

ÖZET

SALGI BEZLERİYLE İLİŞKİLİ VİRÜS YAPILARINI İÇEREN İLETKEN HAVA YOLU HÜCRELERİNİN HEDEFLENMESİNE YÖNELİK BİLEŞİMLER

5

Bir heterolog iletken hava yolu hedefleme sekansı içeren bir yapay AAV kapsidi sağlanmaktadır. Yapay AAV, bununla ilişkilendirilen heterolog moleküllerin iletilmesi için bir hedefleme kısmı olarak kullanılmaktadır. Yapay AAV ayrıca, yapay kapside sahip AAV vektörlerinin meydana getirilmesinde kullanılmaktadır.

10

Ayrıca, iletken hava yolu hücrelerini dönüştürme yetilerinin geliştirilmesi ve/veya yok edilmesi vasıtasıyla vektörlerin natif tropizminin ve dönüştürme veriminin modifiye edilmesine yönelik yöntemler burada açıklanmaktadır. İletken hava yolu hücrelerinin hedeflenmesi ve buraya terapötik ve diğer moleküllerin iletilmesine yönelik yöntemler de sağlanmaktadır.

İSTEMLER

1. Bir AAV Kladı A kapsidinin değişken kıvrım bölgesi IV ve değişken kıvrım bölgesi V'ini kapsayan amino asit fragmentinden bir hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptidi içeren bir yapay AAV kapsidi olup, söz konusu peptid, klad A'dan başka bir klada ait olan parental AAV'den AAV kapsid sekansları tarafından yandan desteklenen, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in amino asidi 447 ile 521'in sekansına sahiptir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, parental AAV kapsidine heterologdur, burada değişken kıvrım bölgelerinin lokasyonu Şekil 2'de tasvir edildiği gibidir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptidi, kapsid sekansının karşılık gelen değişken kıvrım bölgelerinin natif lokasyonunda bulunmaktadır, karşılık gelen bu değişken kıvrım bölgeleri koparak eksilmiştir.
2. Yapay AAV kapsidinin, ayrıca, söz konusu hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptide ait amino asit sekanslarının karboksi ve/veya amino terminusunu yandan destekleyen bir aralayıcı içerdiği, söz konusu aralayıcının, bir ila beş amino asit içerdiği, istem 1'e göre yapay AAV kapsidi.
3. İstem 1'e göre yapay AAV kapsidi olup, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid ayrıca aşağıdakileri içermektedir:
 - (a) fonksiyonel Klad A AAV'lerinden değişken kıvrım IV'nin amino asit terminusu üzerinde olan, ancak değişken kıvrım bölgesi III'ten ayrı olan, bir ila beş amino asit; ve/veya
 - (b) fonksiyonel Klad A AAV'lerinden peptidin karboksi terminusuna ait olan, ancak değişken kıvrım bölgesi VI'nın herhangi bir amino asidinden ayrı olan, bir ila beş amino asit.
4. Hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptidini yandan destekleyen AAV

kapsid sekanslarının, AAV9, AAV5, AAV2, AAV8 ve AAVrh32.33'ten oluşan grup arasından seçilen tek bir parental AAV tarafından sağlandığı, istem 1'e göre yapay AAV kapsidi.

5 5. Yapay AAV kapsidinin, burada paketlenen hiçbir fonksiyonel AAV gen sekansına sahip olmadığı, istem 1'e göre yapay AAV kapsidi.

6. İstem 1'e göre yapay AAV kapsidi olup, burada hava yolu ileten hücre hedeflemeli peptid, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 4'ün amino asit
10 sekansına sahiptir:

NRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQP

KNW-

LPGPCYRQQRVSKTKTDNNNSNFTWTGAS

15 KYNLNGRESIINPG.

7. Söz konusu ekspresyon kasetinin, en az bir AAV ters terminal tekrar sekansı ve ileten hava yolu hücrelerinde heterolog genin ekspresyonuna izin veren düzenleyici sekanslara işlevsel olarak bağlantılandırılan bir heterolog gen
20 içerdiği, istemler 1 ila 6'dan herhangi birine göre bir yapay AAV kapsidi ve kapsid içerisinde paketlenen bir ekspresyon kaseti içeren bir AAV vektörü.

8. Heterolog genin, kistik fibrozun semptomlarının tedavi edilmesi veya iyileştirilmesi için faydalı olan bir gen ürününü kodladığı, istem 7'ye göre
25 AAV vektörü.

9. Heterolog genin, bir fonksiyonel kistik fibroz transmembran düzenleyici (CFTR) sekansı, alfa-1 antitripsin (A1AT), yüzey aktif madde protein C (SPC) ve yüzey aktif madde protein D'den (SPD) oluşan gruptan seçilen bir ürün
30 kodladığı, istem 8'e göre AAV vektörü.

10. İstemler 7 ila 9'dan herhangi birine göre AAV vektörünü ve fizyolojik olarak uyumlu olan bir taşıyıcı içeren bir farmasötik bileşim.

- 5 11. İletken hava yolu hücrelerini hedeflemesi için, seçilmiş bir AAV vektörünün özgüllüğünün değiştirilmesine yönelik bir yöntem olup, söz konusu yöntem, AAV'nin, bir AAV Klad A kapsidinin değişken kıvrım bölgesi IV ve V'ten bir hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid ile donatılması adımını içermektedir, söz konusu peptid, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'in amino
- 10 asidi 447 ila 521'in sekansına sahiptir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, parental AAV kapsidine heterologdur, burada seçilen AAV'nin değişken kıvrım bölgesi IV ve V'i içeren natif AAV kapsidi bölgesi yok edilmektedir.

TARİFNAME

**SALGI BEZLERİYLE İLİŞKİLİ VİRÜS YAPILARINI İÇEREN İLETKEN
HAVA YOLU HÜCRELERİNİN HEDEFLENMESİNE YÖNELİK
BİLEŞİMLER**

5

Bu çalışma, kısmen P01-HL051746 numaralı Ulusal Sağlık Enstitüleri'nin fonu ile gerçekleştirilmiştir. ABD hükümeti bu buluşta belirli haklara sahip olabilir.

10 ÖNCEKİ TEKNİK

Parvovirüs ailesinin bir üyesi olan, salgı bezleriyle ilişkili virüs (AAV), 4.7 kilobaz (kb) ila 6 kb arası, tek zincirli bir lineer DNA genomuna sahip, küçük, zarflı olmayan, yirmi yüzlü bir virüstür. AAV, *Dependovirus* cinsine atanmaktadır, zira virüs, saflaştırılmış adenovirüs stoklarındaki bir kontaminant olarak keşfedilmiştir. AAV'nin yaşam döngüsü; enfeksiyondan sonra AAV genomlarının konak genomlarına entegre edildiği bir latent evreyi ve adenovirüs veya herpes simpleks virüsü enfeksiyonunu takiben, entegre edilen AAV genomlarının kurtarıldığı, çoğaltıldığı ve bulaşıcı virüslerin içerisine paketlenildiği bir bulaşıcı evreyi kapsamaktadır. Hastalık meydana getirmeme nitelikleri, bölünmeyen hücreler de dahil olmak üzere geniş enfektivite konak aralığı ve entegrasyon, AAV'yi ilgi çekici bir iletim vehikülü haline getirmektedir.

Bir AAV'nin kapsidi, T=1 yirmi yüzlü simetri ile düzenlenen, 1:1:10'luk bir tahmini orandaki üç viral proteinin (VP'ler), yani VP1, VP2, ve VP3'ün (toplamda) 60 kopyasını içermektedir [H-J Nam, ve ark., J Virol., 81(22): 12260-12271 (Kasım 2007)]. Bu üç VP aynı mRNA'dan çevrilmekte olup, VP1, C-terminal bölgesindeki tüm VP2 sekansına ilaveten özgün bir N-terminal alanı içermektedir [Nam ve ark., referansı yukarıda verilmiştir]. VP2, C-terminusundaki VP3'e ilaveten ekstra bir N-terminal sekansı içermektedir. AAV2

[Q. Xie, ve ark., Proc Natl. Acad. Sci. ABD 99:10405-10410 (2002)] ve AAV4 [L. Govindasamy, ve ark., J. Virol., 80:11556-11570] kapsidlerinin X-ışını kristal yapılarında ve parvovirüs kapsidleri için belirlenen tüm diğer yapılarda, yalnızca, AAV kapsid proteinlerindeki C-terminal protein sekansı (~530 amino asit) gözlemlenmektedir. VP1'in N-terminal özgün bölgesi ve VP1-VP2 kesişme bölgesi ve VP3'ün ilk 14 ila 16 N-terminal kalıntıları keşfedilmiştir [L. Govindasamy, ve ark., ve Q. Xie ve ark., *referansı yukarıda verilmiştir*]. Soğuk-elektron mikroskobu ve imge geri çatılma verileri, intakt AAV kapsidlerinde, VP1 ve VP2 proteinlerinin N-terminal bölgeleri, kapsidin içerisinde bulunmaktadır [E. Padron, ve ark., J. Virol. 79:5047-5058 (2005); Q. Xie ve ark., *referansı yukarıda verilmiştir*] ve reseptör ve antikör bağlama için bunlara erişilememektedir [S. Kronenberg, ve ark., J. Virol., 79:5296-5303 (2005)]. Dolayısıyla, reseptör tutturma ve transdüksiyon fenotiplerinin, VP1-VP3'ün ortak C-terminal alanı içerisindeki amino asit sekansları tarafından belirlendiğine inanılmaktadır [Nam ve ark., *referansı yukarıda verilmiştir*]. VP1 özgün bölgesinin, nükleer hedefleme için nükleer lokalizasyon sekanslarını içermesinin yanı sıra, reseptör tutturmasından sonra nükleusa gidiş geliş sırasında endozomal kaçış için gereken bir fonksiyonel fosfolipaz A2 enzimini barındırdığı gösterilmiştir [JC Grieger, ve ark., J. Virol. 80:5199-5210 (2006); F., Sonntag, ve ark., J. Virol., 80:11040-11054 (2006)].

Yıllar boyunca, farklı sekanslara sahip yalnızca altı AAV teknikte bilinmekteydi ki bunların çoğu, kültürlerdeki adenovirüs preparasyonlarının kontaminantları olarak izole edilmiştir. Yakın zamanda, araştırmacılar dokudan elde edilen farklı sekanslara sahip çok sayıda AAV açıklamışlardır [G. Gao, ve ark., Proc Natl Acad Sci ABD, 100(10):6081-6086 (Mayıs 13, 2003); US-2003-0138772-A1 (Temmuz 24, 2003)] ve bu AAV'leri farklı serotipler ve kladlar olarak karakterize etmişlerdir [G. Gao, ve ark., J. Virol., 78(12):6381-6388 (Haziran 2004); Uluslararası Patent Yayını No: WO 2005/033321]. Farklı AAV'lerin farklı transfeksiyon verimleri sergilediği ve ayrıca farklı hücreler veya dokulara yönelik

tropizm sergilediğini rapor edilmiştir.

Salgı bezleriyle ilişkili virüs serotipi 6 (AAV6), hem fare akciğerinin iletken hava yolu epitelyumunu hem de insan hava yolu epitelyal (HAE) hücre kültürlerini etkili şekilde dönüştürebilmektedir. CL Halbert ve ark., “Adeno-associated virus Type 6 (AAV6) Vectors Mediate Efficient Transduction of Airway Epithelial Cells in Mouse Lungs Compared to That of AAV2 Vectors”, J. Virol., 75(14): 6615-6624 (Temmuz 2001). Ayrıca bakınız, CL Halbert ve ark, J Virol, 74(3): 1524-1532 (Şubat 2000) (AAV2/6, AAV2/3 ve AAV2’nin çeşitli psödوتيplerini karşılaştırmaktadır) ve EA Rutledge ve ark, J Virol, 72(1): 309-319 (Ocak 1998) (AAV6, AAV2, AAV3 ve AAV4’e ait bulaşıcı klonları karşılaştırmaktadır). Birkaç yeni AAV sekansına dayanan vektörlerin dönüştürme verimlilikleri de *in vivo* fare hava yolu epitelyumunda ve *in vitro* insan kirpikli hava yolu epitelyumunda değerlendirilmiştir [MP Limberis ve ark., Molecular Therapy, 17(2):294-301 (Şubat 2009).] Fare karaciğerinde üç vektör verimli dönüştürme sergilerken, farede gözlemlenen yüksek dönüştürme, vektörlerden yalnızca ikisi için insan hücrelerinde yeniden gerçekleştirilebilmiştir.

In vivo şekilde, hastalıklı hava yolu epitelyumuna terapötik genlerin iletilmesi, kistik fibroz (CF) hava yolu hastalığı, α -1-antitripsin (AAT) eksikliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı ve akciğer hipertansiyonunu kapsayan çeşitli akciğer hastalıklarının genetik tedavisi açısından umut verici bir seçenektir [MK Aneja ve C Rudolph, Curr Opin Mol Ther, 8: 432-438 (2006); PE Cruz ve ark, Pharmacogenomics, 8: 1191-1198 (2007); TR Flotte ve ark, Mol Ther, 15: 229-241 (2007)]. Bununla birlikte, günümüzde güvenli ve tesirli bir terapötik vektörün bulunması zordur.

BULUŞUN KISA AÇIKLAMASI

Mevcut buluş, akciğerin iletken hava yolu hücrelerinin yanı sıra alveolar epiteltal

hücrelerin, tercihen diğer, akciğere ait olmayan hücrelerin tercihe bağlı şekilde hedeflenmesi için AAV kapsidlerine modifikasyona izin veren bir izole peptid ile ilgilidir.

- 5 Bir yönde, buluş, bir AAV Kladı A kapsidinin değişken kıvrım bölgesi IV ve değişken kıvrım bölgesi V'sini kapsayan amino asit fragmentinden bir hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid içeren bir yapay AAV kapsidi sağlamakta olup, söz konusu peptid, klad A'dan farklı olan bir klada ait olan parental AAV'den AAV kapsid sekansları tarafından yandan desteklenen, SEKANS KİMLİK
- 10 NUMARASI: 1'in amino asit 447 ila 521'in sekansına sahiptir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, parental AAV kapsidine heterologdur, burada değişken kıvrım bölgelerinin lokasyonu Şekil 2'de tasvir edildiği gibidir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, kapsid sekansının karşılık gelen kıvrım bölgelerinin natif lokasyonunda bulunmaktadır, karşılık gelen bu değişken
- 15 kıvrım bölgeleri koparak eksilmiştir. Bir yapılandırmada, Klad A kapsidi, AAV1, AAV6 ve hu48R3'ten seçilmektedir.

- Bir başka yönde, buluş, açıklandığı üzere yapay bir kapsid ve kapsidin içerisinde paketlenen bir ekspresyon kaseti içeren bir AAV vektörü sağlamaktadır, burada
- 20 söz konusu ekspresyon kaseti, en az bir AAV ters terminal tekrar sekansı ve iletken hava yolu hücrelerinde heterolog genin ekspresyonuna izin veren regülatör sekanslar ile işlevsel olarak bağlantılandırılan bir heterolog gen içermektedir.

- Buluş, tanımlandığı üzere bir yapay AAV kapsidi içeren bir iletken hava yolu
- 25 hedefleme kısmının sağlanması için kullanılabilmektedir, burada yapay AAV kapsidi, hava yolu iletken epitelyuma iletim için bir molekül ile bağlantılandırılmaktadır. Ayrıca, hava yolu hedefleme kısmını ve fizyolojik olarak uyumlu bir taşıyıcıyı içeren bir farmasötik bileşim de burada açıklanmaktadır.

