아니고, 프로모터가 PCCB 유전자-특이적 내인성 프로모터이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 프로모터가 아니고, 폴리아데닐화 신호 서열이 PCCB 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이며 PCCA 유전자-특이적 내인성 폴리아데닐화 신호 서열이 아닌 것인 벡터 게놈을 포함하는 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 특정 실시양태에서, PCCB 내의 돌연변이는 표 2로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0168] PCCA 및 PCCB에서의 PA-야기 돌연변이를 기재하는 리뷰 논문이 문헌 [Ugarte *et al.*, 1999, *Hum. Mutat.* 14(4): 275-282]에서 제공된다.

[0169] 돌연변이된 PCCA 유전자에 의해 야기된 PA에서, PCCA 유전자 내의 하기의 돌연변이 및 다형성이 확인되었다:

[0170] 표 1 - PCCA 유전자 돌연변이 및 다형성:

미스센스 돌연변이:	148 G→C, 154 C→T, 337 G→A, 416 T→C, 611 T→C, 815 A→G, 1028 A→G, 1043 T→A, 1061 G→T 1121 G→A, 1193 C→T, 1601 G→T, 1816 G→C, 1927 G→T
넌센스 돌연변이:	862 C→T, 1610 C→G
소형 결실:	700 del5, 1115del4, 2058del3
스플라이싱 돌연변이:	1645IVS+1G→A, 1671IVS+5G→C, 1771IV2-2del9, 1824IVS+3del4, 1824IVS+3insCT
다형성:	552A→G, 1348A→G

[0171]

[0172] 돌연변이된 PCCB 유전자에 의해 야기된 PA에서, PCCB 유전자 내의 하기의 돌연변이 및 다형성이 확인되었다:

[0173] 표 2 - PCCB 유전자 돌연변이 및 다형성:

미스센스 돌연변이:	49 C→A, 131 G→C, 318 C→A, 391 G→C, 493 C→T, 502 G→A, 593 G→A, 605 T→A, 683 C→T 1228 C→T, 1283 C→T, 1325 T→C, 1490 C→T, 1534 C→T, 1556 T→C, 1606 A→G,
넌센스 돌연변이:	1495 C→T, 1593 G→A
삽입 및 결실:	418ins12, 790insG, 1170insT, 1218del14ins12, 1222del3, 1298insA
스플라이싱 돌연변이:	IVS1+3G→C, IVS4+3del4, IVS10-11del6, IVS12+3del8, IVS13+1G→T

[0174]

[0175] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 표 1로부터 선택된 PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCA 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, 표 1로부터 선택된 PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, PCCA에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0176] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 인간 대상체에게 본원에 개시된 적어도 1종의 rAAV의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 표 2로부터 선택된 PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 한 실시양태에서, 본 개시내용은 AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 여기서 벡터 게놈이 PCCB 또는 그의 이소형, 또는 그의 기능성 단편 또는 기능성 변이체에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV를 투여하는 것을 포함하는, 표 2로부터 선택된 PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 PA를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, PCCB에 대한 코딩 서열은 서열식별번호: 7-12로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 캡시드는 AAV9 캡시드이다.

[0177] 임의의 적절한 방법 또는 경로가 본원에 기재된 rAAV 또는 rAAV-함유 조성물을 투여하는데 사용될 수 있다. 투여 경로는, 예를 들어, 전신, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 및 기타 비경구 투여 경로를 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV, rAAV를 포함하는 조성물, 또는 다중 rAAV (예를 들어, PCCA를 발현하는 하나의 rAAV 및 PCCB를 발현하는 제2 rAAV)를 포함하는 조성물은 정맥내로 투여된다.

[0178] 투여되는 구체적인 용량은 각각의 환자에 대한 균일 용량, 예를 들어, 환자당 1.0×10^{11} - 1.0×10^{14}개 게놈

카피 (GC)의 바이러스일 수 있다. 대안적으로, 환자의 용량이 환자의 체중 또는 표면적에 근접하도록 맞춰질 수 있다. 적합한 투여량을 결정하는 것에서의 다른 요인은 치료 또는 예방될 질환 또는 병태, 질환의 중증도, 투여 경로, 및 환자의 연령, 성별 및 의학적 상태를 포함할 수 있다. 치료를 위한 적합한 투여량을 결정하는데 필요한 계산의 추가 개량이, 특히 본원에서 개시된 투여량 정보 및 검정법을 고려하여, 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 이루어질 수 있다. 투여량은 적합한 용량-반응 데이터와 함께 사용되는 투여량을 결정하기 위한 공지된 검정법을 사용하는 것을 통해 결정될 수도 있다. 질환 진행이 모니터링됨에 따라 개별적인 환자의 투여량이 조정될 수도 있다.

[0179] 일부 실시양태에서, rAAV는, 예를 들어, qPCR 또는 디지털 액적 PCR (ddPCR)에 의해 측정된 바와 같은 약 1.0 x 10^{11}개 게놈 카피/환자 체중 킬로그램 (GC/kg) 내지 약 1 x 10^{14}개의 GC/kg, 약 5 x 10^{11}개 게놈 카피/환자 체중 킬로그램 (GC/kg) 내지 약 5 x 10^{13}개의 GC/kg, 또는 약 1 x 10^{12} 내지 약 1 x 10^{13}개의 GC/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 약 1 x 10^{12} 내지 약 약1 x 10^{13}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 약 1.1 x 10^{11}, 약 1.3 x 10^{11}, 약 1.6 x 10^{11}, 약 1.9 x 10^{11}, 약 2 x 10^{11}, 약 2.5 x 10^{11}, 약 3.0 x 10^{11}, 약 3.5 x 10^{11}, 약 4.0 x 10^{11}, 약 4.5 x 10^{11}, 약 5.0 x 10^{11}, 약 5.5 x 10^{11}, 약 6.0 x 10^{11}, 약 6.5 x 10^{11}, 약 7.0 x 10^{11}, 약 7.5 x 10^{11}, 약 8.0 x 10^{11}, 약 8.5 x 10^{11}, 약 9.0 x 10^{11}, 약 9.5 x 10^{11}, 약 1.0 x 10^{12}, 약 1.5 x 10^{12}, 약 2.0 x 10^{12}, 약 2.5 x 10^{12}, 약 3.0 x 10^{12}, 약 3.5 x 10^{12}, 약 4.0 x 10^{12}, 약 4.5 x 10^{12}, 약 5.0 x 10^{12}, 약 5.5 x 10^{12}, 약 6.0 x 10^{12}, 약 6.5 x 10^{12}, 약 7.0 x 10^{12}, 약 7.5 x 10^{12}, 약 8.0 x 10^{12}, 약 8.5 x 10^{12}, 약 9.0 x 10^{12}, 약 9.5 x 10^{12}, 약 1.0 x 10^{13}, 약 1.5 x 10^{13}, 약 2.0 x 10^{13}, 약 2.5 x 10^{13}, 약 3.0 x 10^{13}, 약 3.5 x 10^{13}, 약 4.0 x 10^{13}, 약 4.5 x 10^{13}, 약 5.0 x 10^{13}, 약 5.5 x 10^{13}, 약 6.0 x 10^{13}, 약 6.5 x 10^{13}, 약 7.0 x 10^{13}, 약 7.5 x 10^{13}, 약 8.0 x 10^{13}, 약 8.5 x 10^{13}, 약 9.0 x 10^{13}, 약 9.5 x 10^{13}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여된다. rAAV는 원하는 치료 결과에 필요한 바와 같이 단일 용량으로 또는 다중 용량 (예컨대 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10회 이상의 용량)으로 투여될 수 있다.

[0180] 용량은 매주, 매월 또는 매년 1회 이상, 또는 심지어 2 내지 20년마다 1회로 제공될 수 있다. 예를 들어, 각각의 용량은 최소 1주 간격, 2주 간격, 3주 간격, 1개월 간격, 3개월 간격, 6개월 간격, 또는 1년 간격으로 제공될 수 있다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 체액 또는 조직 내에서의 표적화가능한 구축물 또는 복합체의 측정된 체류 시간 및 농도를 기초로 투약에 대한 반복률을 용이하게 추정할 수 있다.

[0181] 설명 전반에 걸쳐, 조성물이 특정 성분을 갖거나, 수반하거나, 또는 포함하는 것으로 기재되는 경우, 또는 공정 및 방법이 특정 단계를 갖거나, 수반하거나, 또는 포함하는 것으로 기재되는 경우, 추가적으로, 열거된 성분으로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 본 발명의 조성물이 있고, 열거된 공정 단계로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어지는 본 발명에 따른 공정 및 방법이 있는 것으로 구상된다.

[0182] 본 개시내용에서, 요소 또는 성분이 열거된 요소 또는 성분의 목록에 포함되고/거나 그로부터 선택된다고 하는 경우, 요소 또는 성분이 열거된 요소 또는 성분 중 어느 하나일 수 있거나, 또는 요소 또는 성분이 열거된 요소 또는 성분 중 2개 이상으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다는 것을 이해하여야 한다.

[0183] 추가로, 본원에서 명시적이든 또는 암시적이든, 본원에 기재된 조성물 또는 방법의 요소 및/또는 특색이 본 발명의 취지 및 범주를 벗어나지 않으면서 다양한 방식으로 조합될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 예를 들어, 특정한 화합물이 언급되는 경우, 문맥적으로 달리 이해되지 않는 한, 이러한 화합물은 본 발명의 조성물의 다양한 실시양태에서 및/또는 본 발명의 방법에서 사용될 수 있다. 다시 말해서, 본 개시내용에서, 명확하고 간결한 개시내용이 작성되고 그려질 수 있게 하는 방식으로 실시양태들이 기재되고 도시되었지만, 본 교시내용 및 발명(들)을 벗어나지 않으면서 실시양태들이 다양하게 조합되거나 분리될 수 있다는 것이 의도되고 이해될 것이다. 예를 들어, 본원에서 기재되고 도시된 모든 특색이 본원에서 기재되고 도시된 본 발명(들)의 모든 특색에 적용될 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0184] "적어도 하나의"라는 표현은, 문맥 및 용법으로부터 달리 이해되지 않는 한, 개별적으로 이러한 표현 뒤의 열거된 대상 각각 및 열거된 대상 중 2종 이상의 다양한 조합을 포함한다는 것을 이해하여야 한다. 3종 이상의 열거된 대상과 관련된 "및/또는"이라는 표현은 문맥으로부터 달리 이해되지 않는 한 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다.

[0185] 용어 "포함하다", "포함한다", "포함한", "갖다", "갖는다", "갖는", "함유하다", "함유한다" 또는 "함유하는" (그의 문법적 등가물을 포함함)의 사용은, 달리 구체적으로 언급되거나 또는 문맥으로부터 이해되지 않는 한, 일반적으로 개방적이고 비제한적인 것으로, 예를 들어, 추가적인 열거되지 않은 요소 또는 단계를 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0186] 용어 "약"이 정량적인 값 앞에서 사용되는 경우, 구체적으로 달리 언급되지 않는 한, 본 발명은 특정한 정량적인 값 자체를 또한 포함한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 달리 지시되거나 추론되지 않는 한, 용어 "약"은 공칭 값으로부터의 ±10% 변동을 지칭한다.

[0187] 본 발명이 작동가능하게 유지되는 한 단계의 순서 또는 특정 동작을 수행하는 순서가 중요하지 않다는 것을 이해하여야 한다. 또한, 2개 이상의 단계 또는 동작이 동시에 수행될 수 있다.

[0188] 본원에서의 임의의 모든 예, 또는 예시적인 언어, 예를 들어, "예컨대" 또는 "포함한"을 사용하는 것은 단지 본 발명을 더 잘 설명하기 위해서 의도될 뿐이고, 청구되지 않는 한 본 발명의 범주에 제한을 부여하지 않는다. 명세서 내의 어떠한 언어도 임의의 청구되지 않은 요소를 본 발명의 실행에 필수적인 것으로 지시하는 것으로 해석되지 않아야 한다.

[0189] 실시예

[0190] 일반적으로 기재되고 있는 본 개시내용이 하기의 실시예를 참조로 더 쉽게 이해될 것이며, 이는 단지 본 개시내용의 특정 측면 및 실시양태의 설명을 목적으로 포함될 뿐이고, 어떠한 방식으로도 본 개시내용의 범주를 제한하도록 의도되지 않는다.

[0191] 실시예 1: PCCA의 RNA 및 단백질 발현

[0192] *RNA 발현*

[0193] 본 실시예는 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 형질감염 후의 PCCA의 RNA 발현에 관한 것이다. 간략하게, 리포펙타민(Lipofectamine) 2000 (인비트로젠(Invitrogen))을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, HepG2 세포를 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에 HepG2 세포를 수확하고, 용해시켰다. TRIzol 시약 (인비트로젠)을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, 용해된 HepG2 세포로부터 RNA를 추출하였다. OD260/280 및 OD260/230 비를 통해 나노드롭(NanoDrop) ND-1000 (써모 사이언티픽(Thermo Scientific))을 사용하여 RNA의 품질 및 양을 측정하였다. 하이-캐퍼시티(High-Capacity) cDNA 역전사 키트 (써모피셔 사이언티픽(ThermoFisher Scientific))를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 전체 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 7500 실시간 PCR 시스템을 사용하여 파워 SYBR 녹색 PCR 마스터 믹스(Power SYBR Green PCR Master Mix) (어플라이드 바이오시스템즈)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 실시간 RT-qPCR을 수행하였다. "처리 없음" 대조군에 대해 상대적으로 RNA 중합효소 II 폴리펩티드 A (POLR2A)를 각각의 샘플에 대한 내부 대조군으로 이용하고 계산된 배수 변화를 정규화하는 델타-델타 Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법 (문헌 [Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods 25(4): 402-408]을 참조한다)에 의해 PCCA 발현에서의 배수 변화를 계산하였다. **도 3**은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로의 형질감염 후에 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCA RNA 발현에서의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다.

[0194] 플롯팅된 데이터는 DTC346으로의 형질감염 후의 완전한 천연 인간 PCCA의 RNA 발현이 DTC347 및 DTC348으로의 형질감염 후의 2개의 코돈-최적화 PCCA 버전의 발현과 유사하였음을 나타낸다. DTC349로 형질감염된 세포는 더 높은 RNA 발현을 실연하였다.

[0195] *단백질 발현*

[0196] 본 실시예는 또한 연속 간세포 세포주 HepG2 및 Huh7의 형질감염 후의 PCCA의 단백질 발현에 관한 것이다. 간

략하게, 리포펙타민 2000 (인비트로젠)을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, HepG2 및 Huh7 세포주를 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC365), 또는 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343)로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에 세포를 수확하고, 프로테아제 억제제 믹스 (시그마(Sigma)) 및 포스파타제 억제제 칵테일 2+3 (시그마 P5726 및 P0044)이 보충된 NP-40 용해 완충제 (50 mM 트리스·HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40)로 용해시켰다. 단백질을 10% 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE) 겔에서 해상하고, IMMUN-BLOT® 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막 (바이오-래드(Bio-Rad))으로 옮겼다. 1:1000 희석의 항-PCCA (앱캠(Abcam), 영국 캠브리지) 항체에 이어서 원적외선 형광단에 접합된 2차 항체 (리코(Licor)의 IRDye 2차 항체)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0197] **도 4a**는 각각 레인 1에서 레인 7까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC365), 또는 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0198] **도 4a**에 나타난 바와 같이, "처리 없음" 대조군 (레인 1)에서의 예상된 기저 수준의 PCCA 단백질 발현, 및 "처리 없음" 대조군 (레인 1)에 비교했을 때 DTC346 (레인 2)로 형질감염된 세포 및 DTC347 (레인 3) 또는 DTC348 (레인 4)로 형질감염된 세포에서의 PCCA 단백질의 과다발현이 있었다. DTC349 (레인 5)로 형질감염된 세포는 이러한 버전이 많은 양의 RNA를 발현하는 것으로 관찰되었음에도 불구하고 PCCA 단백질의 과다발현을 실연하지 않았다. DTC343 (레인 7)으로 형질감염된 세포는 예상대로 eGFP 발현을 실연하였다.

[0199] **도 4b**는 각각 레인 1에서 레인 7까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 또는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC365)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (Huh7)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0200] **도 4b**에 나타난 바와 같이, "처리 없음" 대조군 (레인 1)에서의 예상된 기저 수준의 PCCA 단백질 발현, 및 "처리 없음" 대조군 (레인 1)에 비교했을 때 DTC346 (레인 3)으로 형질감염된 세포 및 DTC347 (레인 4) 또는 DTC348 (레인 5)로 형질감염된 세포에서의 PCCA 단백질의 과다발현이 있었다. DTC349 (레인 6)로 형질감염된 세포는 이러한 버전이 많은 양의 RNA를 발현하는 것으로 관찰되었음에도 불구하고 PCCA 단백질의 과다발현을 실연하지 않았다. DTC343 (레인 2)으로 형질감염된 세포는 예상대로 eGFP 발현을 실연하였다.

[0201] 실시예 2: 과다발현된 인간 PCCA 단백질이 미토콘드리아에 국재화된다

[0202] 본 실시예는 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 과다발현된 인간 PCCA가 미토콘드리아에 국재화된다는 것을 나타낸다. 간략하게, 연속 간세포 세포주 (HepG2)를 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346)로 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 세포하 분획화에 적용하였으며, 여기서 세포질 및 미토콘드리아 분획이 단리되었다. 전체 세포 용해물을 또한 프로세싱하였다. 단백질을 10% 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE) 겔에서 해상하고, IMMUN-BLOT® 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막 (바이오-래드)으로 옮겼다. 1:1000 희석의 항-PCCA (앱캠, 영국 캠브리지) 항체에 이어서 원적외선 형광단에 접합된 2차 항체 (리코의 IRDye 2차 항체)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다. **도 5**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346)로 또는 그의 부재 하에 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)로부터 단리된 전체 세포 용해물

(WCL); 세포하 분획 (세포질 분획 (세포질); 및 미토콘드리아 분획 (미토콘드리아))에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 PCCA 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. 1X 및 2X는 로딩된 미토콘드리아 분획의 상대 부피를 나타낸다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0203] **도 5**에 나타나고, **도 4a-b**로부터의 결과에 일치하는 바와 같이, 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346)로 형질감염된 세포는 전체 세포 용해물에서 형질감염되지 않은 대조군 세포에 비교했을 때 PCCA 과다발현을 실연하였다 (**도 5**의 레인 7 대 레인 8). 미토콘드리아에 국재화되는 것으로 공지된 단백질인 미토필린의 수준을 질의하여, 단리된 세포 분획의 상대적인 순도를 결정하였다. **도 5**에 나타난 바와 같이, 형질감염되지 않은 세포 및 DTC346-형질감염 세포에 대한 세포질 분획은 검출가능한 수준의 미토필린을 실연하지 않은 반면 (**도 5**의 레인 1 대 레인 2), 예상대로 미토콘드리아 분획 및 전체 세포 용해물에서는 미토필린이 쉽게 검출되었다 (**도 5**의 레인 3-8). 과다발현된 PCCA가 주로 미토콘드리아에 국재화되었다 (**도 5**의 레인 2 대 레인 4 및 6).

[0204] 실시예 3: PCCA AAV9 역가 수율의 비교

[0205] 본 실시예는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346) 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로부터의 PCCA AAV9 역가 수율의 비교에 관한 것이다. 연속 신장 세포주 (HEK293)를 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346), 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349), 또는 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343)로 삼중 형질감염시켰다; 각각은 AAV9 캡시드 발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현되었다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, **도 6**에서 "처리 없음"으로서 표현된다. 세포 상청액을 수확하고, DNase I 또는 등가물로 처리하여, 캡시드화되지 않은 DNA를 제거하고, 이러한 구축물의 디자인 내에 포함된 폴리아데닐화 신호에 대해 특이적인 프라이머/프로브 세트를 이용한 DNase-저항성 입자 (DRP) 역가의 정량을 용이하게 하였다. **도 6**은 좌측에서 우측으로, 연속 신장 세포주 (HEK293)의 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343); 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC346); 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)로의 삼중 형질감염 후에 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCA AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다; 각각은 AAV9 캡시드-발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현된다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, "처리 없음"으로서 표현된다. **도 6**은 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 형질감염되지 않은 세포에 대해 상대적인 PCCA AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타낸다. **도 6**에 제시된 데이터는 천연의 완전한 인간 PCCA를 발현하는 구축물 (DTC346)과 모든 코돈-최적화 버전 (DTC347, DTC348, 및 DTC349) 사이의 유사한 rAAV 역가를 실연한다.

[0206] 실시예 4: PCCA DNA 통합성 테스트

[0207] HEK293 세포에서의 삼중 형질감염을 통한 AAV9 rAAV 바이러스 입자의 생성 후, 세포 상청액을 수확하고, AAVX 수지 (써모 피셔) 또는 등가물과 함께 인큐베이션하였다. AAV9 rAAV 바이러스 입자를 정제한 후, 아미콘 (Amicon) 원심분리 필터 (밀리포어 시그마(Millipore Sigma))를 사용하여 농축하였다. 정제된 바이러스를 알칼리성 용해 완충제에서 인큐베이션하고, DNA 아가로스 겔 내로 로딩하고, 알칼리성 러닝 완충제의 존재 하에 철야로 실행시켰다. **도 7**은 각각 좌측에서 우측으로 PCCA 및 PCCB-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC365), PCCA-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC349, DTC348, DTC347, 또는 DTC346), 또는 eGFP-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC343)를 함유하는 친화력 정제된 AAV9 입자의 DNA 알칼리성 아가로스 겔의 영상이다.

