



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0044522  
(43) 공개일자 2023년04월04일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)  
A61P 21/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)  
C07K 14/47 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12N 15/86 (2013.01)  
A61K 48/0058 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7007688
- (22) 출원일자(국제) 2021년08월04일  
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년03월03일
- (86) 국제출원번호 PCT/CN2021/110521
- (87) 국제공개번호 WO 2022/028472  
국제공개일자 2022년02월10일
- (30) 우선권주장  
PCT/CN2020/107173 2020년08월05일 중국(CN)  
PCT/CN2020/138056 2020년12월21일 중국(CN)

- (71) 출원인  
항저우 엑제제네시스 바이오 엘티디.  
중국 저장 310018 항저우 첸탕 뉴 디스트릭트 허  
상 사이언스 앤드 테크놀로지 센터 바이오팜 타운  
페이즈 3 빌딩 11 룸 401
- (72) 발명자  
주, 페이신  
미국 매사추세츠 02421 렉싱턴 콩코드 애비뉴 212  
에, 귀지에  
미국 플로리다 32606 게인즈빌 엔더블유 101에스  
티 스트리트 2178  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
특허법인 광장리앤코

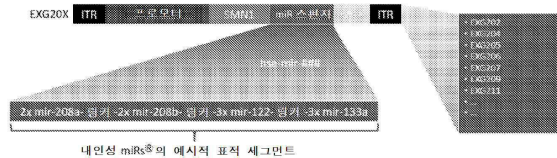
전체 청구항 수 : 총 70 항

(54) 발명의 명칭 **최수성 근위축을 치료하기 위한 핵산 구축물 및 이의 용도**

(57) 요약

SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 핵산 영역; 및 하나 이상의 내인성 마이크로 RNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역을 포함하고, 제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있는, 핵산.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

*A61P 21/00* (2018.01)

*A61P 25/00* (2018.01)

*C07K 14/4707* (2013.01)

*C12N 2310/141* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

*C12N 2750/14145* (2013.01)

*C12N 2800/22* (2013.01)

(72) 발명자

**우, 젠후아**

미국 펜실베이니아 19446 랜스데일 롱 미도우 로드  
2533

**왕, 리준**

미국 캘리포니아 94005 브리즈번 엘더베리 레인  
157

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(i) SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 핵산 영역; 및  
(ii) 하나 이상의 내인성 마이크로RNA(들)(miRNA(들))의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역  
을 포함하고,  
제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있는,  
핵산.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
SMN 단백질 또는 이의 변이체가 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산.

#### 청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,  
제1 핵산 영역이 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,  
제2 핵산 영역이 심장내 내인성 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,  
심장내 내인성 miRNA가 hsa-mir-1-5p, hsa-mir-208a-5p, hsa-mir-208b-5p, hsa-mir-133a-1 및 hsa-mir-488-5p로 이루어진 군으로부터 선택되는, 핵산.

#### 청구항 6

제4항에 있어서,  
심장내 내인성 miRNA가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

#### 청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,  
제2 핵산 영역이 간내 내인성 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,  
간내 내인성 miRNA가 hsa-mir-122인, 핵산.

**청구항 9**

제7항에 있어서,

간내 내인성 miRNA가 서열번호 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 10**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-133a-1의 2 이상의 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-133a-1의 적어도 3 개 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

**청구항 12**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-208a-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 적어도 하나의 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

**청구항 13**

제12항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-208a-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 3 개 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 3 개 표적 세그먼트를 포함하는, 핵산.

**청구항 14**

제5항, 제8항 및 제10항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) hsa-mir-1-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 7과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(ii) hsa-mir-208a-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 8과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(iii) hsa-mir-208b-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 9와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(iv) hsa-mir-122의 표적 세그먼트가 서열번호 10과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(v) hsa-mir-133a-1의 표적 세그먼트가 서열번호 11과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(vi) hsa-mir-488-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 12와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는,

핵산.

**청구항 15**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 서열번호 11의 핵산 서열의 적어도 3 개 반복부를 포함하는, 핵산.

**청구항 16**

제15항에 있어서,

제2 핵산 영역이 간내 내인성 miRNA의 하나 이상의 표적 세그먼트를 추가로 포함하는, 핵산.

**청구항 17**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이

- (i) 서열번호 8의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부,
- (ii) 서열번호 9의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부,
- (iii) 서열번호 10의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부, 및
- (iv) 서열번호 11의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부

를 포함하는,

핵산.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 표적 세그먼트 사이에 하나 이상의 링커를 추가로 포함하고; 선택적으로 링커가 1 내지 10 개 뉴클레오티드를 포함하는, 핵산.

**청구항 19**

제18항에 있어서,

링커가 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 20**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이

- (i) 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열;
- (ii) 서열번호 19와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열;
- (iii) 서열번호 20과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; 또는
- (iv) 서열번호 21과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열

을 포함하는,

핵산.

**청구항 21**

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 핵산 영역이

- (i) 서열번호 36 또는 서열번호 37의 핵산 서열을 갖는 프로모터;
- (ii) CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;
- (iii) proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;
- (iv) proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;
- (v) proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터

를 추가로 포함하고,

선택적으로 hSyn 프로모터가 서열번호 38의 핵산 서열을 포함하고/하거나, CMV 인핸서가 서열번호 39의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proC3 인핸서가 서열번호 40의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proA5 인핸서가 서열번호 41의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proB15 인핸서가 서열번호 42의 핵산 서열을 포함하는,

핵산.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는, 벡터.

**청구항 23**

제22항에 있어서,  
바이러스 벡터인, 벡터.

**청구항 24**

제23항에 있어서,  
바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인, 벡터.

**청구항 25**

제24항에 있어서,  
AAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 또는 이의 조합 또는 변이체로부터 유래되는, 벡터.

**청구항 26**

제25항에 있어서,  
재조합체 AAV9(rAAV9) 벡터 또는 이의 변이체인, 벡터.

**청구항 27**

- (i) 트랜스유전자를 포함하는 제1 핵산 영역; 및
  - (ii) 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역
- 을 포함하고,  
적어도 하나의 표적 세그먼트가 심장내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고, 적어도 하나의 표적 세그먼트가 간내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고;  
제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있고;

rAAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74 또는 AAV44-9로부터의 역위 말단 반복부

(ITR)를 포함하는,

재조합체 AAV(rAAV) 벡터.

**청구항 28**

제27항에 있어서,

제1 핵산 영역이 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SMA 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 29**

제27항 또는 제28항에 있어서,

제1 핵산 영역이 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 30**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

심장내 내인성 miRNA가 hsa-mir-1-5p, hsa-mir-208a-5p, hsa-mir-208b-5p, hsa-mir-133a-1 및 hsa-mir-488-5p 로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나; 간내 내인성 miRNA가 hsa-mir-122인, rAAV 벡터.

**청구항 31**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) 심장내 내인성 miRNA가 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(ii) 간내 내인성 miRNA가 서열번호 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는,

rAAV 벡터.

**청구항 32**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-133a-1의 2 이상의 표적 세그먼트를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 33**

제32항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-133a-1의 적어도 3 개 표적 세그먼트를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 34**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-208a-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 적어도 하나의 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 35**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 hsa-mir-208a-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 3 개 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 3 개 표적 세그먼트를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 36**

제30항 및 제32항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서,

(i) hsa-mir-1-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 7과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(ii) hsa-mir-208a-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 8과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(iii) hsa-mir-208b-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 9와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(iv) hsa-mir-122의 표적 세그먼트가 서열번호 10과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(v) hsa-mir-133a-1의 표적 세그먼트가 서열번호 11과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나;

(vi) hsa-mir-488-5p의 표적 세그먼트가 서열번호 12와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는,

rAAV 벡터.

**청구항 37**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 서열번호 11의 핵산 서열의 적어도 3 개 반복부를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 38**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이

(i) 서열번호 8의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부,

(ii) 서열번호 9의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부,

(iii) 서열번호 10의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부, 및

(iv) 서열번호 11의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부

를 포함하는,

rAAV 벡터.

**청구항 39**

제27항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이 표적 세그먼트 사이에 하나 이상의 링커를 추가로 포함하고, 선택적으로 링커가 1 내지 10 개 뉴클레오티드를 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 40**

제39항에 있어서,

링커가 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 41**

제27항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

제2 핵산 영역이

(i) 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열;

(ii) 서열번호 19와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열;

(iii) 서열번호 20과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; 또는

(iv) 서열번호 21과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열

을 포함하는,

rAAV 벡터.

#### 청구항 42

제27항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서,

제1 핵산 영역이

(i) 서열번호 36 또는 서열번호 37의 핵산 서열을 갖는 프로모터;

(ii) CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;

(iii) proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;

(iv) proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터;

(v) proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는 프로모터

를 추가로 포함하고,

선택적으로 hSyn 프로모터가 서열번호 38의 핵산 서열을 포함하고/하거나, CMV 인핸서가 서열번호 39의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proC3 인핸서가 서열번호 40의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proA5 인핸서가 서열번호 41의 핵산 서열을 포함하고/하거나, proB15 인핸서가 서열번호 42의 핵산 서열을 포함하는,

rAAV 벡터.

#### 청구항 43

제27항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서,

ITR이 AAV9로부터의 것인, rAAV 벡터.

#### 청구항 44

서열번호 22 또는 서열번호 23, 서열번호 24, 또는 서열번호 25의 핵산 서열, 또는 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터.

#### 청구항 45

SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 영역, 및 인핸서 및 코어 프로모터를 포함하는 합성 프로모터를 포함하고, 선택적으로

(i) 합성 프로모터가 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나;

(ii) 합성 프로모터가 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나;

(iii) 합성 프로모터가 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나;

(iv) 합성 프로모터가 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는, 핵산.

**청구항 46**

제45항에 있어서,

hSyn 프로모터가 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 47**

제45항에 있어서,

CMV 인핸서가 서열번호 39와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 48**

제45항에 있어서,

proC3 인핸서가 서열번호 40과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 49**

제45항에 있어서,

proA5 인핸서가 서열번호 41과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 50**

제45항에 있어서,

proB15 인핸서가 서열번호 42와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 51**

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

SMN 단백질 또는 이의 변이체가 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 52**

제45항 내지 제50항 중 어느 한 항에 있어서,

SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열이 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하는, 핵산.

**청구항 53**

제45항 내지 제52항 중 어느 한 항의 핵산을 포함하는, 벡터.

**청구항 54**

제53항에 있어서,

바이러스 벡터인, 벡터.

**청구항 55**

제54항에 있어서,  
바이러스 벡터가 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터인, 벡터.

**청구항 56**

제55항에 있어서,  
AAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 또는 이의 조합 또는 변이체로부터 유래되는, 벡터.

**청구항 57**

제56항에 있어서,  
제조합체 AAV9(rAAV9) 벡터 또는 이의 변이체인, 벡터.

**청구항 58**

서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53의 핵산 서열, 또는 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, rAAV 벡터.

**청구항 59**

(a) 제1항 내지 제21항 및 제45항 내지 제52항 중 어느 하나 항의 핵산; 또는 제27항 내지 제44항 및 제58항 중 어느 한 항의 rAAV 벡터; 및  
(b) AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 또는 이의 변이체의 캡시드 단백질을 포함하는, 제조합체 AAV(rAAV) 입자.

**청구항 60**

제59항에 있어서,  
캡시드 단백질이 AAV9 캡시드 단백질 또는 이의 변이체인, rAAV 입자.

**청구항 61**

제1항 내지 제21항 및 제45항 내지 제52항 중 어느 한 항의 핵산, 제22항 내지 제44항 및 제53항 내지 제58항 중 어느 한 항의 벡터 또는 rAAV 벡터, 또는 제45항, 제46항, 제59항 및 제60항 중 어느 한 항의 rAAV 입자, 및 약학적 허용 부형제를 포함하는, 약학 조성물.

**청구항 62**

세포를 제1항 내지 제21항 및 제45항 내지 제52항 중 어느 한 항의 핵산, 제22항 내지 제44항 및 제53항 내지 제58항 중 어느 한 항의 벡터 또는 rAAV 벡터, 제59항 또는 제60항의 rAAV 입자, 또는 제61항의 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에서 SMN 단백질의 발현을 향상시키는 방법.

**청구항 63**

제1항 내지 제21항 및 제45항 내지 제52항 중 어느 한 항의 핵산, 제22항 내지 제44항 및 제53항 내지 제58항 중 어느 한 항의 벡터 또는 rAAV 벡터, 제59항 또는 제60항의 rAAV 입자, 또는 제61항의 약학 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법.

**청구항 64**

제63항에 있어서,  
질환 또는 장애가 SMN 연관된 질환 또는 장애인, 방법.

**청구항 65**

제64항에 있어서,  
SMN 연관된 질환 또는 장애가 SMN 단백질의 불충분한 발현과 연관된 질환 또는 장애인, 방법.

**청구항 66**

제63항에 있어서,  
질환 또는 장애가 결핍된 SMN 단백질과 연관된 것인, 방법.

**청구항 67**

제63항에 있어서,  
질환 또는 장애가 *smn1* 유전자 결실 및/또는 돌연변이와 연관된 것인, 방법.

**청구항 68**

제63항에 있어서,  
질환 또는 장애가 척수성 근위축(SMA)인, 방법.

**청구항 69**

제63항에 있어서,  
질환 또는 장애가 SMA-I, SMA-II, SMA-III 또는 SMA-IV인, 방법.

**청구항 70**

제63항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서,  
대상체가 2 세 미만인, 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] **관련 출원에 대한 교차 참조**

[0002] 본 출원은 2020년 8월 5일자로 출원된 PCT 출원 PCT/CN2020/107173호; 및 2020년 12월 21일자로 출원된 PCT 출원 PCT/CN2020/138056호의 이익을 주장하며, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **전자적으로 제출된 서열 목록에 대한 참조**

[0004] 본 출원은 파일 "14652-017 228\_SEQ\_LISTING.txt" 및 2021년 7월 21일의 생성일로 108,587 바이트의 크기를 갖는 ASCII 포맷의 서열 목록으로서 EFS-Web을 통해 전자적으로 제출되는 서열 목록을 포함한다. EFS-Web을 통해 제출된 서열 목록은 명세서의 일부이며 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

[0005] **1. 분야**

[0006] 본 발명은 핵산 구축물, 이러한 구축물을 기초로 한 유전자 요법, 및 이의 사용 방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0007] **2. 배경**

[0008] 척수성 근위축(SMA)은 낮은 운동 뉴런의 손실의 결과로서 진행성 근력 약화 및 저혈압을 특징으로 하는 상염색

체 열성 신경변성 장애이다. 신경근 증상의 개시의 연령 및 중증도를 기초로, 4 개의 임상 표현형이 기재되었다 (Lunn and Wang, Lancet, 371 (9630):2120-33 (2008)). 가장 중증 형태인, 1 형 SMA는 베르드니히-호프만병 (Werdnig-Hoffmann disease)으로도 알려진 파괴적인 아동기 병태이다. SMA의 대부분의 경우를 담당하는 유전자 인, 생존 운동 뉴런(SMN)은 염색체 유전자와 5q13에서 확인되었다(Lefebvre et. al., Cell, 80(1):155-65 (1995)). 인간 유전자는 각각 말단소체 및 중심체 복제, SMN1 및 SMN2로 복제된다. SMA는 SMN 단백질의 결실을 야기하는 SMN1 유전자의 돌연변이 또는 결실에 의해 야기되며, 이는 SMN2가 전장 단백질의 충분한 양을 생성하는데 실패하기 때문이다.

[0009] 유전자 요법을 포함한 치료 전략은 SMN 유전자의 발현 증가를 기초로 하여 생성되었다. 그러나, 현재 이용가능한 치료는 예를 들어, SMN 유전자의 불충분한 발현 수준 및 비-표적화 독성을 포함한 다양한 도전에 직면한다. 따라서, 최적화된 SMN 발현 및 감소된 비-표적화 독성을 갖는 SMA에 대한 개선된 유전자 요법에 대한 필요성이 당업계에 있다.

**발명의 내용**

[0010] **3. 요약**

[0011] 일 양태에서, 본원은 (i) SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 제1 핵산 영역; 및 (ii) 하나 이상의 내인성 마이크로RNA(들)(miRNA(들))의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역을 포함하고, 제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있는, 핵산을 제공한다.

[0012] 일부 실시양태에서, SMN 단백질 또는 이의 변이체는 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0013] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0014] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 심장내 내인성 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 심장내 내인성 miRNA는 hsa-mir-1-5p, hsa-mir-208a-5p, hsa-mir-208b-5p, hsa-mir-133a-1 및 hsa-mir-488-5p로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 심장내 내인성 miRNA는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0015] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 간내 내인성 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 간내 내인성 miRNA는 hsa-mir-122이다. 일부 실시양태에서, 간내 내인성 miRNA는 서열번호 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0016] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-133a-1의 2 이상의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-133a-1의 적어도 3 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-208a-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 적어도 하나의 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-208a-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 3 개 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 3 개 표적 세그먼트를 포함한다.

[0017] 일부 실시양태에서, hsa-mir-1-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 7과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; hsa-mir-208a-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 8과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; hsa-mir-208b-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 9와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; hsa-mir-122의 표적 세그먼트는 서열번호 10과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; hsa-mir-133a-1의 표적 세그먼트는 서열번호 11과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; hsa-mir-488-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 12와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함

한다.

- [0018] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 서열번호 11의 핵산 서열의 적어도 3 개 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 간내 내인성 miRNA의 하나 이상의 표적 세그먼트를 추가로 포함한다.
- [0019] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 (i) 서열번호 8의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, (ii) 서열번호 9의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, (iii) 서열번호 10의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부, 및 (iv) 서열번호 11의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부를 포함한다.
- [0020] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 표적 세그먼트 사이에 하나 이상의 링커를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 1 내지 10 개 뉴클레오티드를 포함한다. 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0021] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 (i) 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; (ii) 서열번호 19와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; (iii) 서열번호 20과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; 또는 (iv) 서열번호 21과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0022] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 36 또는 서열번호 37의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 39의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 40의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 41의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 42의 영역을 포함한다.
- [0023] 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산을 포함하는 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터이다. 일부 실시양태에서, 바이러스 벡터는 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터이다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 또는 이의 조합 또는 변이체로부터 유래된다. 구체적 실시양태에서, 벡터는 재조합체 AAV9(rAAV9) 벡터 또는 이의 변이체이다.
- [0024] 또 다른 양태에서, 본원은 (i) 트랜스유전자를 포함하는 제1 핵산 영역; 및 (ii) 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역을 포함하고, 적어도 하나의 표적 세그먼트가 심장내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고, 적어도 하나의 표적 세그먼트가 간내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고; 제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있고; rAAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74 또는 AAV44-9로부터의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는, 재조합체 AAV(rAAV) 벡터를 제공한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함하는 SMA 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 심장내 내인성 miRNA는 hsa-mir-1-5p, hsa-mir-208a-5p, hsa-mir-208b-5p, hsa-mir-133a-1 및 hsa-mir-488-5p로 이루어진 군으로부터 선택되고/되거나; 간내 내인성 miRNA는 hsa-mir-122이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, (i) 심장내 내인성 miRNA는 서열번호 1, 서열번호 2, 서열번호 3, 서열번호 5 또는 서열번호 6과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고/하거나; (ii) 간내 내인성 miRNA는 서열번호 4와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로

부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

- [0029] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-133a-1의 2 이상의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-133a-1의 적어도 3 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-208a-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 적어도 하나의 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 hsa-mir-208a-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-208b-5p의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 3 개 표적 세그먼트 및 hsa-mir-133a-1의 3 개 표적 세그먼트를 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, (i) hsa-mir-1-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 7과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; (ii) hsa-mir-208a-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 8과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; (iii) hsa-mir-208b-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 9와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; (iv) hsa-mir-122의 표적 세그먼트는 서열번호 10과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; (v) hsa-mir-133a-1의 표적 세그먼트는 서열번호 11과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하고/하거나; (vi) hsa-mir-488-5p의 표적 세그먼트는 서열번호 12와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0031] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 서열번호 11의 핵산 서열의 적어도 3 개 반복부를 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 (i) 서열번호 8의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, (ii) 서열번호 9의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, (iii) 서열번호 10의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부, 및 (iv) 서열번호 11의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부를 포함한다.
- [0033] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 표적 세그먼트 사이에 하나 이상의 링커를 추가로 포함하고, 선택적으로 링커는 1 내지 1500 개 뉴클레오티드, 1 내지 500 개 뉴클레오티드, 1 내지 100 개 뉴클레오티드, 1 내지 50 개 뉴클레오티드, 또는 1 내지 10 개 뉴클레오티드를 포함한다.
- [0034] 일부 실시양태에서, 링커는 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16 및 서열번호 17로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0035] 일부 실시양태에서, 제2 핵산 영역은 (i) 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; (ii) 서열번호 19와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; (iii) 서열번호 20과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열; 또는 (ii) 서열번호 21과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0036] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 36 또는 서열번호 37의 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 39의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 40의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 41의 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 서열번호 38의 영역 및 서열번호 42의 영역을 포함한다.
- [0037] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터는 AAV9로부터의 ITR을 포함한다.
- [0038] 또 다른 양태에서, 본원은 SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 영역, 및 인핸서 및 코어 프로모터를 포함하는 합성 프로모터를 포함하고, 선택적으로 (i) 합성 프로모터가 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나; (ii) 합성 프로모터가 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나; (iii) 합성

프로모터가 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하거나; (iv) 합성 프로모터가 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하는, 핵산을 제공한다.