- 30 Bir başka yönde, buluş, iletken hava yolu hücrelerini hedeflemesi için seçilen bir

AAV vektörünün özgüllüğünün değiştirilmesine yönelik bir yöntem sağlamakta olup, söz konusu yöntem, AAV'nin, bir AAV Klad A kapsidinin değişken kıvrım bölgesi IV ve V'den bir hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid ile donatılması adımını içermektedir, söz konusu peptid, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in amino asidi 447 ila 521'in sekansına sahiptir, burada hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, parental AAV kapsidine heterologdur, burada seçilen AAV'nin değişken kıvrım bölgesi IV ve V'yi içeren natif AAV kapsidi bölgesi kesilerek çıkarılmaktadır. Ayrıca, iletken alveolar epitelyum hücrelerini natif şekilde hedeflemeyen bir parental AAV'nin özgüllüğünün, buna söz konusu hücreleri hedefleme yetisinin sağlanması için değiştirilmesine yönelik bir yöntem açıklanmaktadır.

Buluş, bir yapay AAV kapsidi veya aynısını içeren bir AAV vektörünü içeren kültür içerisinde bir konak hücrenin sağlanması için kullanılabilir.

Bir başka yönde, buluş, açıklandığı üzere bir AAV vektörü ve fizyolojik olarak uyumlu bir taşıyıcı içeren bir bileşim sağlamaktadır.

Buluş, iletken hava yolu hücrelerinin ve alveolar epitelyum hücrelerinin, özellikle akciğere ait olmayan hücrelerin tercihe bağlı olarak hedeflenmesine yönelik bir yöntemin sağlanması için kullanılabilir. Yöntem, burada açıklandığı üzere bir AAV vektörü ile hücrenin temas ettirilmesini kapsamaktadır.

Spesifik olarak, ihtiyaç halindeki bir sujeye burada açıklandığı üzere bir yapay kapside sahip bir AAV vektörünün veya bir hedefleme kısmının iletilmesi vasıtasıyla, kistik fibroz (CF) hava yolu hastalığı, α -1-antitripsin (AAT) eksikliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD) ve akciğer hipertansiyonunun tedavi edilmesine yönelik bir yöntem burada açıklanmaktadır.

Mevcut buluşun bu ve diğer avantajları, buluşun aşağıdaki ayrıntılı

açıklamasından kolaylıkla anlaşılabacaktır.

Şekillerin Kısa Açıklaması

- 5 Şekil 1A, VP1 ve VP2 özgün bölgelerini ve dokuz varsayımsal değişken kıvrım alanını gösteren, AAV kapsid sekansının bir şemasıdır. Yapılan yer değişimleri A-F ile gösterilmektedir. Şekil 1B, Şekil 1A'da tanımlanmış bölgelere referansla, PCR vasıtasıyla bireysel fragmentlerin meydana getirilmesine dair bir diyagramdır. Şekil 1C, dış primerlerin varlığında, Şekil 10 1B'de gösterildiği üzere oluşturulan fragmentler arasında meydana gelen, kesişim uzatma (SOE) reaksiyonları vasıtasıyla uç birleştirmenin bir diyagramıdır.
- Şekil 2, AAV6 [SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1] ve AAV9 (SEKANS KİMLİK NUMARASI: 2] kapsidinin amino asit sekanslarının bir hizalaması 15 olup, vp1, vp2, vp3, sekiz β -fıçı zinciri ve dokuz değişken kıvrım alanı I, II, II, IV, V, VI, VII, VIII ve IX'in lokasyonlarını göstermektedir.

BULUŞUN AYRINTILI AÇIKLAMASI

- 20 Mevcut buluş, aslen bu tropizme sahip olmayan AAV'lere iletken hava yolu tropizmi kazandıran, izole edilmiş bir peptid ile ilgilidir. İletken hava yolu tropizimli peptid, yapay AAV kapsidlerinin, iletken hava yolu epitelyumunun yanı sıra, aveolar epitelyuma, tercihen akciğere ait olmayan hücrelere ve dokulara hedeflenmesine izin vermektedir. Bu hem terapötik açıdan hem de güvenlik 25 açısından arzu edilmektedir, zira burada açıklanan yapılar, hastalıklı hücrelerin daha spesifik şekilde hedeflenmesine izin vermektedir ve hedef olmayan, pulmoner olmayan hücrelerin ve dokuların dönüşümünü minimuma indirmekte veya elimine etmektedir.
- 30 Mevcut buluş, bir heterolog hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid içeren

yapay, salgı bezleriyle ilişkili bir virüs kapsidi ile ilgilidir. Bu peptid, değişken kıvrım bölgesi IV ve değişken kıvrım bölgesi V'yi kapsayan AAV kapsid bölgesinden elde edilmektedir. Şekil 2'de kolaylıkla görülebildiği üzere, değişken kıvrım bölgeleri, doğrudan birbirine bitişik değildir, daha ziyade aralarında diğer AAV kapsid sekanslarına sahiplerdir. Mevcut buluşa göre, heterolog hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, ayrıca, değişken kıvrım bölgesi IV'nin amino terminusunda bulunan, ancak değişken kıvrım bölgesi III'te bulunmayan fonksiyonel Klad A - AAV'lerden bazı amino asitleri kapsayabilmektedir. İşlevsel Klad A - AAV'lere yönelik bu bölgede yaklaşık 57 amino asit mevcutken, hedefleme peptidi, hiçbir amino asit içermeyebilmektedir, bir ila beş amino asit veya değişken kıvrım IV'nin amino terminusu üzerinde birkaç başka fragment içerebilmektedir. Dahası, heterolog hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, ayrıca, peptidin karboksi terminusunda bulunan, ancak değişken kıvrım bölgesi VI'nın herhangi bir amino asitinin dahil olmadığı fonksiyonel Klad A - AAV'den bazı amino asitleri içerebilmektedir. İşlevsel Klad A - AAV'lere kıvrımlar V ve VI arasındaki bu bölgede 13 amino asit mevcutken, peptid, bu bölgenin 0, 1 ila 5 veya birkaç başka fragmentini içerebilmektedir.

Bir yapılandırmada, fonksiyonel Klad A AAV, AAV1, AAV6, hu44R2, ve hu48R3'ten seçilmekte olup [WO 2006/110689], bunların tamamı, bu bölgede özdeş bir amino asit sekansını paylaşmaktadır. Bir yapay AAV kapsidi; parental AAV'deki bu bölgeyi yandan destekleyen amino asit sekanslarına heterolog olan AAV değişken kıvrım IV ve/veya değişken kıvrım V bölgesine ait karboksi ve/veya amino terminus üzerinde amino asit kalıntıları tarafından yandan desteklenen bu peptidi içermektedir.

Hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid, bir fonksiyonel Klad A AAV'den farklı olan bir AAV kapsidinin karşılık gelen değişken kıvrım bölgesi içerisine tasarlanmaktadır. Sonuç; parental (kaynak) AAV'nin tropizminden farklı olan iletken hava yoluna (ve tercihe bağlı olarak alveolar epitelyum) yönelik bir

tropizm ve/veya dönüştürme verimliliğine sahip bir yapay kapsiddir. Bu tür bir yapay kapsid, çeşitli teknikler ile meydana getirilebilmektedir.

Burada kullanıldığı üzere, “parental AAV kapsidi”, burada açıklandığı üzere
 5 heterolog hava yolu iletken hücre hedeflemeli peptid tarafından modifiye edilen
 natif tropizme sahip kapside işaret etmektedir. Parental AAV kapsid sekanslarının
 kaynağı, bu klada ait üyelerin çoğu, iletken hava yolu tropizminin bazı
 seviyelerini sergilediği için klad A’nın dışındaki bir AAV’dır. İşlevsel klad A
 AAV’leri, AAV6, AAV 1, hu44R2, ve hu48R3’ü kapsamaktadır. Diğer klad A
 10 AAV’leri ise diğerlerinin yanı sıra hu. 44, hu.46, hu.43, ve hu.48’i kapsamaktadır
 [WO 2005/033321 ve WO 2006/110689].

Diğer AAV kladları, Klad B (AAV2 tarafından temsil edilmektedir), Klad C
 (AAV2-AAV3 hibridi tarafından temsil edilmektedir), Klad D (AAV7 tarafından
 15 temsil edilmektedir), Klad E (AAV8 tarafından temsil edilmektedir) ve Klad F’yi
 (insan AAV9 tarafından temsil edilmektedir) kapsamaktadır. Yukarıda açıklanan
 AAV3, AAV5, ve rh32/33 ve rh34, açık şekilde birbirinden farklıdır, ancak
 burada açıklanan ekranda belirlenmemiştir ve bu kladlardan hiçbirine dahil
 edilmemiştir. AAV kladlarına dair ilave bir tartışma, G. Gao, ve ark., J. Virol.,
 20 78(12):6381-6388 (Haziran 2004) ve WO 2004/028817 ve WO 2005/033321
 numaralı Uluslararası Patent Yayınlarında sağlanmaktadır. En sondaki doküman
 ayrıca yeni insan AAV sekanslarını da sağlamaktadır.

Ancak, bir başka yapılandırmada, parental kapsid sekansları, herhangi bir
 25 terapötik veya diğer ürünün bir vektörü veya taşıyıcı olarak kullanılacak olan
 AAV’nin iletimini olanaksızlaştıran bir seviyede iletken hava yolu hücrelerini
 aslen dönüştüren bir AAV’ye aittir.

İletken hava yolu hedefleme peptidi, bir fonksiyonel Klad A salgı bezleriyle
 30 ilişkili virüsün değişken kıvrım bölgesi IV ve değişken kıvrım bölgesi V’yi

kapsayan bölgeden elde edilmektedir. Bir yapılandırmada, fonksiyonel Klad A - AAV, AAV1, AAV6, hu44R2 ve hu48R3'ten seçilmektedir. AAV6 kapsidi, SEKANS KİMLİK NUMARASI: 1'in numaralandırılmasından hareketle, bu peptid, SEKANS KİMLİK NUMARASI 1'in AAV6 kapsidine ait amino asit 447
5 ila amino asit 521'e karşılık gelmektedir.

Dolayısıyla, bir yapılandırmada, bu hedefleme peptidi şu amino asit sekansına sahiptir: SEKANS KİMLİK NUMARASI:4:

NRTQNQSGSAQNKDLLFSRGSPAGMSVQPKNWLPGPCYRQQRVSKTKTD
10 NNNSNFTWTGASKYNLNGRESIINPG. AAV6 amino asit lokasyonlarıyla ilgili burada sağlanan bilgiye dayanarak, teknikte uzman bir kişi, teknikte bilinen yöntemler kullanılarak sekansların hizalanması vasıtasıyla ve/veya kapsidlerinin kristal yapısı vasıtasıyla diğer Klad A AAV kapsidinin karşılık gelen sekanslarını kolaylıkla belirleyebilmektedir.

15 Ayrıca, iletken hava yolu hedefleme peptidinin, yukarıdaki peptidin amino ve/veya karboksi terminusundan kesilmiş yaklaşık bir ila yaklaşık sekiz kalıntıya sahip olduğu örnekler de burada açıklanmaktadır. Bir başka örnekte, hava yolu iletken hücre hedefleme peptidi, bu bölge içerisindeki fonksiyonel bir fragmenttir, yani istenen hedeflemeyi sağlayan, bu bölgenin dahili bir fragmentidir. Bu tür bir fragment, uzunluk bakımından en az yaklaşık 65 amino asit, uzunluk bakımından en az yaklaşık 50 amino asit, uzunluk bakımından en az yaklaşık 45 amino asit uzunluğundadır veya daha kısadır. Uygun şekilde, bu tür fragmentler, AAV6 kapsidinin numaralandırılmasından hareketle (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1),
25 amino asitler 447 ila 469, amino asitler 447 ila 472, amino asitler 451 ila 469, amino asitler 451 ila 474'ten değişken kıvrım IV aralığından elde edilmektedir. Bir örnekte, bu fragmentler, bir Klad A AAV'den değişken kıvrım V sekanslarına bağlıdır. Örneğin, değişken kıvrım V, Klad A AAV'nin amino asitleri 487 ila 521 veya 489 ila 532 aralığında olabilmektedir veya bunun istenen hedeflemeyi
30 sağlayan bir fragmenti olabilmektedir (örneğin 487 ila 506; 487 ila 510; 489 ila

506, 487 ila 510). Bir örnekte, değişken kıvrımlar IV – V’ten bölge aralığı, yani amino asitler 447 ila 510, iletken hava yolu peptidi olarak kullanılmaktadır. Bir başka örnekte, değişken kıvrımlar IV ve V içerisindeki fragmentler, bağlayıcı AAV6 amino asit sekansları olmaksızın kimerik yapının içerisinde

5 sağlanmaktadır. Bir örnekte, kimerik yapı, diğer AAV6 kapsid sekansları olmaksızın (örneğin değişken kıvrım IV sekansları olmaksızın) AAV’nin veya bir başka Klad A AAV’nin değişken kıvrım bölgesi V’i kapsamaktadır. AAV6 amino asit lokasyonlarıyla ilgili burada sağlanan bilgiye dayanarak, teknikte uzman bir kişi, sekansların hizalanması vasıtasıyla ve/veya kapsidlerin kristal yapısı

10 vasıtasıyla diğer Klad A AAV kapsid sekanslarının karşılık gelen sekanslarını kolayca belirleyebilmektedir.

Bir diğer örnekte, bir kimerik kapsid, Klad A AAV’nin diğer değişken kıvrım bölgeleri (örneğin AAV6) olmaksızın, bir kimerik kapsid içerisinde, burada

15 açıklandığı gibi AAV6’nın değişken kıvrım bölgesi 5’i veya bunun bir fragmentini kapsamaktadır. Bir başka örnekte, kimerik kapsid, en azından, AAV6’nin her iki değişken kıvrım bölgesi IV ve V’ye ait fragmentleri kapsamaktadır. AAV6 amino asit lokasyonlarıyla ilgili burada sağlanan bilgiye dayanarak, teknikte uzman bir kişi, sekansların hizalanması vasıtasıyla ve/veya

20 kapsidlerin kristal yapısı vasıtasıyla diğer Klad A AAV kapsid sekanslarının karşılık gelen sekanslarını kolayca belirleyebilmektedir.

Hava yolu iletken hava yolu hedefleme peptidi, ana AAV’nin kapsid proteininin içerisindeki karşılık gelen bölgeye yerleştirilebilmektedir. Burada sağlanan bilgi

25 göz önünde bulundurularak, teknikte uzman bir kişi, bir başka AAV’nin (örneğin bir Klad A AAV’dan farklı olan) karşılık gelen değişken bölgesini kolayca konumlandırabilmektedir. Buradaki değişken bölgeler, H-J Nam, ve ark., J Virol, 81(22):12260-12271 (Kasım 2007) referansında sağlanan AAV8 ile ilgili yapısal bilgi ile uyumludur. Buradaki Şekiller 1 - 2, şematik çizimleri ve AAV6 kapsidini

30 kapsayan bir örnek hizalamayı sağlamaktadır. Diğer kapsid protein hizalamaları

da açıklanmıştır [*bakınız örneğin* WO 03/042397 A1 ve WO 2005/033321] veya hazırlanabilmektedir.

Tipik olarak, AAV kapsid vp1 proteinine dayanarak bir hizalama hazırlandığında, hizalama, bir referans AAV sekansına (örneğin AAV2 veya AAV6) göre tanımlanan insersiyonları ve delesyonları kapsamaktadır ve amino asit kalıntılarının numaralandırılması, hizalama için sağlanan bir referans ölçeğine dayanmaktadır. Bununla birlikte, herhangi bir belirli AAV sekansı, referans ölçeğine kıyasla daha az amino asit kalıntısına sahip olabilmektedir. Mevcut buluşta, parenteral AAV ve referans kütüphanesine ait sekans tartışılırken, “aynı pozisyon” veya “karşılık gelen pozisyon” terimi, hizalanan sekanslara yönelik referans ölçeğine göre sekanslardan her birindeki aynı kalıntı numarasında konumlandırılan amino aside işaret etmektedir. Bununla birlikte, hizadan çıkarıldığında, AAV vp1 proteinlerinden her biri, farklı kalıntı numaralarında konumlandırılan bu amino asitlere sahip olabilmektedir.