[0208] **도 7**에 나타난 바와 같이, 겔 영상은 벡터 게놈 (DTC346, DTC347, DTC348, 및 DTC349)의 적합한 패키징을 시사하는 천연 및 코돈-최적화 PCCA 벡터 카세트에 대한 예상 크기의 명확한 단일 밴드를 나타낸다. eGFP 대조군 (DTC343)은 소형 벡터 게놈을 패키징하는 것의 공지된 제약과 일치하는 2개의 밴드의 패키징을 실연하였다.

[0209] 실시예 5: PCCB의 RNA 및 단백질 발현

[0210] *RNA 발현*

[0211] 본 실시예는 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 형질감염 후의 PCCB의 RNA 발현에 관한 것이다. 간략하게, 리포펙타민 2000 (인비트로젠)을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, HepG2 세포를 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC370, DTC368, DTC369, 또는 DTC371)로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에 HepG2 세포를 수확하고, 용해시켰다. TRIzol 시약 (인비트로젠)을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, 용해된 HepG2 세포로부터 RNA를 추출하였다. OD260/280 및 OD260/230 비를 통해 나노드롭 ND-1000 (써모 사이언티픽)을 사용하여 RNA의 품질 및 양을 측정하였다. 하이-캐퍼시티 cDNA 역전사 키트 (써모피셔 사이언티픽)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 전체 RNA를 cDNA로 역전사시켰다. 어플라이드 바이오시스템즈 7500 실시간 PCR 시스템을 사용하여 파워 SYBR 녹색 PCR 마스터 믹스 (어플라이드 바이오시스템즈)를 제조사의 설명서에 따라 사용하여 실시간 RT-qPCR을 수행하였다. "처리 없음" 대조군에 대해 상대적으로 RNA 중합효소 II 폴리펩티드 A (POLR2A)를 각각의 샘플에 대한 내부 대조군으로 이용하고 계산된 배수 변화를 정규화하는 델타-델타 Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) 방법 (문헌 [Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta C(T)) method. Methods 25(4): 402-408]을 참조한다)에 의해 PCCB 발현에서의 배수 변화를 계산하였다. **도 8**은 연속 간세포 세포주 (HepG2)의 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC370, DTC368, DTC369, 또는 DTC371)로의 형질감염 후에 RT-qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCB RNA 발현에서의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다.

[0212] 플롯팅된 데이터는 DTC366으로의 형질감염 후의 인간 PCCB의 완전한 천연 서열의 RNA 발현이 DTC367, DTC368, DTC370, 또는 DTC371로의 형질감염 후의 4개의 코돈-최적화 인간 PCCB 버전의 발현과 유사하였음을 나타낸다. DTC369로 형질감염된 세포는 더 낮은 RNA 발현을 실연하였다.

[0213] *단백질 발현*

[0214] 본 실시예는 또한 연속 간세포 세포주 HepG2 및 Huh7의 형질감염 후의 PCCB의 단백질 발현에 관한 것이다. 간략하게, 리포펙타민 2000 (인비트로젠)을 제조사의 설명서에 따라 사용하여, HepG2 및 Huh7 세포주를 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로 형질감염시켰다. 형질감염 72시간 후에 세포를 수확하고, 프로테아제 억제제 믹스 (시그마) 및 포스파타제 억제제 칵테일 2+3 (시그마 P5726 및 P0044)이 보충된 NP-40 용해 완충제 (50 mM 트리스·HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1.0% NP-40)로 용해시켰다. 단백질을 10% 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE) 겔에서 해상하고, IMMUN-BLOT® 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막 (바이오-래드)으로 옮겼다. 1:1000 희석의 항-PCCB (앱캠, 영국 캠브리지) 항체에 이어서 원적외선 형광단에 접합된 2차 항체 (리코의 IRDye 2차 항체)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0215] **도 9a**는 각각 레인 1에서 레인 8까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0216] **도 9a**에 나타난 바와 같이, "처리 없음" 대조군 (레인 1)에서의 예상된 기저 수준의 PCCB 단백질 발현, 및 "처리 없음" 대조군 (레인 1)에 비교했을 때 DTC366 (레인 3)으로 형질감염된 세포 및 DTC367 (레인 4) 또는 DTC370 (레인 7)로 형질감염된 세포에서의 PCCB 단백질의 과다발현이 있었다. DTC368 (레인 5), DTC369 (레인 6), 또는 DTC371 (레인 8)로 형질감염된 세포는 PCCB 단백질의 과다발현을 실연하지 않았다. DTC343 (레인 2)

으로 형질감염된 세포는 예상대로 eGFP 발현을 실연하였다.

[0217] **도 9b**는 각각 레인 1에서 레인 8까지 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343), 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366), 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC369, DTC368, DTC370, 또는 DTC371)로 형질감염된 연속 간세포 세포주 (Huh7)에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0218] **도 9b**에 나타난 바와 같이, "처리 없음" 대조군 (레인 1)에서의 예상된 기저 수준의 PCCB 단백질 발현, 및 "처리 없음" 대조군 (레인 1)에 비교했을 때 DTC366 (레인 3)으로 형질감염된 세포 및 DTC367 (레인 4) 또는 DTC370 (레인 7)으로 형질감염된 세포에서의 PCCB 단백질의 과다발현이 있었다. DTC368 (레인 6), DTC369 (레인 5), 또는 DTC371 (레인 8)로 형질감염된 세포는 PCCB 단백질의 과다발현을 실연하지 않았다. DTC343 (레인 2)으로 형질감염된 세포는 예상대로 eGFP 발현을 실연하였다.

[0219] 실시예 6: 과다발현된 인간 PCCB 단백질이 미토콘드리아에 국재화된다

[0220] 본 실시예는 연속 간세포 세포주 (HepG2)에서 과다발현된 인간 PCCB가 미토콘드리아에 국재화된다는 것을 나타낸다. 간략하게, 연속 간세포 세포주 (HepG2)를 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366)로 형질감염시켰다. 형질감염 후, 세포를 세포하 분획화에 적용하였으며, 여기서 세포질 및 미토콘드리아 분획이 단리되었다. 전체 세포 용해물을 또한 프로세싱하였다. 단백질을 10% 소듐 도데실 술페이트 폴리아크릴아미드 전기영동 (SDS-PAGE) 겔에서 해상하고, IMMUN-BLOT® 폴리비닐리덴 플루오라이드 (PVDF) 막 (바이오-래드)으로 옮겼다. 1:1000 희석의 항-PCCB (앱캠, 영국 캠브리지) 항체에 이어서 원적외선 형광단에 접합된 2차 항체 (리코의 IRDye 2차 항체)를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 수행하였다.

[0221] **도 10**은 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366)로 또는 그의 부재 하에 형질감염된 연속 간세포 세포주 (HepG2)로부터 단리된 전체 세포 용해물 (WCL); 세포하 분획 (세포질 분획 (세포질); 및 미토콘드리아 분획 (미토콘드리아))에서 웨스턴 블롯에 의해 검출된 PCCB 단백질 발현 수준을 나타내는 영상이다. 1X 및 2X는 로딩된 미토콘드리아 분획의 상대 부피를 나타낸다. β-액틴 ("액틴")이 로딩 대조군으로서 사용되었다.

[0222] **도 10**에 나타나고, 이전 결과에 일치하는 바와 같이, 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366)로 형질감염된 세포는 전체 세포 용해물에서 형질감염되지 않은 대조군 세포에 비교했을 때 PCCB 단백질 과다발현을 실연하였다 (레인 7 대 레인 8). 미토콘드리아에 국재화되는 것으로 공지된 단백질인 미토필린의 수준을 질의하여, 단리된 세포 분획의 상대적인 순도를 결정하였다. **도 10**에 나타난 바와 같이, 형질감염되지 않은 세포 및 DTC366-형질감염 세포에 대한 세포질 분획은 검출가능한 수준의 미토필린을 실연하지 않은 반면 (레인 1 대 레인 2), 예상대로 미토콘드리아 분획 및 전체 세포 용해물에서는 미토필린이 쉽게 검출되었다 (레인 3-8). 과다발현된 PCCB가 주로 미토콘드리아에 국재화되었다 (레인 2 대 레인 4 및 6).

[0223] 실시예 7: PCCB AAV9 역가 수율의 비교

[0224] 본 실시예는 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366) 또는 인간 PCCB의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로부터의 PCCB AAV9 역가 수율의 비교에 관한 것이다. 연속 신장 세포주 (HEK293)를 강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343); 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366); 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로 삼중 형질감염시켰다; 각각은 AAV9 캡시드 발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현되었다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, **도 11**에서 "처리 없음"으로서 표현된다. 세포 상청액을 수확하고, DNase I 또는 등가물로 처리하여, 캡시드화되지 않은 DNA를 제거하고, 이러한 구축물의 디자인 내에 포함된 폴리아데닐화 신호에 대해 특이적인 프라이머/프로브 세트를 이용한 DNase-저항성 입자 (DRP) 역가의 정량을 용이하게 하였다. **도 11**은 좌측에서 우측으로, 연속 신장 세포주 (HEK293)의

강화된 녹색 형광 단백질 eGFP를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC343); 인간 PCCB의 완전한 천연 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC366); 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열을 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 보유하는 rAAV 벡터 플라스미드 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)로의 삼중 형질감염 후에 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 PCCB AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타내는 막대 그래프이다; 각각은 AAV9 캡시드 발현 플라스미드 (pAAV2/9) 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 공급하는 플라스미드 (pAdHelper)로 공동-형질감염된 세포에서 발현된다. 형질감염되지 않은 세포가 대조군으로서 사용되었고, "처리 없음"으로서 표현된다. **도 11**은 qPCR에 의해 결정된 바와 같은 형질감염되지 않은 세포에 대해 상대적인 PCCB AAV9 역가 (게놈 카피 (GC)/mL 단위)의 배수 변화를 나타낸다. **도 11**에 제시된 데이터는 천연의 완전한 인간 PCCB를 발현하는 구축물 (DTC366)과 모든 코돈-최적화 버전 (DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 및 DTC371) 사이의 유사한 rAAV 역가를 실연한다.

[0225] 실시예 8: PCCB DNA 통합성 테스트

[0226] HEK293 세포에서의 삼중 형질감염을 통한 AAV9 rAAV 바이러스 입자의 생성 후, 세포 상청액을 수확하고, AAVX 수지 (써모 피셔) 또는 등가물과 함께 인큐베이션하였다. AAV9 rAAV 바이러스 입자를 정제한 후, 아미콘 원심 분리 필터 (밀리포어 시그마)를 사용하여 농축하였다. 정제된 바이러스를 알칼리성 용해 완충제에서 인큐베이션하고, DNA 아가로스 겔 내로 로딩하고, 알칼리성 러닝 완충제의 존재 하에 철야로 실행시켰다. **도 12**는 각각 좌측에서 우측으로 대조군 플라스미드 (빈 벡터가 있는 플라스미드, 처리 없음), eGFP-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC343), 또는 PCCB-발현 재조합 AAV (rAAV) 벡터 카세트 (DTC366, DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 또는 DTC371)를 함유하는 친화력 정제된 AAV9 입자의 DNA 알칼리성 아가로스 겔의 영상이다.

[0227] **도 12**에 나타난 바와 같이, 겔 영상은 벡터 게놈 (DTC366, DTC367, DTC368, DTC369, DTC370, 및 DTC371)의 적합한 패키징을 시사하는 천연 및 코돈-최적화 PCCB 벡터 카세트에 대한 예상 크기의 명확한 단일 밴드를 나타낸다. eGFP 대조군 (DTC343)은 소형 벡터 게놈을 패키징하는 것의 공지된 제약과 일치하는 2개의 밴드의 패키징을 실연하였다.

[0228] 실시예 9: PCCA 바이러스 벡터의 야생형 마우스로의 투여

[0229] 본 실시예는 완전한 천연 인간 PCCA (DTC346) 또는 코돈-최적화 (DTC347, DTC348, 및 DTC349) 인간 PCCA를 발현하는 rAAV로의 처리 후의 야생형 FVB 마우스에서의 인간 PCCA 단백질 발현에 관한 것이다. 간략하게, 마우스 (n= 2 또는 3)에 서열식별번호: 38로 표현되는 완전한 천연 인간 PCCA를 발현하는 rAAV (DTC346) 또는 코돈-최적화 인간 PCCA를 발현하는 rAAV (DTC347, DTC348, 및 DTC349)를 1.66 x 10^{11}개의 바이러스 게놈 (VG) 또는 5 x 10^{11}개의 VG로 정맥내로 주사하였다. 인간 PCCA 단백질 및 내인성 마우스 PCCA 단백질을 LC-MS에 의해 검출하였다. **도 13**은 인간 PCCA의 완전한 천연 서열 (DTC346) 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)을 코딩하는 rAAV로의 처리 후의 야생형 FVB 마우스에서의 마우스 내인성 PCCA 발현에 대해 상대적인 인간 PCCA 단백질 발현의 백분율을 나타내는 막대 그래프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. **도 13**에 제시된 데이터는 1.66 x 10^{11}개의 VG의 천연 PCCA (DTC346)의 투여로부터 발현된 인간 PCCA가 내인성 마우스 PCCA 수준에 대해 2.5%였고, 5 x 10^{11}개의 VG의 천연 PCCA 바이러스 벡터 (DTC346)의 투여로부터 발현된 인간 PCCA가 내인성 마우스 PCCA 수준에 대해 11.6%였음을 나타낸다.

[0230] 실시예 10: 저차형 PCCA 마우스 모델에서의 인간 PCCA 활성

[0231] 본 실시예는 저차형 PCCA 마우스 모델에서 인간 PCCA 활성을 테스트하는 것에 관한 것이다. 마우스에서의 PCCA 유전자의 결실은 가장 중증인 형태의 인간 질환을 모방한다. PCCA 유전자 결실이 있는 마우스는 출생 후 36시간 이내에 사망하여, 이들에서 정맥내 전신 요법을 테스트하는 것을 어렵게 만든다 (문헌 [Guenzel *et al.*, Mol Ther. 2013 Jul; 21(7): 1316-1323]을 참조한다). 저차형 PCCA 마우스는 마우스 PCCA 녹아웃의 배경에서 병원성 A138T 돌연변이가 있는 인간 PCCA를 코딩하는 트랜스진의 도입으로 인해 감소된 PCCA 활성을 갖는다. 이러한 돌연변이체 PCCA 유전자는 프로피오닐카르니틴, 메틸시트레이트, 글리신, 알라닌, 라이신, 암모니아, 및 심근병증과 연관된 마커의 수준이 프로피온산혈증 (PA) 환자에서의 이러한 화합물의 수준과 유사하게 상승되는 것을 초래한다. 간략하게, 마우스 (n=5)에 서열식별번호: 38로 표현되는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)를 1.66 x 10^{11}개의 바이러스 게놈 (VG) 또는 5 x 10^{11}개의 VG로 정맥내로 주사하였다. PBS-처리 마우스가 대조군 마우스로서 사용되었다.

[0232] *PCCA 발현 수준 및 효소 활성 검정법*

[0233] 주사 6주 후, 마우스 간을 균질화하고, 인간 야생형 PCCA 단백질을 LC-MS에 의해 측정하였다. **도 14**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열 (DTC346) 또는 인간 PCCA의 코돈-최적화 서열 (DTC347, DTC348, 또는 DTC349)을 코딩하는 rAAV로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서 발현된 인간 야생형 PCCA 단백질의 농도 (nmol/g 단백질 단위)를 나타내는 막대 그래프이다. 열거된 백분율 숫자는 야생형 FVB 마우스의 내인성 PCCA 단백질 수준에 대한 백분율로서 계산된 인간 야생형 PCCA 발현을 나타낸다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 열거된 백분율 숫자는 야생형 FVB 마우스의 내인성 PCCA 단백질 수준에 대한 백분율로서 계산된 인간 야생형 PCCA 발현을 나타낸다. 이전의 결과와 일치하여, 코돈-최적화 인간 PCCA를 코딩하는 rAAV로부터 발현된 인간 PCCA 단백질은 완전한 천연 인간 PCCA를 코딩하는 rAAV로부터 발현된 천연 인간 PCCA 단백질에 비교했을 때 더 낮은 발현 수준을 실연하였다. 간 균질화물의 PCCA 효소 활성을 섬광 카운터를 사용하여 중탄산나트륨 [C14]의 혼입으로서 측정하였다. **도 15**는 평균 분당 카운트 (CPM) 데이터에 의해 측정된 바와 같은, 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 인간 PCCA 활성의 막대 그래프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 열거된 백분율 숫자는 야생형 FVB 마우스에서 관찰된 것에 대해 상대적인 CPM 데이터를 기재한다. 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 **는 PBS-처리 군에 비교하여 $p<0.01$을 나타낸다.

[0234] **도 15**에 나타난 바와 같이, 더 높은 용량 (5×10^{11}개의 VG)의 완전한 천연 인간 PCCA를 코딩하는 rAAV가 주사된 마우스가 PBS-처리 마우스에 비교하여 PCCA 활성의 통계적으로 유의한 개선 (11%)을 실연하였다.

[0235] *천연 PCCA 바이러스 벡터를 저차형 PCCA 마우스에 투여하는 것의 프로피온산혈증 (PA)의 공지된 바이오마커의 농도에 대한 효과*

[0236] 본 실시예는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)를 저차형 PCCA 마우스에 투여하는 것의 PA의 공지된 바이오마커의 혈장 농도에 대한 효과를 테스트하는 것에 또한 관련된다. 간략하게, 마우스 (n = 5)에 서열식별번호: 38로 표현되는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열 (DTC346)을 코딩하는 rAAV를 1.66×10^{11}개의 VG 또는 5×10^{11}개의 VG로 정맥내로 주사하였다. PA의 공지된 바이오마커 (프로피오닐카르니틴 (C3), 아세틸카르니틴 (C2), 및 2-메틸시트레이트 (2MC))의 혈장 농도를 액체 크로마토그래피-질량 분광법 (LC-MS)에 의해 결정하였다. **도 16a-c**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 전 (Pre) 및 처리하고 나서 2, 3, 4, 및 6주 후 (각각 2W, 3W, 4W, 및 6W)의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 프로피온산혈증의 공지된 바이오마커의 농도를 나타내는 막대 그래프이다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 던넷 다중 비교 검정을 사용하여 **는 PBS-처리 군에 비교하여 $p<0.01$을 나타내고, ***는 PBS-처리 군에 비교하여 $p < 0.001$을 나타낸다. **도 16a**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 C3 (프로피오닐카르니틴)의 혈장 농도를 나타내는 막대 그래프이다. **도 16b**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 혈장 C3/C2 농도 비 (프로피오닐카르니틴/아세틸카르니틴)의 막대 그래프이다. **도 16c**는 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로의 처리 후의 저차형 PCCA 마우스 모델 (A138T 돌연변이체)에서의 2-메틸시트레이트 (2MC)의 혈장 농도를 나타내는 막대 그래프이다.

[0237] 어느 한쪽 용량 (1.66×10^{11}개의 VG 또는 5×10^{11}개의 VG)의 인간 PCCA의 완전한 천연 서열을 코딩하는 rAAV (DTC346)로 처리된 마우스가 PBS-처리 마우스에 비교하여 혈장 C3, C3/C2 및 2-MC 수준의 통계적으로 유의한 감소를 실연하였다.

[0238] 번호가 매겨진 실시양태

[0239] 본원에 개시된 실시양태는 본 개시내용의 번호가 매겨진 실시양태에서 제공된 바와 같은 실시양태 P1 내지 P136을 포함한다.

[0240] 실시양태 P1: 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0241] (a) 5' ITR 서열;

[0242] (b) 프로모터 서열;

[0243] (c) PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및

[0244] (d) 3' ITR 서열.

[0245] 실시양태 P2: 실시양태 P1에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

[0246] 실시양태 P3: 실시양태 P2에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

[0247] 실시양태 P4: 실시양태 P2에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8로부터의 것인 rAAV.

[0248] 실시양태 P5: 실시양태 P1에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

[0249] 실시양태 P6: 실시양태 P1 내지 P5 중 어느 하나에 있어서, 프로모터가 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, 및 CAG 프로모터로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0250] 실시양태 P7: 실시양태 P6에 있어서, 프로모터가 CBA 프로모터인 rAAV.

[0251] 실시양태 P8: 실시양태 P1 내지 P7 중 어느 하나에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

[0252] 실시양태 P9: 실시양태 P8에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 rAAV.

[0253] 실시양태 P10: 실시양태 P1 내지 P7 중 어느 하나에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

[0254] 실시양태 P11: 실시양태 P10에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

[0255] 실시양태 P12: 실시양태 P1 내지 P11 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0256] 실시양태 P13: 실시양태 P1 내지 P11 중 어느 하나에 있어서, 3' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0257] 실시양태 P14: 실시양태 P1 내지 P11 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및 3' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0258] 실시양태 P15: 실시양태 P12 내지 P14 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및 3' ITR 서열이 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0259] 실시양태 P16: 실시양태 P1 내지 P11 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및/또는 3' ITR 서열이 비-AAV2 공급원으로부터의 것인 rAAV.

[0260] 실시양태 P17: 실시양태 P1 내지 P16 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0261] 실시양태 P18: 실시양태 P17에 있어서, 인핸서가 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 ApoE 인핸서로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0262] 실시양태 P19: 실시양태 P18에 있어서, 인핸서가 CMV 인핸서인 rAAV.

[0263] 실시양태 P20: 실시양태 P19에 있어서, 인핸서가 서열식별번호: 19를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0264] 실시양태 P21: 실시양태 P18 내지 P20 중 어느 하나에 있어서, 인핸서가 프로모터 서열의 상류에 위치하는 것인 rAAV.