- [0039] 일부 실시양태에서, hSyn 프로모터는 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0040] 일부 실시양태에서, CMV 인핸서는 서열번호 39와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0041] 일부 실시양태에서, proC3 인핸서는 서열번호 40과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0042] 일부 실시양태에서, proA5 인핸서는 서열번호 41과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0043] 일부 실시양태에서, proB15 인핸서는 서열번호 42와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0044] 일부 실시양태에서, SMN 단백질 또는 이의 변이체는 서열번호 33의 아미노산 서열 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0045] 일부 실시양태에서, SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0046] 다른 양태에서, 본원은 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53의 핵산 서열, 또는 서열번호 45, 서열번호 46, 서열번호 47, 서열번호 48, 서열번호 49, 서열번호 50, 서열번호 51, 서열번호 52 또는 서열번호 53과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0047] 다른 양태에서, 본원은 서열번호 22 또는 서열번호 23, 서열번호 24, 또는 서열번호 25의 핵산 서열, 또는 서열번호 21, 서열번호 22, 서열번호 23, 서열번호 24 또는 서열번호 25와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0048] 또 다른 양태에서, 본원은 (a) 본원에 제공된 핵산 또는 rAAV 벡터; 및 (b) AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 또는 이의 변이체의 캡시드 단백질을 포함하는 재조합체 AAV(rAAV) 입자를 제공한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV9 캡시드 단백질 또는 이의 변이체이다.
- [0049] 또 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산, 벡터 또는 rAAV 벡터, 또는 rAAV 입자, 및 약학적 허용 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0050] 또 다른 양태에서, 본원은 세포를 본원에 제공된 핵산, 벡터 또는 rAAV 벡터, rAAV 입자, 또는 약학 조성물과 접촉시키는 단계를 포함하는, 세포에서 SMN 단백질의 발현을 향상시키는 방법을 제공한다.
- [0051] 또 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산, 벡터 또는 rAAV 벡터, rAAV 입자, 또는 약학 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는, 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMN 연관된 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, SMN 연관된 질환 또는 장애는 SMN 단백질의 불충분한 발현과 연관된 질환 또는 장애이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 결핍된 SMN 단백질과 연관된다. 다른 실시양태에서, 질환 또는 장애는 *smn1* 유전자 결실 및/또는 돌연변이와 연관된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 척수성 근위축(SMA)이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA-I, SMA-II, SMA-III 또는 SMA-IV이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 2 세 미만이다.

**도면의 간단한 설명**

[0052] **4. 도면의 간단한 설명**

도 1a는 본원에 제공된 예시적 rAAV 벡터의 설계를 나타낸다. 도 1b는 다중 표적 세그먼트를 포함하는 본 핵산 구축물 또는 rAAV 벡터의 예시적 핵산 영역을 나타낸다.

도 2a는 본원에 제공된 다양한 rAAV 벡터의 SMN 단백질 발현 수준을 나타낸다. 도 2b는 본원에 제공된 코돈 최

적화된 구축물에 대한 전사체 분석의 결과를 나타낸다.

도 3은 본 rAAV 입자에 대한 생체내(*in vivo*) 효능 분석의 생존 결과를 나타낸다.

도 4는 본 rAAV 입자에 대한 생체내 효능 분석의 개방 영역 활성 결과를 나타낸다.

도 5는 본 rAAV 입자에 대한 생체내 효능 분석의 체중 결과를 나타낸다.

도 6은 miRNA의 상이한 표적 세그먼트를 포함하는 rAAV 사이의 생존 결과의 비교를 나타낸다.

도 7a 및 7b는 합성 프로모터를 포함하는 본원에 제공된 예시적 구축물을 나타낸다.

도 8a는 다른 프로모터를 포함하는 구축물과 비교한 본원에 제공된 합성 프로모터를 포함하는 구축물의 생체내 효능 분석 결과를 나타낸다.

도 8b는 낮은 투여량의 상이한 인헨서를 갖는 다양한 합성 프로모터를 갖는 구축물의 생체내 효능을 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### [0053] 5. 상세한 설명

[0054] 본 발명은 부분적으로 신규한 핵산 구축물(예를 들어, SMN 단백질을 코딩하고 조직 특이적 마이크로RNA의 표적 서열을 포함하는 핵산 구축물), 이를 포함하는 AAV 벡터, 및 이의 개선된 특성을 기초로 한다.

#### [0055] 5.1. 정의

[0056] 본원에 기재되거나 언급된 기술 및 절차는 예를 들어, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3d ed. 2001); *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel et al. eds., 2003); *Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic* (An ed. 2009); *Monoclonal Antibodies: Methods and Protocols* (Albitar ed. 2010); 및 *Antibody Engineering Vols 1 and 2* (Kontermann and Driebel eds., 2d ed. 2010)에 기재된 광범위하게 이용되는 방법론과 같이 통상의 기술자에 의해 전통적인 방법론을 사용하는 일반적으로 잘 이해되고/되거나 공통적으로 이용되는 것을 포함한다.

[0057] 본원에 달리 정의되지 않는 경우, 본 명세서에 사용되는 기술적 및 과학적 용어는 통상의 기술자에 의해 일반적으로 이해되는 의미를 갖는다. 본 명세서를 해석하는 목적을 위해, 다음 용어의 설명이 적용될 것이며, 적절한 언젠라도 단수형으로 사용된 용어는 또한 복수를 포함할 것이며, 그 반대도 마찬가지이다. 기재된 용어의 임의의 설명이 본원에 참고로 포함되는 임의의 문서와 상반되는 경우에, 하기 기재된 용어의 설명이 우선할 것이다.

[0058] 용어 "폴리펩티드" 및 "펩티드" 및 "단백질"은 본원에서 상호교환적으로 사용되고 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭한다. 중합체는 선형 또는 분지형일 수 있고, 이는 변형된 아미노산을 포함할 수 있고, 이는 비-아미노산에 의해 중단될 수 있다. 상기 용어는 또한, 자연적으로 또는 개입; 예를 들어 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 아세틸화, 인산화, 또는 임의의 다른 조작 또는 변형에 의해 변형된 아미노산 중합체를 포함한다. 또한, 예를 들어, 비제한적으로, 비천연 아미노산뿐 아니라, 당업계에 알려진 다른 변형을 포함한 아미노산의 하나 이상의 유사체를 함유하는 폴리펩티드가 상기 정의 내에 포함된다.

[0059] 본원에 상호교환적으로 사용된 바와 같은 "폴리뉴클레오티드" 또는 "핵산"은 임의의 길이의 뉴클레오티드의 중합체를 지칭하며 DNA 및 RNA를 포함한다. 뉴클레오티드는 데옥시리보뉴클레오티드, 리보뉴클레오티드, 변형된 뉴클레오티드 또는 염기, 및/또는 이의 유사체, 또는 DNA 또는 RNA 중합효소 또는 합성 반응에 의해 중합체로 혼입될 수 있는 임의의 물질일 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 변형된 뉴클레오티드, 예컨대 메틸화된 뉴클레오티드 및 이의 유사체를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 "올리고뉴클레오티드"는 일반적으로, 그러나 필수적으로는 아닌, 길이가 약 200 개 미만의 뉴클레오티드인 짧은, 일반적으로 단일-가닥, 합성 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 용어 "올리고뉴클레오티드" 및 "폴리뉴클레오티드"는 서로 배타적이지 않다. 폴리뉴클레오티드에 대한 상기 설명은 올리고뉴클레오티드에 동등하게 완전히 적용가능하다. 본 발명의 결합 분자를 생산하는 세포는 부모 하이브리도마 세포뿐 아니라, 폴리펩티드를 코딩하는 핵산이 도입된 세균 및 진핵생물 숙주 세포를 포함할 수 있다. 달리 나타내지 않는 경우, 본원에 개시된 임의의 단일-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 말단은 5' 말단이고; 이중-가닥 폴리뉴클레오티드 서열의 좌측 방향은 5' 방향으로 지칭된다. 초기 RNA 전사체의 5'에서 3' 첨가의 방향은 전사 방향으로 지칭되고; RNA 전사체의 5'에서 5' 말단인 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "상부 서열"로 지칭되고; RNA 전사체의 3'에서 3' 말단인 RNA 전사체와 동일한 서열을 갖는 DNA 가닥 상의 서열 영역은 "하부 서열"로 지칭된다.

- [0060] 본원에 사용된 바와 같이, "핵염기"는 다른 핵산의 염기와 페어링될 수 있는 헤테로사이클릭 모이어티를 지칭하는 것을 의미한다.
- [0061] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴클레오타이드"는 뉴클레오시드의 당 부분에 공유결합으로 연결된 포스페이트 기를 갖는 뉴클레오시드를 지칭하는 것을 의미한다.
- [0062] 본원에 사용된 바와 같이, "뉴클레오시드"는 당에 연결된 핵염기를 지칭하는 것을 의미한다.
- [0063] DNA 및 RNA 가닥의 비대칭 말단은 5' (5 프라임) 및 3' (3 프라임) 말단으로 지칭되고, 5' 말단은 말단 포스페이트 기를 갖고 3' 말단은 말단 하이드록실 기를 갖는다. 5 프라임(5') 말단은 이의 말단에 데옥시리보오스 또는 리보오스의 당-고리에 제5 탄소를 갖는다. 핵산은 5'-에서 3'-방향으로 *생체내*에서 합성되며, 이는 새로운 가닥을 조립하기 위해 사용되는 중합효소가 포스포디에스테르 결합을 통해 3'-하이드록실(-OH) 기에 각각의 새로운 뉴클레오타이드를 부착하기 때문이다.
- [0064] "단리된 핵산"은 보통 실질적으로 다른 계통 DNA 서열로부터 분리되는 핵산, 예를 들어 RNA, DNA, 또는 혼합된 핵산뿐 아니라, 자연적으로 천연 서열을 동반하는 단백질 또는 복합체, 예컨대 리보솜 및 중합효소이다. "단리된" 핵산 분자는 핵산 분자의 천연 공급원에 존재하는 다른 핵산 분자로부터 분리되는 것이다. 또한, "단리된" 핵산 분자, 예컨대 cDNA 분자는 재조합체 기술에 의해 생산될 때 다른 세포 물질, 또는 배양 배지가 실질적으로 없거나, 화학적으로 합성될 때 화학적 전구체 또는 다른 화학물질이 실질적으로 없을 수 있다. 상기 용어는 이의 천연 발생 환경으로부터 제거된 핵산 서열을 포함하며, 재조합체 또는 클로닝된 DNA 단리물 및 화학적으로 합성된 유사체 또는 이중 시스템에 의해 생물학적으로 합성된 유사체를 포함한다. 실질적으로 순수한 분자는 분자의 단리된 형태를 포함할 수 있다. 구체적으로, 본원에 기재된 폴리펩티드를 코딩하는 "단리된" 핵산 분자는 보통 그것이 생산된 환경에서 연합되는 적어도 하나의 오염물질 핵산 분자로부터 확인되고 분리되는 핵산 분자이다.
- [0065] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "상동성"은 2 개 폴리뉴클레오타이드 또는 2 개 폴리펩티드 모이어티 사이의 % 동일성을 지칭한다. 2 개 DNA, 또는 2 개 폴리펩티드 서열은 서열이 분자의 정의된 길이에 대해 이들 사이에 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%-85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%-98% 서열 동일성, 적어도 약 99%, 또는 임의의 %를 나타낼 때, 서로에 대해 "실질적으로 상동성"이다. 본원에 사용된 바와 같이, 실질적으로 상동성은 또한 특정 DNA 또는 폴리펩티드 서열과 완벽한 동일성을 나타내는 서열을 지칭한다.
- [0066] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "동일성"은 각각 2 개 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오타이드-대-뉴클레오타이드 또는 아미노산-대-아미노산 대응성을 지칭한다. % 동일성을 결정하기 위한 방법은 당업계에 잘 알려져 있다. 예를 들어, % 동일성은 서열을 정렬하는 단계, 2 개 정렬된 서열 사이의 매치의 정확한 수를 계수하는 단계, 짧은 서열의 길이로 나누는 단계, 및 결과를 100으로 곱하는 단계에 의한 2 개 분자 사이의 서열 정보의 직접 비교에 의해 결정될 수 있다. 펩티드 분석을 위해 Smith and Waterman *Advances in Appl. Math.* 2:482-489, 1981의 국소 상동성 알고리즘을 조정하는 ALIGN, Dayhoff, M. O. in *Atlas of Protein Sequence and Structure* M. O. Dayhoff ed., 5 Suppl. 3:353-358, National Biomedical Research Foundation, Washington, D.C.와 같이, 용이하게 이용가능한 컴퓨터 프로그램이 분석에서 도움을 주기 위해 사용될 수 있다. 뉴클레오타이드 서열 동일성을 결정하기 위한 프로그램, 예를 들어 Smith and Waterman 알고리즘에 또한 의존하는 BESTFIT, FASTA 및 GAP 프로그램은 Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 (available from Genetics Computer Group, Madison, Wis.)에서 이용가능하다. 이들 프로그램은 제조사에 의해 권고되고 상기 지칭된 Wisconsin Sequence Analysis Package에 기재된 디폴트 파라미터로 용이하게 이용된다. 예를 들어, 기준 서열에 대한 특정 뉴클레오타이드 서열의 % 동일성은 6 개 뉴클레오타이드 위치의 디폴트 스코어링 표 및 갭 페널티를 갖는 Smith and Waterman의 상동성 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있다. 본 발명의 맥락에서 % 동일성을 수립하는 다른 방법은 에든버러 대학교에 의해 저작권보호되고, John F. Collins 및 Shane S. Sturrok에 의해 개발되고, IntelliGenetics, Inc. (Mountain View, Calif.)에 의해 배부된 프로그램의 MPSRCH 패키지를 사용하는 것이다. 이 패키지 세트로부터, Smith-Waterman 알고리즘이 이용될 수 있으며, 이때 디폴트 파라미터가 스코어링 표(예를 들어, 12의 갭 개방 페널티, 1의 갭 확장 페널티, 및 6의 갭)에 대해 사용된다. 생성된 데이터로부터, "매치" 값은 "서열 동일성"을 반영한다. 서열 사이의 % 동일성 또는 유사성을 계산하기 위한 다른 적합한 프로그램은 일반적으로 당업계에 알려져 있으며, 예를 들어 다른 정렬 프로그램은 디폴트 파라미터와 함께 사용된 BLAST이다. 예를 들어, 다음 디폴트 파라미터를 사용하는 BLASTN 및 BLASTP가 사용될 수 있다: 유전자 코드=표준; 필터=없음; 표준=양측; 컷오프=60; 예상치=10; 매트릭스=BLOSUM62; 설명=50 개 서열; 분류=높은 스코에 의함; 데이터베이스=비-중복, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 번역+스위스 단백질+Spudate+PIR. 이

들 프로그램의 상세내용은 당업계에 잘 알려져 있다. 대안적으로, 상동성은 상동성 영역 사이의 안정적인 듀플렉스를 형성하는 조건 하의 폴리뉴클레오티드의 하이브리드화, 그 후 단일-가닥-특이적 뉴클레아제(들)를 이용한 분해, 및 분해된 단편의 크기 결정에 의해 결정될 수 있다. 실질적으로 상동성인 DNA 서열은 예를 들어 상기 특정 시스템에 대해 정의된 바와 같은 엄격한 조건 하의 써던 하이브리드화(Southern hybridization) 실험에서 확인될 수 있다. 적절한 하이브리드화 조건을 정의하는 것은 당업계의 기술 내에 있다. 예를 들어, 상기 Sambrook et al., supra; DNA Cloning, supra; Nucleic Acid Hybridization을 참고한다.

[0067] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "벡터"는 예를 들어, 숙주 세포 내로 핵산 서열을 도입하기 위해 핵산 서열을 보유하거나 포함하기 위해 사용되는 물질을 지칭한다. 사용을 위해 적용가능한 벡터는 예를 들어, 발현 벡터, 플라스미드, 파지 벡터, 바이러스 벡터, 에피솜, 및 인공 염색체를 포함하며, 이는 숙주 세포의 염색체 내로의 안정적인 통합을 위해 작동가능한 선택 서열 또는 마커를 포함할 수 있다. 또한, 벡터는 하나 이상의 선택가능 마커 유전자 및 적절한 발현 제어 서열을 포함할 수 있다. 포함될 수 있는 선택가능 마커 유전자는 예를 들어, 항생제 또는 독소, 보체 영양요구 결핍에 대한 저항성을 제공하거나, 배양 배지에 없는 임계 영양소를 공급한다. 발현 제어 서열은 구성적 및 유도성 프로모터, 전사 인핸서, 전사 종결자 등을 포함할 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 2 이상의 핵산 분자가 공동-발현되어야 할 때, 양측 핵산 분자는 예를 들어, 단일 발현 벡터 내로 또는 별도 발현 벡터 내에 삽입될 수 있다. 숙주 세포 내로의 핵산 분자의 도입은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여 확인될 수 있다. 이러한 방법은 예를 들어, 핵산 분석, 예컨대 mRNA의 노던 블롯(Northern blot) 또는 중합효소 연쇄 반응(PCR) 증폭, 유전자 생산물의 발현을 위한 면역블로팅, 또는 도입된 핵산 서열 또는 이의 대응하는 유전자 생산물의 발현을 시험하기 위한 다른 적합한 분석 방법을 포함한다. 용어 "벡터"는 클로닝 및 발현 비히클뿐만 아니라, 바이러스 벡터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 벡터는 제조합체 AAV 벡터이다.

[0068] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "제조합체 AAV 벡터(rAAV 벡터)"는 AAV로부터의 핵산 서열 및 하나 이상의 이중 서열(즉, AAV 기원이 아닌 핵산 서열)을 포함하는 폴리뉴클레오티드 벡터를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 이중 서열은 적어도 하나, 특정 실시양태에서, 2 개의 AAV 역위 말단 반복부 서열(ITR)의 측면에 있다. 일부 실시양태에서, 이러한 rAAV 벡터는 예를 들어, 적합한 헬퍼 바이러스로 감염되고(또는 적합한 헬퍼 기능을 발현하고) AAV rep 및 cap 유전자 생산물(즉, AAV Rep 및 Cap 단백질)을 발현하는 숙주 세포에 존재할 때, 감염성 바이러스 캡시드 입자 내로 복제되고 패키징될 수 있다. rAAV 벡터는 큰 폴리뉴클레오티드 내로(예를 들어, 염색체 내 또는 다른 벡터, 예컨대 클로닝 또는 형질주입을 위해 사용되는 플라스미드 내) 혼입될 수 있으며, AAV 패키징 기능 및 적합한 헬퍼 기능의 존재 하에 복제 및 이입에 의해 "구제"될 수 있다. rAAV 벡터는, 비제한적으로, 지질과 복합체화되고, 리포솜 내에 캡슐화되고, 바이러스 캡시드 입자, 특히 AAV 입자에 이입된 플라스미드, 선형 인공 염색체를 포함한 다수의 형태 중 임의의 것일 수 있다. rAAV 벡터는 AAV 캡시드 내로 패키징되어, "제조합체 아데노-연관 바이러스 캡시드 입자(rAAV 입자)"를 생성할 수 있다.

[0069] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "이중"은 핵산 서열, 예컨대 코딩 서열 및 제어 서열과 결합하여 보통 함께 결합되지 않고/않거나 보통 특정 세포와 연합되지 않는 서열을 지칭한다. 따라서, 핵산 구축물 또는 벡터의 "이중" 영역은 자연에서 다른 분자와 연합하여 발견되지 않는 다른 핵산 분자 내부의 또는 이에 부착된 핵산의 세그먼트이다. 예를 들어, 핵산 구축물의 이중 영역은 자연에서 코딩 서열과 연합하여 발견되지 않는 서열의 측면에 있는 코딩 서열을 포함한다. 이중 코딩 서열의 다른 예는 코딩 서열 자체가 자연에서 발견되지 않는 구축물(예를 들어, 천연 유전자와 상이한 코돈을 갖는 합성 서열)이다.

[0070] 다른 요소의 측면에 있는 서열에 대해 본원에 사용된 바와 같은 용어 "측면에 있는"은 서열에 대해 상부 및/또는 하부, 즉 5' 및/또는 3'의 하나 이상의 측면 요소의 존재를 나타낸다. 용어 "측면에 있는"은 서열이 필수적으로 인접하다는 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 예를 들어, 트랜스유전자를 코딩하는 핵산과 측면 요소 사이에 개재 서열이 있을 수 있다. 2 개의 다른 요소(예를 들어, TR)의 "측면에 있는" 서열(예를 들어, 트랜스유전자)은 하나의 요소가 서열에 대해 5'에 위치하고 나머지가 서열에 대해 3'에 위치한다는 것을 나타내지만; 그 사이에 개재 서열이 있을 수 있다.

[0071] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "역위 말단 반복부" 또는 "ITR" 서열은 대향 방향에 있는 바이러스 게놈의 말단에서 발견되는 상대적으로 짧은 서열을 지칭한다. "AAV 역위 말단 반복부(ITR)" 서열은 당업계에 잘 알려져 있으며, 보통 천연 단일-가닥 AAV 게놈의 양측 말단에 존재하는 대략 145-뉴클레오티드 서열이다. ITR의 최외측 125 뉴클레오티드는 2 개의 교번 방향 중 하나로 존재할 수 있어, 상이한 AAV 게놈 사이 및 단일 AAV 게놈의 2 개 말단 사이에 이중성을 야기할 수 있다. 최외측 125 뉴클레오티드는 또한 자가-상보성의 몇몇 짧은 영역(A, A

′, B, B′, C, C′ 및 D 영역으로 지정됨)을 함유하여, ITR의 이 부분 내에 가닥내 염기-페어링을 발생시킨다.