Hizalamalar, halka açık veya piyasada mevcut olan birçok Çoklu Sekans Hizalama Programından herhangi biri kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Sekans hizalama programları amino asit sekansları için uygun olup, bunlar, örneğin “Clustal X”, “MAP”, “PIMA”, “MSA”, “BLOCKMAKER”, “MEME”, ve “Match-Box” programlarıdır. Genel olarak, bu programlardan herhangi biri varsayılan ayarlarda kullanılmaktadır, ancak teknikte uzman bir kişi ihtiyaç duyulması halinde bu ayarları değiştirebilmektedir. Alternatif olarak, teknikte uzman bir kişi, en azından bahsi geçen algoritmalar ve programlar seviyesinde özdeşlik veya hizalama sağlayan bir başka algoritmadan veya bilgisayar programından faydalanabilmektedir. *Bakınız, örneğin, J. D. Thomson ve ark, Nucl. Acids. Res., “A comprehensive comparison of multiple sequence alignments”, 27(13):2682-2690 (1999).*

Teknikte, yukarıda açıklanan programlarda bulunanlar da dahil olmak üzere,

nükleotit sekans özdeşliğinin ölçülmesi için kullanılabilen bir takım algoritmalar da mevcuttur. Bir başka örnek olarak, polinükleotit sekansları, GCG Versiyon 6.1'deki bir program olan Fasta kullanılarak karşılaştırılabilmektedir. Fasta, soru ve arama sekanslar arasındaki en iyi örtüşmeye ait bölgelerin hizalamalarını ve

5 yüzde sekans özdeşliklerini sağlamaktadır. Örneğin, nükleik asit sekansları arasındaki yüzde sekans  zdeşliği, GCG Versiyon 6.1'de sağlandığı üzere, varsayılan parametreleri (kelime boyutu 6 ve skor matrisine yönelik NOPAM faktörü) ile birlikte Fasta kullanılarak belirlenebilmektedir. Amino asit hizalamalarının gerçekleştirilmesine yönelik benzer programlar da mevcuttur.

10 Genel olarak bu programlar varsayılan ayarlarda kullanılmaktadır, ancak teknikte uzman bir kişi ihtiyaç duyulması halinde bu ayarları değiştirebilmektedir. Alternatif olarak, teknikte uzman bir kişi, en azından bahsi geçen algoritmalar ve programlar tarafından sağlanan seviyede özdeşlik veya hizalama sağlayan bir başka algoritmadan veya bilgisayar programından faydalanabilmektedir.

15 Yukarıda tartışıldığı üzere, hava yolu iletken peptid sekansı, heterolog kapsid sekansına ait karşılık gelen değişken kıvrım bölgelerine ait natif lokasyonda bulunmaktadır. Bu,  rneğin buradaki örneklerde gösterilen veya teknikte bilinenler gibi teknikler kullanılarak istenen bölgelerin karşılıklı olarak yerinin

20 değiştirilmesi de dahil olmak üzere teknikte uzman kişiler tarafından bilinen çeşitli teknikler vasıtasıyla gerçekleştirilebilmektedir. Aşağıdaki örneklerde gösterildiği üzere, bu, tipik olarak, heterolog kapsid sekansına ait karşılık gelen değişken kıvrım bölgelerinin eksize edilmesini kapsamaktadır. Bununla birlikte, örneğin değiştirilecek olan amino aside yönelik kodon üzerinde konvansiyonel,

25 alan hedefli mutajenez teknikleri de dahil olmak üzere uygun olan diğer teknikler de kullanılabilmektedir. Tipik olarak, alan hedefli mutajenez, muhafaza edilen amino asit kalıntısına yönelik arzu edilen kodonun elde edilmesi için gereken birkaç adım kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Bu tür yöntemler teknikte uzman kişiler tarafından iyi bilinmektedir ve yayınlanan yöntemlerin ve/veya piyasada

30 mevcut olan kitlerin ( rneğin Stratagene ve Promega'dan temin edilebilmektedir)

kullanımıyla gerçekleştirilebilmektedir. Alan hedefli mutajenez AAV genomik sekans üzerinde gerçekleştirilebilmektedir. AAV sekansı, uygunluk için bir vektör (örneğin bir plazmid omurgası) tarafından taşınabilmektedir. Alternatif olarak, teknikte uzman bir kişi, örneğin kimyasal olarak sentezlenen bir peptidin yerleştirilmesi ve benzeri gibi teknikte uzman kişiler tarafından bilinen diğer teknikleri kullanarak parental AAV'yi değiştirebilmektedir.

Buluşa göre kapsidlerde, değişken kıvrım bölgeleri işlevsel şekilde koparak eksilmiştir. Tercihe bağlı olarak, tercihe bağlı bir aralayıcı, hava yolu ileten hedefleme peptid değişkenine ait karboksi ve/veya amino terminusu yandan desteklemektedir. Belirli yapılandırmalarda, aralayıcı, doğada mevcut olmaması, yani sentetik olarak veya yapay şekilde tasarlanan veya hazırlanan bir polipeptid olması bakımından natif olmayan bir ekzojen amino asit sekansıdır. Bu aralayıcılar, bir Klad A kapsisinden farklı olan bir kaynaktan veya AAV'den farklı olan bir kaynaktan elde edilen bir ila beş amino asit içerebilmektedir. Bir yapılandırmada, bir fonksiyonel delesyon seçilen bir değişken kıvrım içerisinde gerçekleştirilmektedir ve buraya hiçbir molekül eklenmemektedir. Bu, örneğin kapsiddeki bir başka yerde büyük bir ekin bulundurulabilmesi gibi birçok sebepten dolayı arzu edilebilmektedir. İşlevsel şekilde koparak eksilen bu tür bir AAV, diğer kullanımların yanı sıra bir AAV viryonunun üretilmesi için kullanılabilir.

Buluşun yapısı vasıtasıyla, AAV veya AAV kapsidine ait natif tropizm değiştirilmektedir. Dolayısıyla, "değiştirilmiş tropizm" ifadesi, modifiye edilmiş AAV kapsidinin veya AAV vektörünün, değiştirilen veya elde edildiği yaban tipi virüsten farklı olan bir hedef hücre bağlama özgülüğü sergilediği anlamına gelmektedir. Dolayısıyla, bir yapılandırmada, buluş, burada açıklandığı üzere bir heterolog hava yolu ileten hücre hedefleme peptidinin sağlanması vasıtasıyla, ileten hava yolu hücrelerini hedeflemesi için, seçilmiş bir AAV vektörünün özgülüğünün değiştirilmesine yönelik bir yöntem sağlamaktadır. Hedefleme

peptidi ayrıca alveolar epitelyumun hedeflenmesine yönelik yetiyi de sağlayabilmektedir.

Bir yapılandırmada, kapsid sekansları tek bir AAV kaynağı tarafından sağlanmaktadır. Uygun AAV'ler, örneğin AAV9, AAV5, AAV2, AAV8, ve AAVrh32.22 de dahil olmak üzere, normalde herhangi bir verimlilik ile iletken hava yolu hücrelerini dönüştürmeyen AAV'ler arasından seçilebilmektedir. Başka AAV'ler de, açıklananlar arasından [WO 03/042397 A1; WO 2005/033321; WO 2006/110689] ve özellikle Klad A'nın dışındaki AAV'ler arasından kolayca seçilebilmektedir. Alternatif olarak, AAV kapsidi, birden fazla AAV'den elde edilebilmektedir.

Bir yapılandırmada, seçilen AAV kapsidi, bir heparin bağlama motifinden yoksundur. AAV, bir heparin bağlama motifinden doğal olarak yoksun olabilmektedir veya heparin bağlama motifi, örneğin WO 2008/027084 numaralı dokümanda açıklanan yöntemler gibi yöntemler kullanılarak yok edilebilmektedir. Örneğin, yapay kapsid proteini veya yapay kapsid proteinine sahip bir AAV vektörünün üretiminin, veriminin ve/veya geri kazanımının artırılması için yaban tipi AAV sekanslarına yönelik başka modifikasyonlar da gerçekleştirilebilmektedir.

“Fonksiyonel” terimi, natif ürün ile aynı seviyede olmasa da, kendi natif işlevini gerçekleştiren bir ürüne (örneğin bir protein veya peptid) işaret etmektedir. “Fonksiyonel” terimi ayrıca, bir ürünü kodlayan ve arzu edilen bir ürünün eksprese edilebildiği bir gene işaret etmektedir. Bir “fonksiyonel delesyon”, ürünün kendi natif işlevini gerçekleştirme yetisini tahrip eden bir delesyona işaret etmektedir.

Aksi belirtilmediği sürece (yukarıdaki gibi), fragmentler terimi, uzunluk bakımından en az 8 amino asit, uzunluk bakımından en az 15 amino asit, uzunluk

bakımından en az 25 amino asit uzunluğunda olan peptidleri kapsamaktadır. Bununla birlikte, arzu edilen diğer uzunluklara sahip fragmentler, arzu edilen bağlama bağlı şekilde kolayca kullanılabilir. Bu tür fragmentler rekombinant şekilde veya diğer uygun yollarla, örneğin kimyasal sentez
5 vasıtasıyla üretilmektedir.

“Yüzde (%) özdeşlik” terimi, bir proteinin veya bunun bir fragmentinin tam uzunluğu üzerinden, amino asit sekansları için kolayca belirlenebilmektedir. Uygun şekilde, bir fragmentin uzunluğu en az yaklaşık 8 amino asit kadardır ve
10 yaklaşık 700 amino aside kadar çıkabilmektedir. Genel olarak, salgı bezleriyle ilişkili iki farklı virüs arasındaki “özdeşlik”, “homoloji” veya “benzerliğe” işaret edildiğinde, “özdeşlik”, “homoloji” veya “benzerlik”, “hizalanan” sekanslara referansla belirlenmektedir. “Hizalanan” sekanslar veya “hizalamalar”, bir referans sekansa kıyasla kayıp veya ilave bazlar veya amino asitler için sıklıkla
15 düzeltmeler içeren, çoklu nükleik asit sekanslarına veya protein (amino asit) sekanslarına işaret etmektedir.

Bu tarifname boyunca ve istemlerde kullanıldığı üzere, “içermek” ve “kapsamak” terimleri ve diğer varyantların arasından, “içermektedir”, “içeren”,
20 “kapsamaktadır” ve “kapsayan” da dahil olmak üzere bunun varyantları, diğer bileşenleri, elemanları, tam sayıları, adımları ve benzerini bünyesinde barındırmaktadır. “Oluşmak” veya “oluşan” terimi, diğer bileşenleri, elemanları, tam sayıları, adımları ve benzerini dışarıda bırakmaktadır.

25 Akciğer/İletken Hava Yolu Hedefleme Kısım

Bir yapılandırmada, buluş, bir “boş kapsid” olan, yani paketlenmiş hiçbir fonksiyonel sekansa sahip olmayan bir kapsid olan bir yapay AAV kapsidi sağlamaktadır. Bir başka ifadeyle, kapsid bir AAV viral genomdan yoksundur
30 ve/veya hiçbir ekspresyon kaseti içermemektedir. Bir yapılandırmada, yapay

AAV kapsidi, paketlenmiş hiçbir fonksiyonel AAV sekansına sahip değildir. Bir başka yapılandırmada ise AAV, hiçbir fonksiyonel AAV gen kodlama sekansı veya hiçbir endojen veya heterolog ekspresyon kaseti içermemektedir.

- 5 Bir “boş” AAV kapsidi, bir heterolog molekül için bir hedefleme proteini olarak kullanılabilir. Arzu edilen terapötik veya immünojenik veya bir başka molekül, bir “bağlayıcı” sekans vasıtasıyla buluşun yapay AAV kapsidi ile ilişkilendirilebilir.
- 10 Bir yapılandırmada, AAV kapsidi ve molekül arasındaki kimyasal çapraz bağlama, kovalent veya kovalent olmayan bağ vasıtasıyla gerçekleştirilmektedir. Bununla birlikte, teknikte bilinen diğer afinite bağlama çiftlerinden de faydalanılabilmektedir. Teknike bilinen diğer konjugasyon kimyaları da tasarlanmakta ve buradaki yapılandırmalarda kullanılabilir olup, bunlar,
- 15 teknikte uzman kişiler tarafından bilinen diğer bağlantıların arasından, aktif polietilen glikol (PEG), maleimid veya süksinimid ester bazlı çapraz bağlayıcılar veya SATA-SMCC iki işlevli çapraz bağlayıcıları kapsamaktadır, ancak bunlarla sınırlı değildir. Bir başka yapılandırmada, ilgilenilen molekül, Destito, ve ark., Chem Biol 2007 Ekim; 14(10):1152-1162 (2007) ve Oh, ve ark., Bioconj Chem
- 20 2006; 17:721-727 (2006) referanslarında açıklandığı üzere, bir PEG bağlayıcısı (‘aralayıcı’) vasıtasıyla boş AAV kapsidi ile bağlantılandırılabilir.

Bir başka yapılandırmada, ilgilenilen molekül, Chatterji, ve ark., Bioconj Chem ; 15:807-813 (2004) referansında açıklandığı üzere, N-hidroksisüksinimid (NHS) esterleri kullanılarak AAV yüzey lisin kalıntılarının veya maleimid ve haloasetamid tepkenleri kullanılarak sülfhidril gruplarının kimyasal modifikasyonu vasıtasıyla tutturulmaktadır. Bir başka yapılandırmada, yüzey karboksilat grupları, spesifik tutturma için modifiye edilmektedir.

- 30 Bir başka yapılandırmada, ilgilenilen molekül, bir immünoglobulin moleküne ait

AAV bağlama alanı vasıtasıyla bir AAV kapsidi ile bağlantılandırılabilir. Diğer yapılandırmalarda ise bağlama alanı, bir Fab, Fab', (Fab')₂, veya bir immünoglobulin molekülünün bir Fv fragmenti olabilir. Bağlama alanı, yukarıda not edilenler de dahil olmak üzere bilinen herhangi bir şekilde ilgilenilen molekül ile bağlantılandırılabilir. Bir yapılandırmada, bir PEG bağlayıcısı, bağlama alanı ve ilgilenilen molekül arasında dahil edilmektedir.

Bir bağlayıcı sekansına tutturma vasıtasıyla DNA'nın veya amino asit sekanslarının dahil edilmesine yönelik bu tür yapı teknikleri, teknikte bilinmektedir ve bir protein/genetik mühendisinin rutin becerisi dahilindedir.

Bir AAV kapsidine bağlantılandırma ve hedef hücrelere iletme için faydalı olan moleküller, örneğin kistik fibroz, α -1-antitripsin (AAT) eksikliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD), akciğer hipertansiyonu, astım, akciğer kanseri gibi rahatsızlıkların tedavisi bakımından faydalı olanları kapsamaktadır. Uygun molekül örnekleri, gen ürünlerini eksprese eden nükleik asitleri taşıyan, viral temelli olmayan vektörleri (örneğin plazmidler, "çıplak-DNA", kozmidler, vb.) kapsayabilmektedir. Uygun gen ürünleri örnekleri, aşağıda ekspresyon kasetleri ile bağlantılı olarak açıklananları kapsamaktadır. İlave, nükleik asit temelli olmayan diğer moleküller bu yapılandırmada kullanılabilir olup, bunlar, örneğin steroidler, steroid türevleri, immün düzenleyici moleküller, enzimler, proteinler, küçük moleküller ve diğer kimyasal kısımları kapsamaktadır.