[0265] 실시양태 P22: 실시양태 P1 내지 P21 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0266] 실시양태 P23: 실시양태 P22에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, 프로메가 키메라 인트론, 또는 hFIX 인트론으로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0267] 실시양태 P24: 실시양태 P23에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론인 rAAV.

[0268] 실시양태 P25: 실시양태 P24에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 20을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0269] 실시양태 P26: 실시양태 P23에 있어서, 인트론이 rHBB 인트론인 rAAV.

[0270] 실시양태 P27: 실시양태 P26에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 21을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0271] 실시양태 P28: 실시양태 P1 내지 P27 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 폴리아데닐화 신호 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0272] 실시양태 P29: 실시양태 P28에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 및 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0273] 실시양태 P30: 실시양태 P29에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0274] 실시양태 P31: 실시양태 P30에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0275] 실시양태 P32: 실시양태 P29에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 SV40 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0276] 실시양태 P33: 실시양태 P32에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0277] 실시양태 P34: 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0278] (a) 5' ITR 서열;

[0279] (b) 프로모터 서열;

[0280] (c) PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열; 및

[0281] (d) 3' ITR 서열.

[0282] 실시양태 P35: 실시양태 P34에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

[0283] 실시양태 P36 :실시양태 P35에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

[0284] 실시양태 P37: 실시양태 P35에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8로부터의 것인 rAAV.

[0285] 실시양태 P38: 실시양태 P34에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

[0286] 실시양태 P39: 실시양태 P34 내지 P38 중 어느 하나에 있어서, 프로모터가 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, 및 CAG 프로모터로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0287] 실시양태 P40: 실시양태 P39에 있어서, 프로모터가 CBA 프로모터인 rAAV.

[0288] 실시양태 P41: 실시양태 P34 내지 P40 중 어느 하나에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

[0289] 실시양태 P42: 실시양태 P41에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 7을 포함하는 것인 rAAV.

[0290] 실시양태 P43: 실시양태 P34 내지 P40 중 어느 하나에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

[0291] 실시양태 P44: 실시양태 P43에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

[0292] 실시양태 P45: 실시양태 P34 내지 P44 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0293] 실시양태 P46: 실시양태 P34 내지 P44 중 어느 하나에 있어서, 3' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0294] 실시양태 P47: 실시양태 P34 내지 P44 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및 3' ITR 서열이 AAV2로부터의 것인 rAAV.

[0295] 실시양태 P48: 실시양태 P45 내지 P47 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및 3' ITR 서열이 서열식별번호: 15를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0296] 실시양태 P49: 실시양태 P34 내지 P44 중 어느 하나에 있어서, 5' ITR 서열 및/또는 3' ITR 서열이 비-AAV2 공급원으로부터의 것인 rAAV.

[0297] 실시양태 P50: 실시양태 P34 내지 P49 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인핸서 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0298] 실시양태 P51: 실시양태 P50에 있어서, 인핸서가 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 ApoE 인핸서로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0299] 실시양태 P52: 실시양태 P51에 있어서, 인핸서가 CMV 인핸서인 rAAV.

[0300] 실시양태 P53: 실시양태 P52에 있어서, 인핸서가 서열식별번호: 19를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0301] 실시양태 P54: 실시양태 P51 내지 P53 중 어느 하나에 있어서, 인핸서가 프로모터 서열의 상류에 위치하는 것인 rAAV.

[0302] 실시양태 P55: 실시양태 P34 내지 P54 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 하나 이상의 인트론 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0303] 실시양태 P56: 실시양태 P55에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, 프로메가 키메라 인트론, 또는 hFIX 인트론으로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0304] 실시양태 P57: 실시양태 P56에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론인 rAAV.

[0305] 실시양태 P58: 실시양태 P57에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 20을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0306] 실시양태 P59: 실시양태 P56에 있어서, 인트론이 rHBB 인트론인 rAAV.

[0307] 실시양태 P60: 실시양태 P59에 있어서, 인트론이 서열식별번호: 21을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0308] 실시양태 P61: 실시양태 P34 내지 P60 중 어느 하나에 있어서, 패키징된 게놈이 폴리아데닐화 신호 서열을 추가로 포함하는 것인 rAAV.

[0309] 실시양태 P62: 실시양태 P61에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 및 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0310] 실시양태 P63: 실시양태 P62에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0311] 실시양태 P64: 실시양태 P63에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 22를 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0312] 실시양태 P65: 실시양태 P62에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 SV40 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0313] 실시양태 P66: 실시양태 P65에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 서열식별번호: 23을 포함하거나 또는 그로 이루어지는 것인 rAAV.

[0314] 실시양태 P67: 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0315] (a) 5' ITR 서열;

[0316] (b) 인핸서 서열;

[0317] (c) 프로모터 서열;

[0318] (d) 인트론 서열;

[0319] (e) PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열;

[0320] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0321] (g) 3' ITR 서열.

[0322] 실시양태 P68: 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0323] (a) 5' ITR 서열;

[0324] (b) 인핸서 서열;

[0325] (c) 프로모터 서열;

[0326] (d) 인트론 서열;

[0327] (e) PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열;

[0328] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0329] (g) 3' ITR 서열.

[0330] 실시양태 P69: 실시양태 P67 또는 실시양태 P68에 있어서, AAV 캡시드가 혈청형 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, rh10, 또는 hu37의 AAV로부터의 것인 rAAV.

[0331] 실시양태 P70: 실시양태 P69에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

[0332] 실시양태 P71: 실시양태 P69에 있어서, AAV 캡시드가 AAV8로부터의 것인 rAAV.

[0333] 실시양태 P72: 실시양태 P67 또는 실시양태 P68에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9 변이체 캡시드인 rAAV.

[0334] 실시양태 P73: 실시양태 P67 내지 P72 중 어느 하나에 있어서, 프로모터가 닭 β-액틴 (CBA) 프로모터, 시토메갈로바이러스 극초기 유전자 (CMV) 프로모터, 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 알파-1 항-트립신 (A1AT) 프로모터, 및 CAG 프로모터로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0335] 실시양태 P74: 실시양태 P73에 있어서, 프로모터가 CBA 프로모터인 rAAV.

[0336] 실시양태 P75: 실시양태 P67에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

[0337] 실시양태 P76: 실시양태 P75에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 1을 포함하는 것인 rAAV.

[0338] 실시양태 P77: 실시양태 P67에 있어서, PCCA에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

[0339] 실시양태 P78: 실시양태 P77에 있어서, PCCA에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

[0340] 실시양태 P79: 실시양태 P68에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 야생형 코딩 서열인 rAAV.

[0341] 실시양태 P80: 실시양태 P79에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 7을 포함하는 것인 rAAV.

[0342] 실시양태 P81: 실시양태 P68에 있어서, PCCB에 대한 부분적인 또는 완전한 코딩 서열이 코돈-최적화 코딩 서열인 rAAV.

[0343] 실시양태 P82: 실시양태 P81에 있어서, PCCB에 대한 코딩 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 코딩 서열을 포함하는 것인 rAAV.

[0344] 실시양태 P83: 실시양태 P67 내지 P82 중 어느 하나에 있어서, 인핸서가 시토메갈로바이러스 극초기 유전자

(CMV) 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR), 닭 β-액틴 (CBA) 인핸서, En34 인핸서, 및 ApoE 인핸서로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0345] 실시양태 P84: 실시양태 P83에 있어서, 인핸서가 CMV 인핸서인 rAAV.

[0346] 실시양태 P85: 실시양태 P67 내지 P84 중 어느 하나에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론, 토끼 헤모글로빈 서브유닛 베타 (rHBB) 인트론, 인간 베타 글로빈 IVS2 인트론, 프로메가 키메라 인트론, 또는 hFIX 인트론으로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0347] 실시양태 P86: 실시양태 P85에 있어서, 인트론이 SV40 소형 T 인트론인 rAAV.

[0348] 실시양태 P87: 실시양태 P85에 있어서, 인트론이 rHBB 인트론인 rAAV.

[0349] 실시양태 P88: 실시양태 P67 내지 P87 중 어느 하나에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열, SV40 폴리아데닐화 신호 서열, 및 토끼 베타 글로빈 폴리아데닐화 신호 서열로부터 선택되는 것인 rAAV.

[0350] 실시양태 P89: 실시양태 P88에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 소 성장 호르몬 (BGH) 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0351] 실시양태 P90: 실시양태 P88에 있어서, 폴리아데닐화 신호 서열이 SV40 폴리아데닐화 신호 서열인 rAAV.

[0352] 실시양태 P91: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0353] (a) 5' ITR 서열;

[0354] (b) 인핸서 서열;

[0355] (c) 프로모터 서열;

[0356] (d) 인트론 서열;

[0357] (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열;

[0358] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0359] (g) 3' ITR 서열.

[0360] 실시양태 P92: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0361] (a) 5' ITR 서열;

[0362] (b) 인핸서 서열;

[0363] (c) 프로모터 서열;

[0364] (d) 인트론 서열;

[0365] (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열;

[0366] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0367] (g) 3' ITR 서열.

[0368] 실시양태 P93: 실시양태 P91 또는 P92에 있어서, AAV 캡시드가 AAV9로부터의 것인 rAAV.

[0369] 실시양태 P94: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0370] (a) 5' ITR 서열;

[0371] (b) 인핸서 서열;

[0372] (c) 프로모터 서열;

[0373] (d) 인트론 서열;

[0374] (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열;

[0375] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0376] (g) 3' ITR 서열.

[0377] 실시양태 P95: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0378] (a) 5' ITR 서열;

[0379] (b) 인핸서 서열;

[0380] (c) 프로모터 서열;

[0381] (d) 인트론 서열;

[0382] (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열;

[0383] (f) 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0384] (g) 3' ITR 서열.

[0385] 실시양태 P96: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0386] (a) AAV2 5' ITR 서열;

[0387] (b) CMV 인핸서 서열;

[0388] (c) CBA 프로모터 서열;

[0389] (d) rHBB 또는 SV40 소형 T 인트론 서열;

[0390] (e) 서열식별번호: 1-6으로부터 선택된 PCCA에 대한 코딩 서열;

[0391] (f) BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0392] (g) AAV2 3' ITR 서열.

[0393] 실시양태 P97: 프로피온산혈증 (PA)의 치료에 유용한 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)로서, AAV9 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하며, 상기 벡터 게놈이 작동가능하게 연결된 성분으로서 5'에서 3'으로의 순서로 하기를 포함하는 것인 rAAV:

[0394] (a) AAV2 5' ITR 서열;

[0395] (b) CMV 인핸서 서열;

[0396] (c) CBA 프로모터 서열;

[0397] (d) rHBB 또는 SV40 소형 T 인트론 서열;

[0398] (e) 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 PCCB에 대한 코딩 서열;

[0399] (f) BGH 또는 SV40 폴리아데닐화 신호 서열; 및

[0400] (g) AAV2 3' ITR 서열.

[0401] 실시양태 P98: 실시양태 P67 내지 P97 중 어느 하나에 있어서, 벡터 게놈이 벡터 게놈 요소 (d)와 (e) 사이에 위치하는 컨센서스 코작 서열을 포함하는 것인 rAAV.

[0402] 실시양태 P99: 실시양태 P98에 있어서, 컨센서스 코작 서열이 서열식별번호: 24를 포함하는 것인 rAAV.

[0403] 실시양태 P100: 이전 실시양태 중 어느 하나의 rAAV 및 제약상 허용되는 담체를 포함하는 조성물.

[0404] 실시양태 P101: 인간 대상체에게 실시양태 P1 내지 P99 중 어느 하나의 rAAV 또는 실시양태 P100의 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

[0405] 실시양태 P102: 인간 대상체에게 하기를 투여하는 것을 포함하는, 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법:

[0406] (1) 실시양태 P1 내지 P33 중 어느 하나의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량; 및

[0407] (2) 실시양태 P34 내지 P66 중 어느 하나의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량.

[0408] 실시양태 P103: 실시양태 P102에 있어서, (1) 및 (2)의 조성물이 동시에 투여되는 것인 방법.

[0409] 실시양태 P104: 실시양태 P102에 있어서, (1) 및 (2)의 조성물이 순차적으로 투여되는 것인 방법.

[0410] 실시양태 P105: 실시양태 P102에 있어서, (1) 및 (2)의 조성물이 별개로 투여되는 것인 방법.

[0411] 실시양태 P106: 인간 대상체에게 실시양태 P1 내지 P33 중 어느 하나의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, PCCA 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

[0412] 실시양태 P107: 실시양태 P106에 있어서, PCCA 내의 상기 돌연변이가 표 1로부터 선택되는 것인 방법.

[0413] 실시양태 P108: 인간 대상체에게 실시양태 P34 내지 P66 중 어느 하나의 rAAV를 포함하는 조성물의 치료 유효량을 투여하는 것을 포함하는, PCCB 내의 적어도 하나의 돌연변이로 진단된 인간 대상체에서 프로피온산혈증 (PA)을 치료하는 방법.

[0414] 실시양태 P109: 실시양태 P108에 있어서, PCCB 내의 상기 돌연변이가 표 2로부터 선택되는 것인 방법.

[0415] 실시양태 P110: 실시양태 P101 내지 P109 중 어느 하나에 있어서, 재조합 바이러스, rAAV, 또는 조성물이 피하로, 근육내로, 피내로, 복강내로 또는 정맥내로 투여되는 것인 방법.

[0416] 실시양태 P111: 실시양태 P110에 있어서, rAAV 또는 조성물이 정맥내로 투여되는 것인 방법.

[0417] 실시양태 P112: 실시양태 P101 내지 P111 중 어느 하나에 있어서, rAAV가 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{14}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

[0418] 실시양태 P113: 실시양태 P112에 있어서, rAAV가 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{13}개 게놈 카피 (GC)/kg의 용량으로 투여되는 것인 방법.

[0419] 실시양태 P114: 실시양태 P110 내지 P113 중 어느 하나에 있어서, rAAV를 투여하는 것이 단일 용량의 rAAV의 투여를 포함하는 것인 방법.

[0420] 실시양태 P115: 실시양태 P110 내지 P113 중 어느 하나에 있어서, rAAV를 투여하는 것이 다중 용량의 rAAV의 투여를 포함하는 것인 방법.

[0421] 실시양태 P116: 서열식별번호: 16의 PCCA 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산으로서, 여기서 핵산 서열이 서열식별번호: 1의 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 것인 재조합 핵산.

[0422] 실시양태 P117: 실시양태 P116에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0423] 실시양태 P118: 실시양태 P117에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0424] 실시양태 P119: 실시양태 P116 내지 P118 중 어느 하나에 있어서, 핵산 서열이 3' 단부에 TGA, TAA, 및 TAG로부터 선택된 하나 이상의 정지 코돈을 추가로 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0425] 실시양태 P120: 서열식별번호: 17의 PCCB 폴리펩티드를 코딩하는 재조합 핵산으로서, 여기서 핵산 서열이 서열식별번호: 7의 야생형 코딩 서열에 80% 미만 동일한 것인 재조합 핵산.

[0426] 실시양태 P121: 실시양태 P120에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0427] 실시양태 P122: 실시양태 P121에 있어서, 핵산 서열이 서열식별번호: 8-12로부터 선택된 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0428] 실시양태 P123: 실시양태 P120 내지 P122 중 어느 하나에 있어서, 핵산 서열이 3' 단부에 TGA, TAA, 및 TAG로부터 선택된 하나 이상의 정지 코돈을 추가로 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0429] 실시양태 P124: 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 재조합 핵산.

[0430] 실시양태 P125: 실시양태 P124에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0431] 실시양태 P126: 실시양태 P125에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0432] 실시양태 P127: 서열식별번호: 2-6으로부터 선택된 서열을 포함하는 재조합 핵산.

[0433] 실시양태 P128: 실시양태 P124 내지 P127 중 어느 하나에 있어서, 핵산 서열이 3' 단부에 TGA, TAA, 및 TAG로부터 선택된 하나 이상의 정지 코돈을 추가로 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0434] 실시양태 P129: 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 서열에 적어도 80% 동일한 서열을 포함하는 재조합 핵산.

[0435] 실시양태 P130: 실시양태 P129에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 서열에 적어도 90% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0436] 실시양태 P131: 실시양태 P130에 있어서, 재조합 핵산이 서열식별번호: 2-6으부터 선택된 서열에 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0437] 실시양태 P132: 서열식별번호: 7-12로부터 선택된 서열을 포함하는 재조합 핵산.

[0438] 실시양태 P133: 실시양태 P129 내지 P132 중 어느 하나에 있어서, 핵산 서열이 3' 단부에 TGA, TAA, 및 TAG로부터 선택된 하나 이상의 정지 코돈을 추가로 포함하는 것인 재조합 핵산.

[0439] 실시양태 P134: 실시양태 P116 내지 P133 중 어느 하나에 따른 재조합 핵산을 포함하는 rAAV.

[0440] 실시양태 P135: 실시양태 P116 내지 P133 중 어느 하나에 따른 재조합 핵산 또는 실시양태 P134의 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

[0441] 실시양태 P136: 실시양태 P135에 있어서, 상기 숙주 세포가 HeLa, Cos-7, HEK293, A549, BHK, Vero, RD, HT-1080, ARPE-19, 또는 MRC-5 세포로부터 선택되는 것인 숙주 세포.

[0442] 참조로 포함됨

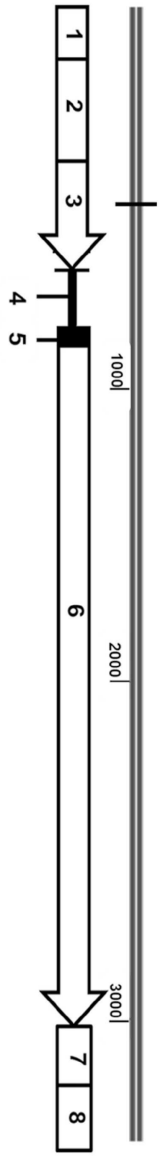
[0443] 본원에서 언급된 각각의 특허 문서 및 과학 논문의 전체 개시내용은 모든 목적을 위해 참조로 포함된다.

[0444] 등가물

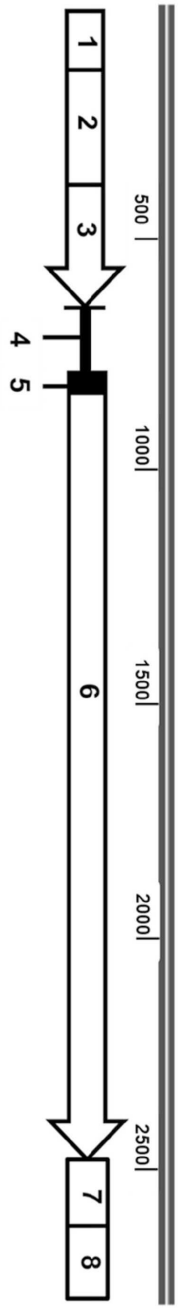
[0445] 본 개시내용이 그의 취지 또는 본질적인 특성에서 벗어나지 않으면서 다른 특정한 형태로 구현될 수 있다. 따라서, 상기 실시양태는 본원에 기재된 개시내용을 제한하기보다는 모든 측면에서 예시적인 것으로 고려되어야 한다. 상이한 실시양태들의 다양한 구조적 요소 및 다양한 개시된 방법 단계가 다양한 조합 및 순열로 활용될 수 있고, 모든 이같은 변형은 본 개시내용의 형태로 간주되어야 한다. 따라서 본 개시내용의 범주는 상기 설명보다는 첨부된 청구범위에 의해 지시되고, 청구범위와 등가의 의미 및 범위 내에 속하는 모든 변화는 본원에 포함되도록 의도된다.