- [0072] "코딩 서열" 또는 선택된 폴리펩티드를 "코딩하는" 서열은 적절한 조절 서열의 제어 하에 위치할 때, 폴리펩티드로 전사되고(DNA의 경우) 번역되는(mRNA의 경우) 핵산 분자이다. 코딩 서열의 경계는 5′ (아미노) 말단의 출발 코돈 및 3′ (카복시) 말단의 번역 종결 코돈에 의해 결정된다. 전사 종결 서열은 코딩 서열에 대해 3′에 위치할 수 있다.
- [0073] 용어 "제어 서열"은 특정 숙주 유기체에서 작동가능하게 연결된 코딩 서열의 발현을 위해 필요한 DNA 서열을 지칭한다. 원핵생물에 대해 적합한 제어 서열은 예를 들어, 프로모터, 선택적으로 작동자 서열, 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵생물 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호, 및 인핸서를 이용하는 것으로 알려져 있다.
- [0074] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된", 및 유사한 어구(예를 들어, 유전적으로 융합된)는 핵산 또는 아미노산에 대해 사용될 때, 각각 서로 기능적 관계에 위치한 핵산 서열 또는 아미노산 서열의 작동상 연결을 지칭한다. 예를 들어, 작동가능하게 연결된 프로모터, 인핸서 요소, 개방 판독 프레임, 5′ 및 3′ UTR, 및 종결자 서열은 핵산 분자(예를 들어, RNA)의 정확한 생산을 야기한다. 일부 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 핵산 요소는 개방 판독 프레임의 전사 및 궁극적으로 폴리펩티드의 생산(즉, 개방 판독 프레임의 발현)을 야기한다. 다른 예로서, 작동가능하게 연결된 펩티드는 기능적 도메인이 서로 적절한 거리를 두고 위치하여, 각각의 도메인의 의도된 기능을 부여하는 것이다.
- [0075] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "프로모터"는 이의 일반적 의미에서 DNA 조절 서열을 포함하는 뉴클레오티드 영역을 지칭하며, 조절 서열은 RNA 중합효소에 결합하고 하부(3′-방향) 코딩 서열의 전사를 개시할 수 있는 유전자로부터 유래된다. 전사 프로모터는 "유도성 프로모터"(프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현이 피분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 유도됨), "억제성 프로모터"(프로모터에 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드 서열의 발현이 피분석물, 보조인자, 조절 단백질 등에 의해 유도됨), 및 "구성적 프로모터"를 포함할 수 있다.
- [0076] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "트랜스유전자"는 광범위한 의미에서 예를 들어, 표적 세포에서의 발현을 위해 바이러스 벡터에 혼입된 임의의 이종 뉴클레오티드 서열을 의미하며 이는 발현 제어 서열, 예컨대 프로모터와 연합될 수 있다. 발현 제어 서열은 표적 세포에서 트랜스유전자의 발현을 촉진하는 능력을 기초로 하여 선택될 것이라는 것이 통상의 기술자에 의해 인식된다. 트랜스유전자의 예는 치료 폴리펩티드 또는 검출가능 마커를 코딩하는 핵산이다.
- [0077] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "AAV 캡시드" 또는 "AAV 캡시드 단백질" 또는 "AAV cap"는 AAV 캡시드(*cap*) 유전자(예를 들어, VP1, VP2, 및 VP3)에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체를 지칭한다. 예를 들어, 상기 용어는, 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV-2/1, AAV 2/6, AAV 2/7, AAV 2/8, AAV 2/9, AAV LK03, AAVrh10, AAVrh74, AAV44-9, 또는 이의 변이체와 같은 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래된 캡시드 단백질을 포함한다. 상기 용어는 또한 키메라 AAV와 같은 재조합체 AAV에 의해 발현되거나 이로부터 유래된 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0078] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "AAV 캡시드 입자" 또는 "AAV 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질(예를 들어, VP1 단백질, VP2 단백질, VP3 단백질, 또는 이의 변이체)을 포함하고 선택적으로 AAV 계놈으로부터의 핵산 또는 AAV 계놈으로부터 유래된 핵산을 캡슐화한다.
- [0079] 벡터 또는 바이러스 캡시드에 대해 사용된 용어 "혈청형"은 캡시드 단백질 서열 및 캡시드 구조를 기초로 한 별개의 면역학적 프로파일에 의해 정의된다.
- [0080] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "키메라"는 바이러스 캡시드 또는 입자에 대해, 개시내용 전체가 본원에 참고로 포함되는 Rabinowitz et al., 미국 특허 제6,491,907호에 기재된 바와 같이 캡시드 또는 입자가 상이한 파르보바이러스, 바람직하게는 상이한 AAV 혈청형으로부터의 서열을 포함한다는 것을 의미한다.
- [0081] 용어 "재조합체"는 일반적으로 자연에서 발견된 것과 별개인 유전자 개체를 의미한다. 폴리뉴클레오티드 또는 유전자에 적용된 바와 같이, 이는 폴리뉴클레오티드가 클로닝, 제한 및/또는 결찰 단계, 및 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오티드와 별개인 구축물의 생산을 야기하는 다른 절차의 다양한 조합의 생산물이라는 것을 의미한다.
- [0082] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합체 바이러스"는 예를 들어, 입자 내로의 이종 핵산 구축물의 첨가 또는 삽입에 의해 유전적으로 변경된 바이러스를 지칭한다. 예를 들어, 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합체 AAV

입자" 또는 "rAAV"는 예를 들어, 내인성 AAV 유전자의 결실 또는 다른 돌연변이 및/또는 AAV 입자의 폴리뉴클레오티드 내로의 이중 핵산 구축물의 첨가 또는 삽입에 의해 유전적으로 변경된 AAV를 지칭한다.

- [0083] 본원에 사용된 바와 같이, "탈표적화 활성"은 이의 표적 핵산에 대한 안티센스 화합물의 하이브리드화에 기인하는 임의의 검출가능 또는 측정가능 활성을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 탈표적화 활성은 표적 핵산 또는 이러한 표적 핵산에 의해 코딩된 이의 단백질 생산물의 양 또는 발현에서의 감소이다.
- [0084] 본원에 사용된 바와 같이, "내인성 miRNA"는 예를 들어, 가공의 단계 후, 수소 결합을 통해 표적 핵산에 대한 하이브리드화를 거칠 수 있는, 예를 들어 임의의 포유동물 세포에 의해 발현된 알려지거나 알려지지 않은 마이크로RNA, 또는 단백질/RNA 복합체를 지칭한다. 내인성 miRNA의 비-제한적인 예는 단일-가닥 및 이중-가닥 DNA 또는 RNA, 또는 핵산 화합물, 예컨대 안티센스 올리고뉴클레오티드, siRNA, shRNA, ssRNA, miRNA, lncRNA 및 점유-기반 화합물을 포함한다.
- [0085] 본원에 사용된 바와 같이, "탈표적화 억제"는 표적 핵산 수준과 비교하여 표적 핵산에 대해 상보성인 내인성 miRNA의 존재 하의 또는 내인성 miRNA의 부재 하의 표적 핵산 수준의 감소를 지칭한다.
- [0086] 본원에 사용된 바와 같이, "안티센스 올리고뉴클레오티드"는 표적 핵산의 대응 세그먼트에 대한 하이브리드화를 허용하는 핵염기 서열을 갖는 단일-가닥 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 일부 실시양태에 따르면, 본 발명의 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 핵산 내의 표적 영역에 대해 적어도 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95% 서열 상보성을 포함한다. 예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드의 20 개 핵염기 중 18 개가 상보성이고, 따라서 표적 영역에 특이적으로 하이브리드화할 내인성 miRNA는 90% 상보성을 나타낼 것이다. 표적 핵산의 영역을 갖는 내인성 miRNA의 % 상보성은 일상적으로 기본 국소 정렬 검색 도구(BLAST 프로그램)를 사용하여 결정될 수 있다(Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990); Zhang and Madden, Genome Res., 7, 649-656 (1997) 참고). 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 내인성 및 다른 miRNA를 포함하며, 이는 rAAV 벡터 발현된 SMN1 mRNA에 하이브리드화하며, 이들 내인성 miRNA의 대표적인 서열이 본원에 기재된다.
- [0087] 본원에 사용된 바와 같이, "야생형 SMN1 전사체"는 miRNA의 조직 특이적 표적 세그먼트의 배열이 있거나 없는 야생형 SMN1 mRNA를 함유하는 AAV 벡터로부터 생산된 전사체를 의미한다. 따라서, miRNA의 조직 특이적 표적 세그먼트의 배열이 있거나 없는 야생형 SMN1 전사체는 규범적으로 전사된 포유동물 세포 "SMN1 센스 전사체"와 상이하하며, 이는 숙주 세포 *smn1* 유전자의 코딩 가닥(센스 가닥으로도 지칭됨)으로부터 생산된다.
- [0088] 본원에 사용된 바와 같이, "특이적으로 하이브리드화가능"은 소망하는 효과를 유도하기 위해 안티센스 올리고뉴클레오티드와 표적 핵산 사이의 충분한 정도의 상보성을 갖는 한편, 특이적 결합을 소망하는 조건 하에, 즉 생체내 분석 및 치료적 치료의 경우에 생리학적 조건 하에 비-표적 핵산에 최소 효과를 나타내거나 효과를 나타내지 않는 안티센스 화합물을 지칭한다.
- [0089] 본원에 사용된 바와 같이, "엄격한 하이브리드화 조건" 또는 "엄격한 조건"은 올리고머 화합물이 이의 표적 서열에 하이브리드화하지만, 최소 수의 다른 서열에 하이브리드화할 조건을 지칭한다.
- [0090] 본원에 사용된 바와 같이, "표적 세그먼트"는 안티센스 화합물(예를 들어, miRNA)이 표적화되는 표적 핵산의 뉴클레오티드의 서열을 지칭한다. "5' 표적 부위"는 표적 세그먼트의 5'-최대 뉴클레오티드를 지칭한다. "3' 표적 부위"는 표적 세그먼트의 3'-최대 뉴클레오티드를 지칭하는 것을 의미한다. miRNA의 표적 세그먼트는 mRNA 전사체가 miRNA에 의해 특이적으로 하이브리드화가능한 핵산 서열이다.
- [0091] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "형질주입된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된"은 외인성 핵산이 숙주 세포 내로 전달되거나 도입되는 과정을 지칭한다. "형질주입된" 또는 "형질전환된" 또는 "형질도입된" 세포는 외인성 핵산으로 형질주입되거나, 형질전환되거나 형질도입된 것이다. 예를 들어, 용어 "형질주입"은 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하기 위해 사용되며, 세포는 외인성 DNA가 세포막 내에 도입되었을 때, "형질주입"되었다. 다수의 형질주입 기술은 일반적으로 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Graham *et al.* (1973) *Virology*, 52:456, Sambrook *et al.* (1989) *Molecular Cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis *et al.* (1986) *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier, 및 Chu *et al.* (1981) *Gene* 13:197을 참고한다. 이러한 기술이 사용되어, 적합한 숙주 세포 내로 하나 이상의 외인성 분자를 도입할 수 있다. 바이러스에 의한 세포의 "형질도입"은 바이러스 입자로부터 세포로 핵산, 예컨대 DNA 또는 RNA의 전달이 있다는 것을 의미한다.
- [0092] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "숙주 세포"는 핵산 분자로 형질주입될 수 있는 특정 세포 및 이러한 세포의 자

손 또는 잠재적 자손을 지칭한다. 숙주 세포는 세균 세포, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포일 수 있다.

- [0093] 용어 "정제된"은 관심 물질이 그것이 잔류하는 샘플의 대부분의 비율을 포함하는 물질(화합물, 폴리뉴클레오티드, 단백질, 폴리펩티드, 폴리펩티드 조성물)의 단리를 지칭한다. 통상적으로, 샘플에서 실질적으로 정제된 구성요소는 샘플의 50%, 80%-85%, 90-99%, 예컨대 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%를 포함한다. 관심 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 정제하기 위한 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 이온-교환 크로마토그래피, 친화도 크로마토그래피 및 밀도에 따른 침강을 포함한다.
- [0094] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약학적 허용"은 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나, 미국 약전, 유럽 약전, 또는 동물, 및 더욱 특히 인간에서의 사용을 위한 다른 일반적으로 인식된 약전에 열거된 것을 의미한다.
- [0095] 일 실시양태에서, 각각의 구성요소는 약학 제형의 다른 성분과 양립성이고, 타당한 이득/위험 비에 비례한, 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 면역원성, 또는 다른 문제 또는 합병증이 없는 인간 및 동물의 조직 또는 기관과 접촉하여 사용하기에 적합하다는 의미에서 "약학적 허용"이다. 예를 들어, Lippincott Williams & Wilkins: Philadelphia, PA, 2005; Handbook of Pharmaceutical Excipients, 6th ed.; Rowe et al., Eds.; The Pharmaceutical Press and the American Pharmaceutical Association: 2009; Handbook of Pharmaceutical Additives, 3rd ed.; Ash and Ash Eds.; Gower Publishing Company: 2007; Pharmaceutical Preformulation and Formulation, 2nd ed.; Gibson Ed.; CRC Press LLC: Boca Raton, FL, 2009를 참고한다. 일부 실시양태에서, 약학적 허용 부형제는 이용되는 투여량 및 농도에서 이에 노출되는 세포 또는 포유동물에 대해 비독성이다. 일부 실시양태에서, 약학적 허용 부형제는 수성 pH 완충 용액이다.
- [0096] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "치료하다", "치료" 및 "치료하는 것"은 하나 이상의 요법의 투여로부터 야기되는 질환 또는 병태의 진행, 중증도, 및/또는 기간의 감소 또는 개선을 지칭한다. 치료하는 것은 환자가 여전히 기저 장애로부터 괴로울 수 있음에도 불구하고, 개선이 환자에서 관찰되도록 기저 질환과 연관된 하나 이상의 증상의 감소, 경감 및/또는 완화가 있었는지 여부를 평가함으로써 결정될 수 있다. 용어 "치료하는 것"은 질환을 관리하는 것 및 개선하는 것 둘 다를 포함한다. 용어 "관리하다", "관리하는 것", 및 "관리"는 질환의 치유를 반드시 야기하지는 않는, 대상체가 요법으로부터 유래받는 유익한 효과를 지칭한다. "치료" 또는 "치료하는 것"은 (1) 질환을 예방하는 것, 즉 질환의 발달을 예방하는 것 또는 질환에 노출되거나 취약해질 수 있지만, 질환의 증상을 아직 겪거나 나타내지 않는 대상체에서 질환이 적은 강도로 발생하도록 야기하는 것, (2) 질환을 억제하는 것, 즉 질환 상태 발달을 막는 것, 이의 진행을 예방하거나 지연시키는 것, 또는 이를 역전시키는 것, (3) 질환의 증상을 완화시키는 것, 즉 대상체에 의해 겪은 증상의 수를 감소시키는 것, 및 (4) 질환 또는 이의 증상의 진행을 감소, 예방 또는 지연시키는 것을 포함한다. 용어 "예방하다", "예방하는 것", 및 "예방"은 질환, 장애, 병태, 또는 연관된 증상(들)의 개시(또는 재발)의 가능성을 감소시키는 것을 지칭한다.
- [0097] 본원에 사용된 바와 같이, "투여하다", "투여", 또는 "투여하는 것"은 예컨대 구강, 점막, 국부, 피내, 비경구, 정맥내, 유리체내, 관절내, 망막하, 근육내, 척추강내 전달 및/또는 본원에 기재되거나 당업계에 알려진 물리적 전달의 임의의 다른 방법에 의해 대상체 또는 환자(예를 들어, 인간)에 물질(예를 들어, 본원에 제공된 접합체 또는 약학 조성물)을 주사하거나, 그렇지 않으면 물리적으로 전달하는 활동을 지칭한다. 특별한 실시양태에서, 투여는 정맥내 주입에 의한 것이다. 본원에 제공된 접합체 또는 조성물은 전신으로 또는 특정 조직으로 전달될 수 있다.
- [0098] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 주어진 병태, 장애 또는 질환 및/또는 이와 관련된 증상을 치료하고/하거나, 진단하고/하거나, 예방하고/하거나, 이의 개시를 지연시키고/시키거나, 이의 중증도 및/또는 기간을 감소시키고/시키거나 개선하기에 충분한 치료제(예를 들어, 본원에 제공된 접합체 또는 약학 조성물)의 양을 지칭한다. 이들 용어는 또한 주어진 질환의 발전 또는 진행의 감소, 늦춤, 또는 개선, 주어진 질환의 재발, 발달 또는 개시의 감소, 늦춤, 또는 개선, 및/또는 다른 요법의 예방적 또는 치료적 효과(들)를 개선하거나 향상시키는 것 또는 다른 요법에 대한 다리로서 제공하는 것을 위해 필요한 양을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 바와 같은 "유효량"은 또한 특정 결과를 달성하기 위한 본원에 기재된 접합체의 양을 지칭한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 및 "환자"는 상호교환적으로 사용된다.
- [0099] 본원에 사용된 바와 같이, 대상체는 포유동물, 예컨대 비-영장류(예를 들어, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 염소, 토끼, 래트, 마우스 등) 또는 영장류(예를 들어, 원숭이 및 인간), 예를 들어 인간이다. 특정 실시양태에서, 대상체는 본원에 제공된 질환 또는 장애로 진단된 포유동물, 예를 들어 인간이다. 다른 실시양태에서, 대상체는

본원에 제공된 질환 또는 장애가 발달할 위험에 있는 포유동물, 예를 들어 인간이다. 구체적 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0100] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "요법들" 및 "요법"은 질환 또는 장애 또는 이의 증상(예를 들어, 본원에 제공된 질환 또는 장애 또는 이와 연관된 하나 이상의 증상 또는 병태)의 예방, 치료, 관리, 또는 개선에 사용될 수 있는 임의의 프로토콜(들), 방법(들), 조성물, 제형, 및/또는 약제(들)를 지칭할 수 있다. 특정 실시양태에서, 용어 "요법들" 및 "요법"은 약물 요법, 아주반트 요법, 방사선, 수술, 생물학적 요법, 지지 요법, 및/또는 질환 또는 장애 또는 이의 하나 이상의 증상의 치료, 관리, 예방, 또는 개선에 유용한 다른 요법을 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "요법"은 본원에 기재된 접합체 또는 이의 약학 조성물 이외의 요법을 지칭한다.

[0101] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "SMN과 연관된 질환 또는 장애"는 예를 들어, 증상 또는 직접 또는 간접 원인으로 SMN을 포함하는 질환 또는 장애(SMN 단백질의 비정상적 발현 수준을 포함함)를 지칭한다. SMN과 연관된 질환 또는 장애는, 비제한적으로, *smn1* 유전자의 감소된 발현 또는 돌연변이체 *smn1* 유전자와 연관된 질환 또는 장애를 포함한다.

[0102] 용어 "약" 및 "대략"은 주어진 값 또는 범위의 20% 이내, 15% 이내, 10% 이내, 9% 이내, 8% 이내, 7% 이내, 6% 이내, 5% 이내, 4% 이내, 3% 이내, 2% 이내, 1% 이내, 또는 그 미만을 의미한다.

[0103] 본 발명 및 청구항에 사용된 바와 같이, 단수형 "a", "an" 및 "the"는 맥락이 달리 명확하게 나타내지 않는 경우 복수형을 포함한다.

[0104] 실시양태가 본원에서 용어 "포함하는"과 함께 기재되는 경우, 이와 달리 "구성되는" 및/또는 "본질적으로 구성되는"의 측면에서 기재된 유사한 실시양태가 또한 제공된다는 것이 이해된다. 또한, 실시양태가 본원에서 어구 "본질적으로 구성되는"과 함께 기재되는 경우, 이와 달리 "구성되는"의 측면에서 기재된 유사한 실시양태가 또한 제공된다는 것이 이해된다.

[0105] "A와 B 사이" 또는 "A-B 사이"와 같은 어구에 사용된 바와 같은 용어 "사이"는 A 및 B 둘 다를 포함하는 범위를 지칭한다.

[0106] 본원에서 "A 및/또는 B"와 같은 어구에 사용된 바와 같은 용어 "및/또는"은 A 및 B 둘 다; A 또는 B; A(단독); 및 B(단독)를 포함하는 것으로 의도된다. 마찬가지로, "A, B, 및/또는 C"와 같은 어구에 사용된 바와 같은 용어 "및/또는"은 A, B, 및 C; A, B, 또는 C; A 또는 C; A 또는 B; B 또는 C; A 및 C; A 및 B; B 및 C; A(단독); B(단독); 및 C(단독)의 실시양태 각각을 포함하는 것으로 의도된다.

[0107] **5.2. 핵산 구축물**

[0108] 일 양태에서, 본원은 관심 단백질을 코딩하는 제1 핵산 영역 및 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역(miRNA의 표적 서열로도 지칭됨)을 포함하는 신규한 핵산을 제공한다.

[0109] 일부 실시양태에서, 제1 핵산 영역은 치료 분자(예를 들어, SMN 단백질)를 코딩한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적 세그먼트를 포함하는 제2 핵산은 관심 단백질을 코딩하는 제1 핵산 영역의 3'에 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 표적 세그먼트를 포함하는 제2 핵산 영역은 관심 단백질을 코딩하는 제1 핵산 영역의 3'에 대해 직후 또는 연속이다. 다른 실시양태에서, 하나 이상의 표적 세그먼트를 포함하는 제2 핵산 영역은 하나 이상의 뉴클레오티드(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상의 뉴클레오티드)를 갖는 관심 단백질을 코딩하는 제1 핵산 영역의 3'으로부터 떨어져 있다.

[0110] **5.2.1. 관심 단백질을 코딩하는 핵산**

[0111] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산 구축물은 SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.

[0112] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산 구축물은 서열번호 33의 아미노산 서열을 갖는 SMN 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, SMN 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0113] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산은 서열번호 34 또는 서열번호 35의 핵산 서열과 특정 % 동일성을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 관심 단백질을 코딩하는 핵산은 서열번호 34와 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성 중 어느 하

나를 포함한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 관심 단백질을 코딩하는 핵산은 서열번호 35와 적어도 약 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 서열 동일성 중 어느 하나를 포함한다.