Bir başka yapılandırmada, heterolog hava yolu iletken hücre hedefleme sekansını kapsayan yapay AAV kapsidi, hedeflenen hücrelere bir ürünü ileten bir ekspresyon kasetini paketleyen bir vektörün üretiminde kullanılmaktadır.

İletken Hava Yolu Hedefleme Alanını Kapsayan Yapay AAV Kapsidlerine Sahip AAV Vektörleri

Buluş, buluşun yeni bir AAV kapsidine sahip bir rekombinant, salgı bezleriyle ilişkili virüsün (AAV) meydana getirilmesine yönelik bir yöntemi olanaklı kılmaktadır. Bu tür bir yöntem, burada açıklandığı üzere buluşun yeni bir AAV kapsid proteinini veya bunun fragmentini kodlayan bir nükleik asit sekansı; bir fonksiyonel rep genini; minimum olarak, AAV ters terminal tekrarlarından (ITR'ler) ve bir transgenden oluşan bir ekspresyon kaseti; ve AAV kapsid proteini içerisinde ekspresyon kasetinin paketlenmesinin olanaklı kılınmasına yönelik yeterli yardımcı işlevleri içeren bir konak hücrenin kültürlenmesini kapsamaktadır.

10

Bir AAV kapsidi içerisinde bir AAV ekspresyon kasetinin paketlenmesi için konak hücre içerisinde kültürlenmesi gereken bileşenler, *trans* şekilde konak hücreye sağlanabilmektedir. Alternatif olarak, gereken bileşenlerden biri veya daha fazlası (örneğin ekspresyon kaseti, *rep* sekansları, *cap* sekansları ve/veya yardımcı işlevler), teknikte uzman kişiler tarafından bilinen yöntemler kullanılarak, gereken bileşenlerin birini veya daha fazlasını kapsamaları için tasarlanmış olan dengeli bir konak hücre tarafından sağlanabilmektedir. Daha uygun şekilde, dengeli olan bu tür bir konak hücre, indüklenebilir bir promotorün kontrolü altında gerekli bileşenleri kapsayacaktır. Bununla birlikte, gereken bileşenler kurucu bir promotorün kontrolü altında olabilmektedir. Uygun olan indüklenebilir ve kurucu bileşenlerin örnekleri, burada, transgen ile birlikte kullanım için uygun düzenleyici elemanların tartışmasında sağlanmaktadır. Bir başka alternatifte, seçilen dengeli bir konak hücre, kurucu bir promotorün kontrolü altında seçilmiş bileşenleri ve bir veya daha fazla indüklenebilir promotorün kontrolü altında diğer seçilmiş bileşenleri kapsayabilmektedir. Örneğin, dengeli bir konak hücre meydana getirilebilmekte olup, bu, 293 hücreden (bir kurucu promotorün kontrolü altında E1 yardımcı işlevlerini içeren) elde edilmektedir, ancak indüklenebilir promotorların kontrolü altında rep ve/veya cap proteinlerini kapsamaktadır. Diğer dengeli konak hücreler teknikte uzman bir kişi tarafından meydana getirilebilmektedir.

30

Buluşun rAAV'sinin üretilmesi için gerekli ekspresyon kaseti, *rep* sekansları, *cap* sekansları ve yardımcı işlevler, bunun üzerinde taşınan sekansları aktaran herhangi bir genetik eleman formunda, paketlenme konak hücrelerine iletilebilmektedir. Seçilen genetik eleman, burada açıklananlar da dahil olmak üzere uygun olan herhangi bir yöntem vasıtasıyla iletilebilmektedir. Bu buluşun herhangi bir yapılandırmasının meydana getirilmesinde kullanılan yöntemler, nükleik asit manipülasyonunda uzman olanlar tarafından bilinmektedir ve genetik mühendisliği, rekombinant mühendisliği ve sentetik teknikleri kapsamaktadır. Bakınız, *örneğin*, Sambrook ve ark, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Benzer şekilde, rAAV viryonlarının meydana getirilmesine yönelik yöntemler iyi bilinmektedir ve uygun bir yöntemin seçilmesi mevcut buluşu sınırlandırmamaktadır. Bakınız, *örneğin* K. Fisher ve ark, J. Virol., 70:520-532 (1993) ve 5,478,745 numaralı US Patent dokümanı.

Aksi belirtilmediği sürece, AAV ITR'ler ve burada açıklanan, seçilmiş diğer AAV bileşenleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere AAV2, AAV7, AAV9 veya diğer AAV sekansları da dahil herhangi bir AAV arasından kolayca seçilebilmektedir (*örneğin* WO 03/042397 A1; WO 2005/033321; WO 2006/110689]. Bu ITR'ler veya diğer AAV bileşenleri, bir AAV sekansından, teknikte uzman kişiler tarafından ulaşılabilir olan teknikler kullanılarak kolayca izole edilebilmektedir. Bu tür bir AAV, akademik, ticari veya kamusal kaynaklardan izole edilebilmekte veya elde edilebilmektedir (*örneğin* American Type Culture Collection, Manassas, VA). Alternatif olarak, AAV sekansları, *örneğin* GenBank®, PubMed® veya benzeri gibi literatürden veya veritabanlarından ulaşılabilir olan sekanslar gibi yayınlanan sekanslara referansla sentetik yollarla veya uygun olan diğer yollarla elde edilebilmektedir.

A. Ekspresyon Kaseti

Ekspresyon kaseti, minimum olarak, en az bir AAV ters terminal tekrar sekansı, bir transgen ve bunun düzenleyici sekanslarından oluşmaktadır. Bir yapılandırmada, hem 5' AAV ters terminal tekrarları (ITR'ler) ve 3' ITR'ler, ekspresyon kasetine dahil edilmektedir. Arzu edilen bir yapılandırmada, ekspresyon kaseti, AAV kapsid sekanslarını sağlayanlardan farklı bir AAV sekansından ITR'leri kapsamaktadır. Örneğin, AAV 2 ITR'leri kapsayan psödo tipli vektörler, uygunluk için kullanılabilir. Bununla birlikte, uygun olan diğer kaynaklara ait ITR'ler seçilebilmektedir. Bu ekspresyon kaseti, bir kapsid proteini içerisine paketlenen ve seçilen bir konak hücreye iletilen bir ekspresyon kasetidir.

1. Transgen

Transgen, bir polipeptid, peptid, protein, enzim veya ilgilenilen bir başka ürünü kodlayan, transgeni yandan destekleyen vektör sekanslarına heterolog olan bir nükleik asit sekansıdır. Bir yapılandırmada, ekspresyon kaseti bir nükleik asit sekansını, örneğin bir RNA'yı taşımaktadır. Arzu edilen RNA molekülleri tRNA, dsRNA, RNAi, ribozomal RNA, katalitik RNA'lar, siRNA, küçük hairpin RNA, trans uç birleştirme RNA'sı ve antisens RNA'ları kapsamaktadır. Faydalı bir RNA sekansının bir örneği, tedavi edilen hayvanda hedeflenmiş bir nükleik asit sekansının ekspresyonunu inhibe eden veya ortadan kaldıran bir sekanstır. Tipik olarak, uygun hedef sekanslar onkolojik hedefleri ve viral hastalıkları kapsamaktadır. Bu, örneğin kanser terapilerinde ve aşılar da faydalıdır.

Nükleik asit kodlama sekansı, bir konak hücrede transgen transkripsiyonunun, translasyonun ve/veya ekspresyonun olanaklı kılınacağı şekilde düzenleyici bileşenler ile faal şekilde bağlantılandırılmaktadır.

Buluşun yapıları kullanılarak her çeşit ürün iletebilirken, buluş özellikle, iletken

hava yolu hücreleri ile ilişkilendirilen rahatsızlıkların teşhisinde, tedavisinde ve aşılmasında ve bunların semptomlarının iyileştirilmesinde faydalı olan ürünlerin iletimi için uygundur. Bu tür rahatsızlıklar, bunlarla sınırlı olmaksızın, kistik fibroz, α -1-antitripsin (AAT) eksikliği, kronik obstrüktif akciğer hastalığı (COPD) ve akciğer hipertansiyonunu kapsamaktadır. Uygun gen ürünleri, bir fonksiyonel fibroz transmembran regülatör (CFTR) sekansı, α -1-antitripsin, sekretuvar lökoproteaz inhibitör, yüzey aktif madde protein C (SPC), yüzey aktif madde protein D (SPD) ve örneğin interlökin-12 gibi interlökinler gibi immün düzenleyiciler, granülosit makrofaz koloni stimülasyon faktörü (GM-CSF), interferon- β gibi interferonlar ve herpes simpleks virüsü timidin kinazı (HSV-TK) kapsamaktadır. Diğer gen ürünleri, diğerlerinin arasından, örneğin p53, FUS1 dahil kanser terapötikleri, RNAi gibi RNA'yı kapsayabilmektedir. Diğer uygun ekspresyon ürünleri teknikte uzman bir kişi tarafından kolayca seçilebilmektedir.

2. Düzenleyici Elemanlar

Ekspresyon kasetine yönelik yukarıda tanımlanan ana elemanlara ilaveten, vektör ayrıca, plazmid vektör ile transfekte edilen veya buluş tarafından üretilmiş virüs ile enfekte edilen bir hücre içerisinde transkripsiyonu, translasyonu ve/veya ekspresyonu olanaklı kılınacak şekilde transgen ile işlevsel olarak bağlantılandırılan konvansiyonel kontrol elemanlarını kapsamaktadır. Burada kullanıldığı üzere, "işlevsel olarak bağlantılandırılan" sekanslar, hem ilgilenilen gen ile komşu olan ekspresyon kontrol sekanslarını hem de ilgilenilen genin kontrol edilmesi için *trans* şekilde veya belirli bir mesafede işlev gösteren ekspresyon kontrol sekanslarını kapsamaktadır.

Ekspresyon kontrol sekansları, uygun transkripsiyon başlatıcı, sonlandırıcı, promotor ve artırıcı sekansları; uç birleştirme ve poliadenilasyon (poliA) sinyalleri gibi etkili RNA işlem sinyallerini; sitoplazmik mRNA'yı stabilize eden sekansları; translasyon verimliliğini artıran sekansları (yani Kozak konsensus sekansı);

protein stabilitesini artıran sekansları; ve arzu edildiğinde, kodlanan ürünün salgılanmasını artıran sekansları kapsamaktadır. Natif, kurucu, indüklenebilir ve/veya dokuya özgü olan promotorlar da dahil olmak üzere çok sayıda ekspresyon kontrol sekansı teknikte bilinmekte ve kullanılmaktadır.

5

Kurucu promotorların örnekleri, bunlarla sınırlı olmamak üzere, retroviral Rous sarkoma virüsü (RSV) LTR promotoru (tercihe bağlı olarak RSV artırıcı ile birlikte), sitomegalovirüs (CMV) promotoru (tercihe bağlı olarak CMV artırıcı ile birlikte) [bakınız, *örneğin* Boshart ve ark, Cell, 41:521-530 (1985)], SV40

10

promotoru, dihidrofolat redüktaz promotoru, β -aktin promotoru, fosfogliserol kinaz (PGK) promotoru ve EF1 promotorunu [Invitrogen] kapsamaktadır.

İndüklenebilir promotorlar, gen ekspresyonunun düzenlenmesini mümkün kılmaktadır ve ekzojen olarak sağlanan bileşikler, sıcaklık gibi çevresel faktörler veya *örneğin* akut faz, hücrenin belirli bir farklılaşma durumu gibi spesifik bir

15

fizyolojik durumun varlığı tarafından veya yalnızca çoğalan hücrelerde düzenlenebilmektedir. İndüklenebilir promotorlar ve indüklenebilir sistemler, bunlarla sınırlı olmamak üzere Invitrogen, Clontech ve Ariad da dahil çeşitli ticari kaynaklardan elde edilebilmektedir. Uygun olan birçok başka sistem de açıklanmıştır ve teknikte uzman bir kişi tarafından kolayca seçilebilmektedir.

20

Ekzojen olarak sağlanan bileşikler tarafından düzenlenen indüklenebilir promotorların örnekler, çinko ile indüklenebilir koyun metalloprotein (MT) promotoru, deksametazon (Deks) ile indüklenebilir fare meme tümör virüsü (MMTV) promotoru, T7 polimeraz promotor sistemi [WO 98/10088 numaralı Uluslararası Patent Yayını]; ecdizon böcek promotoru [No ve ark, Proc. Natl.

25

Acad. Sci. ABD, 93:3346-3351 (1996)], tetrasiklin ile baskılanabilir sistem [Gossen ve ark, Proc. Natl. Acad. Sci. ABD, 89:5547-5551 (1992)], tetrasiklin ile indüklenebilir sistem [Gossen ve ark, Science, 268:1766-1769 (1995), ayrıca bakınız Harvey ve ark, Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 (1998)], RU486 ile indüklenebilir sistem [Wang ve ark, Nat. Biotech., 15:239-243 (1997) ve Wang ve

30

ark, Gene Ther., 4:432-441 (1997)] ve rapamisin ile indüklenebilir sistemi

[Magari ve ark, J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997)] kapsamaktadır. Bu bağlamda faydalı olan diğer indüklenebilir promotor türleri, örneğin sıcaklık, akut faz, hücrenin belirli bir farklılaşma durumu gibi spesifik bir fizyolojik durum tarafından veya yalnızca çoğalan hücrelerde düzenlenen promotorlardır.

5

Bir başka yapılandırmada, transgene yönelik natif promotor kullanılacaktır. Transgen ekspresyonunun natif ekspresyonu taklit etmesi arzu edildiğinde natif promotor tercih edilebilmektedir. Natif promotor, transgen ekspresyonunun geçici olarak veya gelişimsel şekilde veya dokuya özgü bir şekilde veya spesifik transkripsiyonel uyarana yanıt olarak düzenlenmesinin gerekmesi durumunda kullanılabilir. Bir başka yapılandırmada, artırıcı elemanlar, poliadenilasyon alanları veya Kozak konsensus sekansları gibi diğer natif ekspresyon kontrol elemanları da natif ekspresyonun taklit edilmesi için kullanılabilir.

10

15

Transgenin bir başka yapılandırması, dokuya özgü bir promotor ile işlevsel olarak bağlantılandırılan bir geni kapsamaktadır. Örneğin, pulmoner dokuya özgü olan veya uygun olması durumunda iletken hava yolu hücrelerine özgü olan promotorlar kullanılabilir. Bu tür promotorların örnekleri, diğerlerinin arasından, örneğin çatal bağlantı kutusu J1 (FOXJ1) promotoru, poliubikitin promotoru UbC, SAM noktalı alan içeren ETS transkripsiyon faktörü (SPDEF) promotoru, Clara hücre salgılayıcı protein/uterogloblin (CCSP/UG) promotorunu kapsayabilmektedir. Akciğere özgü diğer gen promotorları, diğerlerinin arasından, örneğin yüzey aktif madde protein B (SPB), yüzey aktif madde protein C (SPC) ve yüzey aktif madde protein A (SPA), ektojenik insan karsinoembriyonik antijen (CEA) promotoru, Tiroid transkripsiyon faktörü 1 (TTF1) ve insan yüzey aktif madde protein A1'i (hSPA1) kapsayabilmektedir.

20

25

30

Tercihe bağlı olarak, terapötik olarak faydalı transgenleri taşıyan plazmidler ayrıca, diğerlerinin arasından genetisin, higromisin veya purimisin direncini kodlayan sekansları kapsayan, seçilebilir işaretçileri veya haberci genleri

kapsayabilmektedir. Bu tür uygun haberci veya işaretçi genler (tercihen, buluşun yöntemi ile kurtarılabilecek olan viral genomun dışında bulunmaktadır), ampicillin direnci gibi, bakteriyel hücrelerde plazmidlerin mevcudiyetinin sinyallenmesi için kullanılabilir. Diğer plazmid bileşenleri bir replikasyon kaynağını kapsayabilmektedir. Bu ve diğer promotorların ve vektör elemanlarının seçimi konvansiyoneldir ve bu tür sekansların çoğu mevcuttur.