도면

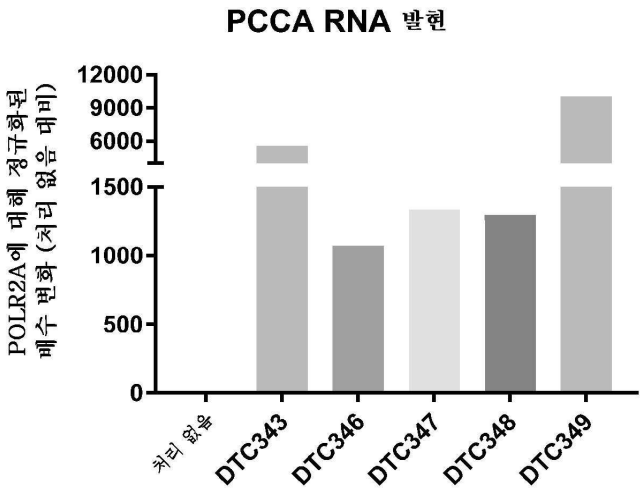
도면1



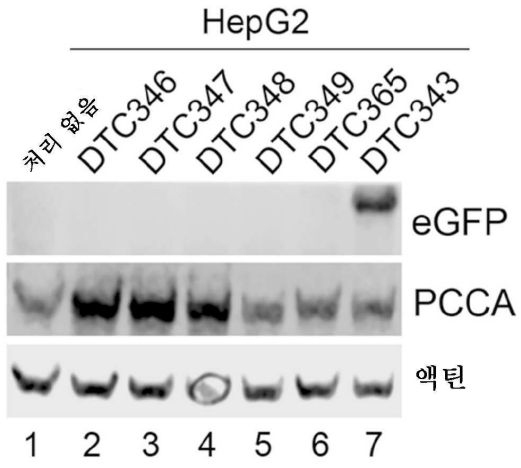
도면2



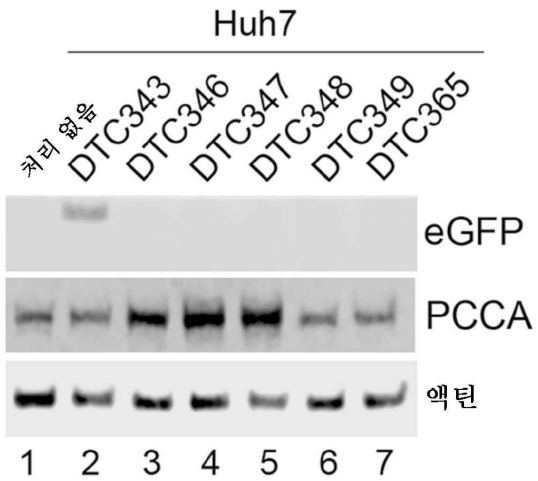
도면3



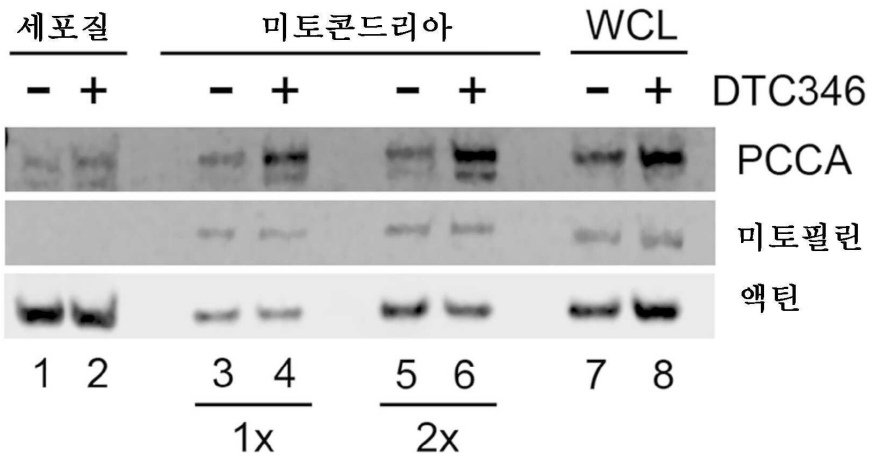
도면4a



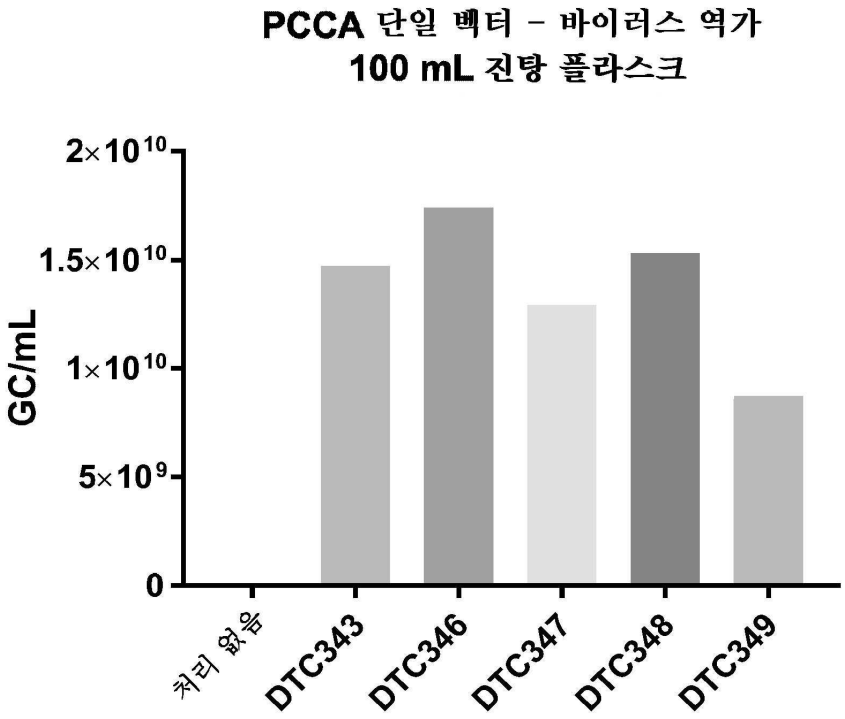
도면4b



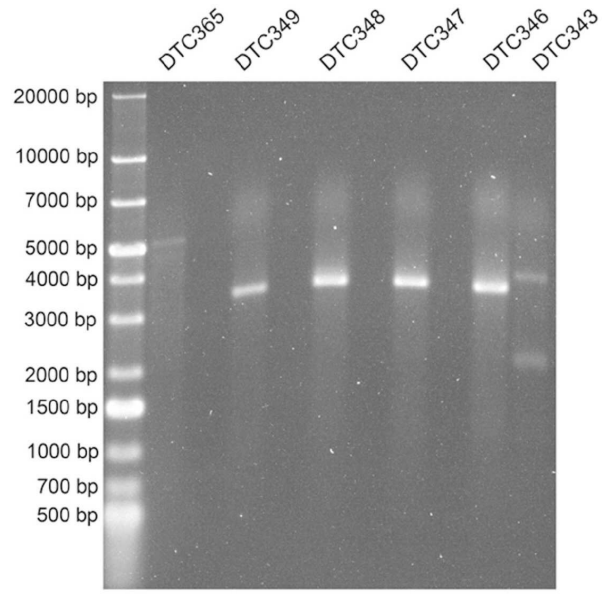
도면5


세포질
미토콘드리아
WCL
- + - + - + - +
DTC346
PCCA
미토필린
액틴
1 2 3 4 5 6 7 8
1x
2x

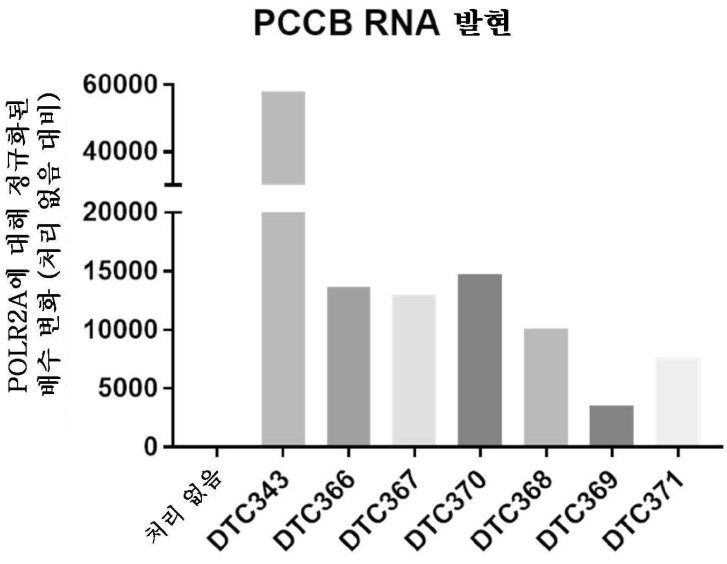
도면6


PCCA 단일 벡터 – 바이러스 역가
100 mL 진탕 플라스크
GC/mL
2×10^10
1.5×10^10
1×10^10
5×10^9
0
처리 없음
DTC343
DTC346
DTC347
DTC348
DTC349

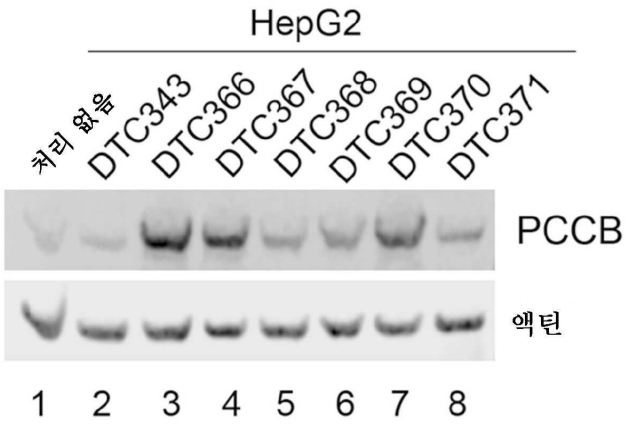
도면7


DTC365
DTC349
DTC348
DTC347
DTC346
DTC343
20000 bp
10000 bp
7000 bp
5000 bp
4000 bp
3000 bp
2000 bp
1500 bp
1000 bp
700 bp
500 bp

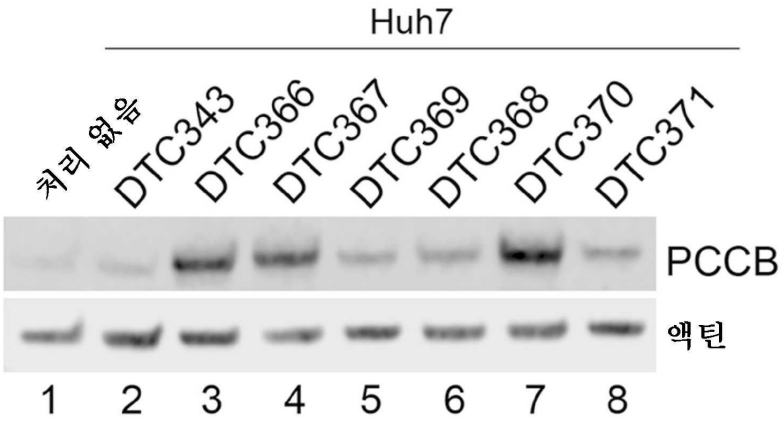
도면8


PCCB RNA 발현
POLR2A에 대해 정규화된
배수 변화 (처리 없음 대비)
60000
40000
20000
15000
10000
5000
0
처리 없음
DTC343
DTC366
DTC367
DTC370
DTC368
DTC369
DTC371

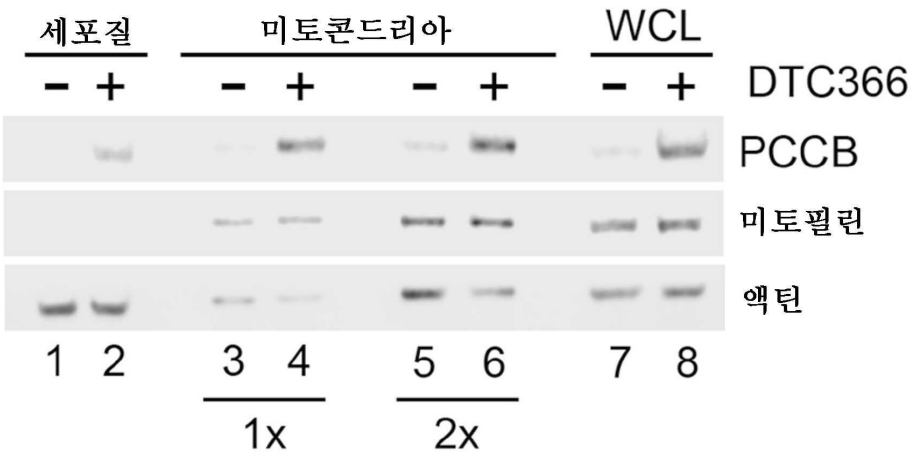
도면9a



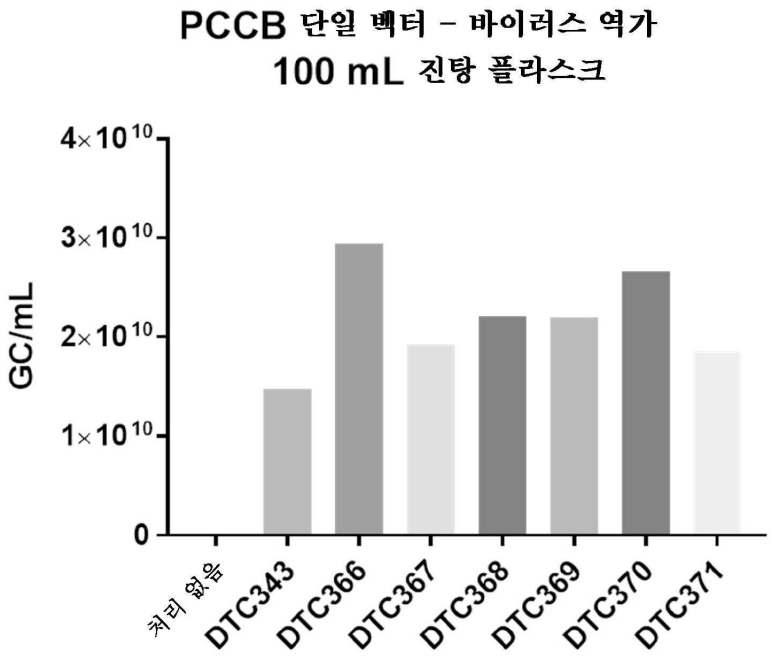
도면9b



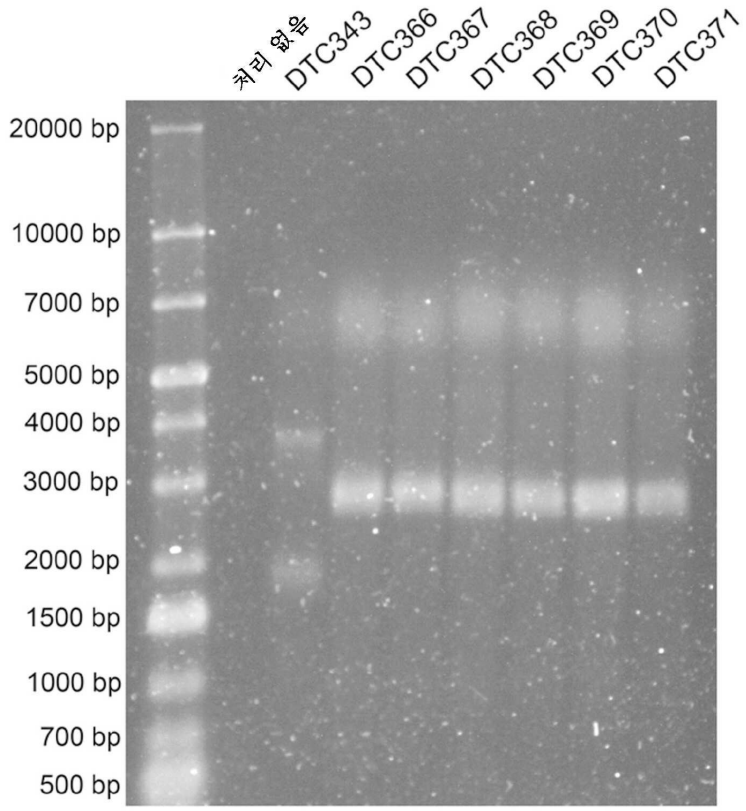
도면10



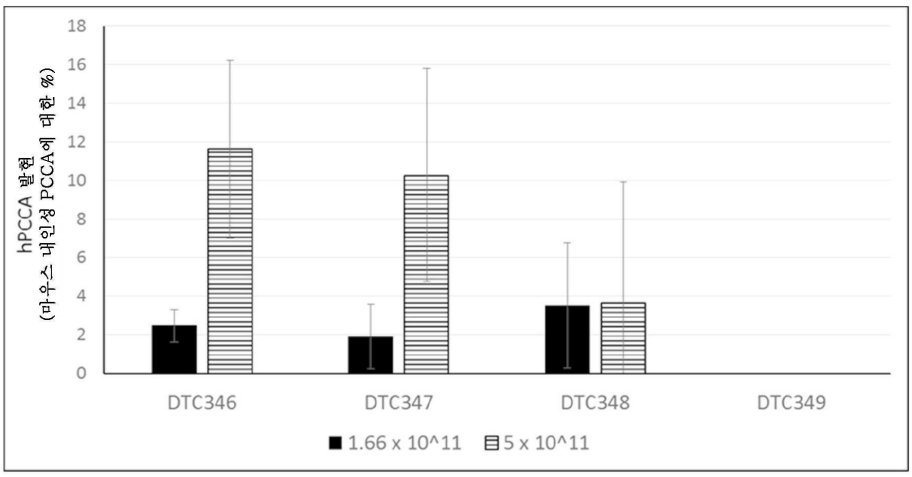
도면11


PCCB 단일 벡터 – 바이러스 역가
100 mL 진탕 플라스크
GC/mL
4×10^10
3×10^10
2×10^10
1×10^10
0
처리 없음
DTC343
DTC366
DTC367
DTC368
DTC369
DTC370
DTC371

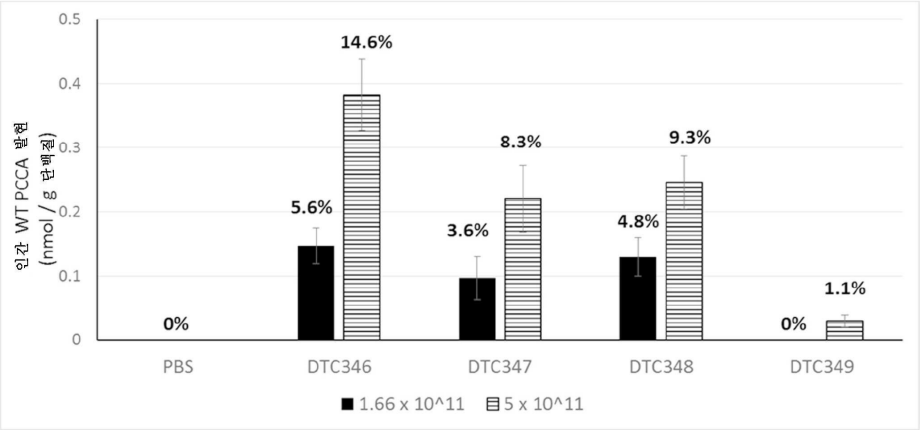
도면12


처리 없음
DTC343
DTC366
DTC367
DTC368
DTC369
DTC370
DTC371
20000 bp
10000 bp
7000 bp
5000 bp
4000 bp
3000 bp
2000 bp
1500 bp
1000 bp
700 bp
500 bp

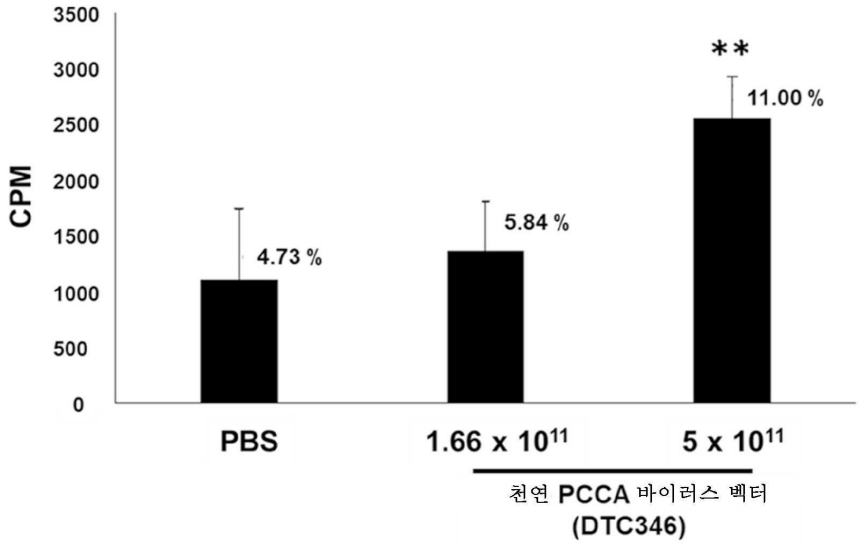
도면13



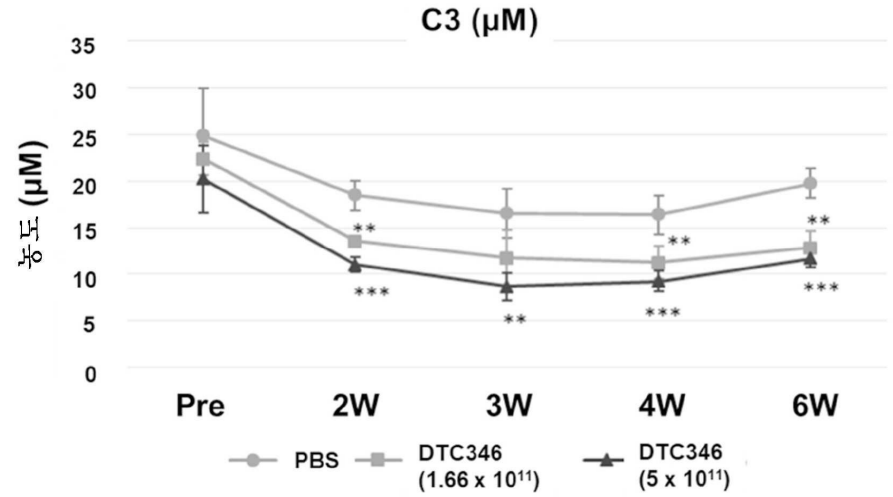
도면14



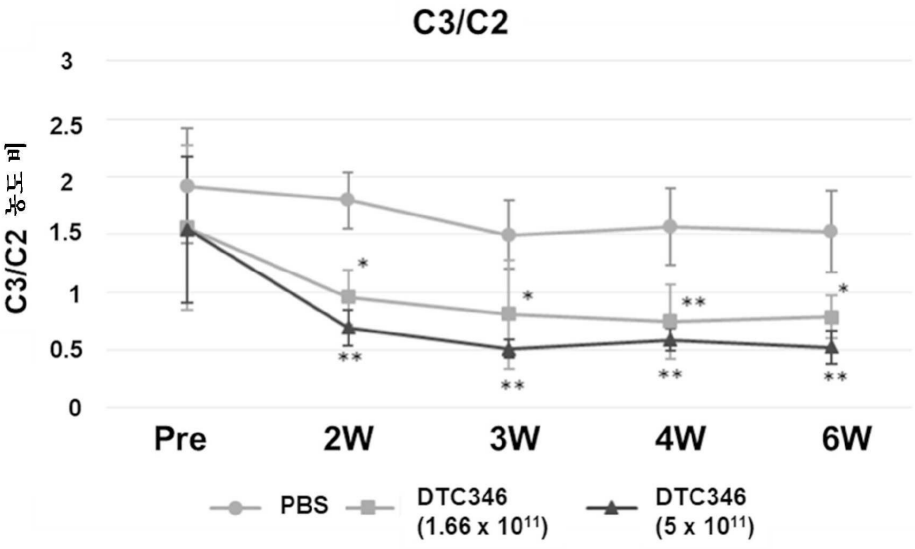
도면15



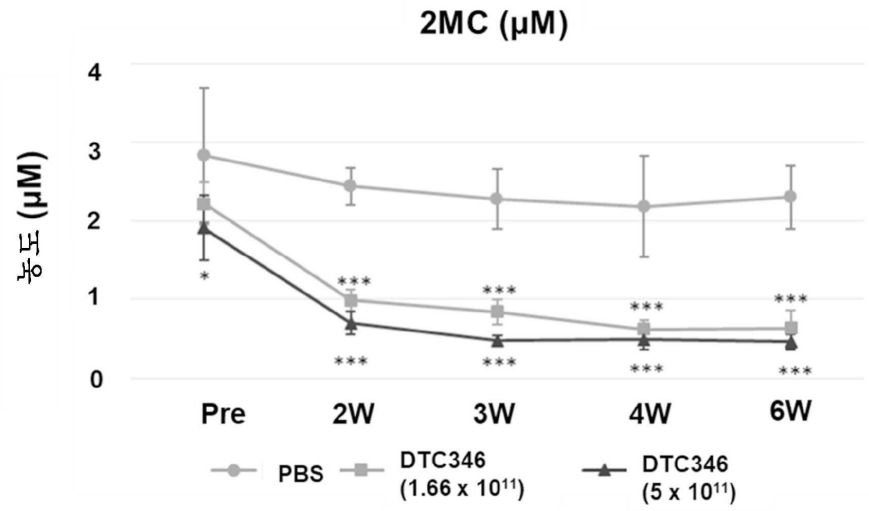
도면16a


C3 (μM)
농도 (μM)
35
30
25
20
15
10
5
0
Pre
2W
3W
4W
6W
PBS
DTC346 (1.66 x 10^11)
DTC346 (5 x 10^11)

도면16b


C3/C2
C3/C2 농도 비
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
Pre
2W
3W
4W
6W
PBS
DTC346 (1.66 x 10^11)
DTC346 (5 x 10^11)

도면16c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> ULTRAGENYX PHARMACEUTICAL INC.