- [0114] 2 개 서열(예를 들어, 아미노산 서열 또는 핵산 서열) 사이의 % 동일성의 결정은 수학적 알고리즘을 사용하여 달성될 수 있다. 2 개 서열의 비교를 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 바람직한, 비-제한적 예는 Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90:5873 5877 (1993)에서와 같이 변형된, Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87:2264 2268 (1990)의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 Altschul *et al.*, J. Mol. Biol. 215:403 (1990)의 NBLAST 및 XBLAST 프로그램에 포함된다. BLAST 뉴클레오티드 검색은 NBLAST 뉴클레오티드 프로그램 파라미터 세트, 예를 들어 스코어=100, 단어 길이=12로 수행되어, 본원에 기재된 핵산 분자에 대해 상동성인 뉴클레오티드 서열을 얻을 수 있다. BLAST 단백질 검색은 XBLAST 프로그램 파라미터 세트, 예를 들어 스코어 50, 단어 길이=3으로 수행되어, 본원에 기재된 단백질 분자에 대해 상동성인 아미노산 서열을 얻을 수 있다. 비교 목적을 위한 갭 정렬을 얻기 위해, Gapped BLAST가 Altschul *et al.*, 핵산 Res. 25:3389 3402 (1997)에 기재된 바와 같이 이용될 수 있다. 대안적으로, PSI BLAST가 사용되어, 분자 사이의 원격 관계(distant relationship)를 검출하는 반복된 검색을 수행할 수 있다(*Id.*). BLAST, Gapped BLAST, 및 PSI Blast 프로그램을 이용할 때, 각각의 프로그램의(예를 들어, XBLAST 및 NBLAST의) 디폴트 파라미터가 사용될 수 있다(예를 들어, 월드와이드 웹, ncbi.nlm.nih.gov 상의 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)(NCBI) 참고). 서열의 비교를 위해 이용되는 수학적 알고리즘의 다른 비-제한적 예는 Myers and Miller, CABIOS 4:11-17 (1998)의 알고리즘이다. 이러한 알고리즘은 GCG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)에 포함된다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 가중 잔기 표, 12의 갭 길이 페널티, 및 4의 갭 페널티가 사용될 수 있다.
- [0115] 2 개 서열 사이의 % 동일성은 갭을 허용하거나 허용하지 않고, 상기 기재된 것과 유사한 기술을 사용하여 결정될 수 있다. % 동일성 계산에서, 통상적으로 정확한 매치만이 계수된다.
- [0116] 일부 실시양태에 따르면, 본원에 기재된 서열은 당 모이어티, 뉴클레오시드간 연결, 또는 핵염기에 대한 하나 이상의 변형을 추가로 포함할 수 있다.
- [0117] 특정 실시양태에 따르면, 핵산은 인간 핵산(즉, 인간 *smn1* 유전자로부터 유래되는 핵산)이다. 다른 실시양태에서, 핵산은 비-인간 핵산(즉, 비-인간 *smn1* 유전자로부터 유래되는 핵산)이다.
- [0118] 일부 실시양태에 따르면, 본원에 제공된 핵산은 하나 이상의 삽입, 결실, 역위, 및/또는 치환을 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 본원에 제공된 핵산 구축물은 코돈 최적화된 핵산 영역을 포함한다. 일 실시양태에 따르면, *smn1*을 코딩하는 핵산은 코돈 최적화된다. 일 실시양태에 따르면, *smn1*을 코딩하는 핵산은 진핵생물, 예를 들어 인간에서 발현을 위해 코돈 최적화된다. 일부 실시양태에 따르면, *smn1*을 코딩하는 코딩 서열은 특정 세포, 예컨대 진핵생물 세포에서 발현을 위해 코돈 최적화된다. 진핵생물 세포는 특정 유기체, 예컨대, 비제한적으로, 인간을 포함한 포유동물, 또는 본원에 논의된 바와 같은 비-인간 진핵세포 또는 동물 또는 포유동물, 예를 들어 마우스, 래트, 토끼, 개, 가축, 또는 비-인간 포유동물 또는 영장류를 포함하는 포유동물의 것 또는 이로부터 유래된 것일 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는 천연 서열의 적어도 하나의 코돈(예를 들어, 약 또는 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 50 이상 코돈 초과)을 상기 숙주 세포의 유전자에서 더욱 빈번하게 또는 가장 빈번하게 사용되는 한편, 천연 아미노산 서열을 유지하는 코돈으로 치환함으로써 관심 숙주 세포에서 향상된 발현을 위해 핵산 서열을 변형하는 과정을 지칭한다. 다양한 종은 특정 아미노산의 특정 코돈에 대해 특정 편향을 나타낸다. 코돈 편향(유기체 사이의 코돈 사용에서의 차이)은 보통 메신저 RNA(mRNA)의 번역의 효율과 관련되며, 이는 결국 다른 것들 중에서, 번역되는 코돈의 특성 및 특정 전달 RNA(tRNA) 분자의 이용가능성에 의존적인 것으로 여겨진다. 세포에서 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩티드 합성에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈의 반영이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화를 기초로 하여 주어진 유기체에서 최적 유전자 발현을 위해 맞춤형될 수 있다. 코돈 사용 표는 예를 들어, [www.kazusa.or.jp/codon/](http://www.kazusa.or.jp/codon/)에서 이용가능한 "코돈 사용 데이터베이스(Codon Usage Database)"에서 용이하게 이용가능하며 이들 표는 다수의 방식으로 조정될 수 있다. Nakamura, Y., *et al.*, Nucl. Acids Res. 28:292 (2000)를 참고한다. 특정 숙주 세포에서의 발현을 위해 특정 서열을 코돈 최적화하기 위한 컴퓨터 알고리즘이 또한 이용가능하며, 예컨대 Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.)가 또한 이용가능하다.
- [0119] 본 발명의 핵산 분자(예를 들어, *smn1* 핵산을 포함함)는 표준 분자 생물학 기술을 사용하여 단리될 수 있다. 하이브리드화 프로브로서 관심 핵산 서열 전부 또는 일부를 사용하는 경우, 핵산 분자는 표준 하이브리드화 및 클

로닝 기술을 사용하여 분리될 수 있다(예를 들어, Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989에 기재된 바와 같음).

- [0120] 본 발명의 방법에서 사용하기 위한 핵산 분자는 또한 관심 핵산 분자의 서열을 기초로 하여 설계된 합성 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용한 중합효소 연쇄 반응(PCR)에 의해 분리될 수 있다. 발명의 방법에서 사용되는 핵산 분자는 표준 PCR 증폭 기술에 따라 주형으로서 cDNA, mRNA 또는 대안적으로 게놈 DNA 및 적절한 올리고뉴클레오티드 프라이머를 사용하여 증폭될 수 있다.
- [0121] 또한, 관심 뉴클레오티드 서열에 대응하는 올리고뉴클레오티드는 또한 표준 기술을 사용하여 화학적으로 합성될 수 있다. 상업적으로 이용가능한 DNA 합성기에서 자동화된 고상 합성을 포함하여, 폴리데옥시뉴클레오티드를 화학적으로 합성하는 많은 방법이 알려져 있다(예를 들어, 본원에 참고로 포함되는 Itakura *et al.* 미국 특허 제 4,598,049호; Caruthers *et al.* 미국 특허 제4,458,066호; 및 Itakura 미국 특허 제4,401,796호 및 제 4,373,071호 참고). 합성 올리고뉴클레오티드를 설계하기 위한 자동화된 방법이 이용가능하다. 예를 들어, Hoover, D.M. & Lubowski, J. Nucleic Acids Research, 30(10): e43 (2002)을 참고한다.
- [0122] 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산 구축물은 SMN 단백질 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, SMN 단백질 변이체는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0123] 본원에 기재된 단백질의 변이체가 제조될 수 있다는 것이 고려된다. 예를 들어, 펩티드 변이체는 코딩 DNA 내로 적절한 뉴클레오티드 변화를 도입하는 것, 및/또는 소망하는 폴리펩티드의 합성에 의해 제조될 수 있다. 상기 아미노산 변화를 인식하는 통상의 기술자는 펩티드의 번역후 과정을 변경할 수 있다.
- [0124] 변이는 원래 폴리펩티드와 비교하여 아미노산 서열에서 변화를 야기하는 폴리펩티드를 코딩하는 하나 이상의 코돈의 치환, 결실, 또는 삽입일 수 있다.
- [0125] 아미노산 치환은 하나의 아미노산을 유사한 구조 및/또는 화학적 특성을 갖는 다른 아미노산으로 치환하는 것, 예컨대 류신의 세린으로의 치환, 예를 들어 보존적 아미노산 치환의 결과일 수 있다. 예를 들어, 아미노산 치환을 야기하는 부위-지시된 돌연변이유발 및 PCR-매개된 돌연변이유발을 포함하여, 통상의 기술자에게 알려진 표준 기술이 사용되어, 본원에 제공된 분자를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에서 돌연변이를 도입할 수 있다. 삽입 또는 결실은 선택적으로 약 1 내지 5 개 아미노산의 범위 내일 수 있다. 특정 실시양태에서, 치환, 결실, 또는 삽입은 원래 분자에 대해 25 개 미만 아미노산 치환, 20 개 미만 아미노산 치환, 15 개 미만 아미노산 치환, 10 개 미만 아미노산 치환, 5 개 미만 아미노산 치환, 4 개 미만 아미노산 치환, 3 개 미만 아미노산 치환, 또는 2 개 미만 아미노산 치환을 포함한다. 구체적 실시양태에서, 치환은 하나 이상의 예측된 비-필수 아미노산 잔기에서 이루어진 보존적 아미노산 치환이다. 허용된 변이는 서열에서 아미노산의 삽입, 결실, 또는 치환을 체계적으로 이루고 부모 펩티드에 의해 나타나는 활성에 대해 생성된 변이체를 시험함으로써 결정될 수 있다.
- [0126] 아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 다중 잔기를 함유하는 폴리펩티드 길이의 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합뿐 아니라, 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 폴리펩티드를 포함한다.
- [0127] 보존적 아미노산 치환에 의해 생성된 단백질은 본 발명에 포함된다. 보존적 아미노산 치환에서, 아미노산 잔기는 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기로 치환된다. 상기 기재된 바와 같이, 유사한 전하를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산 잔기의 패밀리는 당업계에서 정의되었다. 이들 패밀리는 염기성 측쇄(예를 들어, 리신, 아르기닌, 히스티딘), 산성 측쇄(예를 들어, 아스파르트산, 글루탐산), 비전하 극성 측쇄(예를 들어, 글리신, 아스파라긴, 글루타민, 세린, 트레오닌, 티로신, 시스테인), 비극성 측쇄(예를 들어, 알라닌, 발린, 류신, 이소류신, 프롤린, 페닐알라닌, 메티오닌, 트립토판), 베타-분지형 측쇄(예를 들어, 트레오닌, 발린, 이소류신) 및 방향족 측쇄(예를 들어, 티로신, 페닐알라닌, 트립토판, 히스티딘)를 갖는 아미노산을 포함한다. 대안적으로, 돌연변이는 예컨대 포화 돌연변이유발에 의해 코딩 서열의 전부 또는 일부에 따라 무작위적으로 도입될 수 있으며, 생성된 돌연변이체는 생물학적 활성에 대해 스크리닝되어, 활성을 유지하는 돌연변이체를 확인할 수 있다. 돌연변이유발 후, 코딩된 단백질이 발현될 수 있고 단백질의 활성이 결정될 수 있다. 보존적(예를 들어, 유사한 특성 및/또는 측쇄를 갖는 아미노산 기 내부) 치환이 이루어져, 특성을 유지하거나 상당히 변화시키지 않을 수 있다. 예시적 치환이 하기 표에 나타나 있다.

표 1. 아미노산 치환

원래 잔기	예시적 치환
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 노르류신
Leu (L)	노르류신; Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 노르류신

[0128]

[0129]

아미노산은 이의 측쇄의 특성에서의 유사성에 따르 그룹화될 수 있다(예를 들어, Lehninger, *Biochemistry* 73-75 (2d ed. 1975) 참고): 비-극성: Ala(A), Val(V), Leu(L), Ile(I), Pro(P), Phe(F), Trp(W), Met(M); (2) 비전하 극성: Gly(G), Ser(S), Thr(T), Cys(C), Tyr(Y), Asn(N), Gln(Q); (3) 산성: Asp(D), Glu(E); 및 (4) 염기성: Lys(K), Arg(R), His(H). 대안적으로, 천연 발생 잔기는 공통 측쇄 특성을 기초로 하여 그룹으로 나뉘어질 수 있다: (1) 소수성: 노르류신, Met, Ala, Val, Leu, Ile; (2) 중성 친수성: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln; (3) 산성: Asp, Glu; (4) 염기성: His, Lys, Arg; (5) 쇠 배향에 영향을 주는 잔기: Gly, Pro; 및 (6) 방향족: Trp, Tyr, Phe.

[0130]

예를 들어, 본원에 제공된 폴리펩티드의 적절한 입체구조를 유지하는데 관련되지 않은 임의의 시스테인 잔기가 또한 예를 들어, 다른 아미노산, 예컨대 알라닌 또는 세린으로 치환되어, 분자의 산화 안정성을 개선하고 이상 가교를 예방할 수 있다.

[0131]

비-보존적 치환은 이들 클래스 중 하나의 멤버를 다른 클래스로 교환하는 것을 수반할 것이다.

[0132]

아미노산 서열 삽입은 하나의 잔기 내지 100 이상의 잔기를 함유하는 폴리펩티드 길이의 범위의 아미노- 및/또는 카복실-말단 융합뿐 아니라, 단일 또는 다중 아미노산 잔기의 서열내 삽입을 포함한다. 말단 삽입의 예는 N-말단 메티오닐 잔기를 갖는 폴리펩티드를 포함한다.

[0133]

변이는 당업계에 알려진 방법, 예컨대 올리고뉴클레오티드-매개된(부위-지시된) 돌연변이유발, 알라닌 스캐닝, 및 PCR 돌연변이유발을 사용하여 이루어질 수 있다. 부위-지시된 돌연변이유발(예를 들어, Carter, *Biochem J.*

237:1-7 (1986); 및 Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res. 10:6487-500 (1982) 참고), 카세트 돌연변이유발(예를 들어, Wells *et al.*, Gene 34:315-23 (1985) 참고), 또는 다른 알려진 기술이 클로닝된 DNA 상에 수행되어, 폴리펩티드 변이체 DNA를 생산할 수 있다.

[0134] 다른 양태에서, 본원은 서열번호 35의 핵산 서열, 또는 서열번호 35와 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 SMN 단백질을 코딩하는 최적화된 핵산을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 최적화된 핵산은 서열번호 36 또는 서열번호 37을 포함하는 프로모터 영역을 추가로 포함한다. 일부 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 36의 핵산 및 서열번호 35의 핵산을 포함하는 핵산을 제공한다. 다른 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 37의 핵산 및 서열번호 35의 핵산을 포함하는 핵산을 제공한다.

[0135] **5.2.2. 내인성 miRNA의 표적 세그먼트**

[0136] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산 구축물은 관심 단백질(예를 들어, SMN 단백질)을 코딩하는 핵산과 함께 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)을 포함한다. 하기 섹션 6에 나타낸 바와 같이, 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 특정 표적 세그먼트(들)의 포함은 유전자 요법(예를 들어, AAV 기반 유전자 요법)에 대해 비-표적 독성을 감소시키기 위한 유리한 특성을 나타내었다.

[0137] 일부 실시양태에서, 핵산은 2 이상의 내인성 miRNA의 표적 세그먼트를 포함하며, 2 이상의 내인성 miRNA(들)는 조직 특이적 miRNA(들)이다. 본원에 사용된 바와 같이, 조직-특이적 miRNA는 다른 것, 예컨대 간 특이적 miRNA 및 심장 특이적 miRNA와 비교하여 하나 이상의 특정 조직에서 양이 높은 miRNA이다. 일부 실시양태에서, 2 이상의 내인성 miRNA는 동일한 조직에 대해 특이적이다. 다른 실시양태에서, 2 이상의 내인성 miRNA는 상이한 조직에 대해 특이적이다. 일부 구체적 실시양태에서, 핵산은 하나 이상의 간 특이적 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들) 및 하나 이상의 심장 특이적 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함한다.

[0138] 일부 실시양태에서, 핵산은 1 내지 50 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 1 내지 40 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 1 내지 30 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 1 내지 20 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 1 내지 15 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 5 내지 15 개 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 7 내지 11 개 표적 세그먼트를 포함한다.

[0139] miRNA의 표적 세그먼트는 miRNA(예를 들어, 조직 특이적 내인성 miRNA)에 특이적으로 하이브리드화가능하거나 상보성인 핵산 세그먼트를 지칭한다. 하이브리드화의 가장 공통적인 메커니즘은 핵산 분자의 상보성 핵염기 사이에 수소 결합(예를 들어, 왓슨-크릭(Watson-Crick), 호스틴(Hoogsteen) 또는 역 호스틴 수소 결합)을 포함한다. 엄격한 조건은 서열-의존적이고 하이브리드화될 핵산 분자의 성질 및 조성에 의해 결정된다. 서열이 다른 서열에 특이적으로 하이브리드화가능한지 여부를 결정하는 방법은 당업계에 잘 알려져 있다.

[0140] 내인성 miRNA 및 표적 핵산은 내인성 miRNA의 핵염기의 충분한 수가 표적 핵산의 대응 핵염기와 수소 결합할 수 있을 때 서로 상보성인, 소망하는 효과(예를 들어, 표적 핵산, 예컨대 본원에 제공된 표적 세그먼트를 갖는 *smn1*의 안티센스 억제)가 발생할 것이다.

[0141] miRNA와 표적 세그먼트를 갖는 *smn1* 사이의 비-상보성 핵염기는 miRNA가 표적 핵산에 특이적으로 하이브리드화할 수 있도록 유지된다면 용인될 수 있다. 또한, miRNA는 *smn1*의 하나 이상의 세그먼트 상에서 표적 세그먼트와 하이브리드화하여, 개재 또는 인접 세그먼트가 하이브리드화 이벤트(예를 들어, 루프 구조, 미스매치 또는 헤어핀 구조)에 관련되지 않을 수 있다.

[0142] 일부 실시양태에 따르면, 본원에 제공된 miRNA, 또는 이의 특정 부분은 본 핵산 구축물 또는 이의 부분에 제공된 miRNA의 표적 서열과 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%, 또는 적어도 70%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 상보성이다. miRNA와 표적 핵산의 % 상보성은 일상적 방법을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, miRNA의 20 개 핵염기 중 18 개가 표적 영역과 상보성이고, 따라서 특이적으로 하이브리드화할 miRNA는 90% 상보성을 나타낼 것이다. 이 예에서, 나머지 비-상보성 핵염기는 상보성 핵염기와 클러스터링되거나 개재될 수 있으며 서로 또는 상보성 핵염기와 인접할 필요가 없다. 이와 같이, 표적 핵산과 완전 상보성의 2 개 영역의 측면에 있는 4 개(네 개)의 비-상보성 핵염기를 갖는 길이가 18 개 핵염기인 miRNA는 표적 핵산과 77.8% 전체 상보성을 가질 것이며, 따라서 본 발명의 범위 내에 속할 것이다. miRNA와 표적 핵산의 영역의 % 상보성은

일상적으로 당업계에 알려진 BLAST 프로그램(기본 국소 정렬 검색 도구) 및 PowerBLAST 프로그램(Altschul *et al.*, J. Mol. Biol., 1990, 215, 403-410; Zhang and Madden, Genome Res., 1997, 7, 649-656)을 사용하여 결정될 수 있다. % 상동성, 서열 동일성 또는 상보성은 예를 들어, Smith and Waterman(Adv. Appl. Math., 1981, 2, 482-489)의 알고리즘을 사용하는 디폴트 설정을 사용하여 Gap 프로그램(Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, Madison Wis.)에 의해 결정될 수 있다.

- [0143] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 miRNA, 또는 이의 특정 부분은 표적 핵산, 또는 이의 특정 부분과 완전 상보성(즉, 100% 상보성)이다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, miRNA는 본원에 제공된 표적 세그먼트와 완전 상보성이다. 본원에 사용된 바와 같이, "완전 상보성"은 miRNA의 각각의 핵염기가 표적 핵산의 대응 핵염기와 정확히 염기 페어링될 수 있다는 것을 의미한다. 예를 들어, 20-핵염기 miRNA는 miRNA와 완전 상보성인 표적 핵산의 대응 20 개 핵염기 부분이 있는 한, 400 개 핵염기 길이인 표적 서열과 완전 상보성이다. 완전 상보성은 또한 제1 및/또는 제2 핵산의 특정 부분에 대해 사용될 수 있다. 예를 들어, 30 개 핵염기 miRNA 중 20-핵염기 부분은 400 개 핵염기 길이인 표적 서열과 "완전 상보성"일 수 있다. 30 개 핵염기 올리고뉴클레오타이드의 20-핵염기 부분은 표적 서열이 대응 20 개 핵염기 부분을 갖고, 각각의 핵염기가 miRNA의 20 개 핵염기 부분과 상보성인 경우, 표적 서열과 완전 상보성이다. 동시에, 전체 30 개 핵염기 miRNA는 miRNA의 나머지 10 개 핵염기가 표적 서열과 또한 상보성인지 여부에 따라 표적 서열과 완전 상보성일 수 있거나 그렇지 않을 수 있다.
- [0144] 비-상보성 핵염기의 위치는 5' 말단 또는 3' 말단, 또는 miRNA의 5' 말단과 3' 말단의 사이 어디라도 있을 수 있다. 대안적으로, 비-상보성 핵염기 또는 핵염기들은 miRNA의 내부 부분에 있을 수 있다. 2 이상의 비-상보성 핵염기가 존재할 때, 이들은 인접하거나(즉, 연결되거나) 비-인접일 수 있다. 일 실시양태에서, 비-상보성 핵염기는 gapmer 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 윙 세그먼트(wing segment)에 위치한다.
- [0145] 일부 실시양태에 따르면, 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 개, 또는 최대 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 개 핵염기인 miRNA는 표적 핵산에 대해 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 2 이하, 또는 1 이하 비-상보성 핵염기(들)를 포함한다. 일부 실시양태에 따르면, 길이가 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 개, 또는 최대 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30 개 핵염기인 miRNA는 표적 핵산에 대해 8 이하, 7 이하, 6 이하, 5 이하, 4 이하, 3 이하, 2 이하, 또는 1 이하 비-상보성 핵염기(들)를 포함한다.
- [0146] 본원에 제공된 miRNA는 또한 표적 핵산의 부분과 상보성인 것을 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, "부분"은 표적 핵산의 영역 또는 세그먼트 내의 인접(즉, 연결된) 핵염기의 정의된 수를 지칭한다. "부분"은 또한 miRNA의 인접 핵염기의 정의된 수를 지칭할 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 8 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 9 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 10 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 11 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 12 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 13 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 14 개 핵염기 부분과 상보성이다. 일부 실시양태에 따르면, miRNA는 표적 세그먼트의 적어도 15 개 핵염기 부분과 상보성이다. 또한, 표적 세그먼트의 적어도 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 이상의 핵염기 부분, 또는 이들 값 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위와 상보성인 miRNA가 고려된다.
- [0147] 이들 예시적 miRNA의 비-제한적인 예시적 내인성 miRNA 및 비-제한적인 예시적 표적 세그먼트가 하기 표 2에 나타나 있다.