Burada, transgen, promotor/artırıcı ve AAV ITR'lerin kombinasyonu, referansın kolaylaştırılması için bir ekspresyon kaseti olarak adlandırılmaktadır. Bu tarifnamede sağlanan öğretiler ile birlikte, bu tür bir ekspresyon kasetinin tasarımı, konvansiyonel tekniklere başvurarak gerçekleştirilebilmektedir.

3. Bir Paketleme Konak Hücresine Ekspresyon Kasetinin İletilmesi

Ekspresyon kaseti, bir paketleme konak hücresine iletilen, örneğin bir plazmid gibi herhangi bir uygun vektör üzerinde taşınabilmektedir. Bu buluşta faydalı olan plazmidler tasarlanabilmektedir, böylelikle bunlar, prokaryotik hücrelerde, memeli hücrelerinde veya her ikisinde birden replikasyon ve tercihe bağlı olarak entegrasyon için uygun hale gelmektedir. Bu plazmidler (veya 5' AAV ITR-heterolog molekül-3' AAV ITR'yi taşıyan diğer vektörler), ökaryolarda ve/veya prokaryotlarda ekspresyon kasetinin replikasyonunu olanaklı kılan sekansları ve bu sistemlere yönelik seçim işaretçilerini kapsamaktadır. Seçilebilir işaretçiler veya haberci genleri diğerlerinin arasından genetisin, hidromisin veya purimisin direncini kodlayan sekansları kapsayabilmektedir. Plazmidler ayrıca, ampicillin direnci gibi, bakteriyel hücrelerde vektörün mevcudiyetinin sinyallenmesi için kullanılabilen, belirli seçilebilir haberci veya işaretçi genleri de kapsayabilmektedir. Diğer plazmid bileşenleri, Epstein Barr virüsü nükleer antijenini kullanan amlikon sistemi gibi bir amplikonu ve bir replikasyon kaynağını kapsayabilmektedir. Bu amplikon sistemi veya benzer diğer amplikon bileşenleri, hücrelerde yüksek kopyalı epizomal replikasyonunu olanaklı

kılmaktadır. Tercihen, ekspresyon kasetini taşıyan molekül, kısa süreliğine mevcut olabildiği hücreye transfekte edilmektedir. Alternatif olarak, ekspresyon kaseti (5' AAV ITR-heterolog molekül-3' ITR'yi taşıyan), kromozomal olarak veya bir episom olarak konak hücrenin genomuna dengeli biçimde entegre edilebilmektedir. Belirli yapılandırmalarda, ekspresyon kaseti çoklu kopyalarda, tercihe bağlı olarak kafadan-kafaya, kafadan-kuyruğa veya kuyruktan-kuyruğa konkatamerlerde mevcut olabilmektedir. Uygun transfeksiyon teknikleri bilinmektedir ve konak hücreye ekspresyon kasetinin iletilmesi için kolayca kullanılabilir.

10

Genel olarak, transfeksiyon vasıtasıyla ekspresyon kasetini içeren vektör iletilirken, vektör yaklaşık 5 µg ila yaklaşık 100 µg DNA, yaklaşık 10 µg ila yaklaşık 50 µg DNA ila yaklaşık 1×10^4 hücre ila yaklaşık 1×10^{13} hücre veya yaklaşık 1×10^5 hücre miktarında verilmektedir. Bununla birlikte, vektör DNA ila konak hücrelerin ilgili miktarları, seçilen vektör, iletim yöntemi ve seçilen konak hücreler gibi faktörleri göz önünde bulundurabilen, teknikte orta derecede uzman bir kişi tarafından ayarlanabilmektedir.

15

B. *Rep* ve *Cap* Sekansları

20

Ekspresyon kasetine ilaveten, konak hücre, ekspresyon kasetinin içerisinde bulunan AAV ITR'lerin kaynağı veya bir çapraz-dengeleme kaynağı ile aynı olan kaynaktan *rep* sekansları ve konak hücrede buluşun yeni bir AAV kapsid proteininin (veya bunun bir fragmentini içeren bir kapsid proteini) ekspresyonunu yönlendiren sekansları kapsamaktadır. AAV *cap* ve *rep* sekansları, yukarıda açıklandığı üzere bir AAV kaynağından bağımsız şekilde elde edilebilmektedir ve yukarıda açıklandığı üzere teknikteki bir kişi tarafından bilinen herhangi bir şekilde konak hücreye verilebilmektedir. İlaveten, bir AAV vektörü psödotiplenirken, temel *rep* proteinlerinden her birini kodlayan sekanslar farklı AAV kaynakları tarafından tedarik edilebilmektedir (örneğin AAV2, AAV3,

30

AAV4, AAV5, AAV7, AAV8, AAV9 veya burada açıklanan veya teknikte bilinen diğer AAV sekanslarından biri). Örneğin rep78/68 sekansları AAV2'ye ait olabilmekteyken, rep52/40 sekansları ise AAV8'e ait olabilmektedir.

- 5 Bir örnekte, konak hücre stabil olarak, yukarıda açıklananlar gibi uygun bir promotorun kontrolü altında kapsid proteinini kapsamaktadır. En çok arzu edilebilir şekilde, bu örnekte, kapsid proteini, indüklenebilir bir promotorun kontrolü altında eksprese edilmektedir. Bir başka örnekte, kapsid proteini *trans* şekilde konak hücreye tedarik edilmektedir. *Trans* şekilde konak hücreye
- 10 iletilildiğinde, kapsid proteini, konak hücre içerisinde seçilmiş kapsid proteininin ekspresyonunun yönlendirilmesi için gereken sekansları kapsayan bir plazmid vasıtasıyla iletilebilmektedir. En çok arzu edilebilir şekilde, *trans* şekilde konak hücreye iletilildiğinde, kapsid proteinini taşıyan plazmid ayrıca rAAV'nin paketlenmesi için gereken diğer sekansları, örneğin *rep* sekanslarını da
- 15 taşımaktadır.

- Bir başka örnekte, konak hücre stabil olarak, yukarıda açıklananlar gibi uygun bir promotorun kontrolü altında *rep* sekanslarını kapsamaktadır. En çok arzu edilebilir şekilde, bu örnekte, temel rep proteinleri, indüklenebilir bir promotorun
- 20 kontrolü altında eksprese edilmektedir. Bir başka örnekte, rep proteinleri *trans* şekilde konak hücreye tedarik edilmektedir. *Trans* şekilde konak hücreye iletilildiğinde, rep proteinleri, konak hücre içerisinde seçilmiş rep proteinlerinin ekspresyonunun yönlendirilmesi için gereken sekansları kapsayan bir plazmid vasıtasıyla iletilebilmektedir.

25

- Dolayısıyla, bir örnekte, *rep* ve *cap* sekansları, tek bir nükleik sit molekülü üzerinde konak hücreye transfekte edilebilmektedir ve bir epizom olarak hücrede dengeli şekilde mevcut olabilmektedir. Bir başka örnekte, *rep* ve *cap* sekansları, hücrenin kromozomu içerisinde dengeli şekilde entegre edilmektedir. Bir başka
- 30 örnekte, *rep* ve *cap* sekansları konak hücre içerisinde kısa süreli olarak eksprese

edilmektedir. Örneğin, bu tür bir transfeksiyon için faydalı olan bir nükleik asit molekülü, 5' ile 3' arası, bir promotor, promotor ve *rep* gen sekansının başlangıç alanı arasına yerleştirilen tercihe bağlı bir aralayıcı, bir AAV *rep* gen sekansı ve bir AAV *cap* gen sekansı içermektedir.

5

Tercihe bağlı olarak, *rep* ve/veya *cap* sekansları, konak hücrelerin içerisine verilecek olan diğer DNA sekanslarını kapsayan bir vektör üzerinde tedarik edilebilmektedir. Örneğin, vektör, ekspresyon kasetini içeren rAAV yapısını kapsayabilmektedir. Vektör, yardımcı işlevleri kodlayan genlerden biri veya daha

10

fazlasını, örneğin adenoviral proteinler E1, E2a, ve E4 ORF6 ve VAI RNA'ya yönelik geni içerebilmektedir.

Tercihen, bu yapıda kullanılan promotor, teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen veya yukarıda tartışılan kurucu, indüklenebilir veya natif promotorlardan herhangi biri olabilmektedir. Bir yapılandırma, bir AAV P5 promotor sekansı

15

kullanılmaktadır. Bu sekanslardan herhangi birinin sağlanmasına yönelik AAV seçimi buluşu sınırlandırmamaktadır.

Tercih edilen bir başka örnekte, *rep*'e yönelik promotor, transgen düzenleyici elemanlar ile bağlantılı olarak tartışılanlar gibi indüklenebilir bir promotordur. *rep* ekspresyonuna yönelik tercih edilen bir promotor, T7 promotordur. T7 promotörü tarafından düzenlenen *rep* genini ve *cap* genini içeren vektör, T7 polimerazını kurucu şekilde veya indüklenebilir şekilde eksprese eden bir hücreye transfekte edilmektedir veya dönüştürülmektedir. Bakınız, 12 Mart 1998'de

20

yayınlanan, WO 98/10088 numaralı Uluslararası Patent Yayını.

25

Aralayıcı, vektörün tasarımında tercihe bağlı bir elemandır. Aralayıcı, promotor ve *rep* geni ATG başlangıç alanı arasına yerleştirilen bir DNA sekansıdır. Aralayıcı istenen herhangi bir tasarıma sahip olabilmektedir; yani, nükleotitlerin rastgele bir sekansı olabilmektedir veya alternatif olarak bir işaretçi gen gibi bir

30

gen ürününü kodlayabilmektedir. Aralayıcı, tipik olarak başlangıç/durdurma ve poliA alanlarını dahil eden genleri kapsayabilmektedir. Aralayıcı, bir prokaryot veya ökaryottan kodlamasız bir DNA sekansı, tekrarlı, kodlamasız bir sekans, transkripsiyonel kontrollerin olmadığı bir kodlama sekansı veya transkripsiyonel kontrollerin olduğu bir kodlama sekansı olabilmektedir. Aralayıcı sekansların iki örnek kaynağı, örneğin diğerlerinin arasından Gibco veya Invitrogen'de ticari olarak mevcut olan λ faj merdiven sekansları veya maya merdiven sekanslarıdır. Aralayıcı, eksprese edilen *rep52*, *rep40* ve *cap* gen ürünlerini normal seviyelerde bırakarak, *rep78* ve *rep68* gen ürünlerinin ekspresyonunun indirgenmesi için yeterli herhangi bir boyuta sahip olabilmektedir. Aralayıcının uzunluğu, dolayısıyla, yaklaşık 10 bp ile yaklaşık 10.0 kbp aralığında, tercihen yaklaşık 100 bp ile yaklaşık 8.0 kbp aralığında olabilmektedir. Rekombinasyon olasılığının azaltılması için, aralayıcının uzunluğu tercihen 2 kbp'den azdır; ancak buluş bununla sınırlı değildir.

15 *rep* ve *cap*'i sağlayan moleküller kısa süreli olarak konak hücrede mevcut olabilsede (yani transfeksiyon vasıtasıyla), *rep* ve *cap* proteinlerinden birinin veya her ikisinin ve bunların ekspresyonunu kontrol eden promotorların, örneğin bir epizom olarak veya konak hücrenin kromozomuna entegrasyon vasıtasıyla konak hücre içerisinde dengeli şekilde eksprese edilmesi tercih edilmektedir. Bu buluşun yapılandırmalarının meydana getirilmesi için kullanılan yöntemler, yukarıdaki referansta açıklananlar gibi, konvansiyonel genetik mühendisliği veya rekombinant mühendisliği teknikleridir. Bu tarifname belirli yapıların açıklayıcı örneklerini sağlasa da, burada sağlanan bilgileri kullanarak, teknikte uzman bir kişi, en az bir translasyonel başlangıç ve durdurma sinyali ve poliadenilasyon alanlarının tercihe bağlı ilavesi de dahil olmak üzere aralayıcılar, P5 promotorları ve diğer elemanlara dair bir tercihi kullanarak, uygun olan diğer yapılar da seçebilmekte ve tasarlayabilmektedir.

30 Bir başka yapılandırmada, *rep* veya *cap* proteini bir konak hücre tarafından

dengeli şekilde sağlanabilmektedir.

C. Yardımcı İşlevler

- 5 Paketleme konak hücresi ayrıca, buluşun rAAV'sinin paketlenmesi için yardımcı işlevler de gerektirmektedir. Tercihe bağlı olarak, bu işlevler bir herpes virüsü tarafından sağlanabilmektedir. En çok arzu edilebilir şekilde, gerekli yardımcı işlevlerin her biri, yukarıda açıklananlar gibi bir insan veya insan olmayan primat kaynağından veya Amerikan Tıp Kültür Koleksiyonu (ATCC), Manassas, VA
- 10 (US) da dahil olmak üzere çeşitli kaynaklardan sağlanmaktadır. Halihazırda tercih edilen bir örnekte, konak hücre, bir E1a gen ürünü, bir E1b gen ürünü, bir E2a gen ürünü ve/veya bir E4 ORF6 gen ürünü ile donatılmaktadır ve/veya bunları kapsamaktadır. Konak hücre VAI RNA gibi diğer adenoviral genleri kapsayabilmektedir, ancak bu genler gerekli değildir. Tercih edilen bir örnekte,
- 15 diğer hiçbir adenovirüs geni veya gen işlevi konakta mevcut değildir.

- Adenovirüs E1a, E1b, E2a, ve/veya E4ORF6 gen ürünlerinin yanı sıra, istenen diğer herhangi bir yardımcı işlev, bunların bir hücre içerisinde ekspresyonunu mümkün kılan herhangi bir yolla sağlanabilmektedir. Bu ürünleri kodlayan
- 20 sekanslardan her biri ayrı bir vektör üzerinde olabilmektedir veya bir veya daha fazla gen aynı vektör üzerinde olabilmektedir. Vektör plazmidler, kozmidler ve virüsler de dahil olmak üzere teknikte bilinen veya yukarıda açıklanan herhangi bir vektör olabilmektedir. Vektörün konak hücresine iletim diğerlerinin arasından, transfeksiyon, enfeksiyon, elektroporasyon, lipozom iletimi, membran füzyon
- 25 teknikleri, yüksek hızlı DNA-kaplamalı peletler, viral enfeksiyon ve protoplast füzyonu da dahil olmak üzere, teknikte bilinen veya yukarıda açıklanan herhangi bir yoldan gerçekleştirilebilmektedir. Adenoviral genlerin biri veya daha fazlası, konak hücrenin genomuna dengeli şekilde entegre edilebilmektedir, epizomlar olarak dengeli şekilde eksprese edilebilmektedir veya kısa süreliğine eksprese
- 30 edilebilmektedir. Gen ürünleri bir epizom üzerinde kısa süreliğine eksprese

edilebilmektedir veya dengeli şekilde entegre edilebilmektedir veya gen ürünlerinden bazıları dengeli şekilde eksprese edilirken, diğerleri kısa süreliğine eksprese edilebilmektedir. Dahası, adenoviral genlerden her birine yönelik promotorlar, bir kurucu promotor, bir indüklenabilir promotor veya bir natif adenoviral promotor arasından bağımsız şekilde seçilebilmektedir. Promotorlar, organizmaya veya hücre ait belirli bir fizyolojik durum tarafından (yani, farklılaşma durumu tarafından veya çoğalan veya devinimsiz hücreler içerisinde) veya örneğin ekzojen olarak eklenen faktörler gibi diğer yollarla düzenlenebilmektedir.