<120> GENE THERAPY FOR TREATING PROPIONIC ACIDEMIA

<130> ULP-001WO

<150> 62/739,471

<151> 2018-10-01

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2184

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atggcggggt tctgggtcgg gacagcaccg ctggtcgctg ccggacggcg tgggcggtgg 60

ccgccgcagc agctgatgct gagcgcggcg ctgcggaccc tgaagcatgt tctgtactat 120

tcaagacagt gcttaatggt gtcccgtaat cttggttcag tgggatatga tcctaatgaa 180

aaaactttg ataaaattct tgttgctaat agaggagaaa ttgcatgtcg ggttattaga 240

acttgcaaga agatgggcat taagacagtt gccatccaca gtgatgttga tgctagttct 300

gttcatgtga aaatggcgga tgaggctgtc tgtgttggcc cagctcccac cagtaaaagc 360

tacctcaaca tggatgccat catggaagcc attaagaaaa ccagggccca agctgtacat 420

ccaggttatg gattcctttc agaaaacaaa gaatttgcca gatgtttggc agcagaagat 480

gtcgttttca ttggacctga cacacatgct attcaagcca tgggcgacaa gattgaaagc 540

aaattattag ctaagaaagc agaggttaat acaatccctg gctttgatgg agtagtcaag 600

gatgcagaag aagctgtcag aattgcaagg gaaattggct accctgtcat gatcaaggcc 660

tcagcaggtg gtggtgggaa aggcatgcgc attgcttggg atgatgaaga gaccagggat 720

ggttttagat tgtcatctca agaagctgct tctagttttg gcgatgatag actactaata 780

gaaaaattta ttgataatcc tcgtcatata gaaatccagg ttctaggtga taaacatggg 840

aatgctttat ggcttaatga aagagagtgc tcaattcaga gaagaaatca gaaggtggtg 900

gaggaagcac caagcatttt tttggatgcg gagactcgaa gagcgatggg agaacaagct 960

gtagctcttg ccagagcagt aaaatattcc tctgctggga ccgtggagtt ccttgtggac 1020

tctaagaaga atttttattt cttggaaatg aatacaagac tccaggttga gcatcctgtc 1080

acagaatgca ttactggcct ggacctagtc caggaaatga tccgtgttgc taagggctac 1140

cctctcaggc acaaacaagc tgatattcgc atcaacggct gggcagttga atgtcgggtt 1200

tatgctgagg acccctacaa gtcttttggt ttaccatcta ttgggagatt gtctcagtac 1260

caagaaccgt tacatctacc tggtgtccga gtggacagtg gcatccaacc aggaagtgat 1320

attagcattt attatgatcc tatgatttca aaactaatca catatggctc tgatagaact 1380

gaggcactga agagaatggc agatgcactg gataactatg ttattcgagg tgttacacat 1440

aatattgcat tacttcgaga ggtgataatc aactcacgct ttgtaaaagg agacatcagc 1500

actaaatttc tctccgatgt gtatcctgat ggcttcaaag gacacatgct aaccaagagt 1560

gagaagaacc agttattggc aatagcatca tcattgtttg tggcattcca gttaagagca 1620

caacattttc aagaaaattc aagaatgcct gttattaaac cagacatagc caactgggag 1680

ctctcagtaa aattgcatga taaagttcat accgtagtag catcaaacaa tgggtcagtg 1740

ttctcggtgg aagttgatgg gtcgaaacta aatgtgacca gcacgtggaa cctggcttcg 1800

cccttattgt ctgtcagcgt tgatggcact cagaggactg tccagtgtct ttctcgagaa 1860

gcaggtggaa acatgagcat tcagtttctt ggtacagtgt acaaggtgaa tatcttaacc 1920

agacttgccg cagaattgaa caaatttatg ctggaaaaag tgactgagga cacaagcagt 1980

gttctgcgtt ccccgatgcc cggagtggtg gtggccgtct ctgtcaagcc tggagacgcg 2040

gtagcagaag gtcaagaaat ttgtgtgatt gaagccatga aaatgcagaa tagtatgaca 2100

gctgggaaaa ctggcacggt gaaatctgtg cactgtcaag ctggagacac agttggagaa 2160

ggggatctgc tcgtggagct ggaa 2184

<210> 2

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCA Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 2

atggctggat tttgggtcgg aacggcccct ctcgtggccg ccggccgccg gggtcggtgg 60

ccgccgcaac agctgatgtt gtcggccgcg ctgcgcaccc ttaagcatgt gctgtactac 120

tcccggcaat gccttatggt gtccagaaac ctgggtagcg tgggctatga cccgaacgag 180

aaaaccttcg acaagattct ggtggccaac cgggggggaaa ttgcctgccg ggtcatcagg 240

acttgcaaga agatgggcat caagaccgtc gccattcact ccgacgtgga cgcctcctcc 300

gtgcacgtga agatggcaga tgaagccgtc tgcgtgggcc ccgccccgac ctccaagtcc 360

taccttaaca tggacgcgat catggaagcc atcaaaaaga ccagagccca ggcagtgcac 420

ccgggatacg gctttctctc cgaaaacaag gagttcgcgc ggtgcctggc cgctgaagat 480

gtcgtgttca tcggccctga tacccacgcg atccaggcta tgggagacaa gatcgaatcc 540

aagctgctcg ccaagaaagc cgaagtcaac accatacctg ggtttgacgg cgtggtcaag 600

gacgcagaag aagccgtcag gattgcccgc gagatcggat accccgtgat gatcaaggca 660

tccgccgggg ggggaggaaa gggaatgcgc atcgcctggg atgacgaaga aacccgggac 720

ggcttcagac tctcgtcaca agaggccgcg tcctcattcg gggatgaccg gctcctgatt 780

gagaagttca ttgacaatcc tcggcacatc gagattcagg tcctgggcga taagcatgga 840

aacgccctgt ggctgaacga acgcgaatgc agcatccaga ggcggaacca gaaagtggtg 900

gaagaggccc catccatctt tctcgacgcc gagactcgga gagcgatggg tgaacaggcc 960

gtggccctgg cccgagccgt gaagtactcc agcgcgggga ctgtcgagtt cctggtggac 1020

agcaagaaga atttctactt cctggagatg aatactcggc tccaagtgga acaccccgtg 1080

accgaatgca ttaccggtct ggacctcgtc caagaaatga tccgcgtcgc caagggctac 1140

ccattgagac acaaacaggc cgacattcgg atcaacggat gggccgtcga gtgtcgcgtg 1200

tacgcggaag atccgtataa gtcgttcgga ctgccgtcca ttggtagact ctcgcagtac 1260

caagagccac tgcacctccc cggagtgcgc gtggactcag gcatccagcc cggaagcgac 1320

atctctatct actacgaccc catgatttcc aagttgatca cctacgggtc cgataggacc 1380

gaggcactga agcgcatggc tgacgcactt gacaactacg tgatccgcgg ggtcactcac 1440

aacattgccc tgctccgcga agtgatcatc aactcgcgct tcgtgaaggg cgacatctcc 1500

actaagttcc tgtccgacgt gtaccctgac ggtttcaagg gccatatgct gaccaagtcc 1560

gagaagaacc agctcctggc tatcgcctcc tccctgtttg tggcgttcca gctgagggcg 1620

cagcacttcc aggagaacag ccggatgccc gtgatcaagc ctgacatcgc caattgggag 1680

ctgtccgtga agctgcacga taaggtccat accgtggtgg catccaacaa cggatcggtg 1740

ttcagcgtgg aagtggacgg gtccaagctg aacgtgacca gcacatggaa cctggcgtcc 1800

cccctgttgt ctgtgtcggt cgatggcacg cagcgcactg tgcagtgcct ctcccgggaa 1860

gctggcggaa acatgagcat ccagttcctg ggtactgtgt acaaggtcaa cattctgact 1920

cggctggccg ccgagctgaa caagttcatg ttggaaaaag tcaccgaaga tacatcgtca 1980

gtcctgcgga gcccaatgcc tggagtcgtg gtggcggtgt cagtgaagcc cggcgatgct 2040

gtggccgaag gccaagagat ctgcgtgatc gaggccatga agatgcagaa ctcgatgacc 2100

gccggaaaga ccggtaccgt gaagtccgtg cattgtcaag cgggcgacac tgtgggagag 2160

ggagatctgc tcgtggagct ggag 2184

<210> 3

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCA Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 3

atggccggct tctgggtcgg caccgcccct ctggtcgcgg ccggacgacg cggacgctgg 60

ccaccccagc aactgatgct gagcgcggcc ttgaggactc tgaagcacgt gctctactac 120

tcgcggcagt gcctgatggt gtcccggaat ctggggtccg tgggatacga ccctaacgaa 180

aagaccttcg ataagatcct cgtggcaaat cggggagaga tcgcgtgtcg cgtgatccgc 240

acgtgcaaga agatggggat caagactgtg gcaatccata gcgatgtgga tgcatcctcg 300

gtccacgtga agatggccga cgaagctgtg tgcgtgggac cggcgccgac ttcgaaatcg 360

tacctgaaca tggacgctat tatggaggcg atcaagaaaa cgcgcgccca agcggtccat 420

cccggttacg gattcctgag cgagaacaag gaatttgcac ggtgcctcgc tgccgaggac 480

gtggtgttta tcggtcccga cacccacgcc atccaagcta tgggggacaa gattgagtcc 540

aagctcctgg cgaaaaaggc agaggtcaac acaattcctg gtttcgacgg cgtcgtgaag 600

gacgccgaag aagccgtgcg catcgcgagg gaaatcggtt accctgtgat gattaaggcc 660

tccgccggcg gcggtggaaa gggaatgaga attgcctggg acgatgaaga aacccgcgac 720

ggattccgcc tgtcgagcca ggaagccgcc tcttccttcg gcgatgacag actgctgatc 780

gaaaagttca tcgataaccc cagacacatt gagatccaag tgctcgggga taagcacggc 840

aacgcccttt ggctgaacga gagagagtgc tccattcaac gccgcaatca gaaggtcgtg 900

gaggaagccc cgtcgatatt cctggatgcc gaaacccggc gggccatggg agagcaggct 960

gtcgcgttgg cgcgggccgt caagtacagc tcggccggga ccgtggaatt tctggtcgat 1020

tccaagaaga acttctattt cctggagatg aacaccagac tccaggtcga gcacccggtc 1080

actgagtgta tcaccgggct cgatctggtg caagagatga ttcgggtggc gaagggatat 1140

ccccttcggc ataaacaagc cgacatcagg atcaacggtt gggccgtgga atgcagggtc 1200

tacgccgagg acccctacaa gagcttcggc ctgcccagca tcggccgcct gtcacagtat 1260

caggaaccgc tgcatcttcc gggcgtgcgg gtcgacagcg gaattcagcc tggctcagat 1320

atctccatct actacgatcc aatgatctca aagctgatta cttatggatc cgaccggacc 1380

gaagcccttа agcgaatggc cgacgccctg gacaactacg tgatccgggg agtgacccac 1440

aacatcgcct tgctgcggga agtgatcatt aacagcagat tcgtgaaggg agacatcagc 1500

accaagttcc tgtcggatgt ctacccggac gggttcaaag ggcacatgct tactaagtcc 1560

gagaagaatc agctgctcgc cattgcgtca agcttgttcg tggcctttca actccgggcc 1620

cagcacttcc aggaaaactc ccgcatgcca gtcattaagc cggacatcgc caactgggaa 1680

ctcagcgtga agctccatga caaagtgcat accgtggtgg ccagcaacaa cggtagcgtg 1740

ttctcagtcg aggtcgatgg ctcgaagctc aacgtcactt ccacttggaa cttggccagc 1800

ccgctgctgt ccgtgtccgt ggacggaacc cagaggaccg tgcagtgtct gtcgagagaa 1860

gccggcggca acatgtcaat ccagttcctg ggaaccgtgt acaaggtcaa catcctgacc 1920

agactggccg ccgaactgaa caagtttatg ctcgagaaag tgaccgagga cactagctcc 1980

gtgctgcgct cccctatgcc cggagtggtc gtggcagtgt ccgtgaagcc gggcgacgcc 2040

gtggccgagg gacaggaaat ctgtgtgatc gaagcgatga agatgcagaa ttcaatgacc 2100

gcgggaaaga ctgggaccgt gaagtctgtg cactgccagg ctggcgatac cgtgggggag 2160

ggcgaccttc tggtggaact cgag 2184

<210> 4

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCA Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 4

atggctgggt tttgggtggg gacagctcct ctggtggctg ctgggaggag ggggaggtgg 60

cctcctcagc agctgatgct gtctgctgct ctgaggacac tgaagcatgt gctgtattat 120

tctaggcagt gtctgatggt gtctaggaat ctggggtctg tggggtatga tcctaatgag 180

aagacatttg ataagattct ggtggctaat agggggggaga ttgcttgtag ggtgattagg 240

acatgtaaga agatggggat taagacagtg gctattcatt ctgatgtgga tgcttcttct 300

gtgcatgtga agatggctga tgaggctgtg tgtgtggggc ctgctcctac atctaagtct 360

tatctgaata tggatgctat tatggaggct attaagaaga caagggctca ggctgtgcat 420

cctgggtatg ggtttctgtc tgagaataag gagtttgcta ggtgtctggc tgctgaggat 480

gtggtgttta ttgggcctga tacacatgct attcaggcta tgggggataa gattgagtct 540

aagctgctgg ctaagaaggc tgaggtgaat acaattcctg ggtttgatgg ggtggtgaag 600

gatgctgagg aggctgtgag gattgctagg gagattgggt atcctgtgat gattaaggct 660

tctgctgggg gggggggggaa ggggatgagg attgcttggg atgatgagga gacaagggat 720

gggtttaggc tgtcttctca ggaggctgct tcttcttttg gggatgatag gctgctgatt 780

gagaagttta ttgataatcc taggcatatt gagattcagg tgctgggggga taagcatggg 840

aatgctctgt ggctgaatga gagggagtgt tctattcaga ggaggaatca gaaggtggtg 900

gaggaggctc cttctatttt tctggatgct gagacaagga gggctatggg ggagcaggct 960

gtggctctgg ctagggctgt gaagtattct tctgctggga cagtggagtt tctggtggat 1020

tctaagaaga atttttattt tctggagatg aatacaaggc tgcaggtgga gcatcctgtg 1080

acagagtgta ttacagggct ggatctggtg caggagatga ttagggtggc taaggggtat 1140

cctctgaggc ataagcaggc tgatattagg attaatgggt gggctgtgga gtgtagggtg 1200

tatgctgagg atccttataa gtcttttggg ctgccttcta ttgggaggct gtctcagtat 1260

caggagcctc tgcatctgcc tggggtgagg gtggattctg ggattcagcc tgggtctgat 1320

atttctattt attatgatcc tatgatttct aagctgatta catatgggtc tgataggaca 1380

gaggctctga agaggatggc tgatgctctg gataattatg tgattagggg ggtgacacat 1440

aatattgctc tgctgaggga ggtgattatt aattctaggt ttgtgaaggg ggatatttct 1500

acaaagtttc tgtctgatgt gtatcctgat gggtttaagg ggcatatgct gacaaagtct 1560

gagaagaatc agctgctggc tattgcttct tctctgtttg tggcttttca gctgagggct 1620

cagcattttc aggagaattc taggatgcct gtgattaagc ctgatattgc taattgggag 1680

ctgtctgtga agctgcatga taaggtgcat acagtggtgg cttctaataa tgggtctgtg 1740

ttttctgtgg aggtggatgg gtctaagctg aatgtgacat ctacatggaa tctggcttct 1800

cctctgctgt ctgtgtctgt ggatgggaca cagaggacag tgcagtgtct gtctagggag 1860

gctgggggga atatgtctat tcagtttctg gggacagtgt ataaggtgaa tattctgaca 1920

aggctggctg ctgagctgaa taagtttatg ctggagaagg tgacagagga tacatcttct 1980

gtgctgaggt ctcctatgcc tggggtggtg gtggctgtgt ctgtgaagcc tggggatgct 2040

gtggctgagg ggcaggagat ttgtgtgatt gaggctatga agatgcagaa ttctatgaca 2100

gctgggaaga cagggacagt gaagtctgtg cattgtcagg ctggggatac agtgggggag 2160

ggggatctgc tggtggagct ggag 2184

<210> 5

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCA Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 5

atggcagggt tttgggtggg gacagcacca ctggtggcag cagggaggag ggggaggtgg 60

ccaccacagc agctgatgct gtcagcagca ctgaggacac tgaagcatgt gctgtattat 120

tcaaggcagt gtctgatggt gtcaaggaat ctggggtcag tggggtatga tccaaatgag 180

aagacatttg ataagattct ggtggcaaat agggggggaga ttgcatgtag ggtgattagg 240

acatgtaaga agatggggat taagacagtg gcaattcatt cagatgtgga tgcatcatca 300

gtgcatgtga agatggcaga tgaggcagtg tgtgtggggc cagcaccaac atcaaagtca 360

tatctgaata tggatgcaat tatggaggca attaagaaga caagggcaca ggcagtgcat 420

ccagggtatg ggtttctgtc agagaataag gagtttgcaa ggtgtctggc agcagaggat 480

gtggtgttta ttgggccaga tacacatgca attcaggcaa tgggggataa gattgagtca 540

aagctgctgg caaagaaggc agaggtgaat acaattccag ggtttgatgg ggtggtgaag 600

gatgcagagg aggcagtgag gattgcaagg gagattgggt atccagtgat gattaaggca 660

tcagcagggg gggggggggaa ggggatgagg attgcatggg atgatgagga gacaagggat 720

gggtttaggc tgtcatcaca ggaggcagca tcatcatttg gggatgatag gctgctgatt 780

gagaagttta ttgataatcc aaggcatatt gagattcagg tgctggggga taagcatggg 840

aatgcactgt ggctgaatga gagggagtgt tcaattcaga ggaggaatca gaaggtggtg 900

gaggaggcac catcaatttt tctggatgca gagacaagga gggcaatggg ggagcaggca 960

gtggcactgg caagggcagt gaagtattca tcagcaggga cagtggagtt tctggtggat 1020

tcaaagaaga atttttattt tctggagatg aatacaaggc tgcaggtgga gcatccagtg 1080

acagagtgta ttacagggct ggatctggtg caggagatga ttagggtggc aaaggggtat 1140

ccactgaggc ataagcaggc agatattagg attaatgggt gggcagtgga gtgtagggtg 1200

tatgcagagg atccatataa gtcatttggg ctgccatcaa ttgggaggct gtcacagtat 1260

caggagccac tgcatctgcc aggggtgagg gtggattcag ggattcagcc agggtcagat 1320

atttcaattt attatgatcc aatgatttca aagctgatta catatgggtc agataggaca 1380

gaggcactga agaggatggc agatgcactg gataattatg tgattagggg ggtgacacat 1440

aatattgcac tgctgaggga ggtgattatt aattcaaggt ttgtgaaggg ggatatttca 1500

acaaagtttc tgtcagatgt gtatccagat gggtttaagg ggcatatgct gacaaagtca 1560

gagaagaatc agctgctggc aattgcatca tcactgtttg tggcatttca gctgagggca 1620

cagcattttc aggagaattc aaggatgcca gtgattaagc cagatattgc aaattgggag 1680

ctgtcagtga agctgcatga taaggtgcat acagtggtgg catcaaataa tgggtcagtg 1740

ttttcagtgg aggtggatgg gtcaaagctg aatgtgacat caacatggaa tctggcatca 1800

ccactgctgt cagtgtcagt ggatgggaca cagaggacag tgcagtgtct gtcaagggag 1860

gcaggggggа atatgtcaat tcagtttctg gggacagtgt ataaggtgaa tattctgaca 1920

aggctggcag cagagctgaa taagtttatg ctggagaagg tgacagagga tacatcatca 1980

gtgctgaggt caccaatgcc aggggtggtg gtggcagtgt cagtgaagcc aggggatgca 2040

gtggcagagg ggcaggagat ttgtgtgatt gaggcaatga agatgcagaa ttcaatgaca 2100

gcagggaaga cagggacagt gaagtcagtg cattgtcagg caggggatac agtgggggag 2160

ggggatctgc tggtggagct ggag 2184

<210> 6

<211> 2184

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCA Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 6