표 2. miRNA 및 이의 표적화 서열의 목록

miRNA (hsa-)	miRNA 서열	표적 세그먼트
mir-1-5p (≒mir-1)	5'-UGGGAACAUAUCUUUAUAUGCC CAUUGGACCUAGCUAAGCUAUGGAAU GUAAAGAAGUAUGUAUCUCA-3'( 서열 번호 1)	5'-atggcatataaagaagtatgt-3' ( 서열번호 7)
mir-208a-5p (≒mir-208a)	5'-UGACGGGCGAGCUUUUGGCCCGGGU UAUACCUGAUGCUCACGUAUAAGACG AGCAAAAAGCUUGUUGGUCA-3' (서열 번호 2)	5'-gtataacccggcctcaaaagctc-3' ( 서열번호 8)
mir-208b-5p (≒mir-208b)	5'-CCUCUCAGGGAAGCUUUUUGCUCGA AUUAUGUUUCUGAUCCGAAUAUAAGA CGAACAAAAGGUUUGUCUGAGGGCAG-3' ( 서열번호 3)	5'-acataattcgagcaaaaagct-3' ( 서열번호 9)
mir-122	5'-CCUAGCAGAGCUGUGGAGUGUGAC AAUGGUGUUUGUCUAAACUAUCAA ACGCCAUUAUCACACUAAAUAGCUAC UGCUAGGC-3' ( 서열번호 4)	5'-caaaccattgtcactcca-3' ( 서열번호 10)
mir-133a-1 (≒mir-133a)	5'-ACAAUGCUUUGCUAGAGCUGGUA AAUGGAACCAAAUCGCCUCUCAAUG GAUUUGGUCCCCUUAACAGCUGUA GCUAUGCAUUGA-3' ( 서열번호 5)	5'-cagctggtgaaggggacaaa-3' ( 서열번호 11)
mir-488-5p (≒mir-488)	5'-GAGAAUCAUCUCUCCAGAUAAUUG CACUCUCAAAACAAGUUUCCAAAUUGU UUGAAAGGCUAUUCUUGGUCAGAUG ACUCUC-3' ( 서열번호 6)	5'-ttgagagtgcattatctggg-3' ( 서열번호 12)

[0148]

[0149]

일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1을 포함한다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 적어도 80% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 80% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 81% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 82% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 83% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 84% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 85% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 86% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 87% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 88% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 89% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 90% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 91% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 92% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 93% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 94% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 95% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 96% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 97% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 98% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 1과 약 99% 동일하다. 일부 실시양태에서, 핵산은 상기 miRNA 중 임의의 것의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함한다.

[0150]

일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 적어도 80% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 80% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 81% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 82% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 83% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 84% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 85% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 86% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 87% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 88% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 89% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 90% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 91% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 92% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열은 서열번호 2와 약 93% 동일하다. 일부 실시양태에서, 내인성 miRNA 서열





서열번호 12의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 이상의 반복부를 포함한다.

[0161] 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 표적 세그먼트의 적어도 2 개 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 표적 세그먼트의 적어도 3 개 반복부를 포함한다.

[0162] 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 적어도 하나의 표적 세그먼트 및 간 특이적 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 표적 세그먼트의 적어도 2 개 반복부 및 간 특이적 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 hsa-mir-133a(또는 hsa-mir-133a-1)의 표적 세그먼트의 적어도 3 개 반복부 및 간 특이적 miRNA의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 실시양태에서, 간 특이적 miRNA는 hsa-mir-122이다. 일부 더욱 구체적인 실시양태에서, hsa-mir-133a의 표적 세그먼트는 서열번호 11을 포함하고 hsa-mir-122의 표적 세그먼트는 서열번호 10을 포함한다.

표 3. 예시적 링커

링커 명칭	링커 서열
EXG-Link01	5'-cttgac-3' ( 서열번호 13)
EXG-Link02	5'-ccatag-3' ( 서열번호 14)
EXG-Link03	5'-tttcta-3' ( 서열번호 15)
EXG-Link04	5'-caagct-3' ( 서열번호 16)
EXG-Link05	5'-gatcta-3' ( 서열번호 17)

[0163]

[0164] 일부 실시양태에서, 본 핵산 구축물에서 표적 서열 내의 다중 표적 세그먼트는 중첩될 수 있다. 대안적으로, 이들은 비-중첩될 수 있다. 일부 실시양태에서, 표적 영역 내의 표적 세그먼트는 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10, 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10 이하, 약 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 또는 10 이하의 뉴클레오티드이거나, 상기 값 중 임의의 2 개에 의해 정의된 범위인 다수의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에서, 표적 서열 내의 표적 세그먼트는 5 이하, 또는 약 5 이하의 뉴클레오티드에 의해 분리된다. 일부 실시양태에 따르면, 표적 세그먼트는 인접한다.

[0165] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 링커는 2 개 표적 세그먼트 사이에 존재한다. 일부 실시양태에서, 모든 표적 세그먼트는 링커에 의해 연결된다. 다른 실시양태에서, 표적 세그먼트의 일부만이 링커에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 핵산 내의 링커는 동일하다. 다른 실시양태에서, 상이한 링커가 본 핵산 내에 있다.

[0166] 예시적 링커가 표 3에 나타나 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 13을 갖는 하나 이상의 링커(들)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 14를 갖는 하나 이상의 링커(들)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 15를 갖는 하나 이상의 링커(들)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 16을 갖는 하나 이상의 링커(들)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 17을 갖는 하나 이상의 링커(들)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 서열번호 13, 서열번호 14, 서열번호 15, 서열번호 16, 및 서열번호 17로부터 각각 독립적으로 선택되는 2 이상의 링커를 포함한다.

[0167] 다중 내인성 miRNA의 다중 표적 세그먼트를 포함하는 예시적 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)이 하기 섹션 6에서 표 6에 나타나 있다.

[0168] 일부 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 hsa-mir-208a의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-208b의 적어도 하나의 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 적어도 하나의 표적 세그먼트, 및 hsa-mir-133a의 적어도 하나의 표적 세그먼트를 포함한다. 일부 더욱 구체적 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 hsa-mir-208a의 2 개 표적 세그먼트, hsa-mir-208b의 2

개 표적 세그먼트, hsa-mir-122의 3 개 표적 세그먼트, 및 hsa-mir-133a의 3 개 표적 세그먼트를 포함한다. 구체적 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 서열번호 8의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, 서열번호 9의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 2 개 반복부, 서열번호 10의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부, 및 서열번호 11의 핵산 서열을 갖는 표적 세그먼트의 3 개 반복부를 포함한다. 일부 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 서열번호 19와 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0169] 일부 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0170] 일부 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 서열번호 20과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0171] 일부 실시양태에서, 다중 표적 세그먼트를 포함하는 핵산(또는 miRNA의 표적 서열)은 서열번호 21과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.

[0172] 일부 실시양태에서, 구성요소 표적 세그먼트는 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 또는 서열번호 21에서의 것의 동일한 순서로 있다. 다른 실시양태에서, 구성요소 표적 세그먼트는 서열번호 18, 서열번호 19, 서열번호 20, 또는 서열번호 21에서의 것과 상이한 순서(5'에서 3')로 있다.

[0173] **5.2.3. 합성 프로모터**

[0174] 하기 섹션 6에 나타낸 바와 같이, 본원에 제공된 특정 합성 프로모터는 특히 SMN을 전달하기 위한 AAV 기반 유전자 요법에서 사용시 놀랍도록 우수한 효과를 제공한다.

[0175] 따라서, 또 다른 양태에서, 본원은 SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 핵산 영역, 및 인핸서 및 코어 프로모터를 포함하는 합성 프로모터를 포함하는 핵산을 제공한다.

[0176] 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다. 다른 실시양태에서, 합성 프로모터는 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함한다.

[0177] 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 CMV 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하고, hSyn 프로모터는 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, CMV 인핸서는 서열번호 39와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0178] 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 proC3 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하고, hSyn 프로모터는 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, proC3 인핸서는 서열번호 40과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0179] 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 proA5 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하고, hSyn 프로모터는 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, proA5 인핸서는 서열번호 41과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.

[0180] 일부 실시양태에서, 합성 프로모터는 proB15 인핸서 및 hSyn 프로모터를 포함하고, hSyn 프로모터는 서열번호 38과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함하고, proB15 인핸서는 서열번호 42와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는

핵산 서열을 포함한다.

- [0181] 일부 실시양태에서, SMN 단백질 또는 이의 변이체는 서열번호 33의 아미노산 서열, 또는 서열번호 33과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.
- [0182] 일부 실시양태에서, SMN 단백질 또는 이의 변이체를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 34 및 서열번호 35로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산 서열을 포함한다.
- [0183] 본 합성 프로모터를 포함하는 예시적 rAAV 벡터가 하기 섹션 6에 기재된다.
- [0184] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 45의 핵산 서열, 또는 서열번호 45와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0185] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 46의 핵산 서열, 또는 서열번호 46과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0186] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 47의 핵산 서열, 또는 서열번호 47과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0187] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 48의 핵산 서열, 또는 서열번호 48과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0188] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 49의 핵산 서열, 또는 서열번호 49와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0189] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 50의 핵산 서열, 또는 서열번호 50과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0190] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 51의 핵산 서열, 또는 서열번호 51과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0191] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 52의 핵산 서열, 또는 서열번호 52와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.
- [0192] 일부 실시양태에서, 본원은 서열번호 53의 핵산 서열, 또는 서열번호 53과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터를 제공한다.

[0193] **5.3. 유전자 요법을 위한 재조합체 바이러스 벡터 및 바이러스 입자**

[0194] 또한, 본원은 본원에 제공된 핵산을 전달하기 위한 바이러스 기반 유전자 요법을 제공한다. 따라서, 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산(관심 단백질을 코딩하는 핵산 영역 및 miRNA의 표적 서그먼트를 포함하는 핵산 영역을 포함함)을 포함하는 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV 벡터)를 제공한다. 또 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산을 포함하는 바이러스 입자(예를 들어, rAAV 또는 rAAV 입자)를 제공한다.

[0195] **5.3.1. 바이러스 기반 유전자 전달 시스템**

[0196] 다수의 바이러스 기반 시스템이 포유동물 세포 내로의 유전자 전달을 위해 개발되었다. 바이러스 벡터의 예는, 비제한적으로, 아데노바이러스 벡터, 아데노-연관 바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 백시니아 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 및 이의 유도체를 포함한다. 바이러스 벡터 기술은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어 Sambrook *et al.* (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York), 및 다른 바이러스학 및 분자 생물학 매뉴얼에 기재되어 있다.

[0197] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 아데노바이러스로부터 유래된다. 예시적 벡터는 HAd5, ChAd3, HAd26, HAd6, AdCH3NSmut, HAd35, ChAd63, HAd4, rcAd26을 기초로 하거나 이로부터 유래된다. 재조합체 아데노바이러스 벡터는 당업계에 알려진 방법에 따라 구축될 수 있다. 예를 들어, O'Connor *et al.*, *Virology*, 217(1):11-22 (1996); Hardy *et al.*, *Journal of Virology*, 73(9):7835-7841 (1999); Hardy *et al.*, *Journal of Virology*, 71(3):1842-1849 (1997)를 참고한다. 일부 실시양태에서, 3-세대 아데노바이러스 벡터("고용량 아데노바이러스 벡터"(HCAV), 헬퍼-의존적 또는 "거틀리스(gutless)" 아데노바이러스 벡터로도 지칭됨)가 본원에서 사용되어, 긴 서열을 전달할 수 있다. 일부 실시양태에서, 관심 폴리뉴클레오티드, 예를 들어 트랜스유전자는 ITR 및 패키징 신호를 함유할 뿐인 아데노바이러스 벡터 내로 클로닝된다. 헬퍼 아데노바이러스 벡터는 HEK 세포 내로 공동-형질주입되어, 아데노바이러스 입자를 생성할 수 있다. Lee *et al.*,

*Genes and Diseases*, 4(2):43-63 (2007)을 참고한다.

- [0198] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 렌티바이러스로부터 유래된다. 예시적 벡터는 HIV-1, HIV-2, SIVSM, SIVAGM, EIAV, FIV, VNV, CAEV, 또는 BIV를 기초로 하거나 이로부터 유래된다. 렌티바이러스 벡터는 예를 들어, Cribbs *et al.*, *BMC Biotechnology*, 13:98 (2003); Merten *et al.*, *Mol Ther Methods Clin Dev.*, 13 (3):16017 (2016); Durand and Cimarelli, *Viruses*, 3:132-159 (2011)에 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법에 따라 생산될 수 있다. 일부 실시양태에서, 3-세대 자가-비활성화 렌티바이러스 벡터가 본원에서 사용된다.
- [0199] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 단순 포진 바이러스(HSV)로부터 유래된다. 일부 실시양태에서, 단순 포진 바이러스는 단순 포진 1형 바이러스(HSV-1), 단순 포진 2형 바이러스(HSV-2), 또는 이의 임의의 유도체이다. 예시적 벡터는 HSV-1, HSV-2, CMV, VZV, EBV, 및 KSHV를 기초로 하거나 이로부터 유래된다. HSV-기반 벡터는 예를 들어, 그 전체가 본원에 참고로 포함되는 미국 특허 제7,078,029호, 제6,261,552호, 제5,998,174호, 제5,879,934호, 제5,849,572호, 제5,849,571호, 제5,837,532호, 제5,804,413호, 및 제5,658,724호, 및 국제 특허 출원 WO 91/02788호, WO 96/04394호, WO 98/15637호, 및 WO 99/06583호에 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법에 따라 구축될 수 있다.
- [0200] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 HSV-기반 벡터는 앰플리콘 벡터이다. 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 HSV-기반 벡터는 복제-결합 벡터이다. 또 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 HSV-기반 벡터는 복제-가능 벡터이다.
- [0201] 앰플리콘은 HSV DNA 복제의 원점(ori) 및 HSV 절단-패키징 인식 서열(pac) 둘 다를 함유하도록 조작된 플라스미드-유래된 벡터이다. 앰플리콘이 HSV 헬퍼 기능을 갖는 포유동물 세포 내로 형질주입될 때, 이들은 복제되고, 머리-에서-꼬리 연결된 연쇄체를 형성한 다음에, 바이러스 입자로 패키징된다. 결합 헬퍼 HSV를 이용한 감염을 기초로 하는 하나 및 HSV-1 유전자의 형질주입을 기초로 하는 나머지, 예컨대 pac-결실된 중첩 코스미드 또는 pac-결실되고 ICP27-결실된 BAC-HSV-1의 세트의, 앰플리콘 입자를 생산하기 위해 현재 사용되는 2개의 주요 방법이 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 앰플리콘은 트랜스유전자의 다중 복제(예를 들어, 최대 15개 복제)를 포함하여 외래 DNA의 큰 단편(예를 들어, 최대 152 kb)을 수용할 수 있으며, 비-독성이다.
- [0202] 일부 실시양태에서, 본원에 사용된 HSV-기반 벡터는 적어도 하나의 필수 HSV 유전자가 결핍되고, HSV-기반 벡터는 또한 비-필수 유전자의 하나 이상의 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, HSV-기반 벡터는 복제-결핍이다. 대부분의 복제-결핍 HSV-기반 벡터는 결실을 함유하여, 하나 이상의 즉시-초기, 초기, 또는 후기 HSV 유전자를 제거하여, 복제를 예방한다. 다른 실시양태에서, HSV-기반 벡터는 ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, ICP47, 및 이의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택되는 즉시 초기 유전자가 결핍된다. 구체적 실시양태에서, HSV-기반 벡터는 ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, 및 ICP47 전부가 결핍된다. 예시적 복제-가능 벡터는 NV-1020(HSV-1), RAV9395(HSV-2), AD-472(HSV-2), NS-gEnu11(HSV-1), 및 ImmunoVEX(HSV2)를 포함한다. 예시적 복제-결합 벡터는 d15-29(HSV-2), d15-29-4L(HSV-1), DISC-dH(HSV-1 및 HSV-2), CJ9gD(HSV-1), TOH-OVA(HSV-1), d106(HSV-1), d81(HSV-1), HSV-SIV d106(HSV-1), 및 d106(HSV-1)을 포함한다.
- [0203] 복제-결핍 HSV-기반 벡터는 통상적으로 바이러스 벡터 저장액의 높은 역가를 생성하기 위해 적절한 수준에서 복제-결핍 HSV-기반 벡터에 존재하지 않지만, 바이러스 증식을 위해 요구되는 유전자 기능을 제공하는 상보성 세포주에서 생산된다. 예시적 세포주는 복제-결핍 HSV-기반 벡터에 존재하지 않는 적어도 하나, 및 일부 실시양태에서, 모든 복제-필수 유전자 기능을 보완한다. 예를 들어, ICP0, ICP4, ICP22, ICP27, 및 ICP47이 결핍된 HSV-기반 벡터는 인간 골육종 계열 U2OS에 의해 보완될 수 있다. 세포주는 또한 결손일 때, 성장 또는 복제 효율을 감소시키는 비-필수 유전자(예를 들어, UL55)를 보완할 수 있다. 보완 세포주는 모든 HSV 기능(예를 들어, 단지 역위 말단 반복부 및 패키징 신호 또는 단지 ITR 및 HSV 프로모터와 같이 최소 HSV 서열을 포함하는 HSV 앰플리콘의 증식을 가능하게 함)을 포함하여, 초기 영역, 즉시-초기 영역, 후기 영역, 바이러스-연관 영역, 또는 이의 조합에 의해 코딩되는 적어도 하나의 복제-필수 유전자 기능에서의 결핍을 보완할 수 있다. 일부 실시양태에서, 세포주는 추가로 세포 DNA와 재조합되는 HSV-기반 벡터 게놈의 가능성을 최소화하고, 사실상 제거하는, HSV-기반 벡터와 비-중첩 방식으로 보완 유전자를 함유하는 것을 특징으로 한다. 따라서, 복제 가능 HSV의 존재는 벡터 저장액에서 회피되지 않는 경우, 최소화되며, 이는 따라서 특정 치료 목적, 특히 유전자 요법 목적을 위해 적합하다. 보완 세포주의 구축은 당업계에 잘 알려진 표준 분자 생물학 및 세포 배양 기술을 포함한다.
- [0204] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자는 아데노-연관 바이러스(AAV)로부터 유래

된다. AAV와 관련된 더욱 상세한 내용은 하기 섹션 5.3.2-5.3.4에서 제공된다.