10

D. Konak Hücreler ve Paketleme Hücresi Hatları

Konak hücrenin kendisi, prokaryotik (örneğin bakteriyel) hücreler ve böcek hücreleri, maya hücreleri ve memeli hücreleri de dahil olmak üzere ökaryotik hücreler de dahil herhangi bir biyolojik organizmadan seçilebilmektedir. Özellikle arzu edilen konak hücreler, bunlarla sınırlı olmaksızın, A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, BHK, MDCK, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, HeLa gibi hücreler, 293 hücreler (fonksiyonel adenoviral E1'i eksprese eden), Saos, C2C12, L hücreleri, HT1080, HepG2 ve insan, maymun, fare, sıçan, tavşan ve hamster da dahil olmak üzere memelilerden elde edilen birincil fibroblast, hepatosit ve miyoblast hücreleri de dahil olmak üzere herhangi bir memeli türü arasından seçilebilmektedir. Hücreleri sağlayan memeli türlerinin seçimi buluşu sınırlandırmamaktadır; memeli hücresi, yani fibroblast, hepatosit, tümör hücresi ve benzeri tipini sınırlandırmamaktadır. Kullanılan hücreye yönelik gereklilikler, E1, E2a ve/veya E4 ORF6'dan başka herhangi bir adenovirüs geni taşımaması; rAAV üretimi sırasında bulaşkan bir virüsün homolog rekombinasyonu ile sonuçlanabilen herhangi bir başka virüs genini kapsamaması; ve DNA'nın enfeksiyonunu veya transfeksiyonunu ve transfekte edilen DNA'nın ekspresyonunu gerçekleştirebilmesidir. Tercih edilen bir örnekte, konak hücre içerisinde dengeli şekilde transfekte edilen *rep* ve *cap*'e sahip olan hücredir.

30

Mevcut buluşta faydalı olan bir konak hücre, *rep* ve *cap*'i kodlayan sekanslar ile dengeli şekilde dönüştürülen ve adenovirüs E1, E2a, ve E4ORF6 DNA ve yukarıda açıklandığı üzere ekspresyon kasetini taşıyan bir yapı ile transfekte edilen bir konak hücredir. B-50 (WO 99/15685 numaralı Uluslararası Patent Başvurusu Yayını) gibi dengeli *rep* ve/veya *cap* ekspresyonlu hücre hatları veya 5,658,785 numaralı US Patent dokümanında açıklananlar da benzer şekilde kullanılabilir. Arzu edilen bir başka konak hücre, E4 ORF6'nın eksprese edilmesi için yeterli olan minimum adenoviral DNA'yı kapsamaktadır. Tekil 10 şekilde düzeltilen AAV *cap* sekansları kullanılarak diğer hücre hatları da meydana getirilebilmektedir.

Bir konak hücrenin hazırlanması, seçilen DNA sekanslarının birleştirilmesi gibi teknikleri kapsamaktadır. Bu birleştirme, konvansiyonel tekniklerden 15 faydalanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Bu tür teknikler, iyi bilinen, ve yukarıda başvuru Sambrook ve ark. referansında açıklanan cDNA ve genomik klonlamayı, polimeraz zincir reaksiyonu, sentetik yöntemler ve istenen nükleotit sekansını sağlayan diğer uygun herhangi bir yöntem ile birlikte adenovirüs ve AAV genomlarının örtüşen oligonükleotit sekanslarının kullanımını 20 kapsamaktadır.

Moleküllerin (plazmidler veya virüsler olarak) konak hücreye verilmesi de teknikte uzman bir kişi tarafından bilinen ve tarifname boyunca tartışılan teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Tercih edilen örneklerde, standart 25 transfeksiyon teknikleri, örneğin CaPO₄ transfeksiyon veya elektroporasyon ve/veya insan embriyonik böbrek hücresi hattı HEK 293 (*trans* şekilde işlev gösteren E1 proteinlerini saptayan fonksiyonel adenovirüs E1 genlerini kapsayan bir insan böbreği hücre hattı) gibi hücre hatlarının içerisinde hibrit adenovirüs/AAV vektörlerinin enfeksiyonu kullanılmaktadır.

Farmasötik Bileşimler ve Bunlara Yönelik Kullanımlar

- Bir hava yolu hedefleme molekülü içeren farmasötik bileşimler burada açıklanmakta olup, bunlar, hava yolu iletken epitelyuma iletim için bir kısım ile
- 5 bağlantılandırılan bir yapay AAV kapsidi ve fizyolojik olarak uygun olan bir taşıyıcı içermektedir. Diğer farmasötik bileşimler, fizyolojik olarak uygun bir taşıyıcı ile birlikte, burada açıklanan bir yapay AAV kapsidini kapsayan bir AAV vektörünü kapsamaktadır. Bu bileşimler, tercihe bağlı olarak iletken hava yolu hücrelerinin hedeflenmesi için ve alveolar epitelyalin, tercihen akciğere ait
- 10 olmayan hücrelerin hedeflenmesi için oldukça uygundur. Bir yapılandırmada, bu bileşimler intranazal, oral veya intratrakeal iletim için uygun olan bir taşıyıcı ile birlikte formüle edilmektedir. Bununla birlikte, diğer formüller ve iletim yolları da seçilebilmektedir.
- 15 Yapay AAV kapsidini içeren rekombinant vektörler, yayınlanan yöntemlere göre konak hücrelere iletilebilmektedir. Tercihen fizyolojik olarak uygun olan bir taşıyıcının içerisinde askıda olan rAAV, bir insana veya insan olmayan memeli bir hastaya uygulanabilmektedir. Uygun taşıyıcılar, transfer virüsünün yönlendirildiği
- 20 indikasyon göz önünde bulundurularak teknikte uzman bir kişi tarafından kolaylıkla seçilebilmektedir. Örneğin uygun bir taşıyıcı çeşitli tamponlama çözeltileri (örneğin fosfat tamponlu salin) ile birlikte formüle edilen salini kapsamaktadır. Diğer örnek taşıyıcılar steril salin, laktoz, sukroz, kalsiyum fosfat, jelatin, dekstran, agar, pektin, yerfıstığı yağı, susam yağı ve suyu kapsamaktadır.
- 25 Tercihe bağlı olarak, bileşimler, AAV ve taşıyıcılara ilaveten, koruyucular veya kimyasal stabilizörler gibi diğer konvansiyonel farmasötik içerik maddelerini kapsayabilmektedir. Uygun örnek koruyucular, klorobütanol, potasyum sorbat, sorbik asit, sülfür dioksit, propil gallat, parabenler, etil vanilin, gliserin, fenol ve paraklorofenolü kapsamaktadır. Uygun kimyasal stabilizörler jelatin ve albümini
- 30 kapsamaktadır.

Vektörler veya AAV hedefleme kısımları; medikal teknikte uzman bir kişi tarafından belirlenebilen, uygunsuz yan etkiler olmaksızın veya medikal olarak kabul edilebilen fizyolojik etkiler ile birlikte terapötik bir faydanın sağlanması için yeterli olan miktarlarda uygulanmaktadır. Konvansiyonel veya farmasötik olarak kabul edilebilir uygulama yolları, bunlarla sınırlı olmamak üzere, istenen bir organa doğrudan iletim (örneğin akciğere), oral, inhalasyon, intranazal, intratrakeal, interaarteriyel, intraoküler intravenöz, intramüsküler, subkütanöz, intradermal ve diğer parental uygulama yollarını kapsamaktadır. Arzu edilmesi durumunda uygulama yolları birleştirilebilmektedir.

Viral vektörün veya hedefleme kısmının dozajları, birincil olarak, tedavi edilen rahatsızlık, hastanın yaşı, ağırlığı ve sağlığı gibi faktörlere dayanacaktır ve dolayısıyla hastalar arasında değişiklik gösterebilmektedir. Örneğin, viral vektörün terapötik olarak etkili bir insan dozajı, genel olarak, yaklaşık 1×10^9 ila 1×10^{16} genom virüs vektörü içeren çözeltinin yaklaşık 0.1 mL'si ile yaklaşık 100 mL'si aralığındadır. Geniş organlara (örneğin karaciğer, kas, kalp ve akciğer) iletme yönelik tercih edilen bir insan dozajı, 1 ila 100 mL'lik bir hacimde, yaklaşık 5×10^{10} ila 5×10^{13} AAV genomu olabilmektedir. Göze iletme yönelik tercih edilen bir dozaj, yaklaşık 0.1 mL ila 1 mL'lik bir hacimde, yaklaşık 5×10^9 ila 5×10^{12} genom kopyasıdır. Örneğin, bir hava yolu iletken hücre hedefleme kısmının terapötik olarak etkili bir insan dozajı, genel olarak, kısmın yaklaşık 100 µg'ı ila yaklaşık 10 mg'ı arasındadır. Bu, örneğin çözeltinin yaklaşık 0.1 mL'si ile yaklaşık 100 mL'sinde, çözelti içerisinde iletilebilmektedir. Hem viral vektör hem de hedefleme kısmı için, dozaj, yan etkilere karşı terapötik faydanın dengelenmesi için ayarlanabilmektedir ve bu tür dozajlar, rekombinant vektörün kullanıldığı terapötik uygulamaya bağlı olarak değişiklik gösterebilmektedir. Transgenin ekspresyon seviyeleri ve bir terapötik veya aşı molekülünün dolaşımsal yarı ömrü, dozaj sıklığının belirlenmesi için izlenebilmektedir. Tercihe bağlı olarak, terapötik amaçlara yönelik olarak açıklananlara benzer dozaj rejimlerinden, buluşun

bileşimleri kullanılarak immünizasyon için faydalanılabilmektedir.

Buluşun AAV-türevli yapıları tarafından iletme yönelik terapötik ürünlerin ve immünojenik ürünlerin örnekleri aşağıda sağlanmaktadır. Bu yapılar, burada
5 açıklandığı üzere, çeşitli terapötik rejimler veya aşı rejimleri için kullanılabilmektedir. İlaveten bu vektörler, arzu edilen bir terapötik ve/veya aşısall rejimde, diğer bir veya daha fazla vektör veya aktif içerik maddesi ile kombinasyon halinde iletilebilmektedir.

10 ÖRNEKLER

Aşağıdaki örnekler yalnızca örnekleyicidir ve mevcut buluşu sınırlandırmamaktadır.

15 Örnek 1: *AAV6/9 Kimerik Kapside Sahip AAV*

A. Değişken kıvrım bölgeleri IV - V'ye sahip AAV kimerasının meydana getirilmesi

20 AAV6 ve AAV9 kapsidinin spesifik alanları, kesişim uzatması vasıtasıyla PCR uç birleştirme kullanılarak değiş tokuş edilmiştir (Şekiller 1A ila C). Bu yöntem, her bir vektör kapsidinde değiş tokuş edilecek olan bölgelerin kuvvetlendirilmesi için primerlerin kullanımını kapsamaktadır. Bu primerler; PCR ürünlerinin uçlarının tamamlayıcı sekanslar içermesi için, heterolog kapsid sekansının tamamlayıcısı
25 olan 10-15 baz çiftinin bir 5' çıkıntısına sahip olmaları için tasarlanmıştır. Bu, kimerik kapsid sekansının oluşturulması için dış 5' ve 3' uçlarının tamamlayıcısı olan bir primer seti kullanılarak bir ikinci PCR reaksiyonunda fragmentlerin bir araya getirilmesini sağlamıştır. F ileri primere ve R ise revers primere işaret etmektedir.

30 AAV6 VL IV-V

5' -AGCCTGGACCGRCTATGAATCC -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 5

5' - GCCATAGCAGGTCCAGGGTTGAT-3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 6

5

AAV9 VP1- VL IV

5'-AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 7

5' - GGATTCATYAGYCGGTCCAGGCT -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 8

10

AAV9 VL V- ucu

5'-ATCAACCCTGGACCTGCTATGGC -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 9

5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 10

15

20

On iki kimer meydana getirilmiş olup, bunlar, VP1 ve VP2 özgün bölgelerinin ve kapsidin dokuz varsayımsal yüzey değişken kıvrım bölgelerinin yer değişimlerini kapsamaktadır.

25

Ardından bu kimerik kapsid sekansları, kısıtlama alanı sindirimi vasıtasıyla AAV2 *rep* genini kapsayan bir plazmide klonlanmıştır ve ardından, bir sitomegalovirüs (CMV) promotorundan eksprese edilen ve AAV2 ters terminal tekrarları (ITR) tarafından yandan desteklenen GFP'yi içeren bir plazmid artı bir AdV yardımcı plazmid ile birlikte, 293 hücreye transfeke edilmiştir. Bu

30

vektörlerden altısı, bir CMV promotorundan GFP veya bir tavuk β-aktin (CB)

promotorundan nLacZ eksprese ederek, geniş ölçekli preparasyona ve saflaştırmaya geçirilmiştir. Vektör titreleri, sığır büyüme hormonu (bGH) poliA'ya özgü primerler ve prob kullanılarak TaqMan gerçek zamanlı PCR vasıtasıyla belirlenmiştir.

5

B. İnsan hava yolu epitelyal hücre kültürlerinin dönüştürülmesi

Bunun ardından, bu altı vektörün dönüştürme profilleri, insan iletken hava yolunu dönüştürme yetisinin belirlenmesi için insan hava yolu epitelyal (HAE) hücre kültürleri üzerinde incelenmiştir [TE Gray, ve ark. Am J Respir Cell Mol Biol, 14: 104-12 (1996)]. Birinci HAE hücreleri (Lonza), 24-kuyucuklu trans-kuyucuklu plakalar üzerinde ~50,000 hücre/kuyucukta tohumlanmıştır. Tamamen birleştiklerinde, bu hücreler, uygun hücre farklılaşmasının sağlanması için deneylerde kullanılmadan önce en az 4 hafta boyunca hava-dışı ara biriminde yetiştirilmektedir. HAE hücrelerinin AAV dönüşümünün incelenmesi için, altı AAV kimerası, artı kontrol olarak GFP'yi eksprese eden AAV2/6 ve AAV2/9, 50µl içerisinde 1×10^{11} genom kopyası (GC)/kuyucukta HAE hücrelerinin apikal yüzeyine ilave edilmiştir. Vektör 2 saat sonra çıkarılmıştır ve hücreler hava-sıvı ara biriminde tutulmuştur. GFP ekspresyonu beş gün sonra değerlendirilmiştir.

20

Bu deney, AAV6 kapsidinin değişken kıvrım bölgeleri IV-V'in yerinin (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in amino asidi 447-521) AAV9 kapsidine (AAV2/9-6VL IV-V) değiştirilmesi, AAV6'ya benzer olan bir dönüştürme sağlarken, AAV9'un, normalde iletken hava yolunu dönüştürmediğini ortaya çıkarmıştır. Buna karşılık, AAV6 kapsidine (AAV2/6-9VL IV-V) AAV9'un homolog bölgesinin yerinin değiştirilmesi, AAV6'nın etkili bir şekilde HAE hücrelerini dönüştürme yetisini yok etmiştir. Bu, AAV6 kapsidinin bu alanının iletken hava yolu tropizmi için önemli olduğunu göstermektedir. İlaveten, bu fenomen, AAV6'nın değişken bölgeleri IV-V'ye özgüdür, zira diğer kimeralar için aynı sonuçlar gözlemlenmemiştir.

30

C. Mürin akciğerinin in vivo olarak dönüştürülmesi

Bu vektörlerin dönüştürme profilleri de intranazal instilasyondan sonra fare
 5 akciğerinde incelenmiştir. nLacZ'ı eksprese eden her bir kimeranın 1×10^{11} GC'si
 artı kontroller olarak AAV2/6 ve AAV2/9, 50 µl toplam hacimli fosfat tamponlu
 salin (PBS) içerisinde C57BI/6 farelerine intranazal şekilde iletilmiştir. Yirmi bir
 gün sonra, akciğerler, optimal kesme sıcaklığı (OCT) bileşiği ve PBS'nin 1:1'lik
 bir karışımı ile şişirilmiştir, çıkarılmıştır ve β-gal ekspresyonu için bölümlendirme
 10 ve lekeleme için OCT içerisinde dondurulmuştur.