atggctggtt tttgggtagg tacagcacca ctagtagcag caggtaggag gggtaggtgg 60

ccaccacaac aactaatgct atcagcagca ctaaggacac taaagcatgt actatattat 120

tcaaggcaat gtctaatggt atcaaggaat ctggggtctg tggggtatga tcctaatgag 180

aagacatttg ataagattct ggtggctaat agggggggaga ttgcttgtag ggtgattagg 240

acatgtaaga agatggggat taagacagtg gctattcatt ctgatgtgga tgcttcttct 300

gtgcatgtga agatggctga tgaggctgtg tgtgtggggc ctgctcctac atctaagtct 360

tatctgaata tggatgctat tatggaggct attaagaaga caagggctca ggctgtgcat 420

cctgggtatg ggtttctgtc tgagaataag gagtttgcta ggtgtctggc tgctgaggat 480

gtggtgttta ttgggcctga tacacatgct attcaggcta tgggggataa gattgagtct 540

aagctgctgg ctaagaaggc tgaggtgaat acaattcctg ggtttgatgg ggtggtgaag 600

gatgctgagg aggctgtgag gattgctagg gagattgggt atcctgtgat gattaaggct 660

tctgctgggg gggggggggaa ggggatgagg attgcttggg atgatgagga gacaagggat 720

gggtttaggc tgtcttctca ggaggctgct tcttcttttg gggatgatag gctgctgatt 780

gagaagttta ttgataatcc taggcatatt gagattcagg tgctgggggа taagcatggg 840

aatgctctgt ggctgaatga gagggagtgt tctattcaga ggaggaatca gaaggtggtg 900

gaggaggctc cttctatttt tctggatgct gagacaagga gggctatggg ggagcaggct 960

gtggctctgg ctagggctgt gaagtattct tctgctggga cagtggagtt tctggtggat 1020

tctaagaaga atttttattt tctggagatg aatacaaggc tgcaggtgga gcatcctgtg 1080

acagagtgta ttacagggct ggatctggtg caggagatga ttagggtggc taaggggtat 1140

cctctgaggc ataagcaggc tgatattagg attaatgggt gggctgtgga gtgtagggtg 1200

tatgctgagg atccttataa gtcttttggg ctgccttcta ttgggaggct gtctcagtat 1260

caggagcctc tgcatctgcc tggggtgagg gtggattctg ggattcagcc tgggtctgat 1320

atttctattt attatgatcc tatgatttct aagctgatta catatgggtc tgataggaca 1380

gaggctctga agaggatggc tgatgctctg gataattatg tgattagggg ggtgacacat 1440

aatattgctc tgctgaggga ggtgattatt aattctaggt ttgtgaaggg ggatatttct 1500

acaaagtttc tgtctgatgt gtatcctgat gggtttaagg ggcatatgct gacaaagtct 1560

gagaagaatc agctgctggc tattgcttct tctctgtttg tggcttttca gctgagggct 1620

cagcattttc aggagaattc taggatgcct gtgattaagc ctgatattgc taattgggag 1680

ctgtctgtga agctgcatga taaggtgcat acagtggtgg cttctaataa tgggtctgtg 1740

ttttctgtgg aggtggatgg gtctaagctg aatgtgacat ctacatggaa tctggcttct 1800

cctctgctgt ctgtgtctgt ggatgggaca cagaggacag tgcagtgtct gtctagggag 1860

gctgggggga atatgtctat tcagtttctg gggacagtgt ataaggtgaa tattctgaca 1920

aggctggctg ctgagctgaa taagtttatg ctggagaagg tgacagagga tacatcttct 1980

gtgctgaggt ctcctatgcc tggggtggtg gtggctgtgt ctgtgaagcc tggggatgct 2040

gtggctgagg ggcaggagat ttgtgtgatt gaggctatga agatgcagaa ttctatgaca 2100

gctgggaaga cagggacagt gaagtctgtg cattgtcagg ctggggatac agtgggggag 2160

ggggatctgc tggtggagct ggag 2184

<210> 7

<211> 1617

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

atggcggcgg cattacgggt ggcggcggtc ggggcaaggc tcagcgttct ggcgagcggt 60

ctccgcgccg cggtccgcag cctttgcagc caggccacct ctgttaacga acgcatcgaa 120

aacaagcgcc ggaccgcgct gctgggaggg ggccaacgcc gtattgacgc gcagcacaag 180

cgaggaaagc taacagccag ggagaggatc agtctcttgc tggaccctgg cagctttgtt 240

gagagcgaca tgtttgtgga acacagatgt gcagattttg gaatggctgc tgataagaat 300

aagtttcctg gagacagcgt ggtcactgga cgaggccgaa tcaatggaag attggtttat 360

gtcttcagtc aggattttac agtttttgga ggcagtctgt caggagcaca tgcccaaaag 420

atctgcaaaa tcatggacca ggccataacg gtgggggctc cagtgattgg gctgaatgac 480

tctgggggag cacggatcca agaaggagtg gagtctttgg ctggctatgc agacatcttt 540

ctgaggaatg ttacggcatc cggagtcatc cctcagattt ctctgatcat gggcccatgt 600

gctggtgggg ccgtctactc cccagcccta acagacttca cgttcatggt aaaggacacc 660

tcctacctgt tcatcactgg ccctgatgtt gtgaagtctg tcaccaatga ggatgttacc 720

caggaggagc tcggtggtgc caagacccac accaccatgt caggtgtggc ccacagagct 780

tttgaaaatg atgttgatgc cttgtgtaat ctccgggatt tcttcaacta cctgcccctg 840

agcagtcagg acccggctcc cgtccgtgag tgccacgatc ccagtgaccg tctggttcct 900

gagcttgaca caattgtccc tttggaatca accaaagcct acaacatggt ggacatcata 960

cactctgttg ttgatgagcg tgaatttttt gagatcatgc ccaattatgc caagaacatc 1020

attgttggtt ttgcaagaat gaatgggagg actgttggaa ttgttggcaa ccaacctaag 1080

gtggcctcag gatgcttgga tattaattca tctgtgaaag gggctcgttt tgtcagattc 1140

tgtgatgcat tcaatattcc actcatcact tttgttgatg tccctggctt tctacctggc 1200

acagcacagg aatacggggg catcatccgg catggtgcca agcttctcta cgcatttgct 1260

gaggcaactg tacccaaagt cacagtcatc accaggaagg cctatggagg tgcctatgat 1320

gtcatgagct ctaagcacct ttgtggtgat accaactatg cctggcccac cgcagagatt 1380

gcagtcatgg gagcaaaggg cgctgtggag atcatcttca aagggcatga gaatgtggaa 1440

gctgctcagg cagagtacat cgagaagttt gccaaccctt tccctgcagc agtgcgaggg 1500

tttgtggatg acatcatcca accttcttcc acacgtgccc gaatctgctg tgacctggat 1560

gtcttggcca gcaagaaggt acaacgtcct tggagaaaac atgcaaatat tccattg 1617

<210> 8

<211> 1617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCB Coding Sequence -

Codon-Optimized

<400> 8

atggctgccg ccctgcgcgt ggcggccgtg ggagcaagac tgtccgtgct ggcgtcgggc 60

ttgagagcgg ccgtgcggag cctgtgctca caagcaacct cggtgaacga acgcatcgag 120

aacaagcgca ggactgcgct gctgggcggg ggccagcgca ggatcgacgc acagcataag 180

cgcggaaagc tgaccgcccg cgagcggatt tccctgctcc tggatcctgg aagcttcgtg 240

gagtccgaca tgttcgtgga gcaccgctgc gccgacttcg ggatggctgc cgacaagaac 300

aagttccccg gggactcagt ggtcactggt cgcggaagaa tcaatggccg gctcgtctac 360

gtgttctcac aagactttac tgtgttcggc ggctccctgt cgggagccca cgcgcaaaag 420

atctgcaaga ttatggatca ggccatcact gtgggagcgc ctgtgattgg actcaacgac 480

tccgggggag caagaatcca ggaaggagtg gaaagccttg ccggctacgc tgacatcttc 540

ctccggaacg tgaccgcctc tggagtgatt ccgcaaatct ccctgatcat gggaccatgt 600

gccgggggcg ccgtgtactc cccggcgctg actgacttca ctttcatggt caaggacaca 660

tcctacctgt tcatcaccgg tcccgacgtc gtgaagtccg tgaccaacga ggatgtgacc 720

caggaagaac tgggggggggc caagacgcat accaccatgt cgggagtggc ccaccgggcc 780

ttcgagaacg atgtggacgc cttgtgcaac cttcgggact tcttcaatta tctcccgctg 840

agcagccagg atccggcccc agtgcgggaa tgccacgacc cttcggatcg gttggtgcct 900

gagctggata ccatcgtgcc cctcgaatcc accaaggctt acaacatggt cgacatcatt 960

cactccgtgg tggacgagag ggaattcttc gagattatgc cgaactacgc caagaacatc 1020

attgtcggat tcgcccgcat gaacggtcga actgtgggca ttgtcggaaa ccagcctaaa 1080

gtggcctccg gttgcctgga catcaactca agcgtgaagg gtgccagatt tgtgcggttt 1140

tgtgacgcgt tcaatattcc gctgatcacc ttcgtcgacg tcccgggctt cctgcctggg 1200

accgcccagg aatacggcgg catcatcaga cacggcgcga agctcctcta cgcgttcgcg 1260

gaagccaccg tgcccaaggt caccgtgatc actcgcaagg catacggcgg cgcatacgat 1320

gtgatgtcct ccaagcacct gtgtggcgac accaactacg cctggcccac cgccgagatc 1380

gccgtgatgg gtgccaaggg tgctgtcgag atcatcttca agggacatga aaacgtggaa 1440

gctgcccagg ccgagtacat tgaaaagttc gctaacccct tccctgccgc cgtgcgggga 1500

tttgtggatg acattatcca gccgagctcg accagggcca gaatctgctg cgatcttgat 1560

gtgttggcca gcaaaaaggt ccagcggccc tggcggaaac acgccaacat tccactg 1617

<210> 9

<211> 1617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCB Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 9

atggccgcgg cgcttagagt ggccgctgtg ggagccaggc tgagcgtgct ggccagcggt 60

ctgcgcgccg cagtgcgctc gctgtgtagc caggctacct ccgtgaatga gcggatcgaa 120

aacaagcggc gcaccgccct gttgggcggc ggacagcggc gaattgacgc ccaacacaag 180

cggggaaagc tcactgcgag ggaaagaatc tcactgctgc tcgaccccgg gtcgttcgtg 240

gaatcggata tgtttgtcga acatagatgc gcagatttcg gaatggccgc tgacaagaac 300

aagttcccgg gagattccgt cgtgaccgga agggggcgca ttaacgggag acttgtgtac 360

gtgttcagcc aggatttcac ggtgttcggc ggatcactga gcggtgcaca tgcacagaag 420

atctgcaaga tcatggacca ggccattacc gtcggggcac ctgtgatcgg cctgaatgat 480

tcgggcggag cccggattca agagggcgtg gagtcactcg cgggttacgc cgacattttc 540

ctgcggaacg tcaccgcctc cggcgtgatc cctcaaatca gcctcattat gggcccctgc 600

gcgggcggtg ccgtctactc acccgctctg accgatttta ccttcatggt caaggacacc 660

tcctatctgt ttatcactgg accagatgtg gtcaagtccg tgaccaacga ggacgtcact 720

caggaagaac tcggtggagc aaagacccac actactatgt ccggggtcgc gcatagagct 780

ttcgaaaacg acgtcgatgc tctctgtaac ctgagggatt tcttcaacta ccttccactg 840

tcgtcgcaag acccagcccc cgtgcgcgag tgccacgatc cctccgaccg cctggtgccg 900

gaactcgaca ctattgtccc tctggagtca accaaggcct acaacatggt ggacatcatc 960

catagcgtcg tggatgaacg ggagttcttc gaaatcatgc ccaactatgc gaaaaatatc 1020

atcgtgggct ttgcgcggat gaacggccgc accgtgggca tagtgggcaa ccagccgaag 1080

gtcgcgtcgg gatgcctcga tatcaacagc tctgtgaagg gagcgcggtt cgtgcgcttc 1140

tgcgacgcct tcaacatccc cttgatcacc ttcgtggatg tgcctgggtt cttgcctgga 1200

accgcccagg aatacggggg gatcattcgg cacggagcaa aactgctgta cgccttcgcc 1260
gaggccactg tgccgaaagt gacagtgatt acccggaagg cctacggggg tgcctacgac 1320
gtgatgagct ccaagcacct gtgcggagac accaattacg cgtggcctac tgctgaaatt 1380
gctgtcatgg gagccaaggg cgccgtggaa atcattttca agggccacga aaacgtcgag 1440
gccgcccaag ctgagtacat cgagaagttt gccaacccgt ttcctgcggc tgtgcgcggc 1500
ttcgtcgacg atatcattca gccctcgtcc actcgcgccc gcatttgttg tgacctcgac 1560
gtgctggcgt ccaagaaagt gcaaagaccg tggagaaagc atgcaaacat cccgctc 1617

<210> 10
<211> 1617
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCB Coding Sequence - Codon-Optimized
<400> 10
atggctgctg ctctgagggt ggctgctgtg ggggctaggc tgtctgtgct ggcttctggg 60
ctgagggctg ctgtgaggtc tctgtgttct caggctacat ctgtgaatga gaggattgag 120
aataagagga ggacagctct gctgggggggg gggcagagga ggattgatgc tcagcataag 180
agggggaagc tgacagctag ggagaggatt tctctgctgc tggatcctgg gtcttttgtg 240
gagtctgata tgtttgtgga gcataggtgt gctgattttg ggatggctgc tgataagaat 300

aagtttcctg gggattctgt ggtgacaggg agggggagga ttaatgggag gctggtgtat 360
gtgttttctc aggattttac agtgtttggg gggtctctgt ctggggctca tgctcagaag 420
atttgtaaga ttatggatca ggctattaca gtgggggctc ctgtgattgg gctgaatgat 480
tctgggggggg ctaggattca ggaggggggtg gagtctctgg ctgggtatgc tgatattttt 540
ctgaggaatg tgacagcttc tggggtgatt cctcagattt ctctgattat ggggccttgt 600
gctgggggggg ctgtgtattc tcctgctctg acagatttta catttatggt gaaggataca 660
tcttatctgt ttattacagg gcctgatgtg gtgaagtctg tgacaaatga ggatgtgaca 720

caggaggagc tgggggggggc taagacacat acaacaatgt ctggggtggc tcatagggct 780
tttgagaatg atgtggatgc tctgtgtaat ctgagggatt tttttaatta tctgcctctg 840
tcttctcagg atcctgctcc tgtgagggag tgtcatgatc cttctgatag gctggtgcct 900
gagctggata caattgtgcc tctggagtct acaaaggctt ataatatggt ggatattatt 960

cattctgtgg tggatgagag ggagtttttt gagattatgc ctaattatgc taagaatatt 1020

attgtggggt ttgctaggat gaatgggagg acagtgggga ttgtggggaa tcagcctaag 1080

gtggcttctg ggtgtctgga tattaattct tctgtgaagg gggctaggtt tgtgaggttt 1140

tgtgatgctt ttaatattcc tctgattaca tttgtggatg tgcctgggtt tctgcctggg 1200

acagctcagg agtatggggg gattattagg catggggcta agctgctgta tgcttttgct 1260

gaggctacag tgcctaaggt gacagtgatt acaaggaagg cttatggggg ggcttatgat 1320

gtgatgtctt ctaagcatct gtgtggggat acaaattatg cttggcctac agctgagatt 1380

gctgtgatgg gggctaaggg ggctgtggag attattttta aggggcatga gaatgtggag 1440

gctgctcagg ctgagtatat tgagaagttt gctaatcctt ttcctgctgc tgtgaggggg 1500

tttgtggatg atattattca gccttcttct acaagggcta ggatttgttg tgatctggat 1560

gtgctggctt ctaagaaggt gcagaggcct tggaggaagc atgctaatat tcctctg 1617

<210> 11

<211> 1617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCB Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 11

atggcagcag cactgagggt ggcagcagtg ggggcaaggc tgtcagtgct ggcatcaggg 60

ctgagggcag cagtgaggtc actgtgttca caggcaacat cagtgaatga gaggattgag 120

aataagagga ggacagcact gctgggggggg gggcagagga ggattgatgc acagcataag 180

agggggaagc tgacagcaag ggagaggatt tcactgctgc tggatccagg gtcatttgtg 240

gagtcagata tgtttgtgga gcataggtgt gcagattttg ggatggcagc agataagaat 300

aagtttccag gggattcagt ggtgacaggg agggggagga ttaatgggag gctggtgtat 360

gtgttttcac aggattttac agtgtttggg gggtcactgt caggggcaca tgcacagaag 420

atttgtaaga ttatggatca ggcaattaca gtgggggcac cagtgattgg gctgaatgat 480

tcaggggggg caaggattca ggaggggggtg gagtcactgg cagggtatgc agatattttt 540

ctgaggaatg tgacagcatc aggggtgatt ccacagattt cactgattat ggggccatgt 600

gcaggggggg cagtgtattc accagcactg acagatttta catttatggt gaaggataca 660

tcatatctgt ttattacagg gccagatgtg gtgaagtcag tgacaaatga ggatgtgaca 720

caggaggagc tgggggggggc aaagacacat acaacaatgt caggggtggc acatagggca 780

tttgagaatg atgtggatgc actgtgtaat ctgagggatt tttttaatta tctgccactg 840

tcatcacagg atccagcacc agtgagggag tgtcatgatc catcagatag gctggtgcca 900

gagctggata caattgtgcc actggagtca acaaaggcat ataatatggt ggatattatt 960

cattcagtgg tggatgagag ggagtttttt gagattatgc caaattatgc aaagaatatt 1020

attgtggggt ttgcaaggat gaatgggagg acagtgggga ttgtggggaa tcagccaaag 1080

gtggcatcag ggtgtctgga tattaattca tcagtgaagg gggcaaggtt tgtgaggttt 1140

tgtgatgcat ttaatattcc actgattaca tttgtggatg tgccagggtt tctgccaggg 1200

acagcacagg agtatggggg gattattagg catggggcaa agctgctgta tgcatttgca 1260

gaggcaacag tgccaaaggt gacagtgatt acaaggaagg catatggggg ggcatatgat 1320

gtgatgtcat caaagcatct gtgtggggat acaaattatg catggccaac agcagagatt 1380

gcagtgatgg gggcaaaggg ggcagtggag attattttta aggggcatga gaatgtggag 1440

gcagcacagg cagagtatat tgagaagttt gcaaatccat ttccagcagc agtgaggggg 1500

tttgtggatg atattattca gccatcatca acaagggcaa ggatttgttg tgatctggat 1560

gtgctggcat caaagaaggt gcagaggcca tggaggaagc atgcaaatat tccactg 1617

<210> 12

<211> 1617

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: PCCB Coding Sequence - Codon-Optimized

<400> 12

atggctgcag cactaagggt agcagcagta ggtgcaaggc tatcagtact agcatcaggt 60

ctaagggcag cagtaaggtc actatgttca caagcaacat cagtaaatga aaggatagaa 120

aataagagga ggacagcact actaggtggt gggcagagga ggattgatgc tcagcataag 180

agggggaagc tgacagctag ggagaggatt tctctgctgc tggatcctgg gtcttttgtg 240

gagtctgata tgtttgtgga gcataggtgt gctgattttg ggatggctgc tgataagaat 300

aagtttcctg gggattctgt ggtgacaggg agggggagga ttaatgggag gctggtgtat 360

gtgttttctc aggattttac agtgtttggg gggtctctgt ctggggctca tgctcagaag 420

atttgtaaga ttatggatca ggctattaca gtgggggctc ctgtgattgg gctgaatgat 480

tctgggggggg ctaggattca ggaggggggtg gagtctctgg ctgggtatgc tgatattttt 540

ctgaggaatg tgacagcttc tggggtgatt cctcagattt ctctgattat ggggccttgt 600

gctgggggggg ctgtgtattc tcctgctctg acagatttta catttatggt gaaggataca 660

tcttatctgt ttattacagg gcctgatgtg gtgaagtctg tgacaaatga ggatgtgaca 720

caggaggagc tgggggggggc taagacacat acaacaatgt ctggggtggc tcatagggct 780

tttgagaatg atgtggatgc tctgtgtaat ctgagggatt tttttaatta tctgcctctg 840

tcttctcagg atcctgctcc tgtgagggag tgtcatgatc cttctgatag gctggtgcct 900

gagctggata caattgtgcc tctggagtct acaaaggctt ataatatggt ggatattatt 960

cattctgtgg tggatgagag ggagtttttt gagattatgc ctaattatgc taagaatatt 1020

attgtggggt ttgctaggat gaatgggagg acagtgggga ttgtggggaa tcagcctaag 1080

gtggcttctg ggtgtctgga tattaattct tctgtgaagg gggctaggtt tgtgaggttt 1140

tgtgatgctt ttaatattcc tctgattaca tttgtggatg tgcctgggtt tctgcctggg 1200

acagctcagg agtatggggg gattattagg catggggcta agctgctgta tgcttttgct 1260

gaggctacag tgcctaaggt gacagtgatt acaaggaagg cttatggggg ggcttatgat 1320

gtgatgtctt ctaagcatct gtgtggggat acaaattatg cttggcctac agctgagatt 1380

gctgtgatgg gggctaaggg ggctgtggag attatttttа aggggcatga gaatgtggag 1440

gctgctcagg ctgagtatat tgagaagttt gctaatcctt ttcctgctgc tgtgaggggg 1500

tttgtggatg atattattca gccttcttct acaagggcta ggatttgttg tgatctggat 1560

gtgctggctt ctaagaaggt gcagaggcct tggaggaagc atgctaatat tcctctg 1617

<210> 13

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: AAV9 Nucleic Acid Sequence