- [0205] 관심 핵산은 예를 들어, 제한 엔도뉴클레아제 부위 및 하나 이상의 선택가능 마커를 사용하는 것을 포함하여, 당업계에서 임의의 알려진 분자 클로닝 방법을 사용하여 벡터 내로 클로닝될 수 있다. 일부 실시양태에서, 핵산은 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 다양한 프로모터가 포유동물 세포에서의 유전자 발현을 위해 탐구되었으며, 당업계에 알려진 프로모터 중 임의의 것이 본 발명에서 사용될 수 있다. 프로모터는 대략 구성적 프로모터 또는 조절된 프로모터, 예컨대 유도성 프로모터로서 분류될 수 있다.
- [0206] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산은 구성적 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 구성적 프로모터는 이중 유전자(트랜스유전자로도 지칭됨)가 숙주 세포에서 구성적으로 발현되게 한다. 본원에서 고려되는 예시적 구성적 프로모터는, 비제한적으로, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, 인간 연장 인자-1 알파(hEF1 $\alpha$ ), 유비퀴틴 C 프로모터(UbiC), 포스포글리세로키나아제 프로모터(PGK), 유인원 바이러스 40 초기 프로모터(SV40), 및 CMV 초기 인핸서와 결합된 닭  $\beta$ -액틴 프로모터(CAGG)를 포함한다. 트랜스유전자 발현 구동에 대한 이러한 구성적 프로모터의 효율은 많은 수의 연구에서 광범위하게 비교되었다.
- [0207] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산은 유도성 프로모터에 작동가능하게 연결된다. 유도성 프로모터는 조절된 프로모터의 범주에 속한다. 유도성 프로모터는 하나 이상의 조건, 예컨대 물리적 조건, 조작된 면역 이펙터 세포의 미세환경, 또는 조작된 면역 이펙터 세포의 생리학적 상태, 유도인자(즉, 유도제), 또는 이의 조합에 의해 유도될 수 있다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 유도 조건은 조작된 포유동물 세포에서, 및/또는 약학 조성물을 받는 대상체에서 내인성 유전자의 발현을 유도하지 않는다. 일부 실시양태에서, 유도 조건은 유도인자, 조사(예컨대, 이온화 방사선, 광), 온도(예컨대, 열), 산화환원 상태, 종양 환경, 및 조작된 포유동물 세포의 활성화 상태로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0209] 통상의 기술자는 표적 세포가, 비제한적으로, 특이적, 유도성, 조직-특이적, 또는 세포 사이클-특이적인 종인 프로모터를 포함한 특이적 프로모터를 요구할 수 있다는 것을 인식할 수 있다(Parr *et al.*, Nat. Med. 3:1145-9 (1997); 이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨). 일 실시양태에서, 프로모터는 본원에 기재된 폴리뉴클레오티드의 발현을 구동하기 위해 효과적인 것으로 여겨지는 프로모터이다. 대부분의 조직에서 발현을 촉진하는 프로모터는 예를 들어, 비제한적으로, 인간 연장 인자 1 $\alpha$ -서브유닛(EF1 $\alpha$ ), 즉시-초기 거대세포바이러스(CMV), RSV LTR, MoMLV LTR, 포스포글리세레이트 키나아제-1(PGK) 프로모터, 유인원 바이러스 40(SV40) 프로모터 및 CK6 프로모터, 트랜스티레틴 프로모터(TTR), TK 프로모터, 테트라사이클린 반응성 프로모터(TRE), HBV 프로모터, hAAT 프로모터, LSP 프로모터, 키메라 간-특이적 프로모터(LSP), 텔로머라아제(hTERT) 프로모터, 닭  $\beta$ -액틴(CBA) 및 이의 유도제 CAG 및 miniCBA,  $\beta$  글루쿠로니다아제(GUSB), 또는 유비퀴틴 C(UBC)를 포함한다. 조직-특이적 발현 요소가 사용되어, 특정 세포 유형, 예컨대, 비제한적으로, 신경계 프로모터로의 발현을 제한할 수 있으며, 이는 뉴런, 별아교세포, 또는 희소돌기신경교로로의 발현을 제한하기 위해 사용될 수 있다. 뉴런에 대한 조직-특이적 발현 요소의 비-제한적인 예는 뉴런-특이적 에놀라아제(NSE), 혈소판-유래된 성장 인자(PDGF), 혈소판-유래된 성장 인자 B-쇄(PDGF- $\beta$ ), 시냅신(Syn), 메틸-CpG 결합 단백질 2(MeCP2), CaMKII, mGluR2, NFL, NFH, n $\beta$ 2, PPE, Enk 및 EAAT2 프로모터를 포함한다. 상술한 프로모터는 다른 합성 짧은 조절 요소와 조합되어, DNA 서열에 중심 상동성을 갖는 신규한 합성 프로모터를 생성할 수 있다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 프로모터는 뉴런 세포에서 이중 핵산을 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 운동 뉴런 세포에서 이중 핵산을 발현할 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 별아교세포에서 이중 핵산을 발현할 수 있다. 일부 실시양태에 따르면, 프로모터는 뉴런 세포에 대해 특이적인 합성 조절 요소와 조합된 인간 시냅신 1(hSyn) 프로모터, 또는 hSyn이다. 일부 실시양태에 따르면, 프로모터는 별아교세포에 대해 특이적인 합성 조절 요소와 조합된 신경교 섬유 산성 단백질(GFAP) 또는 EAAT2 프로모터 또는 GFAP 또는 EAAT2이다.
- [0211] 일 실시양태에서, 핵산 구축물은, 비제한적으로, 합성 제어 요소와 조합된 CMV 또는 U6, 또는 CMV 또는 U6과 같은 프로모터를 포함한다. 비-제한적인 예로서, 본 rAAV 벡터에서 프로모터는 CBA 또는 miniCBA 프로모터이다. 다른 비-제한적인 예로서, 본 rAAV 벡터에서 프로모터는 변형된 miniCBA 프로모터이다. 일 실시양태에서, rAAV 벡터는 조작된 프로모터를 갖는다. 일 실시양태에서, rAAV 벡터는 합성 인핸서 요소를 추가로 포함한다.
- [0212] 일 실시양태에서, 벡터 계놈은 포유동물 계놈으로부터의 변형된 서열을 갖는 인트론, 또는 합성 인트론과 같은 트랜스유전자 표적 특이성 및 발현을 향상시키기 위한 적어도 하나의 요소(예를 들어, Powell *et al.* Viral Expression Cassette Elements to Enhance Transgene Target Specificity and Expression in Gene Therapy,

2015 참고; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)를 포함한다. 인트론의 비-제한적인 예는 MVM(67-97 bps), F.IX 절단된 인트론 1(300 bps),  $\beta$ -글로빈 SD/면역글로불린 중쇄 스플라이스 수용체(250 bps), 아데노바 이러스 스플라이스 공여체/면역글로빈 스플라이스 수용체(500 bps), SV40 후기 스플라이스 공여체/스플라이스 수용체(19S/16S)(180 bps), 및 하이브리드 아데노바 이러스 스플라이스 공여체/IgG 스플라이스 수용체(230 bps)를 포함한다. 일 실시양태에서, 인트론은 길이가 100-500 개 뉴클레오티드일 수 있다. 인트론은 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490 또는 500 개의 길이를 가질 수 있다. 프로모터는 80-100, 80-120, 80-140, 80-160, 80-180, 80-200, 80-250, 80-300, 80-350, 80-400, 80-450, 80-500, 200-300, 200-400, 200-500, 300-400, 300-500, 또는 400-500의 길이를 가질 수 있다.

[0213] 일부 실시양태에서, 벡터는 또한 선택가능 마커 유전자 또는 리포터 유전자를 함유하여, 벡터를 통해 형질주입된 숙주 세포의 집단으로부터 단백질을 발현하는 세포를 선택할 수 있다. 선택가능 마커 및 리포터 유전자 둘 다는 적절한 조절 서열의 측면에 있어, 숙주 세포에서 발현을 가능하게 한다. 예를 들어, 벡터는 핵산 서열의 발현의 조절을 위해 유용한 전사 및 번역 종결자, 개시 서열, 및 프로모터를 함유할 수 있다.

[0214] **5.3.2. 재조합체 AAV 벡터**

[0215] 특정 더욱 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 핵산은 AAV 기반 시스템에 의해 전달되고, 따라서 재조합체 AAV 벡터에 포함된다.

[0216] 임의의 AAV 혈청형 또는 이의 변이체가 본 발명에서 사용될 수 있다. AAV 혈청형은, 비제한적으로, AAV1(Genbank 등록번호 NC\_002077.1; HC000057.1), AAV2(Genbank 등록번호 NC\_001401.2, JC527779.1), AAV2i8(Asokan, A., 2010, Discov. Med. 9:399), AAV3(Genbank 등록번호 NC\_001729.1), AAV3-B(Genbank 등록번호 AF028705.1), AAV4(Genbank 등록번호 NC\_001829.1), AAV5(Genbank 등록번호 NC\_006152.1; JC527780.1), AAV6(Genbank 등록번호 AF028704.1; JC527781.1), AAV7(Genbank 등록번호 NC\_006260.1; JC527782.1), AAV8(Genbank 등록번호 NC\_006261.1; JC527783.1), AAV9(Genbank 등록번호 AX753250.1; JC527784.1), AAV10(Genbank 등록번호 AY631965.1), AAVrh10(Genbank 등록번호 AY243015.1), AAV11(Genbank 등록번호 AY631966.1), AAV12(Genbank 등록번호 DQ813647.1), AAV13(Genbank 등록번호 EU285562.1), AAV LK03, AAVrh74, AAV DJ(Wu Z, et al., J Virol. 80:11393-7(2006)), AAVAnc81, Anc82, Anc83, Anc84, Anc110, Anc113, Anc126, 또는 Anc127(Zin, E. et al., Cell. Rep. 12:1056(2016)), AAV\_go.1(Arbetum, A.E. et al., J. Virol. 79:15238(2005)), AAVhu.37, AAVrh8, AAVrh8R, 및 AAV rh.8(Wang et al., Mol. Ther. 18:119-125(2010), 또는 이의 변이체를 포함할 수 있다.

[0217] AAV 변이체는, 비제한적으로, AAV1 변이체(예를 들어, AAV1 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV2 변이체(예를 들어, AAV2 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV3 변이체(예를 들어, AAV3 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV3-B 변이체(예를 들어, AAV3-B 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV4 변이체(예를 들어, AAV4 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV5 변이체(예를 들어, AAV5 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV6 변이체(예를 들어, AAV6 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV7 변이체(예를 들어, AAV7 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV8 변이체(예를 들어, AAV8 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAVrh8, AAVrh8R(예를 들어, AAVrh8 또는 AAVrh8R 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV9 변이체(예를 들어, AAV9 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV10 변이체(예를 들어, AAV10 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAVrh10 변이체(예를 들어, AAVrh10 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV11 변이체(예를 들어, AAV11 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV12 변이체(예를 들어, AAV12 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV13 변이체(예를 들어, AAV13 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), AAV LK03 변이체(예를 들어, AAV LK03 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV), 또는 AAVrh74 변이체(예를 들어, AAVrh74 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV)를 포함한다.

[0218] 본 발명에 사용되는 재조합체 AAV(rAAV) 벡터는 알려진 기술에 따라 구축될 수 있다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 전사의 방향으로 작동가능하게 연결된 구성요소, 전사 개시 영역, 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 및 전사 종결 영역을 포함한 제어 요소를 포함하도록 구축된다. 제어 요소는 관심 세포에 기초하여 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 작동가능하게 연결된 구성요소를 포함하는 생성된 rAAV 벡터 구축물은 기능적 AAV ITR 서열과 측면에 있다(5' 및 3').

[0219] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 폴리펩티드(예를 들어, SMN 단백질을 코딩함)은 적어도 하나의 조절 서열에

작동가능하게 연결된다. 특정 실시양태에서, 조절 서열은 예를 들어, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 예를 들어 상부 인핸서 서열(USE), RNA 가공 신호, 예를 들어 스플라이싱 신호, 폴리아데닐화 신호 서열, 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열, 전사후 조절 요소(PRE) 및/또는 마이크로RNA(miRNA) 표적 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 조절 서열은 번역 효율을 향상시키는 서열(예를 들어, Kozak 서열), 단백질 안정성을 향상시키는 서열, 및/또는 단백질 가공 및/또는 분비를 향상시키는 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 조절 miRNA를 코딩할 수 있다.

[0220] 특정 실시양태에서, 조절 서열은 구성적 프로모터 및/또는 조절 제어 요소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조절 서열은 조절가능 프로모터 및/또는 조절 제어 요소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조절 서열은 유비쿼터스 프로모터 및/또는 조절 제어 요소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조절 서열은 세포- 또는 조직-특이적 프로모터 및/또는 조절 제어 요소를 포함한다. 특정 실시양태에서, 조절 제어 요소는 단백질의 코딩 서열의 5'에 있다(즉, '5 비번역 영역; 5' UTR에 존재함). 다른 실시양태에서, 조절 제어 요소는 단백질의 코딩 서열의 3'에 있다(즉, '3 비번역 영역; 53 UTR에 존재함). 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 하나 초과인 조절 제어 요소를 포함하며, 예를 들어 2, 3, 4 또는 5 개 제어 요소를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드가 하나 초과인 제어 요소를 포함하는 경우에, 각각의 제어 요소는 독립적으로 단백질의 코딩 서열의 5', 3', 측면, 또는 내부에 있을 수 있다.

[0221] 특정 실시양태에서, 제어 요소는 인핸서이다. 일부 실시양태에서, 포함된 제어 요소는 *생체내*에서 대상체에서 단백질의 폴리뉴클레오티드의 전사 또는 발현을 지시한다. 제어 요소는 보통 관심 있는 선택된 폴리뉴클레오티드와 연관된 제어 서열 또는 대안적으로 이중 제어 서열을 포함할 수 있다.

[0222] 예시적 제어 서열은 뉴런-특이적 에놀라아제 프로모터, a GFAP 프로모터, SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터, 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(Ad MLP); 단순 포진 바이러스(HSV) 프로모터, 거대세포바이러스(CMV) 프로모터, 예컨대 CMV 즉시 초기 프로모터 영역(CMVIE), 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, 합성 프로모터, 및 하이브리드 프로모터와 같이 포유동물 또는 바이러스 유전자를 코딩하는 서열로부터 유래된 것을 포함한다.

[0223] 특정 실시양태에서, 프로모터는 세포- 또는 조직-특이적이지 않으며, 예를 들어 프로모터는 유비쿼터스 프로모터인 것으로 고려된다. 다중 세포 또는 조직 유형에서 발현을 촉진할 수 있는 프로모터 서열의 예는 예를 들어, 인간 연장 인자 1a-서브유닛(EF1a), 거대세포바이러스(CMV) 즉시-초기 인핸서 및/또는 프로모터, 닭 베타-액틴(CBA) 및 이의 유도체, 예를 들어, CAG, 예를 들어 S40 인트론을 갖는 CBA 프로모터, 베타 글루쿠로니다아제(GUSB), 또는 유비쿼터스 C(UBC)를 포함한다.

[0224] 특정 실시양태에서, 프로모터 서열은 특정 세포 유형 또는 조직에서 발현을 촉진할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, 프로모터는 근육-특이적 프로모터일 수 있으며, 예를 들어 포유동물 근육 크레아틴 키나아제(MCK) 프로모터, 포유동물 데스민(DES) 프로모터, 포유동물 트로포닌 I(TNNI2) 프로모터, 또는 포유동물 골격 알파-액틴(ASKA) 프로모터일 수 있다. 다른 실시양태에서, 프로모터 서열은 뉴런 세포 또는 세포 유형에서 발현을 촉진할 수 있으며, 예를 들어 뉴런-특이적 에놀라아제(NSE), 시냅신(Syn), 메틸-CpG 결합 단백질 2(MeCP2), Ca<sup>2+</sup>/칼모듈린-의존적 단백질 키나아제 II(CaMKII), 대사형 글루타메이트 수용체 2(mGluR2), 신경미세섬유 경쇄(NFL) 또는 중쇄(NFH), 베타-글로빈 꼬마유전자 hb2, 프리프로엔케팔린(PPE), 엔케팔린(Enk) 또는 흥분 아미노산 수송체 2(EAAT2) 프로모터일 수 있다. 다른 실시양태에서, 프로모터 서열은 간에서 발현을 촉진할 수 있으며, 예를 들어 알파-1-항트립신(hAAT) 또는 티록신 결합 글로불린(TBG) 프로모터일 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 프로모터 서열은 심장 조직에서 발현을 촉진할 수 있으며, 예를 들어 심근세포-특이적 프로모터, 예컨대 MHC, cTnT, 또는 CMV-MUC2k 프로모터일 수 있다.

[0225] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 적어도 하나의 폴리아데닐화(polyA) 신호 서열을 포함할 수 있으며, 이는 당업계에 잘 알려져 있다. 폴리아데닐화 서열이 존재하는 경우에, 이는 일반적으로 트랜스유전자 코딩 서열의 3' 말단과 3' ITR의 5' 말단 사이에 위치한다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 polyA 신호 서열의 5'에 polyA 상부 인핸서 서열을 추가로 포함한다. 특정 사례에서, 조절 서열은 번역 효율을 증가시키는 서열, 예를 들어 Kozak 서열이다.

[0226] 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 인트론을 포함한다. 특정 실시양태에서, 인트론은 본원에 제공된 단백질의 코딩 서열 내에 존재한다. 특정 실시양태에서, 인트론은 단백질의 코딩 서열의 5' 또는 3'에 있다. 특정 실시양태에서, 인트론은 단백질의 코딩 서열의 5' 또는 3' 말단의 측면에 있다. 특정 실시양태에서, 폴리뉴클레오티드는 2 개의 인트론을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나의 인트론은 단백질의 코딩 서열의 5'에 있고 하

나의 인트론은 단백질의 코딩 서열의 3'에 있다. 특정 실시양태에서, 하나의 인트론은 단백질의 코딩 서열의 5' 말단의 측면에 있고 제2 인트론은 단백질의 코딩 서열의 3' 말단의 측면에 있다. 특정 실시양태에서, 인트론은 SV40 인트론, 예를 들어 5' UTR SV40 인트론이다.

[0227] 당업계에서 알려진 AAV ITR의 서열이 본 rAAV 벡터에서 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 벡터에서 사용되는 AAV ITR은 야생형 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 다른 실시양태에서, 본 벡터에서 사용되는 AAV ITR 서열은 야생형 서열이 아니며, 대신에 이는 예를 들어, 뉴클레오티드의 삽입, 결실 또는 치환을 포함한다. 본원에 제공된 AAV ITR은, 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9, 또는 이의 변이체를 포함한 임의의 AAV 혈청형으로부터 유래될 수 있다.

[0228] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 뉴클레오티드 서열의 측면에 있는 5' 및 3' ITR은 동일하고, 동일한 AAV 혈청형으로부터 유래된다. 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 뉴클레오티드 서열의 측면에 있는 5' 및 3' ITR은 상이하고/하거나 상이한 AAV 혈청형으로부터 유래된다.

[0229] 일부 실시양태에서, AAV ITR의 측면에 있는 단백질의 폴리뉴클레오티드를 포함하는 rAAV 벡터는 AAV 게놈 내로, 예를 들어 여기된 AAV 개방 관독 프레임 내로 관심 폴리뉴클레오티드를 직접 삽입함으로써 구축될 수 있으며, 예를 들어 WO 1993/003769호; Kotin (1994) Human Gene Therapy 5:793-801; Shelling and Smith (1994) Gene Therapy 1:165-169; 및 Zhou et al. (1994) J. Exp. Med. 179:1867-1875에 기재된 바와 같이 AAV 게놈의 특정 부분이 선택적으로 결실될 수 있다.

[0230] 다른 실시양태에서, AAV ITR은 AAV 게놈으로부터 또는 이러한 ITR을 함유하는 AAV 벡터로부터 여기된 다음에, 표준 결찰 기술을 사용하여 다른 벡터에 존재하는 단백질의 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 및 3'에 융합된다.

[0231] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터는 재조합체 자가-보완 게놈을 포함한다. 자가-보완 게놈을 포함하는 rAAV는 보통 이의 부분적 보완 서열(예를 들어, 트랜스유전자의 보완 코딩 및 비-코딩 가닥)에 의해 이중 가닥 DNA 분자를 신속하게 형성할 수 있다. 더욱 구체적으로, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터는 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 치료 트랜스유전자 코딩 가닥) 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 치료 트랜스유전자의 비코딩 또는 안티센스 가닥)을 포함하는 rAAV 게놈을 포함하며, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 제2 폴리뉴클레오티드 서열과 가닥내 염기 쌍을 형성할 수 있다. 일부 실시양태에서, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 가닥내 염기-페어링, 예를 들어 헤어핀 DNA 구조를 가능하게 하는 서열에 의해 연결된다. 일부 실시양태에서, 제1 이중 폴리뉴클레오티드 서열 및 제2 이중 폴리뉴클레오티드 서열은 돌연변이된 ITR에 의해 연결되어, rep 단백질은 돌연변이된 ITR에서 바이러스 게놈을 절단하지 않는다. 자가-보완 게놈을 포함하는 rAAV 벡터는 예를 들어, 미국 특허 제7,125,717호; 제7,785,888호; 제7,790,154호; 제7,846,729호; 제8,093,054호; 및 제8,361,457호에 기재된 바와 같이 당업계에 알려진 방법을 사용하여 제조될 수 있다.

[0232] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 5 킬로베이스(kb) 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 4.5 킬로베이스(kb) 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 4.0 킬로베이스(kb) 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 3.5 킬로베이스(kb) 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 3.0 킬로베이스(kb) 미만이다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 벡터에서 폴리뉴클레오티드 분자는 크기가 약 2.5 킬로베이스(kb) 미만이다.

[0233] 일 양태에서, 본원은 (i) 트랜스유전자를 포함하는 제1 핵산 영역; 및 (ii) 하나 이상의 내인성 miRNA(들)의 하나 이상의 표적 세그먼트(들)를 포함하는 제2 핵산 영역을 포함하고, 적어도 하나의 표적 세그먼트가 심장내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고, 적어도 하나의 표적 세그먼트가 간내 내인성 miRNA의 표적 세그먼트이고; 제2 핵산 영역이 제1 핵산 영역의 3'에 있고; rAAV 벡터가 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, 또는 AAV44-9로부터의 역위 말단 반복부(ITR)를 포함하는, 재조합체 AAV(rAAV) 벡터를 제공한다. 일부 실시양태에서, 제1 핵산은 SMN 또는 이의 변이체를 코딩한다.

[0234] 일부 구체적 실시양태에서, 본 rAAV 벡터에서 제2 핵산 영역은 서열번호 18과 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을



실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV7로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV8로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAVrh8로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAVrh8R로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV9로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV10으로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAVrh10으로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV11로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV12로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV13으로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV-DJ로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAV LK03으로부터의 ITR을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 AAVrh74로부터의 ITR을 포함한다.

[0238] 일부 더욱 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 22의 핵산 서열, 또는 서열번호 22와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0239] 일부 더욱 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 23의 핵산 서열, 또는 서열번호 23과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0240] 일부 더욱 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 24의 핵산 서열, 또는 서열번호 24와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0241] 일부 더욱 구체적 실시양태에서, 본원은 서열번호 25의 핵산 서열, 또는 서열번호 25와 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는 벡터를 제공한다.

[0242] **5.3.3. 재조합체 AAV 입자**

[0243] 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 핵산, 및 적어도 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합체 AAV(rAAV) 또는 rAAV 입자를 제공한다. 핵산은 상기 섹션 5.2 및 5.3.2에 기재된 임의의 핵산 및 rAAV 벡터를 포함한다.

[0244] 캡시드 단백질은 ITR과 동일한 혈청형, 또는 이의 유도체로부터 유래될 수 있다. 캡시드는 또한 ITR과 상이한 혈청형의 것일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시양태에서, AAV 입자는 AAV2 ITR 및 AAV6 캡시드(AAV 2/6), AAV2 ITR 및 AAV7 캡시드(AAV 2/7), AAV2 ITR 및 AAV8 캡시드(AAV 2/8), 또는 AAV2 ITR 및 AAV9 캡시드(AAV 2/9)를 포함한다.

[0245] 천연 발생 AAV 캡시드는 AAV VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함하며, 이는 각각 AAV *cap* 유전자의 스플라이스 변이체에 의해 코딩된다. 일반적으로, AAV 입자는 3 개의 단백질, VP1, VP2 및 VP3을 포함하고, VP2 및 VP3은 VP1의 절단된 버전이어서, VP1로 또한 구성되는 서열을 갖는다. 일반적으로, VP1의 아미노산 서열은 캡시드의 혈청형을 정의한다. 따라서, 예를 들어, VP1 캡시드 단백질이 AAV2 VP1 단백질을 코딩하는 경우, AAV는 AAV2 혈청형의 것일 것인 반면, VP1 캡시드 단백질이 AAV8 VP1 단백질을 코딩하는 경우, AAV는 AAV8 혈청형의 것일 것이다.

[0246] 일부 실시양태에서, 본 rAAV 입자에서 AAV 캡시드 단백질(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3)은 천연 발생 캡시드 단백질이 아니다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3)은 천연 발생 캡시드 단백질로부터 유래된다.