Tekrardan, AAV9 kapsidine, AAV6 kapsidinin değişken kıvrım bölgelerin IV-
 V'nin yerinin değiştirilmesinin, iletken hava yolu epitelyumu için AAV9 üzerine
 yeni bir tropizm kazandırdığı gözlemlenmiştir. Ve buna karşılık, AAV6 kapsidine
 15 AAV9'un homolog bölgesinin yerinin değiştirilmesi, AAV6 dönüştürmesini yok
 etmiştir.

Birlikte göz önüne alındığında, bu çalışmalar, iletken hava yolu dönüştürmesi için
 önemli olan AAV6 kapsidinin bir alanının tanımlandığını göstermektedir.
 20 Değişken kıvrım bölgeleri IV-V (AAV6'nın amino asitleri 447-521), kapsidin
 yirmi yüzlü üç katlı eksenine ait yüzeyi dışarıda kalan çıkıntılar üzerinde
 konumlandırılmaktadır ve dönüştürme için gerekli hücreler interaksiyonları
 belirleyebilmektedir.

25 Örnek 2: *AAV9 Kapsidinde AAV6 Dar VL IV ve Dar VL V'ye Sahip AAV6/9
 Kimerası*

*A. Değişken kıvrım bölgeleri IV - V'ye sahip AAV kimerasının meydana
 getirilmesi*

30

AAV6 değişken kıvrım IV ve değişken kıvrım V'nin dar fragmentleri, Örnek 1'de açıklanan yöntemler kullanılarak, kesişim uzatması vasıtasıyla PCR uç birleştirme kullanılarak AAV9'un karşılık gelen bölgelerinin çıkarıldığı AAV9 kapsidine eklenmiştir. F ileri primere ve R ise revers primere işaret etmektedir.

5 **AAV9 VP1- VL IV dar**

5'- AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 11

5'-TCCGGACTGATTCTG/AGTCTTTGAGAGAT-3' R SEKANS KİMLİK

10 NUMARASI: 12

AAV6 VL IV dar

5'-ATCTCTCAAAGACT/CAGAATCAGTCCGGA-3'F SEKANS KİMLİK

15 NUMARASI: 13

5'- ACAGCCATGTT/AGCTGGAGACCC -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 14

AAV9 VL IV dar- VL V dar

20

5'- GGGTCTCCAGCT/AACATGGCTGT -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 15

5'- TAGAAACGCGCTGTTGTCGGTAGCTGG -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 16

25

AAV6 VL V dar

5'- GCTACCGACAACAGCGCGTTTCT -3' F SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 17

30 5'- CCAAGAAGAAGC/ACCAGTCCAGGTA -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 18

AAV9 VL V dar- uç

- 5 5'-TACCTGGACTGGT/GCTTCTTCTTGG -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 19
- 5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3' R SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 20

- 10 Dar AAV6VL-IV dar, SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in amino asit sekansları
450-469'a karşılık gelmektedir. Dar AAV6VL-V dar, SEKANS KİMLİK
NUMARASI:1'in amino asit sekansları 487-505'e karşılık gelmektedir. Elde
edilen kimerik kapsid, AAV6VL-IVdar'ın karboksi terminusu ve AAV6VL-
Vdar'ın amino terminusu arasında bulunan amino asit sekansları da dahil olmak
15 üzere, AAV6 değişken kıvrım bölgelerinin her birine ait amino ve karboksi
terminusu yandan destekleten AAV9 kapsid sekanslarını kapsamaktadır.

- Meydana getirilen kimerik kapsid sekansları, kısıtlama alanı sindirimi vasıtasıyla
AAV2 *rep* genini kapsayan bir plazmide klonlanmıştır ve ardından, bir
20 sitomegalovirüs (CMV) promotorundan eksprese edilen ve AAV2 ters terminal
tekrarları (ITR) tarafından yandan desteklenen ateşböceği lüsiferazı (ffluc) içeren
bir plazmid artı bir AdV yardımcı plazmid ile birlikte, altı-kuyucuklu plakalar
içerisinde 293 hücreye transfekte edilmiştir. Transfeksiyondan bir gün sonra ortam
değiştirilmiştir ve hücre lizatı transfeksiyondan üç gün sonra toplanmıştır. Lizatlar
25 üç kez dondurulmuştur/çözdürülmüştür ve hücre debrisinin giderilmesi için
inceltilmiştir. Vektör genomu kopyaları (GC), bunun ardından, SV40 poliA-
spesifik primlerler ve prob kullanılarak niceliksel PCR vasıtasıyla titrelenmiştir.

- Elde edilen, ffluc ekspresyon kasetini taşıyan kimetik AAV viral partikül,
30 yaklaşık 1×10^{11} genom kopyası/mL seviyesinde titre sergilemiş olup, bu, aynı

ekspresyon kasetlerini, ancak sırasıyla intakt AAV6 veya AAV9 kapsidlerini içeren AAV2/6 ve AAV2/9 kontrollerine yönelik olarak gözlemlenen titrelerin arasındadır.

- 5 *In vitro* dönüştürmenin incelenmesi için, 293 hücre, 96-kuyucuklu plakaların içerisinde 1×10^5 hücre/kuyucukta tohumlanmıştır. Her bir vektörün 1×10^9 GC'si, 100ul toplam ortam hacminde üç kopya halinde hücrelere ilave edilmiştir. Gece boyunca inkübasyondan sonra, vektör çıkarılmıştır ve taze ortam ile değiştirilmiştir. Dönüştürmeden 72 saat sonra, ffluc ekspresyonu ışıltama
10 görüntülemesi ile incelenmiştir.

- Yukarıda açıklandığı şekilde meydana getirilen bir kimerik yapı olan, dar bir değişken kıvrım IV bölgesine ve dar bir değişken kıvrım V bölgesine sahip AAV2/9, (AAV 6'nın amino asitleri 487-505), düşük ölçekli bir titrede ve 293
15 hücre içerisinde *in vitro* dönüştürme için test edilmiştir. Yaklaşık 1×10^{11} genom kopyası/mL'lik titreler gözlemlenmiştir; bu titreler, AAV2/6 kontrolü için gözlemlenenlerden yüksekti, ancak gözlemlenen AAV2/9 kontrolünden düşüktü. Bir AAV6 değişken kıvrım IV bölgesine ve bir dar değişken kıvrım V bölgesine sahip kimerik AAV2/9'a yönelik *in vitro* dönüştürme seviyeleri, AAV2/6 için
20 gözlemlenenlerden daha düşüktü; ancak AAV2/9'dan daha yüksekti.

- Sonuçlar, dar IV ve dar V'ye sahip kimerik AAV6'ya yönelik dönüştürme seviyelerinin, AAV2/9'dan hafif oranda yüksek olduğunu ve AAV2/6'dan ise düşük olduğunu göstermiştir.

25

Geniş çaplı preparasyonlar bu yapılar için meydana getirilmektedir ve bunlar, Örnek 1'de açıklandığı üzere mürin akciğerinde değerlendirilecektir.

Örnek 3: *AAV9 Kapsidinde AAV6 Değişken Kıvrım V'e Sahip AAV6/9 Kimerik*

30

AAV6 değişken kıvrım V'in dar fragmentleri, Örnek 1'de açıklanan yöntemler kullanılarak, kesişim uzatması vasıtasıyla PCR uç birleştirme kullanılarak AAV9'un karşılık gelen bölgesinin çıkarıldığı AAV9 kapsidine (AAV6 kıvrım IV olmaksızın) eklenmiştir. F ileri primere ve R ise revers primere işaret etmektedir.

5

Kimerik kapsid yapılarından biri, yalnızca, AAV9 kapsidinde AAV6'nın değişken kıvrımı V'nin dar bir fragmentini kapsamaktadır: AAV9'un amino asitleri 1 - 486, AAV 6'nın amino asitleri 487-505 (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1) ve AAV9'un amino asitleri 487-736. Bu yapı için aşağıdaki primerlerden

10

AAV6 VL V dar yalnız kimera:

AAV9 VP1- VL V dar

15

5'-AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 27

5-' TAGAAACGCGCTGTTGTCGGTAGCTGG -3' R SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 28

20

Diğer kimerik kapsid yapısı, AAV9 kapsidinin karşılık gelen bölgelerine eklenen AAV6'nın değişken kıvrım V ve değişken kıvrım IV'sinin her iki dar fragmentini kapsamaktadır.

25

AAV6 VL V dar (SEKANS KİMLİK NUMARASI:1'in amino asitleri 487-505'i kodlayan bölgeyi kuvvetlendirmektedir)

5'- GCTACCGACAACAGCGCGTTTCT -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 29

30

5'- CCAAGAAGAAGC/ACCAGTCCAGGTA -3' R SEKANS KİMLİK

NUMARASI: 30

AAV9 VL V dar- uç

- 5 5' - TACCTGGACTGGT/GCTTCTTCTTGG -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 31
5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3' R SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 32

- 10 Bir kimerik yapı olan, dar bir değişken kıvrım V bölgesine sahip AAV2/9, (AAV 6'nın amino asitleri 487-505), düşük ölçekli bir titrede ve 293 hücre içerisinde in vitro dönüştürme için test edilmiştir. Bu, AAV2/6'dan ($\sim 3 \times 10^{10}$) hafif oranda düşük olan bir titreye, ancak AAV2/6'ya benzer in vitro dönüşüme sahiptir.

- 15 Örnek 4: *AAV9 Kapsidinde AAV6 VL IV Fragmentine Sahip AAV6/9 Kimerik*

- AAV6 değişken kıvrım IV'nin modifiye edilmiş dar fragmentleri, Örnek 1'de açıklanan yöntemler kullanılarak, kesişim uzatması vasıtasıyla PCR uç birleştirme kullanılarak AAV9'un karşılık gelen bölgesinin çıkarıldığı AAV9 kapsidine eklenmiştir. Aşağıdaki primerlerden faydalanılmaktadır. F ileri primere ve R ise revers primere işaret etmektedir.

AAV9 VP1- VL IV geniş

- 25 5'-AGACGCGGAAGCTTCGATCAACTAC -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 33
5-' GGATTCATYAGYCGGTCCAGGCT -3' R SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 34

- 30 **AAV6 VL IV geniş L ve dar R (AAV6'nın amino asitleri 447 - 469'u kodlayan bölgeyi kuvvetlendirmektedir)**

5'-AGCCTGGACCGRCTRATGAATCC -3' F SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 35

5'-ACAGCCATGTT/AGCTGGAGACCC -3' R SEKANS KİMLİK
5 NUMARASI: 36

AAV9 VL IV dar- uç

5'- GGGTCTCCAGCT/AACATGGCTGT -3' F SEKANS KİMLİK
10 NUMARASI: 37

5'-ACCTCTAGTCCTGCAGGTTTAAACG -3' R SEKANS KİMLİK
NUMARASI: 38

15 AAV6 değişken kıvrım V olmaksızın, yalnızca AAV6 değişken kıvrım IV'yi veya bunun dar bir fragmentini kapsayan kimerik yapılara yönelik olarak düşük dönüştürme sonuçları gözlemlenmiştir. Bununla birlikte, VL IV bölgesinin amino ucunda ilave amino asitleri kapsayan bir başka yapı da meydana getirilmiştir. Bu yapı, AAV6 amino asitleri 447 ila 469'u kapsamaktadır.

20 Buluş özellikle tercih edilen bir yapılandırmaya referansla açıklanmış olsa da, ekli istemlerin kapsamında modifikasyonların gerçekleştirilebileceği takdir edilecektir.

SEKANS LİSTESİ

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania
25 <120> Salgı bezleriyle ilişkili virüs yapılarını içeren iletken hava yolu hücrelerinin hedeflenmesine yönelik bileşimler
<130> RTM/12140
<150> US 61/174,149
30 <151> 2009-04-30
<150>

PCT/US10/32943

<151> 2010-04-29

<150> EP

10716723.1

5 <151> 2010-04-29

<160> 38

<170> PatentIn versiyon 3.5

<210> 1

<211> 736

10 <212> PRT

<213>

Bilinmiyo

r

<220>

15 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'nın kapsidi

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

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

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

28834.1263

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

28834.1263

Ser 385	Gln	Ala	Val	Gly 390	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys 395	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro 400
Ser	Gln	Met	Leu	Arg 405	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe 410	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr 415	Phe
Glu	Asp	Val	Pro 420	Phe	His	Ser	Ser	Tyr 425	Ala	His	Ser	Gln	Ser 430	Leu	Asp
Arg	Leu	Met 435	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp 440	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr 445	Leu	Asn	Arg
Thr	Gln	Asn 450	Gln	Ser	Gly	Ser 455	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp 460	Leu	Leu	Phe	Ser
Arg 465	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly 470	Met	Ser	Val	Gln	Pro 475	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro 480
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg 485	Gln	Gln	Arg	Val	Ser 490	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp 495	Asn
Asn	Asn	Ser	Asn 500	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly 505	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asn 510	Leu	Asn
Gly 515	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn 520	Pro	Gly	Thr	Ala	Met	Ala 525	Ser	His	Lys
Asp	Asp	Lys 530	Asp	Lys	Phe	Phe 535	Pro	Met	Ser	Gly	Val 540	Met	Ile	Phe	Gly
Lys 545	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala 550	Ser	Asn	Thr	Ala	Leu 555	Asp	Asn	Val	Met	Ile 560
Thr	Asp	Glu	Glu 565	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn 570	Pro	Val	Ala	Thr	Glu 575	Arg
Phe	Gly	Thr	Val 580	Ala	Val	Asn	Leu	Gln 585	Ser	Ser	Ser	Thr	Asp 590	Pro	Ala
Thr 595	Gly	Asp	Val	His	Val	Met	Gly 600	Ala	Leu	Pro	Gly	Met 605	Val	Trp	Gln
Asp 610	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln 615	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala 620	Lys	Ile	Pro	His

28834.1263

Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Val Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213>

5 Bilinmiyor

<220>

<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'un kapsidi

<400> 2

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				

28834.1263

Asn 305	Trp	Gly	Phe	Arg	Pro 310	Lys	Arg	Leu	Asn	Phe 315	Lys	Leu	Phe	Asn	Ile 320
Gln	Val	Lys	Glu	Val 325	Thr	Asp	Asn	Asn	Gly 330	Val	Lys	Thr	Ile	Ala 335	Asn
Asn	Leu	Thr	Ser 340	Thr	Val	Gln	Val	Phe 345	Thr	Asp	Ser	Asp	Tyr 350	Gln	Leu
Pro	Tyr	Val	Leu	Gly	Ser	Ala	His	Glu	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro	Phe	Pro
		355						360					365		
Ala	Asp 370	Val	Phe	Met	Ile	Pro 375	Gln	Tyr	Gly	Tyr	Leu 380	Thr	Leu	Asn	Asp
Gly 385	Ser	Gln	Ala	Val	Gly 390	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr 395	Cys	Leu	Glu	Tyr	Phe 400
Pro	Ser	Gln	Met	Leu 405	Arg	Thr	Gly	Asn	Asn 410	Phe	Gln	Phe	Ser	Tyr 415	Glu
Phe	Glu	Asn	Val 420	Pro	Phe	His	Ser	Ser 425	Tyr	Ala	His	Ser	Gln 430	Ser	Leu
Asp	Arg	Leu 435	Met	Asn	Pro	Leu	Ile 440	Asp	Gln	Tyr	Leu	Tyr 445	Tyr	Leu	Ser
Lys	Thr 450	Ile	Asn	Gly	Ser	Gly 455	Gln	Asn	Gln	Gln	Thr 460	Leu	Lys	Phe	Ser
Val 465	Ala	Gly	Pro	Ser	Asn 470	Met	Ala	Val	Gln	Gly 475	Arg	Asn	Tyr	Ile	Pro 480
Gly	Pro	Ser	Tyr	Arg 485	Gln	Gln	Arg	Val	Ser 490	Thr	Thr	Val	Thr	Gln 495	Asn
Asn	Asn	Ser	Glu 500	Phe	Ala	Trp	Pro	Gly 505	Ala	Ser	Ser	Trp	Ala 510	Leu	Asn
Gly	Arg	Asn 515	Ser	Leu	Met	Asn	Pro 520	Gly	Pro	Ala	Met	Ala 525	Ser	His	Lys