<400> 13

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaatacctg gacccggcaa cggactcgac 180

aaggggggagc cggtcaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtcccag accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140

acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc 1200

ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620

ttaatttttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740

gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800

atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860

aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920

aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980

gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc 2040

gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160

tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 14

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: AAV9 Amino Acid Sequence

<400> 14

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

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

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

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

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

450 455 460

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15
<211> 145
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: AAV2 ITR

<400> 15
ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120
gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 16
<211> 728
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 16
Met Ala Gly Phe Trp Val Gly Thr Ala Pro Leu Val Ala Ala Gly Arg
1 5 10 15
Arg Gly Arg Trp Pro Pro Gln Gln Leu Met Leu Ser Ala Ala Leu Arg

20 25 30
Thr Leu Lys His Val Leu Tyr Tyr Ser Arg Gln Cys Leu Met Val Ser
35 40 45
Arg Asn Leu Gly Ser Val Gly Tyr Asp Pro Asn Glu Lys Thr Phe Asp
50 55 60
Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Cys Arg Val Ile Arg
65 70 75 80
Thr Cys Lys Lys Met Gly Ile Lys Thr Val Ala Ile His Ser Asp Val

85 90 95
Asp Ala Ser Ser Val His Val Lys Met Ala Asp Glu Ala Val Cys Val
100 105 110

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

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

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

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

340 345 350
Arg Leu Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Cys Ile Thr Gly Leu Asp

355 360 365

Leu Val Gln Glu Met Ile Arg Val Ala Lys Gly Tyr Pro Leu Arg His

370 375 380

Lys Gln Ala Asp Ile Arg Ile Asn Gly Trp Ala Val Glu Cys Arg Val

385 390 395 400

Tyr Ala Glu Asp Pro Tyr Lys Ser Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Arg

405 410 415

Leu Ser Gln Tyr Gln Glu Pro Leu His Leu Pro Gly Val Arg Val Asp

420 425 430

Ser Gly Ile Gln Pro Gly Ser Asp Ile Ser Ile Tyr Tyr Asp Pro Met

435 440 445

Ile Ser Lys Leu Ile Thr Tyr Gly Ser Asp Arg Thr Glu Ala Leu Lys

450 455 460

Arg Met Ala Asp Ala Leu Asp Asn Tyr Val Ile Arg Gly Val Thr His

465 470 475 480

Asn Ile Ala Leu Leu Arg Glu Val Ile Ile Asn Ser Arg Phe Val Lys

485 490 495

Gly Asp Ile Ser Thr Lys Phe Leu Ser Asp Val Tyr Pro Asp Gly Phe

500 505 510

Lys Gly His Met Leu Thr Lys Ser Glu Lys Asn Gln Leu Leu Ala Ile

515 520 525

Ala Ser Ser Leu Phe Val Ala Phe Gln Leu Arg Ala Gln His Phe Gln

530 535 540

Glu Asn Ser Arg Met Pro Val Ile Lys Pro Asp Ile Ala Asn Trp Glu

545 550 555 560

Leu Ser Val Lys Leu His Asp Lys Val His Thr Val Val Ala Ser Asn

565 570 575

Asn Gly Ser Val Phe Ser Val Glu Val Asp Gly Ser Lys Leu Asn Val

580 585 590

Thr Ser Thr Trp Asn Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ser Val Ser Val Asp

595 600 605

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

660 665 670
Val Ser Val Lys Pro Gly Asp Ala Val Ala Glu Gly Gln Glu Ile Cys
675 680 685
Val Ile Glu Ala Met Lys Met Gln Asn Ser Met Thr Ala Gly Lys Thr
690 695 700
Gly Thr Val Lys Ser Val His Cys Gln Ala Gly Asp Thr Val Gly Glu
705 710 715 720
Gly Asp Leu Leu Val Glu Leu Glu
725

<210> 17
<211> 539
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 17
Met Ala Ala Ala Leu Arg Val Ala Ala Val Gly Ala Arg Leu Ser Val
1 5 10 15
Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ala Ala Val Arg Ser Leu Cys Ser Gln Ala
20 25 30
Thr Ser Val Asn Glu Arg Ile Glu Asn Lys Arg Arg Thr Ala Leu Leu
35 40 45
Gly Gly Gly Gln Arg Arg Ile Asp Ala Gln His Lys Arg Gly Lys Leu

50 55 60
Thr Ala Arg Glu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Asp Pro Gly Ser Phe Val
65 70 75 80
Glu Ser Asp Met Phe Val Glu His Arg Cys Ala Asp Phe Gly Met Ala

85 90 95

Ala Asp Lys Asn Lys Phe Pro Gly Asp Ser Val Val Thr Gly Arg Gly

100 105 110

Arg Ile Asn Gly Arg Leu Val Tyr Val Phe Ser Gln Asp Phe Thr Val

115 120 125

Phe Gly Gly Ser Leu Ser Gly Ala His Ala Gln Lys Ile Cys Lys Ile

130 135 140

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

145 150 155 160

Ser Gly Gly Ala Arg Ile Gln Glu Gly Val Glu Ser Leu Ala Gly Tyr

165 170 175

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

180 185 190

Ile Ser Leu Ile Met Gly Pro Cys Ala Gly Gly Ala Val Tyr Ser Pro

195 200 205

Ala Leu Thr Asp Phe Thr Phe Met Val Lys Asp Thr Ser Tyr Leu Phe

210 215 220

Ile Thr Gly Pro Asp Val Val Lys Ser Val Thr Asn Glu Asp Val Thr

225 230 235 240

Gln Glu Glu Leu Gly Gly Ala Lys Thr His Thr Thr Met Ser Gly Val

245 250 255

Ala His Arg Ala Phe Glu Asn Asp Val Asp Ala Leu Cys Asn Leu Arg

260 265 270

Asp Phe Phe Asn Tyr Leu Pro Leu Ser Ser Gln Asp Pro Ala Pro Val

275 280 285

Arg Glu Cys His Asp Pro Ser Asp Arg Leu Val Pro Glu Leu Asp Thr

290 295 300

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

305 310 315 320

His Ser Val Val Asp Glu Arg Glu Phe Phe Glu Ile Met Pro Asn Tyr

325 330 335

Ala Lys Asn Ile Ile Val Gly Phe Ala Arg Met Asn Gly Arg Thr Val
340 345 350
Gly Ile Val Gly Asn Gln Pro Lys Val Ala Ser Gly Cys Leu Asp Ile
355 360 365
Asn Ser Ser Val Lys Gly Ala Arg Phe Val Arg Phe Cys Asp Ala Phe

370 375 380
Asn Ile Pro Leu Ile Thr Phe Val Asp Val Pro Gly Phe Leu Pro Gly
385 390 395 400
Thr Ala Gln Glu Tyr Gly Gly Ile Ile Arg His Gly Ala Lys Leu Leu
405 410 415
Tyr Ala Phe Ala Glu Ala Thr Val Pro Lys Val Thr Val Ile Thr Arg
420 425 430
Lys Ala Tyr Gly Gly Ala Tyr Asp Val Met Ser Ser Lys His Leu Cys

435 440 445
Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Trp Pro Thr Ala Glu Ile Ala Val Met Gly
450 455 460
Ala Lys Gly Ala Val Glu Ile Ile Phe Lys Gly His Glu Asn Val Glu
465 470 475 480
Ala Ala Gln Ala Glu Tyr Ile Glu Lys Phe Ala Asn Pro Phe Pro Ala
485 490 495
Ala Val Arg Gly Phe Val Asp Asp Ile Ile Gln Pro Ser Ser Thr Arg

500 505 510
Ala Arg Ile Cys Cys Asp Leu Asp Val Leu Ala Ser Lys Lys Val Gln
515 520 525
Arg Pro Trp Arg Lys His Ala Asn Ile Pro Leu
530 535

<210> 18
<211> 278
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: CBA Promoter
<400> 18

tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc ccccccctcc ccacccccaa 60

ttttgtattt atttattttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120

ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg 180

cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc 240

ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcg 278

<210> 19

<211> 304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: CMV Enhancer

<400> 19

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300

catg 304

<210> 20

<211> 95

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: SV40 Small T Intron

<400> 20

gctctaaggt aaatataaaa tttttaagtg tataatgtgt taaactactg attctaattg 60

tttctctctt ttagattcca acctttggaa ctgat 95

<210> 21

<211> 315

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: rHBB Intron

<400> 21

gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg 60

cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc 120

gggggggagcg gctcggggct gtccgcgggg ggacggctgc cttcgggggg gacggggcag 180

ggcggggttc ggcttctggc gtgtgaccgg cggctcaaga gcctctgcta accatgttca 240

tgccttcttc tttttcctac agctcctggg caacgtgctg gttattgtgc tgtctcatca 300

ttttggcaaa gaatt 315

<210> 22

<211> 215

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: BGH polyadenylation signal sequence

<400> 22

gcctcgactg tgccttctag ttgccagcca tctgttgttt gcccctcccc cgtgccttcc 60

ttgaccctgg aaggtgccac tcccactgtc ctttcctaat aaaatgagga aattgcatcg 120

cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg 180

gaggattggg aagacaatag caggcatgct gggga 215

<210> 23

<211> 198

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: SV40 Late polyadenylation signal sequence

<400> 23

gatccagaca tgataagata cattgatgag tttggacaaa ccacaactag aatgcagtga 60

aaaaaatgct ttatttgtga aatttgtgat gctattgctt tatttgtaac cattataagc 120

tgcaataaac aagttaacaa caacaattgc attcatttta tgtttcaggt tcagggggag 180

gtgtgggagg ttttttag 198

<210> 24

<400> 24

000

<210> 25

<211> 728

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Ala Gly Phe Trp Val Gly Thr Ala Pro Leu Val Ala Ala Gly Arg
1 5 10 15

Arg Gly Arg Trp Pro Pro Gln Gln Leu Met Leu Ser Ala Ala Leu Arg
20 25 30

Thr Leu Lys His Val Leu Tyr Tyr Ser Arg Gln Cys Leu Met Val Ser
35 40 45

Arg Asn Leu Gly Ser Val Gly Tyr Asp Pro Asn Glu Lys Thr Phe Asp
50 55 60

Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Cys Arg Val Ile Arg
65 70 75 80

Thr Cys Lys Lys Met Gly Ile Lys Thr Val Ala Ile His Ser Asp Val
85 90 95

Asp Ala Ser Ser Val His Val Lys Met Ala Asp Glu Ala Val Cys Val
100 105 110

Gly Pro Ala Pro Thr Ser Lys Ser Tyr Leu Asn Met Asp Ala Ile Met
115 120 125

Glu Ala Ile Lys Lys Thr Arg Ala Gln Ala Val His Pro Gly Tyr Gly
130 135 140

Phe Leu Ser Glu Asn Lys Glu Phe Ala Arg Cys Leu Ala Ala Glu Asp
145 150 155 160

Val Val Phe Ile Gly Pro Asp Thr His Ala Ile Gln Ala Met Gly Asp
165 170 175

Lys Ile Glu Ser Lys Leu Leu Ala Lys Lys Ala Glu Val Asn Thr Ile
180 185 190

Pro Gly Phe Asp Gly Val Val Lys Asp Ala Glu Glu Ala Val Arg Ile
195 200 205

Ala Arg Glu Ile Gly Tyr Pro Val Met Ile Lys Ala Ser Ala Gly Gly
210 215 220

Gly Gly Lys Gly Met Arg Ile Ala Trp Asp Asp Glu Glu Thr Arg Asp

225 230 235 240

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

245 250 255

Arg Leu Leu Ile Glu Lys Phe Ile Asp Asn Pro Arg His Ile Glu Ile

260 265 270

Gln Val Leu Gly Asp Lys His Gly Asn Ala Leu Trp Leu Asn Glu Arg

275 280 285

Glu Cys Ser Ile Gln Arg Arg Asn Gln Lys Val Val Glu Glu Ala Pro

290 295 300

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

305 310 315 320

Val Ala Leu Ala Arg Ala Val Lys Tyr Ser Ser Ala Gly Thr Val Glu

325 330 335

Phe Leu Val Asp Ser Lys Lys Asn Phe Tyr Phe Leu Glu Met Asn Thr

340 345 350

Arg Leu Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu Cys Ile Thr Gly Leu Asp

355 360 365

Leu Val Gln Glu Met Ile Arg Val Ala Lys Gly Tyr Pro Leu Arg His

370 375 380

Lys Gln Ala Asp Ile Arg Ile Asn Gly Trp Ala Val Glu Cys Arg Val

385 390 395 400

Tyr Ala Glu Asp Pro Tyr Lys Ser Phe Gly Leu Pro Ser Ile Gly Arg

405 410 415

Leu Ser Gln Tyr Gln Glu Pro Leu His Leu Pro Gly Val Arg Val Asp

420 425 430

Ser Gly Ile Gln Pro Gly Ser Asp Ile Ser Ile Tyr Tyr Asp Pro Met

435 440 445

Ile Ser Lys Leu Ile Thr Tyr Gly Ser Asp Arg Thr Glu Ala Leu Lys

450 455 460

Arg Met Ala Asp Ala Leu Asp Asn Tyr Val Ile Arg Gly Val Thr His

465 470 475 480

Asn Ile Ala Leu Leu Arg Glu Val Ile Ile Asn Ser Arg Phe Val Lys
485 490 495
Gly Asp Ile Ser Thr Lys Phe Leu Ser Asp Val Tyr Pro Asp Gly Phe

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

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

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

690 695 700
Gly Thr Val Lys Ser Val His Cys Gln Ala Gly Asp Thr Val Gly Glu
705 710 715 720
Gly Asp Leu Leu Val Glu Leu Glu

725

<210> 26

<211> 702

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 26

Met Ala Gly Phe Trp Val Gly Thr Ala Pro Leu Val Ala Ala Gly Arg
1 5 10 15
Arg Gly Arg Trp Pro Pro Gln Gln Leu Met Leu Ser Ala Ala Leu Arg

20 25 30
Thr Leu Lys Thr Phe Asp Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile
35 40 45
Ala Cys Arg Val Ile Arg Thr Cys Lys Lys Met Gly Ile Lys Thr Val
50 55 60
Ala Ile His Ser Asp Val Asp Ala Ser Ser Val His Val Lys Met Ala
65 70 75 80
Asp Glu Ala Val Cys Val Gly Pro Ala Pro Thr Ser Lys Ser Tyr Leu

85 90 95
Asn Met Asp Ala Ile Met Glu Ala Ile Lys Lys Thr Arg Ala Gln Ala
100 105 110
Val His Pro Gly Tyr Gly Phe Leu Ser Glu Asn Lys Glu Phe Ala Arg
115 120 125
Cys Leu Ala Ala Glu Asp Val Val Phe Ile Gly Pro Asp Thr His Ala
130 135 140
Ile Gln Ala Met Gly Asp Lys Ile Glu Ser Lys Leu Leu Ala Lys Lys

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

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

210 215 220

Ser Ser Phe Gly Asp Asp Arg Leu Leu Ile Glu Lys Phe Ile Asp Asn

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

Val Val Glu Glu Ala Pro Ser Ile Phe Leu Asp Ala Glu Thr Arg Arg

275 280 285

Ala Met Gly Glu Gln Ala Val Ala Leu Ala Arg Ala Val Lys Tyr Ser

290 295 300

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

305 310 315 320

Phe Leu Glu Met Asn Thr Arg Leu Gln Val Glu His Pro Val Thr Glu

325 330 335

Cys Ile Thr Gly Leu Asp Leu Val Gln Glu Met Ile Arg Val Ala Lys

340 345 350

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

355 360 365

Ala Val Glu Cys Arg Val Tyr Ala Glu Asp Pro Tyr Lys Ser Phe Gly

370 375 380

Leu Pro Ser Ile Gly Arg Leu Ser Gln Tyr Gln Glu Pro Leu His Leu

385 390 395 400

Pro Gly Val Arg Val Asp Ser Gly Ile Gln Pro Gly Ser Asp Ile Ser

405 410 415

Ile Tyr Tyr Asp Pro Met Ile Ser Lys Leu Ile Thr Tyr Gly Ser Asp

420 425 430

Arg Thr Glu Ala Leu Lys Arg Met Ala Asp Ala Leu Asp Asn Tyr Val

435 440 445

Ile Arg Gly Val Thr His Asn Ile Ala Leu Leu Arg Glu Val Ile Ile

450 455 460

Asn Ser Arg Phe Val Lys Gly Asp Ile Ser Thr Lys Phe Leu Ser Asp

465 470 475 480

Val Tyr Pro Asp Gly Phe Lys Gly His Met Leu Thr Lys Ser Glu Lys

485 490 495

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

500 505 510

Arg Ala Gln His Phe Gln Glu Asn Ser Arg Met Pro Val Ile Lys Pro

515 520 525

Asp Ile Ala Asn Trp Glu Leu Ser Val Lys Leu His Asp Lys Val His

530 535 540

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

545 550 555 560

Gly Ser Lys Leu Asn Val Thr Ser Thr Trp Asn Leu Ala Ser Pro Leu

565 570 575

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

580 585 590

Arg Glu Ala Gly Gly Asn Met Ser Ile Gln Phe Leu Gly Thr Val Tyr

595 600 605

Lys Val Asn Ile Leu Thr Arg Leu Ala Ala Glu Leu Asn Lys Phe Met

610 615 620

Leu Glu Lys Val Thr Glu Asp Thr Ser Ser Val Leu Arg Ser Pro Met

625 630 635 640

Pro Gly Val Val Val Ala Val Ser Val Lys Pro Gly Asp Ala Val Ala

645 650 655

Glu Gly Gln Glu Ile Cys Val Ile Glu Ala Met Lys Met Gln Asn Ser

660 665 670

Met Thr Ala Gly Lys Thr Gly Thr Val Lys Ser Val His Cys Gln Ala

675 680 685

Gly Asp Thr Val Gly Glu Gly Asp Leu Leu Val Glu Leu Glu

690 695 700

<210> 27

<211> 681

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 27

Met Ala Gly Phe Trp Val Gly Thr Ala Pro Leu Val Ala Ala Gly Arg
1 5 10 15

Arg Gly Arg Trp Pro Pro Gln Gln Leu Met Leu Ser Ala Ala Leu Arg
20 25 30

Thr Leu Lys His Val Leu Tyr Tyr Ser Arg Gln Cys Leu Met Val Ser
35 40 45

Arg Asn Leu Gly Ser Val Gly Tyr Asp Pro Asn Glu Lys Thr Phe Asp
50 55 60

Lys Ile Leu Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Cys Arg Val Ile Arg
65 70 75 80

Thr Cys Lys Lys Met Gly Ile Lys Thr Val Ala Ile His Ser Asp Val
85 90 95

Asp Ala Ser Ser Val His Val Lys Met Ala Asp Glu Ala Val Cys Val
100 105 110

Gly Pro Ala Pro Thr Ser Lys Ser Tyr Leu Asn Met Asp Ala Ile Met
115 120 125

Glu Ala Ile Lys Lys Thr Arg Ala Gln Ala Val His Pro Gly Tyr Gly
130 135 140

Phe Leu Ser Glu Asn Lys Glu Phe Ala Arg Cys Leu Ala Ala Glu Asp
145 150 155 160

Val Val Phe Ile Gly Pro Asp Thr His Ala Ile Gln Ala Met Gly Asp
165 170 175

Lys Ile Glu Ser Lys Leu Leu Ala Lys Lys Ala Glu Val Asn Thr Ile
180 185 190

Pro Gly Phe Asp Gly Val Val Lys Asp Ala Glu Glu Ala Val Arg Ile
195 200 205

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

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

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

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

450 455 460

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

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

Thr Ser Thr Trp Asn Leu Ala Ser Pro Leu Leu Ser Val Ser Val Asp
595 600 605
Gly Thr Gln Arg Thr Val Gln Cys Leu Ser Arg Glu Ala Gly Gly Asn
610 615 620
Met Ser Ile Gln Phe Leu Gly Thr Val Val Ala Glu Gly Gln Glu Ile
625 630 635 640
Cys Val Ile Glu Ala Met Lys Met Gln Asn Ser Met Thr Ala Gly Lys
645 650 655

Thr Gly Thr Val Lys Ser Val His Cys Gln Ala Gly Asp Thr Val Gly
660 665 670
Glu Gly Asp Leu Leu Val Glu Leu Glu
675 680