[0247] 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 VP1 캡시드 단백질이다. 다른 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 VP2 캡시드 단백질이다. 다른 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 VP3 캡시드 단백질이다. 일부 실시양태에서, rAAV 입자는 VP1 캡시드 단백질, VP2 캡시드 단백질 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 다른 실시양태에서, rAAV 입자는 VP1 캡시드 단백질, VP2 캡시드 단백질 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV 입자는 VP1 캡시드 단백질, VP2 캡시드 단백질 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함하며, rAAV 입자의 캡시드 단백질은 동일한 혈청형의 것이다. 다른 실시양태에서, rAAV 입자는 VP1 캡시드 단백질, VP2 캡시드 단백질 및 VP3 캡시드 단백질을 포함하며, AAV 입자의 캡시드 단백질은 동일한 혈청형의 것이다.

[0248] 특정 양태에서, 캡시드 단백질은 변이체 캡시드 단백질이다. 변이체 캡시드 단백질은 대응하는 기준 캡시드 단백질, 예컨대 천연 발생 부모 캡시드 단백질, 즉 그것이 유래된 캡시드 단백질과 비교하여, 하나 이상의 돌연변이, 예를 들어 아미노산 치환, 아미노산 결실, 및 이중 펩티드 삽입을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질의 아미노산 서열은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 개 아미노산 잔기를 제외하고, 예를 들어 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 또는 30 개 아미노산 잔기 치환을 제외하고 야생형, 또는 기준, 또는 부모 AAV 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 동일하다. 일부

실시양태에서, 본원에 기재된 캡시드 단백질 또는 AAV 입자는 각각 2 이상의 AAV 혈청형 캡시드 단백질 또는 입자의 단백질 서열을 각각 포함하는 키메라 캡시드 단백질 또는 AAV 입자일 수 있다.

- [0249] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 입자에서 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 캡시드 단백질로부터 유래된다. 구체적인 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 입자에서 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV2i8, AAV3, AAV3-B, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAVrh8, AAVrh8R, AAV9, AAV10, AAVrh10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV-DJ, AAV LK03, AAVrh74, AAV44-9 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 갖는다.
- [0250] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV1의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0251] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV2의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0252] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV2i8의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0253] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV3의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0254] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV3-B의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0255] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV4의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0256] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV5의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0257] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV6의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0258] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV7의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0259] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV8의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도



VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.

[0271] 특정 실시양태에서, 본원에 제공된 AAV 입자는 AAV44-9의 VP1, VP2 또는 VP3 아미노산 서열 중 임의의 것과 적어도 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5%, 99.6%, 99.7%, 99.8% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질 서열을 포함하는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.

[0272] 일부 구체적 실시양태에서, 본원에 제공된 rAAV 입자는 본원에 제공된 관심 단백질을 코딩하는 핵산 및 서열번호 26, 서열번호 27, 서열번호 28, 서열번호 29, 서열번호 30, 서열번호 31 또는 서열번호 32의 아미노산 서열을 포함하는 AAV의 VP1을 포함한다. 구체적 실시양태에서, VP1은 서열번호 29의 아미노산 서열을 포함한다.

표 4. 예시적 VP1, VP2 및 VP3 단백질

AAV	서열	서열번호
AAV2 (UniProt: P03135-1)	MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPGPPP PKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG	서열번호 26
VP1: 아미노산 1-735	EPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKY NHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKR	
VP2: 아미노산 138-735	VLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSS GTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPDQPL	
VP3: 아미노산 203-735	GQPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGAD GVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALP TYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGY	

[0273]

	<p>EDFNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRPKRLNF          KLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD          SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYG          YLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN          FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY          LYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS          RNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGA          TKYHLNGRDSLVPNPAMASHKDDEEKFFPQ          SGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN          PVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV          LPGMVWQDRDVYLGPIWAKIPHDTGHFHPS          PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAA          KFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP          EIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGT          RYLTRNL</p>	
<p>AAV8          (Uniprot          Q8JQF8_9VIRU)          VP1: 아미노산          1-738;          VP2: 아미노산          138-738;          VP3: 아미노산          204-738.</p>	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAP          KPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDK          GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYL          RYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAK          KRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRSP          DSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDSESVDPDP          QPLGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNE          GADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTW          ALPTYNNHLYKQISNGTSGGATNDNTYFGYST          PWGYFDNRFHCHFSRPDWQRLINNNWGFRP          KRLSFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQ          VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIP          QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT          GNNFQFTYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPL          IDQYLYLSRTQTTGGTANTQTLGFSQGGPNT          MANQAKNWLPGPCYRQQRVSTTTGQNNNSN          FAWTAGTKYHLNGRNSLANPGIAMATHKDDE          ERFPPSNGILIFGKQNAARDNADYSDVMLTSE</p>	<p>서열번호 27</p>

[0274]

	EEIKTTNPVATEEYGIVADNLQQQNTAPQIGTV NSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDG NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPT TFNQSKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS RWNPEIQYTSNYYKSTSVDFAVNTEGVYSEPR PIGTRYLTRNL	
AAVrh8 (Uniprot Q808Y3_9VIRU)  VP1: 아미노산 1-736  VP2: 아미노산 138-736  VP3: 아미노산 203-736	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAP KPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDK GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYL RYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAK KRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPD SSSGIGKTGQQPAKKRLNFGQTGDSESVDPDQ PLGEPAAAPSGLGPNTMASGGGAPMADNNEG ADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWA LPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTP WGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK RLNFKLFNIQVKEVTTNEGTKTIANNLTSTVQ VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVP QYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRT GNNFQFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI DQYLYLVRTQTTGTGGTQTLAFSQAGPSSM ANQARNWVPGPCYRQQRVSTTTNQNNSNFA WTGAAKFKLNGRDSLMNPGVAMASHKDDDD RFFPSSGVLIFGKQGAGNDGVDYSQVLITDEEE IKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLV HNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDG NFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPL TFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEP RPIGTRYLTRNL	서열번호 28
AAV9 (Uniprot Q6JC40_9VIRU)	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAP QPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLD KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPY	서열번호 29

[0275]

<p>VP1: 아미노산 1-736</p> <p>VP2: 아미노산 138-736</p> <p>VP3: 아미노산 203-736</p>	<p>LKYNHADAIEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQA KKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEP DSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDP QPIGEPPAAPSGVGSMTMASGGGAPVADNNEG ADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVITSTRTWA LPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTP WGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRPK RLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQ VFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIP QYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT GNNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQLDRLMNPLI DQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNM AVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFA WPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGED RFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEE EIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGW VQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTD GNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPP TAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN SKRWNPEIQYTSNYYKSNVFEAVNTEGVYSE PRPIGTRYLTRNL</p>	
<p>AAVrh10 (Uniprot Q808W5_9VIRU)</p> <p>VP1: 아미노산 1-738;</p> <p>VP2: 아미노산 138-738;</p> <p>VP3: 아미노산 204-738.</p>	<p>MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAP KPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDK GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYL RYNHADAIEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAK KRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEPSPQRS DSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSEVPDP QPIGEPPAGPSGLGSGTMAAGGAPMADNNE GADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTW ALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFRP KRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNLTSTIQ VFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIP</p>	<p>서열번호 30</p>

[0276]

	<p>QYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRT                  GNNFEFSYQFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLI                  DQYLYYLSRTQSTGGTAGTQQLFSQAGPNN                  MSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTLSQNNNSNF                  AWTGATKYHLNGRDSL VNPVAMATHKDDE                  ERFFPSSGVL MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTS                  EEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVG                  AVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHT                  DGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP                  PTTFSQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKEN                  SKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTDGTYS                  PRPIGTRYLTRNL</p>	
<p>AAV2v                  VP1: 아미노산                  1-735                   VP2: 아미노산                  138-735;                   VP3: 아미노산                  204-735</p>	<p>MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPP                  PKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKG                  EPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKY                  NHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKR                  VLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSS                  GTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPL                  GQPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGAD                  GVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALP                  TYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGY                  FDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGRPKRLNF                  KLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTD                  SEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYG                  YLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN                  FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQY                  LYFLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS                  RNWLPGPCYRQQGVSKVSADNNNSEFSWTGA                  TKYHLNGRDSL VNPVAMASHKDDEEKFFPQ                  SGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTN                  PVATEQYGSVSTNLQSGNTQAATADVNTQGV                  LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPS</p>	<p>서열번호 31</p>

[0277]

	PLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRFLTRNL	
AAV44-9 VP1: 아미노산 1-736 VP2: 아미노산 138-736; VP3: 아미노산 204-736	MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDDGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEGAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSSGIGKGTQQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPLGEPAAAPSGLGPNTMASGGGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWA LPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTTNEGKTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQALGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYTFEDVFPFHSSYAHSQLDRLMNPLIDQYLYLVRTQTGTGGTQTLAFSQAGPSNMASQARNWVPGPSYRQQRVSTTTNQNNNSNFAWTGAAKFKLNGRDSLMPGVAMASHKDDERFFPSSGVLIFGKQGAGNDGVDYSQVLITDEEIIKATNPVATEEYGAVAINNQAANTQAQTGLVHNQGVIPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPLTFNQAKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL	서열번호 32

[0278]

[0279]

본원에 기재된 rAAV 입자는 당업계에 알려진 임의의 적합한 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 예를 들어, 숙주 세포(예를 들어, 포유동물 세포)는 AAV 입자 생산을 위해 필요한 구성요소를 안정적으로 발현하도록 조작될 수 있다. 이는 AAV rep 및 cap 유전자를 포함하는 플라스미드(또는 다중 플라스미드), 및 선택가능 마커, 예컨대 항생제(예를 들어, 네오마이신 또는 앰피실린) 저항성 유전자를 세포의 게놈 내로 통합함으로써 달성될 수 있다. 세포는 예를 들어, 곤충 또는 포유동물 세포일 수 있으며, 이는 그 다음에 헬퍼 바이러스(예를 들어, 헬퍼 기능을 제공하는 아데노바이러스 또는 바칼로바이러스) 및 5' 및 3' AAV ITR을 포함하는 rAAV 벡터로 공동-감염될 수 있다. 선택가능 마커의 사용은 rAAV의 대규모 생산을 허용한다. 다른 비-제한적인 예로서, 플라스미드 이외의 아데노바이러스 또는 바칼로바이러스가 사용되어, rep 및 cap 유전자를 패키징 세포 내로 도입할 수 있다. 또 다른 비-제한적인 예로서, 5' 및 3' AAV ITR 및 rep 및 cap 유전자를 함유하는 바이러스 벡터 둘 다는 생산자 세포의 DNA 내로 안정적으로 통합될 수 있으며, 헬퍼 기능이 야생형 아데노바이러스에 의해 제공되어, rAAV를 생산할 수 있다.

[0280]

AAV에 대한 헬퍼 바이러스는 AAV가 숙주 세포에 의해 복제되고 패키징되게 하는 바이러스를 지칭한다. 헬퍼 바이러스는 AAV의 복제를 허용하는 헬퍼 기능을 제공한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 폭스바이러스, 예컨대 백시니아를 포함한 다수의 이러한 헬퍼 바이러스가 확인되었다. 아데노바이러스는 다수의 상이한 서브그룹을 포함하지만, 서브그룹 C의 아데노바이러스 5형(Ad5)이 대부분 일반적으로 사용된다. 인간, 비-인간 포유동물 및 조류 기원의 많은 아데노바이러스가 알려져 있으며, ATCC와 같은 보관소로부터 이용가능하다. ATCC와 같은 보관소로부터 또한 이용가능한 헤르페스 패밀리의 바이러스는 예를 들어, 단순 포진 바이러스(HSV), 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스(EBV), 거대세포바이러스(CMV) 및 가성광견병 바이러스(PRV)를 포함한다. AAV의 복제를 위한 아데노바이러스 헬퍼 기능의 예는 E1A 기능, E1B 기능, E2A 기능, VA 기능 및 E4orf6 기능을 포함

한다.

- [0281] AAV의 제제는 감염성 AAV 입자 대 감염성 헬퍼 바이러스 입자의 비가 적어도 약 102: 1; 적어도 약 104: 1, 적어도 약 106: 1; 또는 적어도 약 108: 1인 경우, 헬퍼 바이러스가 실질적으로 없는 것으로 지칭된다. 제제는 또한 동등한 양의 헬퍼 바이러스 단백질(즉, 상기 언급된 헬퍼 바이러스 입자 불순물이 파괴된 형태로 존재했던 경우, 이러한 수준의 헬퍼 바이러스의 결과로서 존재할 단백질)이 없을 수 있다. 바이러스 및/또는 세포 단백질 오염은 일반적으로 SDS 겔 상의 쿠마시(Coomassie) 염색 밴드의 존재(예를 들어, AAV 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3에 대응하는 것 이외의 밴드의 출현)로서 관찰될 수 있다.
- [0282] 특정 실시양태에서, 상기 기재된 rAAV 벡터를 함유하는 숙주 세포는 rAAV 입자를 생산하기 위해 AAV ITR의 측면에 있는 본원에 제공된 관심 단백질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 복제하고 캡슐화하는 AAV 헬퍼 기능을 제공할 수 있게 한다. AAV 헬퍼 기능은 일반적으로 결국 생산적 AAV 복제를 위해 트랜스로 기능하는 AAV 유전자 생산물을 제공하도록 발현될 수 있는 AAV-유래된 코딩 서열이다. AAV 헬퍼 기능은 본원에서 rAAV 벡터로부터 결손되는 필수 AAV 기능을 보완하기 위해 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 주요 AAV ORF, 소위 rep 및 cap 코딩 영역 중 하나, 또는 둘 다, 또는 이의 기능적 동족체를 포함한다.
- [0283] AAV 헬퍼 기능은 rAAV 벡터의 형질주입 전, 또는 그와 동시에 숙주 세포를 AAV 헬퍼 구축물로 형질주입함으로써 숙주 세포 내로 도입될 수 있다. 예를 들어, AAV 헬퍼 구축물이 사용되어, AAV rep 및/또는 cap 유전자의 적어도 일시적인 발현을 제공하여, 생산적 AAV 감염을 위해 필요한 결손 AAV 기능을 보완할 수 있다. 통상적으로, AAV 헬퍼 구축물은 AAV ITR이 결여되고 이들 자체를 복제하거나 패키징할 수 없다. AAV 헬퍼 구축물은 예를 들어, 플라스미드, 파지, 전이인자, 코스미드, 바이러스, 또는 비리온의 형태로 있을 수 있다.
- [0284] 특정 실시양태에서, 숙주 세포는 또한 rAAV 입자를 생산하기 위한 비 AAV-유래된 기능 또는 "부수 기능"을 제공할 수 있거나 제공받는다. 부수 기능은 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, Cap 발현 생산물 및 AAV 캡시드 어셈블리의 합성에 관련된 것을 포함하여, AAV 복제에 요구되는 비 AAV 단백질 및 RNA와 같이, AAV가 이의 복제를 위해 의존적인 비 AAV-유래된 바이러스 및/또는 세포 기능이다. 일부 실시양태에서, 바이러스-기반 부수 기능은 알려진 헬퍼 바이러스로부터 유래될 수 있다.
- [0285] 일부 실시양태에서, 헬퍼 바이러스 및/또는 부수 기능 벡터를 이용한 숙주 세포의 감염의 결과로서, 재조합체 AAV 입자가 생산되고, 생산된 rAAV 입자는 감염성, 복제-결합 바이러스이고, AAV ITR이 양측 상의 측면에 있는 관심 이중 뉴클레오티드 서열을 캡슐화하는 AAV 단백질 셀을 포함한다.
- [0286] rAAV 입자는 당업계에 알려진 정제 방법, 예컨대 크로마토그래피, CsCl 구배, 및 예를 들어, 미국 특허 제 6,989,264호 및 제8,137,948호 및 WO 2010/148143호에 기재된 바와 같은 다른 방법을 사용하여 숙주 세포로부터 정제될 수 있다. 일부 실시양태에서, 잔류 헬퍼 바이러스는 알려진 방법을 사용하여, 예를 들어 가열에 의해 비활성화될 수 있다.
- [0287] **5.3.4. 세포**
- [0288] 다양한 숙주 세포가 사용되어, 본원에 기재된 rAAV 입자를 생산할 수 있다. 본원에 제공된 폴리뉴클레오티드 및 AAV 벡터로부터 AAV 입자를 생산하기 위해 적합한 숙주 세포는 미생물, 효모 세포, 곤충 세포, 및 포유동물 세포를 포함한다. 통상적으로, 이러한 세포는 이중 핵산 분자의 수용체로서 사용될 수 있거나, 사용되었으며, 예를 들어 현탁 배양액 및 생물반응기에서 성장할 수 있다.
- [0289] 일부 실시양태에서, 세포는 포유동물 숙주 세포, 예를 들어 HEK293, HEK293-T, A549, WEHI, 10T1/2, BHK, MDCK, COS1, COS7, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, HeLa, 293, Jurkat, 2V6.11, Saos, C2C12, L, HT1080, HepG2, 일차 섬유아세포, 간세포, 및 근원세포이다.
- [0290] 다른 실시양태에서, 세포는 곤충 세포, 예를 들어 Sf9, SF21, SF900+, 또는 초파리 세포주, 모기 세포주, 예를 들어 *아에데스 알보피투스(Aedes albopictus)* 유래된 세포주, 사육 누에 세포주, 예를 들어 누에나방 세포주, *트리코플루시아 니(Trichoplusia ni)* 세포주, 예컨대 High Five 세포 또는 나비목 세포주, 예컨대 *아스칼라파 오도라타(Ascalapha odorata)* 세포주이다. 일부 실시양태에서, 곤충 세포는 High Five, Sf9, Se301, SeIZD2109, SeUCR1, Sf900+, Sf21, BTI-TN-5B1-4, MG-1, Tn368, HzAm1, BM-N, Ha2302, Hz2E5 및 Ao38을 포함하여, 바칼로바이러스 감염에 민감한 곤충 종으로부터의 세포이다. 예를 들어, Sf9 곤충 세포를 포함한 세포에서 재조합체 AAV의 대규모 생산은 Kotin RM. *Hum Mol Genet.* 20(R1):R2-R6 (2011) doi:10.1093/hmg/ddr141에 의해 기재되었다. 곤충 세포에서 폴리펩티드의 분자 조작 및 발현을 위한 방법론은 예를 들어, Summers and Smith. A Manual of Methods for Baculovirus Vectors and Insect Culture Procedures, Texas Agricultural

Experimental Station Bull. No. 7555, College Station, Tex. (1986); King, L. A. and R. D. Possee, The baculovirus expression system, Chapman and Hall, United Kingdom (1992); O'Reilly, D. R., L. K. Miller, V. A. Luckow, Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual, New York (1992); W.H. Freeman and Richardson, C. D., Baculovirus Expression Protocols, Methods in Molecular Biology, volume 39 (1995)에 기재되어 있다.

- [0291] **5.4. 약학 조성물**
- [0292] 일 양태에서, 본 발명은 본 발명의 벡터 또는 바이러스 입자를 포함하는 약학 조성물을 추가로 제공한다. 일부 실시양태에서, 약학 조성물은 본원에 제공된 벡터 또는 바이러스 입자의 치료적 유효량 및 약학적 허용 부형제를 포함한다.
- [0293] 일부 실시양태에서, 본원은 본원에 제공된 rAAV 벡터의 치료적 유효량 및 약학적 허용 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0294] 다른 실시양태에서, 본원은 본원에 제공된 rAAV 입자의 치료적 유효량 및 약학적 허용 부형제를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0295] 구체적 실시양태에서, 용어 "부형제"는 또한 희석제, 아쥘반트(예를 들어, 프로인트 아쥘반트(Freund's adjuvant)(완전 또는 불완전)), 담체 또는 비히클을 지칭할 수 있다. 약학적 부형제는 멸균액, 예컨대 물, 및 식유, 동물유, 식물유 또는 합성 기원의 것을 포함한 오일, 예컨대 땅콩유, 대두유, 광유, 참기름 등일 수 있다. 생리식염수 및 수성 텍스트로오스 및 글리세롤 용액이 또한 액체 부형제로서 이용될 수 있다. 적합한 약학적 부형제는 전분, 글루코오스, 락토오스, 수크로오스, 젤라틴, 맥아, 쌀, 밀가루, 백악, 실리카 겔, 소듐 스테아레이트, 글리세롤 모노스테아레이트, 탈크, 염화나트륨, 탈지분유, 글리세롤, 프로필렌, 글리콜, 물, 에탄올 등을 포함한다. 조성물은 소망하는 경우, 소량의 습윤제 또는 유회제, 또는 pH 완충제를 또한 함유할 수 있다. 이들 조성물은 용액, 현탁액, 에멀션, 정제, 알약, 캡슐, 분말, 지속-방출 제형 등의 형태를 취할 수 있다. 적합한 약학적 부형제의 예는 Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA 에 기재되어 있다. 이러한 조성물은 본원에 제공된 활성 성분의 예방적 또는 치료적 유효량을, 예컨대 정제된 형태로, 적합한 양의 부형제와 함께 함유하여, 환자에 대한 적절한 투여를 위한 형태를 제공할 것이다. 제형은 투여의 방식에 맞춤화되어야 한다.
- [0296] 일부 실시양태에서, 부형제의 선택은 부분적으로 특정 세포, 바이러스 입자, 및/또는 투여의 방법에 의해 결정된다. 따라서, 다양한 적합한 제형이 있다.
- [0297] 통상적으로, 허용 담체, 부형제, 또는 안정제는 이용되는 투여량 및 농도에서 수용체에 대해 비독성이고, 완충제, 아스코브산, 메티오닌, 비타민 E, 소듐 메타바이설파이트를 포함한 항산화제; 보존제, 등장제, 안정제, 금속 복합체(예를 들어, Zn-단백질 복합체); 킬레이트제, 예컨대 EDTA 및/또는 비-이온성 계면활성제를 포함한다.
- [0298] 특히, 안정성이 pH 의존적인 경우, 치료 효과를 최적화하는 범위로 pH를 제어하기 위해 완충제가 사용될 수 있다. 본 발명과 사용하기 위한 적합한 완충제는 유기 및 무기산 둘 다 및 이의 염을 포함한다. 예를 들어, 시트레이트, 포스페이트, 숙시네이트, 타르트레이트, 푸마레이트, 글루코네이트, 옥살레이트, 락테이트, 아세테이트. 또한, 완충제는 히스티딘 및 트리메틸아민 염, 예컨대 Tris를 포함할 수 있다.
- [0299] 보존제가 첨가되어, 미생물 성장을 지연시킬 수 있다. 본 발명과 사용하기에 적합한 보존제는 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 할라이드(예를 들어, 클로라이드, 브로마이드, 아이오다이드), 벤즈에토늄 클로라이드; 티메로살, 페놀, 부틸 또는 벤질 알코올; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 사이클로헥사놀, 3-펜타놀, 및 m-크레솔을 포함한다.
- [0300] 조성물 중 액체의 긴장성을 조정하거나 유지하기 위해, 때때로 "안정제"로 알려진 긴장제가 존재할 수 있다. 큰, 하전된 생체분자, 예컨대 단백질 및 항체와 사용될 때, 이들은 보통 "안정제"로 지칭되며, 이는 이들이 아미노산 측쇄의 하전된기와 상호작용하여, 이에 의해 분자간 및 분자내 상호작용에 대한 가능성을 감소시킬 수 있기 때문이다. 예시적 긴장제는 다가 당 알코올, 3가 이상 당 알코올, 예컨대 글리세린, 에리트리톨, 아라비톨, 자일리톨, 소르비톨 및 만니톨을 포함한다.
- [0301] 추가 예시적 부형제는 (1) 증량제, (2) 가용성 인핸서, (3) 안정제 및 (4) 변성 또는 용기 벽에 대한 부착을 예방하는 약제를 포함한다. 이러한 부형제는 다가 당 알코올(상기 열거됨); 아미노산, 예컨대 알라닌, 글리신, 글

루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌, 리신, 오르니틴, 류신, 2-페닐알라닌, 글루탐산, 트레오닌 등; 유기 당 또는 당 알코올, 예컨대 수크로오스, 락토오스, 락티톨, 트레할로오스, 스타키오스, 만노오스, 소르보스, 자일로스, 리보오스, 리비톨, 마이오이니시토오스, 마이오이니시톨, 갈락토오스, 갈락티톨, 글리세롤, 사이클리톨 (예를 들어, 이노시톨), 폴리에틸렌 글리콜; 황 함유 환원제, 예컨대 요소, 글루타티온, 티옥산, 소듐 티오글리콜레이트, 티오글리세롤, α-모노티오글리세롤 및 소듐 티오 설페이트; 저분자량 단백질, 예컨대 인간 혈청 알부민, 소 혈청 알부민, 젤라틴 또는 다른 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 모노사카라이드(예를 들어, 자일로스, 만노오스, 프룩토오스, 글루코오스); 디사카라이드(예를 들어, 락토오스, 말토오스, 수크로오스); 트리사카라이드, 예컨대 라피노오스; 및 폴리사카라이드, 예컨대 텍스트린 또는 텍스트란을 포함한다.