28834.1263

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> 3

<211> 736

<212> PRT

<213>

5 Bilinmiyor

<220>

28834.1263

<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 1'in kapsidi

<400> 3

```

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

```

28834.1263

Ser 225	Gly	Asn	Trp	His	Cys 230	Asp	Ser	Thr	Trp	Leu 235	Gly	Asp	Arg	Val	Ile 240
Thr	Thr	Ser	Thr	Arg 245	Thr	Trp	Ala	Leu	Pro 250	Thr	Tyr	Asn	Asn	His 255	Leu
Tyr	Lys	Gln	Ile 260	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr 265	Gly	Ala	Ser	Asn	Asp 270	Asn	His
Tyr	Phe	Gly 275	Tyr	Ser	Thr	Pro	Trp 280	Gly	Tyr	Phe	Asp	Phe 285	Asn	Arg	Phe
His	Cys 290	His	Phe	Ser	Pro	Arg 295	Asp	Trp	Gln	Arg	Leu 300	Ile	Asn	Asn	Asn
Trp 305	Gly	Phe	Arg	Pro	Lys 310	Arg	Leu	Asn	Phe	Lys 315	Leu	Phe	Asn	Ile	Gln 320
Val	Lys	Glu	Val	Thr 325	Thr	Asn	Asp	Gly	Val 330	Thr	Thr	Ile	Ala	Asn 335	Asn
Leu	Thr	Ser	Thr 340	Val	Gln	Val	Phe	Ser 345	Asp	Ser	Glu	Tyr	Gln 350	Leu	Pro
Tyr	Val	Leu 355	Gly	Ser	Ala	His	Gln 360	Gly	Cys	Leu	Pro	Pro 365	Phe	Pro	Ala
Asp 370	Val	Phe	Met	Ile	Pro	Gln 375	Tyr	Gly	Tyr	Leu	Thr 380	Leu	Asn	Asn	Gly
Ser 385	Gln	Ala	Val	Gly 390	Arg	Ser	Ser	Phe	Tyr	Cys 395	Leu	Glu	Tyr	Phe	Pro 400
Ser	Gln	Met	Leu	Arg 405	Thr	Gly	Asn	Asn	Phe 410	Thr	Phe	Ser	Tyr	Thr 415	Phe
Glu	Glu	Val	Pro 420	Phe	His	Ser	Ser	Tyr 425	Ala	His	Ser	Gln	Ser 430	Leu	Asp
Arg	Leu	Met 435	Asn	Pro	Leu	Ile	Asp 440	Gln	Tyr	Leu	Tyr	Tyr 445	Leu	Asn	Arg
Thr 450	Gln	Asn	Gln	Ser	Gly	Ser 455	Ala	Gln	Asn	Lys	Asp 460	Leu	Leu	Phe	Ser

28834.1263

Arg	Gly	Ser	Pro	Ala	Gly	Met	Ser	Val	Gln	Pro	Lys	Asn	Trp	Leu	Pro	465	470	475	480
Gly	Pro	Cys	Tyr	Arg	Gln	Gln	Arg	Val	Ser	Lys	Thr	Lys	Thr	Asp	Asn	485	490	495	
Asn	Asn	Ser	Asn	Phe	Thr	Trp	Thr	Gly	Ala	Ser	Lys	Tyr	Asn	Leu	Asn	500	505	510	
Gly	Arg	Glu	Ser	Ile	Ile	Asn	Pro	Gly	Thr	Ala	Met	Ala	Ser	His	Lys	515	520	525	
Asp	Asp	Glu	Asp	Lys	Phe	Phe	Pro	Met	Ser	Gly	Val	Met	Ile	Phe	Gly	530	535	540	
Lys	Glu	Ser	Ala	Gly	Ala	Ser	Asn	Thr	Ala	Leu	Asp	Asn	Val	Met	Ile	545	550	555	560
Thr	Asp	Glu	Glu	Glu	Ile	Lys	Ala	Thr	Asn	Pro	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	565	570	575	
Phe	Gly	Thr	Val	Ala	Val	Asn	Phe	Gln	Ser	Ser	Ser	Thr	Asp	Pro	Ala	580	585	590	
Thr	Gly	Asp	Val	His	Ala	Met	Gly	Ala	Leu	Pro	Gly	Met	Val	Trp	Gln	595	600	605	
Asp	Arg	Asp	Val	Tyr	Leu	Gln	Gly	Pro	Ile	Trp	Ala	Lys	Ile	Pro	His	610	615	620	
Thr	Asp	Gly	His	Phe	His	Pro	Ser	Pro	Leu	Met	Gly	Gly	Phe	Gly	Leu	625	630	635	640
Lys	Asn	Pro	Pro	Pro	Gln	Ile	Leu	Ile	Lys	Asn	Thr	Pro	Val	Pro	Ala	645	650	655	
Asn	Pro	Pro	Ala	Glu	Phe	Ser	Ala	Thr	Lys	Phe	Ala	Ser	Phe	Ile	Thr	660	665	670	
Gln	Tyr	Ser	Thr	Gly	Gln	Val	Ser	Val	Glu	Ile	Glu	Trp	Glu	Leu	Gln	675	680	685	
Lys	Glu	Asn	Ser	Lys	Arg	Trp	Asn	Pro	Glu	Val	Gln	Tyr	Thr	Ser	Asn	690	695	700	

28834.1263

Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

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

<210> 4
<211> 75
<212> PRT
<213>

5 Bilinmiyor

<220>
<223> AAV klad A kapsid fragmenti

<400> 4

Asn Arg Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu
1 5 10 15

Phe Ser Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp
20 25 30

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr
35 40 45

Asp Asn Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn
50 55 60

Leu Asn Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly
65 70 75

10

<210> 5
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

15

<220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer

<400> 5
agcctggacc grctratgaa tcc 23

20

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 6
gccatagcag gtccaggggtt gat 23
- 5 <210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
10 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 7
agacgcggaa gcttcgatca actac 25
- <210> 8
<211> 23
15 <212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 8
20 ggattcatya gycggtccag gct 23
- <210> 9
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- 25 <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 9
atcaaccctg gacctgctat ggc 23
- <210> 10
30 <211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 10
35 acctctagtc ctgcaggttt aaacg 25
- <210> 11
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Bilinmiyor
- <220>

- <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 11
agacgcggaa gcttcgatca actac 25
- 5 <210> 12
<211> 29
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- 10 <400> 12
tccggactga ttctgagtct ttgagagat 29
- <210> 13
<211> 29
<212> DNA
15 <213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 13
atctctcaaa gactcagaat cagtccgga 29
- 20 <210> 14
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
25 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 14
acagccatgt tagctggaga ccc 23
- <210> 15
<211> 23
30 <212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 15
35 gggctctccag ctaacatggc tgt 23
- <210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- 40 <220>

- <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 16
tagaaaacgcg ctgttgctgg tagctgg 27
- 5 <210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- 10 <400> 17
gctaccgaca acagcgcggtt tct 23
- <210> 18
<211> 25
<212> DNA
- 15 <213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 18
ccaagaagaa gcaccagtcc aggta 25
- 20 <210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
25 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 19
tacctggact ggtgcttctt cttgg 25
- <210> 20
<211> 25
30 <212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- 35 <400> 20
acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25
- <210> 21
<211> 25
<212> DNA
- 40 <213> Bilinmiyor

- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 21
agacgcggaa gcttcgatca actac 25
- 5 <210> 22
<211> 29
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
10 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 22
tccggactga ttctgagtct ttgagagat 29
- <210> 23
<211> 29
15 <212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 23
20 atctctcaaa gactcagaat cagtccgga 29
- <210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- 25 <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 24
acagccatgt tagctggaga ccc 23
- <210> 25
30 <211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
<220>
- <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
35 <400> 25
gggtctccag ctaacatggc tgt 23
- <210> 26
<211> 25
<212> DNA
40 <213> Bilinmiyor
- <220>

<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer

<400> 26
acctctagtc ctgcaggttt aaacg 25

5 <210> 27
<211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

<220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer

10 <400> 27
agacgcggaa gcttcgatca actac 25

<210> 28
<211> 26
<212> DNA
15 <213> Bilinmiyor

<220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer

<400> 28
tagaaacgag ctgttgtagg tagctg 26

20 <210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor

<220>
25 <223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer

<400> 29
gctacagaca acagcgcgtt tot 23

<210> 30
<211> 25
30 <212> DNA
<213> Bilinmiyor

<220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer

35 <400> 30
ccaagaagaa gcaccagtcc aggta 25

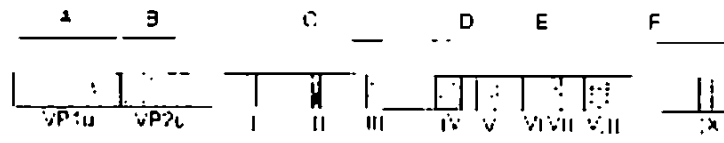
<210> 31
<211> 25
40 <212> DNA
<213> Bilinmiyor

- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 31
tacctggact ggtgcttctt cttgg 25
- 5 <210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- 10 <400> 32
acctctagtc ctgcagggtt aaacg 25
- <210> 33
<211> 25
15 <212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 33
20 agacgcggaa gcttcgatca actac 25
- <210> 34
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- 25 <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 34
ggattcatya gycggtccag gct 23
- <210> 35
- 30 <211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- 35 <400> 35
agcctggacc grctratgaa tcc 23
- <210> 36
<211> 23
40 <212> DNA

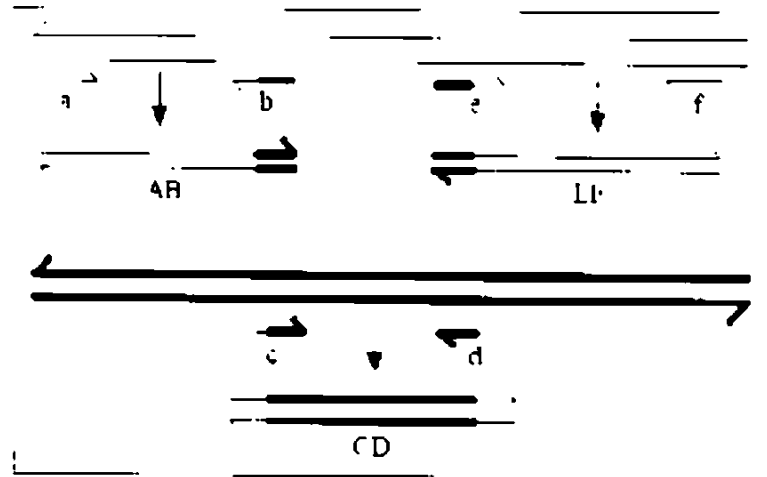
28834.1263

- <213> Bilinmiyor
<220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 6'ya dayalı primer
- <400> 36
5 acagccatgt tagctggaga ccc 23
- <210> 37
<211> 23
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- 10 <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- <400> 37
gggtctccag ctaacatggc tgt 23
- 15 <210> 38
<211> 25
<212> DNA
<213> Bilinmiyor
- <220>
<223> salgı bezleriyle ilişkili virüs 9'a dayalı primer
- 20 <400> 38
acctctagtc ctgcaggttt aaacg 25

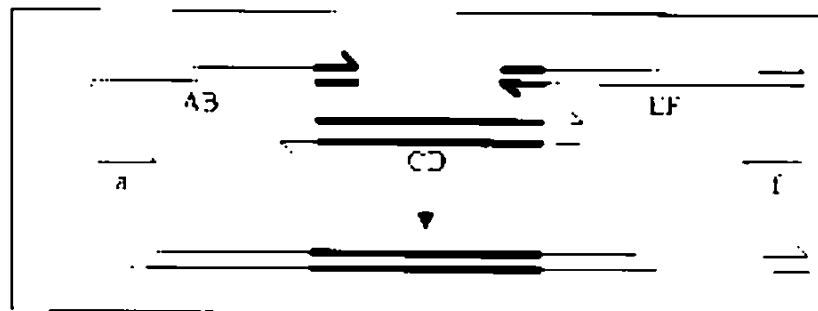
Şekil 1A

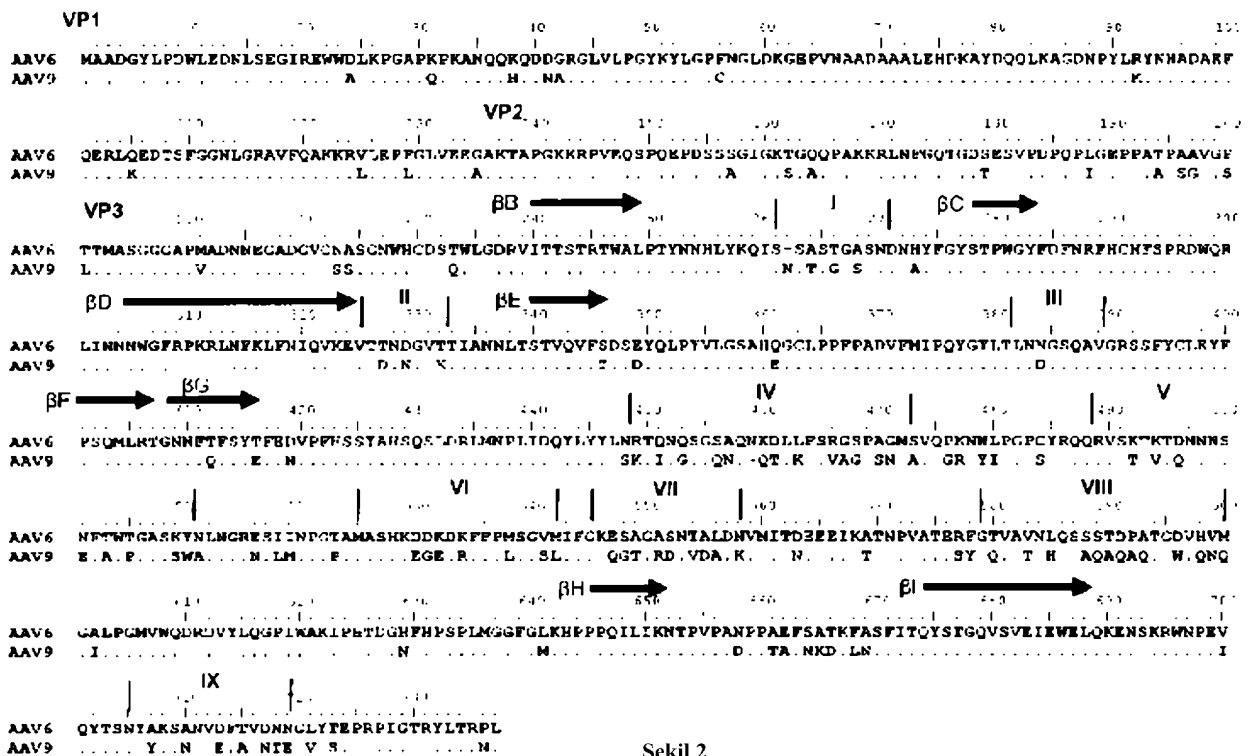


Şekil 1B



Şekil 1C





Şekil 2