<210> 28

<211> 539

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

Met Ala Ala Ala Leu Arg Val Ala Ala Val Gly Ala Arg Leu Ser Val
1 5 10 15

Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ala Ala Val Arg Ser Leu Cys Ser Gln Ala
20 25 30

Thr Ser Val Asn Glu Arg Ile Glu Asn Lys Arg Arg Thr Ala Leu Leu
35 40 45

Gly Gly Gly Gln Arg Arg Ile Asp Ala Gln His Lys Arg Gly Lys Leu
50 55 60

Thr Ala Arg Glu Arg Ile Ser Leu Leu Leu Asp Pro Gly Ser Phe Val
65 70 75 80

Glu Ser Asp Met Phe Val Glu His Arg Cys Ala Asp Phe Gly Met Ala
85 90 95

Ala Asp Lys Asn Lys Phe Pro Gly Asp Ser Val Val Thr Gly Arg Gly
100 105 110

Arg Ile Asn Gly Arg Leu Val Tyr Val Phe Ser Gln Asp Phe Thr Val
115 120 125

Phe Gly Gly Ser Leu Ser Gly Ala His Ala Gln Lys Ile Cys Lys Ile
130 135 140

Met Asp Gln Ala Ile Thr Val Gly Ala Pro Val Ile Gly Leu Asn Asp
145 150 155 160

Ser Gly Gly Ala Arg Ile Gln Glu Gly Val Glu Ser Leu Ala Gly Tyr
165 170 175

Ala Asp Ile Phe Leu Arg Asn Val Thr Ala Ser Gly Val Ile Pro Gln
180 185 190

Ile Ser Leu Ile Met Gly Pro Cys Ala Gly Gly Ala Val Tyr Ser Pro
195 200 205

Ala Leu Thr Asp Phe Thr Phe Met Val Lys Asp Thr Ser Tyr Leu Phe
210 215 220

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

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

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

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

465 470 475 480

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

<210> 29
<211> 559

<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 29

Met Ala Ala Ala Leu Arg Val Ala Ala Val Gly Ala Arg Leu Ser Val
1 5 10 15
Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ala Ala Val Arg Ser Leu Cys Ser Gln Ala
20 25 30
Thr Ser Val Asn Glu Arg Ile Glu Asn Lys Arg Arg Thr Ala Leu Leu
35 40 45
Gly Gly Gly Gln Arg Arg Ile Asp Ala Gln His Lys Arg Gly Lys Leu
50 55 60

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

Trp Ala Gln Trp Leu Pro Leu Val Ile Ser Ala Leu Trp Glu Ala Glu

130 135 140

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

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

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

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

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

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

Pro Phe Pro Ala Ala Val Arg Gly Phe Val Asp Asp Ile Ile Gln Pro
515 520 525
Ser Ser Thr Arg Ala Arg Ile Cys Cys Asp Leu Asp Val Leu Ala Ser
530 535 540
Lys Lys Val Gln Arg Pro Trp Arg Lys His Ala Asn Ile Pro Leu
545 550 555

<210> 30
<211> 1412
<212> DNA
<213> Homo sapiens
<400> 30

tctcaaggtg actctgcagg agatgcaaag tagttaagag gagaaccccc aatactgatg 60

tgtttatagg tgaggtggtc tgatgtctta gatttgcttt aaaatattcc tgcacaaaat 120
aaaaagggga atagatgaaa caagattgac aaaatgttga ttcattgacg cggtgtaatg 180
ggtatctggg tgatcatagt acaattttat ctcttttgta tatattttaa aatttccata 240
atatagcaaa acatgagccc agtccctcaa ggcagccaga tttgggttca aaccctagtt 300

tgacctttta ctcgctgagt gactttaccc tgctacagct tcagtttctc caaatggaaa 360

taatatatac tccattaagg ttcttgtaaa ctctcaagta agagggaatc tgaggctcta 420

gcacacggcc cggcccttaa tagttgtact aatttttatt ttatttttcg aaacggagtt 480

tgctctgtca cccaggctgg agtgtagtgg catgatccgg ctcactgcaa cctccacctc 540

cagggttcaa gcaattctcc tgcctcagcc tcctcccgag taactgggat tacaggagtg 600

cgccaccacg cccagctaat ttttgtattt tttagtagag acggggtttc ggcatgttgt 660

ccaggctggt ctccaactcc tgacctcagg ttatcctccc gcctcggcct cccagagtgc 720

tgggattaca ggcgtgagcc actgcgcctg gccagtagtt gtactaacaa gggtttctgc 780

ttgcgagcaa caaagactga ctctagttgt ggctaatttc tttcacacac acatattaag 840

tgccagaggt aggacttgag ctcggatctc tgatttccag acctagaact ttttatgtgt 900

tattacagtc gttaaaaacc ttacctggat ttgtgctttg caatttacgc tttcgaacat 960

gcaggaatgt agtttgggca tttgtctgga acttcggatt ctcgggactc cagggtggcc 1020

aaggcgcgga ggtgactcaa tgacattgac cggcctggat gcacgtgggt tgctgagccg 1080

atgctgggaa ggtacggggt ttgcccggtg caggccgccg gaactcacgc acgcccctgt 1140

ctctctcact cctggggtcg gctctggccg gtggcctcca gctcagctag cggccggacg 1200

cgcagcccgc cgactagccc tccaggtcct agcgcgactc ccggatcccg gatccggcgg 1260

atctggccga ccactcaccc tccccttcc gcaagttagg gggcggggca tcgggtttct 1320

ggctcgtgat ttgccggagc tcctgcgctc cccttctcca ccccctccgg ctgtgtgaga 1380

ggtcagcaga ggggcggtct gcggggacaa ca 1412

<210> 31

<211> 275

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 31

aggatttata acctttcagt catcacccaa tttaattagc catttgcatg atgctttcac 60

acacaattga ttcaagcatt atacaggaac acccctgtgc agctacgttt acgtcgtcat 120

ttattccaca gagtcaagac caatattctg ccaaaaaatc accaatggaa attttcattg 180

atataaatac ttgtacatat gatttgtact tctgctgtga gattccctag tgtcaaaatt 240

aaatcaataa aactgagcat ttgtctaaat attag 275

<210> 32

<211> 1378

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 32

gctggcccca gccccagagt ttctgattta aaggtctgga gtaagttctg agaattcgag 60

cttgcatttc caactcactc ccaggtgata ctgaagttgc tggattgaca agattccctc 120

cttgatcaaa cattggtcag gctcttctga gctctctctt tgactaggcc tgagtgtggg 180

ctcccatgtc attccttgtg gaattccatt ttagcaagaa acttgccaag tcagtttagc 240

cagaatcctc cattcttgat atctgattac tctccatatc tggttttgac ccataccgcc 300

accatccccc aggtgatgtt cagttaccct gacctgcctt gggcaggaat cctgttaggt 360

caatttagcc agattccccg ccaatgtttc ctcttagtaa ttttccatcc actgacttcc 420

acacactgcc ccttagctat aaattaccac tttgctatat tcagcccaat cgctctgact 480

tatggcaaaa ctctatccct acctctgtca gattgggcct gaataaagtt tgccttacca 540

ttcttaaaca tgaataatta agtgtcatga atagtttttt ctttaatggg atccatactt 600

tgagaactac tgattagagg ttaagggtcc tgtgctcatt atctggcaca tattaatgat 660

aggtctctga gtttgaatcc tggccaacca cattgtcagt cttggctttt ttttttttt 720

ttttttgaga cagggttttg cccaggctgg agtgcagtga tgcaatcacg gctcactgca 780

gcctcgactt cctgggccaa gccatcctgc cgccttagcc tcccgagtag ctggggtcac 840

aggtgcaagc cgccatgccc agctaatttt taatttttt gtagaggtgg ggtcttacta 900

tattgctcag gctggtcttg ggctcctggg ctcacctacc tcggcctcag tcttgcctct 960

tgatcaaatc actcatctct ctgtgcttga tttacctcat ctgtgaaatc cagatagtaa 1020

gctagtgcat ggtaagtgca aaaagcaaca cctggcacaa tgcttaataa atgttggtta 1080

aatcttataa tcattttctg taggaagtgg gacgacaaag ttaagggtct aggtggtcag 1140

agaagagcaa ggactatgtc ccttttttgt gcagccaggc aggccctgta ctttttctct 1200

gcgcgaccct cctcgggcag caccgggtct cgaactctca cgccttactc ccaagcaggt 1260

tctgtagtcc agcccccgcg gctccctaca gccagccgat gctgcgcaag cgccgtaccc 1320

acgctttagc acatgcgtac tcaggtgcgc cggtagggga cgcgccggca cagcaaaa 1378

<210> 33

<211> 159

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 33

acaaatcaaa ggaaaagaaa ccaagaactg aattactgtc tgcccattca catcccattc 60

ctgccttttg caatcatgaa acctgggaat ccaaatagtt ggataactta gaataactaa 120

gtttattaaa ttctagaaag atctcttttg tgccttact 159

<210> 34

<211> 793

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 34

tttttgtatt ttttagtaga gacggggttt cggcatgttg tccaggctgg tctccaactc 60

ctgacctcag gttatcctcc cgcctcggcc tcccagagtg ctgggattac aggcgtgagc 120

cactgcgcct ggccagtagt tgtactaaca agggtttctg cttgcgagca acaaagactg 180

actctagttg tggctaattt ctttcacaca cacatattaa gtgccagagg taggacttga 240

gctcggatct ctgatttcca gacctagaac tttttatgtg ttattacagt cgttaaaaac 300

cttacctgga tttgtgcttt gcaatttacg ctttcgaaca tgcaggaatg tagtttgggc 360

atttgtctgg aacttcggat tctcgggact ccagggtggc caaggcgcgg aggtgactca 420

atgacattga ccggcctgga tgcacgtggg ttgctgagcc gatgctggga aggtacgggg 480

tttgcccggt gcaggccgcc ggaactcacg cacgcccctg tctctctcac tcctggggtc 540

ggctctggcc ggtggcctcc agctcagcta gcggccggac gcgcagcccg ccgactagcc 600

ctccaggtcc tagcgcgact cccggatccc ggatccggcg gatctggccg accactcacc 660

ctccccttc cgcaagttag ggggcggggc atcgggtttc tggctcgtga tttgccggag 720

ctcctgcgct ccccttctcc acccccctccg gctgtgtgag aggtcagcag aggggcggtc 780

tgcggggaca aca 793

<210> 35

<211> 168

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 35

aggatttata acctttcagt catcacccaa tttaattagc catttgcatg atgctttcac 60

acacaattga ttcaagcatt atacaggaac acccctgtgc agctacgttt acgtcgtcat 120

ttattccaca gagtcaagac caatattctg ccaaaaaatc accaatgg 168

<210> 36

<211> 468

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 36

gctggtcttg ggctcctggg ctcacctacc tcggcctcag tcttgcctct tgatcaaatc 60

actcatctct ctgtgcttga tttacctcat ctgtgaaatc cagatagtaa gctagtgcat 120

ggtaagtgca aaaagcaaca cctggcacaa tgcttaataa atgttggtta aatcttataa 180

tcattttctg taggaagtgg gacgacaaag ttaagggtct aggtggtcag agaagagcaa 240

ggactatgtc cctttttgt gcagccaggc aggccctgta ctttttctct gcgcgaccct 300

cctcgggcag caccgggtct cgaactctca cgccttactc ccaagcaggt tctgtagtcc 360

agcccccgcg gctccctaca gccagccgat gctgcgcaag cgccgtaccc acgctttagc 420

acatgcgtac tcaggtgcgc cggtagggga cgcgccggca cagcaaaa 468

<210> 37

<211> 102

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 37

acaaatcaaa ggaaaagaaa ccaagaactg aattactgtc tgcccattca catcccattc 60

ctgccttttg caatcatgaa acctgggaat ccaaatagtt gg 102

<210> 38

<211> 3360

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: rAAV with native PCCA cDNA sequence (DTC346)

<400> 38

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcctcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct 180

gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 240

caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggactattt acggtaaact gcccacttgg 300

cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgcccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 360

ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca 420

tctacgtatt agtcatcgct attaccatgc gtcgaggtga gccccacgtt ctgcttcact 480

ctccccatct ccccccccctc cccaccccca attttgtatt tatttatttt ttaattattt 540

tatgcagcga tgggggcggg gggggggggg gcgcgcgcca ggcggggcgg ggcggggcga 600

ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc ggcggcagcc aatcagagcg gcgcgctccg 660

aaagtttcct tttatggcga ggcggcggcg gcggcggccc tataaaaagc gaagcgcgcg 720

gcgggcggct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt 780

ctaattgttt ctctctttta gattccaacc tttggaactg atgccgccac catggcgggg 840

ttctgggtcg ggacagcacc gctggtcgct gccggacggc gtgggcggtg gccgccgcag 900

cagctgatgc tgagcgcggc gctgcggacc ctgaagcatg ttctgtacta ttcaagacag 960

tgcttaatgg tgtcccgtaa tcttggttca gtgggatatg atcctaatga aaaaactttt 1020

gataaaattc ttgttgctaa tagaggagaa attgcatgtc gggttattag aacttgcaag 1080

aagatgggca ttaagacagt tgccatccac agtgatgttg atgctagttc tgttcatgtg 1140

aaaatggcgg atgaggctgt ctgtgttggc ccagctccca ccagtaaaag ctacctcaac 1200

atggatgcca tcatggaagc cattaagaaa accagggccc aagctgtaca tccaggttat 1260

ggattccttt cagaaaacaa agaatttgcc agatgtttgg cagcagaaga tgtcgttttc 1320

attggacctg acacacatgc tattcaagcc atgggcgaca agattgaaag caaattatta 1380

gctaagaaag cagaggttaa tacaatccct ggctttgatg gagtagtcaa ggatgcagaa 1440

gaagctgtca gaattgcaag ggaaattggc taccctgtca tgatcaaggc ctcagcaggt 1500

ggtggtggga aaggcatgcg cattgcttgg gatgatgaag agaccaggga tggttttaga 1560

ttgtcatctc aagaagctgc ttctagtttt ggcgatgata gactactaat agaaaaattt 1620

attgataatc ctcgtcatat agaaatccag gttctaggtg ataaacatgg gaatgcttta 1680

tggcttaatg aaagagagtg ctcaattcag agaagaaatc agaaggtggt ggaggaagca 1740

ccaagcattt ttttggatgc ggagactcga agagcgatgg gagaacaagc tgtagctctt 1800

gccagagcag taaaatattc ctctgctggg accgtggagt tccttgtgga ctctaagaag 1860

aatttttatt tcttggaaat gaatacaaga ctccaggttg agcatcctgt cacagaatgc 1920

attactggcc tggacctagt ccaggaaatg atccgtgttg ctaagggcta ccctctcagg 1980

cacaaacaag ctgatattcg catcaacggc tgggcagttg aatgtcgggt ttatgctgag 2040

gacccctaca agtcttttgg tttaccatct attgggagat tgtctcagta ccaagaaccg 2100

ttacatctac ctggtgtccg agtggacagt ggcatccaac caggaagtga tattagcatt 2160

tattatgatc ctatgatttc aaaactaatc acatatggct ctgatagaac tgaggcactg 2220

aagagaatgg cagatgcact ggataactat gttattcgag gtgttacaca taatattgca 2280

ttacttcgag aggtgataat caactcacgc tttgtaaaag gagacatcag cactaaattt 2340

ctctccgatg tgtatcctga tggcttcaaa ggacacatgc taaccaagag tgagaagaac 2400

cagttattgg caatagcatc atcattgttt gtggcattcc agttaagagc acaacatttt 2460

caagaaaatt caagaatgcc tgttattaaa ccagacatag ccaactggga gctctcagta 2520

aaattgcatg ataaagttca taccgtagta gcatcaaaca atgggtcagt gttctcggtg 2580

gaagttgatg ggtcgaaact aaatgtgacc agcacgtgga acctggcttc gcccttattg 2640

tctgtcagcg ttgatggcac tcagaggact gtccagtgtc tttctcgaga agcaggtgga 2700

aacatgagca ttcagtttct tggtacagtg tacaaggtga atatcttaac cagacttgcc 2760

gcagaattga acaaatttat gctggaaaaa gtgactgagg acacaagcag tgttctgcgt 2820

tccccgatgc ccggagtggt ggtggccgtc tctgtcaagc ctggagacgc ggtagcagaa 2880

ggtcaagaaa tttgtgtgat tgaagccatg aaaatgcaga atagtatgac agctgggaaa 2940

actggcacgg tgaaatctgt gcactgtcaa gctggagaca cagttggaga aggggatctg 3000

ctcgtggagc tggaatgaat ccagacatga taagatacat tgatgagttt ggacaaacca 3060

caactagaat gcagtgaaaa aaatgcttta tttgtgaaat ttgtgatgct attgctttat 3120

ttgtaaccat tataagctgc aataaacaag ttaacaacaa caattgcatt cattttatgt 3180

ttcaggttca gggggaggtg tgggaggttt tttagaggaa cccctagtga tggagttggc 3240

cactccctct ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg 3300

ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa 3360

<210> 39

<211> 2806

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: rAAV with native PCCB cDNA sequence

<400> 39

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcctcgtta cataacttac ggtaaatggc ccgcctggct 180

gaccgcccaa cgacccccgc ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc 240

caatagggac tttccattga cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg 300

cagtacatca agtgtatcat atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat 360

ggcccgcctg gcattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca 420

tctacgtatt agtcatcgct attaccatgt cgaggtgagc cccacgttct gcttcactct 480

ccccatctcc cccccctccc caccccccaat tttgtattta tttatttttt aattattttg 540

tgcagcgatg ggggcggggg gggggggggg gcgcgcgcca ggcggggcgg ggcggggcga 600

ggggcggggc ggggcgaggc ggagaggtgc ggcggcagcc aatcagagcg gcgcgctccg 660

aaagtttcct tttatggcga ggcggcggcg gcggcggccc tataaaaagc gaagcgcgcg 720

gcgggcggct ctaaggtaaa tataaaattt ttaagtgtat aatgtgttaa actactgatt 780

ctaattgttt ctctctttta gattccaacc tttggaactg atctcgaggc cgccaccatg 840

gcggcggcat tacgggtggc ggcggtcggg gcaaggctca gcgttctggc gagcggtctc 900

cgcgccgcgg tccgcagcct ttgcagccag gccacctctg ttaacgaacg catcgaaaac 960

aagcgccgga ccgcgctgct gggaggggggc caacgccgta ttgacgcgca gcacaagcga 1020

ggaaagctaa cagccaggga gaggatcagt ctcttgctgg accctggcag ctttgttgag 1080

agcgacatgt ttgtggaaca cagatgtgca gattttggaa tggctgctga taagaataag 1140

tttcctggag acagcgtggt cactggacga ggccgaatca atggaagatt ggtttatgtc 1200

ttcagtcagg attttacagt ttttggaggc agtctgtcag gagcacatgc ccaaaagatc 1260

tgcaaaatca tggaccaggc cataacggtg ggggctccag tgattgggct gaatgactct 1320

gggggagcac ggatccaaga aggagtggag tctttggctg gctatgcaga catctttctg 1380

aggaatgtta cggcatccgg agtcatccct cagatttctc tgatcatggg cccatgtgct 1440

ggtggggccg tctactcccc agccctaaca gacttcacgt tcatggtaaa ggacacctcc 1500

tacctgttca tcactggccc tgatgttgtg aagtctgtca ccaatgagga tgttacccag 1560

gaggagctcg gtggtgccaa gacccacacc accatgtcag gtgtggccca cagagctttt 1620

gaaaatgatg ttgatgcctt gtgtaatctc cgggatttct tcaactacct gcccctgagc 1680

agtcaggacc cggctcccgt ccgtgagtgc cacgatccca gtgaccgtct ggttcctgag 1740

cttgacacaa ttgtcccttt ggaatcaacc aaagcctaca acatggtgga catcatacac 1800

tctgttgttg atgagcgtga atttttgag atcatgccca attatgccaa gaacatcatt 1860

gttggttttg caagaatgaa tgggaggact gttggaattg ttggcaacca acctaaggtg 1920

gcctcaggat gcttggatat taattcatct gtgaaagggg ctcgttttgt cagattctgt 1980

gatgcattca atattccact catcactttt gttgatgtcc ctggctttct acctggcaca 2040

gcacaggaat acgggggcat catccggcat ggtgccaagc ttctctacgc atttgctgag 2100

gcaactgtac ccaaagtcac agtcatcacc aggaaggcct atggaggtgc ctatgatgtc 2160

atgagctcta agcacctttg tggtgatacc aactatgcct ggcccaccgc agagattgca 2220

gtcatgggag caaagggcgc tgtggagatc atcttcaaag ggcatgagaa tgtggaagct 2280

gctcaggcag agtacatcga gaagtttgcc aaccctttcc ctgcagcagt gcgagggttt 2340

gtggatgaca tcatccaacc ttcttccaca cgtgcccgaa tctgctgtga cctggatgtc 2400

ttggccagca agaaggtaca acgtccttgg agaaaacatg caaatattcc attgtaatct 2460

agagatccag acatgataag atacattgat gagtttggac aaaccacaac tagaatgcag 2520

tgaaaaaaat gctttatttg tgaaatttgt gatgctattg ctttatttgt aaccattata 2580

agctgcaata aacaagttaa caacaacaat tgcattcatt ttatgtttca ggttcagggg 2640

gaggtgtggg aggtttttta gaggaacccc tagtgatgga gttggccact ccctctctgc 2700

gcgctcgctc gctcactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg acctttggtc 2760

gcccggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gagagggagt ggccaa 2806