[0302] 치료제 가용화를 도울 뿐 아니라, 교반-유도된 응집에 대해 치료 단백질을 보호하기 위해 비-이온성 계면활성제 또는 세제("습윤제"로도 알려짐)가 존재할 수 있으며, 이는 또한 활성 치료 단백질의 변성을 야기하지 않으면서 제형을 전단 표면 응력에 노출시킨다. 적합한 비-이온성 계면활성제는 예를 들어, 폴리소르베이트(20, 40, 60, 65, 80 등), 폴리옥사머(184, 188 등), PLURONIC® 폴리올, TRITON®, 폴리옥시에틸렌 소르비탄 모노에테르(TWEEN®-20, TWEEN®-80 등), 라우로마크로콜 400, 폴리옥실 40 스테아레이트, 폴리옥시에틸렌 수산화된 피마자유 10, 50 및 60, 글리세롤 모노스테아레이트, 수쿠로오스 지방산 에스테르, 메틸 셀룰로오스 및 카복시메틸 셀룰로오스를 포함한다. 사용될 수 있는 음이온성 세제는 소듐 라우릴 설페이트, 디옥틸 소듐 설포숙시네이트 및 디옥틸 소듐 설포네이트를 포함한다. 양이온성 세제는 벤즈알코늄 클로라이드 또는 벤즈에토늄 클로라이드를 포함한다.

[0303] 약학 조성물이 생체내 투여를 위해 사용되기 위해, 이들은 바람직하게는 멸균이다. 약학 조성물은 멸균 여과 막을 통한 여과에 의해 멸균될 수 있다. 본원의 약학 조성물은 일반적으로 멸균 접속 포트를 갖는 용기, 예를 들어 피하 주사 바늘에 의해 찌를 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알 내에 위치할 수 있다.

[0304] 투여의 경로는 알려지고 허용되는 방법에 따른 것, 예컨대 적합한 방식으로 긴 기간에 걸친 단일 또는 다중 볼루스 또는 주입, 예를 들어 피하, 정맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 병변내 또는 관절내 경로, 유리체내, 망막내 주사, 국부 투여, 흡입에 의한 주사 또는 주입에 의한 것 또는 지속 방출 또는 연장-방출 수단에 의한 것이다.

[0305] 다른 실시양태에서, 약학 조성물은 제어 방출 또는 지속 방출 시스템으로서 제공될 수 있다. 일 실시양태에서, 펌프가 사용되어, 제어 또는 지속 방출을 달성할 수 있다(예를 들어, Sefton, Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201-40 (1987); Buchwald *et al.*, Surgery 88:507-16 (1980); and Saudek *et al.*, N. Engl. J. Med. 321:569-74 (1989) 참고). 다른 실시양태에서, 중합체 물질이 사용되어, 본원에 제공된 예방제 또는 치료제 또는 조성물의 제어 또는 지속 방출을 달성할 수 있다(예를 들어, Medical Applications of Controlled Release (Langer and Wise eds., 1974); Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance (Smolen and Ball eds., 1984); Ranger and Peppas, J. Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem. 23:61-126 (1983); Levy *et al.*, Science 228:190-92 (1985); During *et al.*, Ann. Neurol. 25:351-56 (1989); Howard *et al.*, J. Neurosurg. 71:105-12 (1989); 미국 특허 제5,679,377호; 제5,916,597호; 제5,912,015호; 제5,989,463호; 및 제5,128,326호; PCT 공보 WO 99/15154호 및 WO 99/20253호 참고). 지속 방출 제형에 사용되는 중합체의 예는, 비제한적으로, 폴리(2-하이드록시 에틸 메타크릴레이트), 폴리(메틸 메타크릴레이트), 폴리(아크릴산), 폴리(에틸렌-코-비닐 아세테이트), 폴리(메타크릴산), 폴리글리콜리드(PLG), 폴리안하이드라이드, 폴리(N-비닐 피롤리돈), 폴리(비닐 알코올), 폴리아크릴아미드, 폴리(에틸렌 글리콜), 폴리락티드(PLA), 폴리(락티드-코-글리콜리드)(PLGA), 및 폴리오쏘에스테르를 포함한다. 일 실시양태에서, 지속 방출 제형에 사용되는 중합체는 불활성이고, 여과가능 불순물이 없고, 저장에 대해 안정적이고, 멸균성이고, 생물분해성이다.

[0306] 또 다른 실시양태에서, 제어 또는 지속 방출 시스템은 특정 표적 조직, 예를 들어 비강 또는 폐의 근처에 위치할 수 있으며, 따라서 전신 용량의 분획만을 요구할 수 있다(예를 들어, Goodson, Medical Applications of Controlled Release Vol. 2, 115-38 (1984) 참고). 제어 방출 시스템은 예를 들어, Langer, Science 249:1527-33 (1990)에 의해 논의된다. 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 약제를 포함하는 지속 방출 제형을 생산하기 위해 통상의 기술자에게 알려진 임의의 기술이 사용될 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제4,526,938호, PCT 공보 WO 91/05548호 및 WO 96/20698호, Ning *et al.*, Radiotherapy & Oncology 39:179-89 (1996); Song *et al.*, PDA J. of Pharma. Sci. & Tech. 50:372-97 (1995); Cleek *et al.*, Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater. 24:853-54 (1997); 및 Lam *et al.*, Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater. 24:759-60

(1997) 참고).

- [0307] 본원에 기재된 약학 조성물은 또한 치료되는 특정 지시를 위해 필요한 바와 같은 하나 초과와 활성 화합물 또는 약제를 함유할 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, 조성물은 세포독성제, 화학치료제, 사이토카인, 면역억제제, 또는 성장 억제제를 포함할 수 있다. 이러한 분자는 의도된 목적을 위해 효과적인 양으로 조합되어 적합하게 존재한다.
- [0308] 활성 성분은 또한 예를 들어, 코아세르베이션 기술에 의해 또는 계면 중합에 의해 제조된 마이크로캡슐, 예를 들어 콜로이드 약물 전달 시스템(예를 들어, 리포솜, 알부민 마이크로스피어, 마이크로에멀션, 나노-입자 및 나노캡슐)에서 또는 마크로에멀션에서 각각 하이드록시메틸셀룰로오스 또는 젤라틴-마이크로캡슐 및 폴리-(메틸메타크릴레이트) 마이크로캡슐 내에, 포집될 수 있다. 이러한 기술은 *Remington's Pharmaceutical Sciences* 18th edition에 개시되어 있다.
- [0309] 비제한적으로, 리포솜 내 캡슐화, 마이크로입자, 마이크로캡슐, 본원에 제공된 치료 분자를 발현할 수 있는 재조합체 세포, 바이러스 벡터 또는 다른 벡터의 부분으로서 핵산의 구축물 등을 포함하여, 다양한 조성물 및 전달 시스템이 알려져 있으며, 본원에 제공된 치료제와 함께 사용될 수 있다.
- [0310] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 질환 또는 장애를 치료하거나 예방하기 위한 유효량, 예컨대 치료적 유효량 또는 예방적 유효량의 결합 분자 및/또는 바이러스 입자를 함유한다. 일부 실시양태에서, 치료 또는 예방 효능은 치료된 대상체의 주기적 평가에 의해 모니터링된다. 조건에 따라 수일 이상에 걸친 반복된 투여 동안, 치료는 질환 증상의 소망하는 역제가 발생할 때까지 반복된다. 그러나, 다른 투여량 요법이 유용할 수 있으며 결정될 수 있다.
- [0311] **5.5. 방법 및 용도**
- [0312] 다른 양태에서, 본원은 본원에 제공된 벡터, 또는 바이러스 입자(rAAV)를 사용하기 위한 방법 및 이의 용도를 제공한다.
- [0313] 이러한 방법 및 용도는 예를 들어, 질환 또는 장애를 갖는 대상체에 대한 분자, rAAV 또는 이를 함유하는 조성물의 투여를 포함하는 치료 방법 및 용도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 분자, 바이러스 입자, 및/또는 조성물은 질환 또는 장애의 치료에 효과적인 유효량으로 투여된다. 용도는 이러한 방법 및 치료, 및 이러한 치료 방법을 수행하기 위한 의학의 제조에서 바이러스 입자의 용도를 포함한다. 일부 실시양태에서, 방법은 질환 또는 병태를 갖거나 이를 갖는 것으로 의심되는 대상체에 바이러스 입자, 또는 이를 포함하는 조성물 투여함으로써 수행된다. 일부 실시양태에서, 방법은 이에 의해 대상체에서 질환 또는 장애를 치료한다.
- [0314] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료는 질환 또는 장애, 또는 이와 연관된 증상, 역효과 또는 결과, 또는 표현형의 완전 또는 부분적 개선 또는 감소를 야기한다. 치료의 바람직한 효과는, 비제한적으로, 질환의 발생 또는 재발 예방, 증상의 경감, 질환의 임의의 직접적 또는 간접적 병리학적 결과의 축소, 진이 예방, 질환 진행의 속도 감소, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해 또는 개선된 예후를 포함한다. 상기 용어는 질환의 완전 치유 또는 임의의 증상의 완전 제거 또는 모든 증상 또는 결과에 대한 효과(들)를 포함하지만, 이를 의미하지는 않는다.
- [0315] 본원에 사용된 바와 같이, 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 치료는 질환 또는 장애의 발달을 지연시키고, 예를 들어 질환(예컨대, SMA)의 발달을 연기하고/하거나, 방해하고/하거나, 늦추고/늦추거나, 지연시키고/시키거나, 안정화시키고/시키거나 억제하고/하거나 연기한다. 이 지연은 병력 및/또는 치료되는 개체에 따라 다양한 길이의 시간의 것일 수 있다. 통상의 기술자에게 명백한 바와 같이, 충분한 또는 상당한 지연은 사실상 개체가 질환 또는 장애를 발달시키지 않는 예방을 포함할 수 있다.
- [0316] 다른 실시양태에서, 본원에 제공된 방법 및 용도는 질환 또는 장애를 예방한다.
- [0317] 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMN과 연관된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMN 단백질의 불충분한 발현과 연관된다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 결핍된 SMN 단백질(예컨대, 돌연변이체 SMN 단백질)과 연관된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자가 사용되어, *smn1* 결실 및/또는 돌연변이를 갖는 SMA를 갖는 대상체를 치료한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 *smn1* 돌연변이 또는 미세 결실을 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 *smn1* 넌센스 돌연변이를 갖는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 하나 이상의 *smn1* 프레임 시프트 돌연변이를 갖는다.
- [0318] 일부 구체적 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA이다. 특정 실시양태에서, 본 발명은 SMN(예를 들어, SMN1) 연

관된 질환 또는 장애, 예를 들어 신경근 변성 질환, 예컨대 SMA-I, SMA-II, SMA-III, 및 SMA-IV에 대한 유전자 요법의 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 신경근 변성 질환, 예컨대 SMA I 형, II, III 및 IV 형이다. 일부 구체적 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA I 형이다. 일부 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA II 형이다. 다른 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA III 형이다. 또 다른 실시양태에서, 질환 또는 장애는 SMA IV 형이다.

[0319] *smn1* 유전자에서의 미세결실 및 넌-센스 돌연변이는 SMA-I의 가장 빈번한 유전적 원인이다. 방대한 대다수의 신경학적으로 건강한 개체는 혈액에서 검출되는 충분한 수준의 SMN1 단백질 발현을 갖는다. SMN 단백질(예를 들어, SMN1) 발현의 결여는 또한 예를 들어, 파킨슨병(Parkinson disease), 진행성 핵상 마비, 운동실조, 피질 기저핵 증후군, 헌팅턴병(Huntington disease)-유사 증후군, 크로이츠펠트-야콥병(Creutzfeldt-Jakob disease) 및 알츠하이머병(Alzheimer disease)을 포함한 다른 신경변성 질환의 원인으로 확인되었다. 일부 실시양태에서, SMN 연관된 질환 또는 장애는 SMN 단백질 발현 결핍 연관된 질환(예를 들어, SMN1 발현 결핍 연관된 질환)이다.

[0320] 척수성 근위축(SMA), 초기-개시 신경근 변성 장애는 예를 들어, 운동 피질, 뇌줄기 및 척수에서 운동 뉴런의 선택적 사멸이 특징인 진행성이고 치명적인 질환이다. SMA-I로 진단된 환자는 예를 들어, 경직, 반사항진 또는 반사저하, 섬유속연축, 근위축 및 마비가 특징인 진행성 근육 표현형이 발달한다. 이들 운동 손상은 운동 뉴런의 손실로 인한 근육의 신경제거에 의해 야기된다. SMA-I의 주요 병리학적 특징은 피질척수로의 변성 및 하위 운동 뉴런(LMN) 또는 전각 세포의 광범위한 손실, 일차 운동 피질에서 베헤(Betz) 세포 및 다른 추상 세포의 손실 및 운동 피질 및 척수에서의 반응성 신경아교증을 포함한다. SMA-I은 보통 호흡기 결합 및/또는 염증으로 인해 진단 후 0.9 내지 2 년 이내에 치명적이다.

[0321] 일부 실시양태에서, SMA의 증상은, 비제한적으로, 운동 뉴런 변성, 근력 저하, 근위축, 근육의 긴장, 호흡 곤란, 불분명한 말투, 섬유속연축 발달, 이마관자엽 변성 및/또는 조기 사망을 포함하며, 이는 치료되는 대상체에서 개선된다. 다른 양태에서, 본 발명의 조성물은 뇌 및 척수 중 하나 또는 둘 다에 적용된다. 일부 실시양태에 따르면, 근협응 및 근기능 중 하나 또는 둘 다가 개선된다. 일부 실시양태에 따르면, 대상체의 생존이 연장된다.

[0322] 일부 실시양태에서, AAV 유래된 야생형 *smn1* 또는 코돈-최적화된 *smn1*의 발현의 전체 향상은 대상체에서 SMA의 효과를 감소시킨다.

[0323] 일부 실시양태에서, 대상체에 대한 본 발명의 조성물의 투여는 대상체의 형질도입된 세포에서 *smn1*(예를 들어, 야생형 *smn1* 또는 코돈 최적화된 *smn1*) mRNA 전사를 향상시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 야생형 *smn1* 및/또는 코돈-최적화된 *smn1*의 전사는 대상체의 CNS의 영역, 또는 CNS의 특정 세포를 포함하여 형질도입된 세포에서 약 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300% 또는 500%, 또는 적어도 20-30%, 20-40%, 20-50%, 20-60%, 20-70%, 20-80%, 20-90%, 20-95%, 20-100%, 30-40%, 30-50%, 30-60%, 30-70%, 30-80%, 30-90%, 30-95%, 30-100%, 40-50%, 40-60%, 40-70%, 40-80%, 40-90%, 40-95%, 40-100%, 50-60%, 50-70%, 50-80%, 50-90%, 50-95%, 50-100%, 60-70%, 60-80%, 60-90%, 60-95%, 60-100%, 70-80%, 70-90%, 70-95%, 70-100%, 80-90%, 80-95%, 80-100%, 90-95%, 90-100% 또는 95-100%, 100-500% 향상될 수 있다.

[0324] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자는 SMA의 초기 단계에 있는 대상체에 투여될 수 있다. 초기 단계 증상은, 비제한적으로, 약하고 부드럽거나 빠근한, 단단하고 경련성인 근육, 근육의 경련 및 떨림(섬유속연축), 대용량 근육의 손실(위축), 피로, 열악한 균형, 불분명한 단어, 약한 움켜쥌, 및/또는 보행시 발걸림을 포함한다. 증상은 단일 신체 영역으로 제한될 수 있거나 중간 증상은 하나 초과 영역에 영향을 줄 수 있다. 비-제한적인 예로서, 본원에 기재된 벡터 또는 입자의 투여는 초기 단계 SMA의 증상의 중증도 및/또는 발생을 감소시킬 수 있다.

[0325] 다른 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자는 중간 단계의 SMA-I 또는 후기 단계의 SMA-I, 또는 초기 단계의 SMA-II-IV에 있는 대상체에 투여될 수 있다. 중간 단계의 SMA-I 또는 후기 단계의 SMA-I, 또는 초기 단계의 SMA-II-IV는, 비제한적으로, 초기 단계와 비교하여 더욱 확산된 근육 증상을 포함하고, 일부 근육은 마비되는 한편, 나머지는 약화되거나 영향을 받지 않고, 계속된 근육 떨림(섬유속연축), 미사용된 근육은 구축을 야기할 수 있으며, 이때 관절은 경직되고, 고통스러워지고 때때로 변형되고, 삼킴 근육의 약화는 삼킴 및 식사 및 침 관리의 큰 어려움을 야기할 수 있고, 호흡근에서의 약화는 호흡 부전을 야기할 수 있으며, 이는 누울 때 두드러질 수 있고/있거나 대상체는 비제어된 또는 부적절한 웃음 또는 울음의 병치레(감정실금)를 가질 수 있다. 비-제한적인 예로서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자의 투여는 중간 단계 SMA-I 또는 후기 단

계 SMA-I, 또는 초기 단계 SMA-II-IV의 중증도 및/또는 발생을 감소시킬 수 있다.

- [0326] 본원에 기재된 조성물은 임의의 경로에 의해, 예를 들어 혈관내로(예를 들어, 정맥내로(IV) 또는 동맥내로), 동맥 내로 직접, 전신으로(예를 들어, 정맥내 주사에 의한), 또는 국소로(예를 들어, 동맥내 또는 안구내 주사에 의한) 개체에 투여될 수 있다. 비-제한적인 예시적 투여 방법은 정맥내(예를 들어, 주입 펌프에 의한), 복강내, 안구내, 동맥내, 폐내, 구강, 흡입, 방광내, 근육내, 기관내, 피하, 안구내, 척추강내, 경피, 흉막경유, 동맥내, 국부, 흡입(예를 들어, 스프레이의 분무로서), 점막(예컨대, 비점막을 포함), 피하, 경피, 위장, 관절내, 수조내, 심실내, 두개내, 요도내, 간내, 종양내, 유리체내 및 망막하 주사를 포함한다. 일부 실시양태에서, SMA를 치료하기 위한 본 발명의 조성물은 정맥내로, 근육내로, 피하로, 복강내로, 척추강내로 및/또는 심실내로 SMA 치료를 필요로 하는 대상체에 투여되고, 본 핵산이 혈액-뇌 장벽 및 혈액 척수 장벽 중 한 또는 둘 다를 통과하게 한다. 일부 실시양태에서, 방법은 본 발명의 조성물의 치료적 유효량을 대상체의 중추신경계(CNS)에 직접적으로 투여하는 단계(예를 들어, 심실내로 투여하는 단계 및/또는 척추강내로 투여하는 단계)(예를 들어, 주입 펌프 및/또는 전달 스캐폴드를 사용함)를 포함한다. 벡터 또는 바이러스 입자가 사용되어, 대상체에서 *smn1* 유전자 발현을 향상시키고/시키거나 SMA의 하나 이상의 증상을 감소시킬 수 있어, SMA는 치료적으로 치료된다.
- [0327] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산 서열을 포함하는 AAV 벡터 또는 AAV 입자의 조성물은 조성물이 중추신경계로 들어가고 운동 뉴런 내로 관통하기 용이하게 하는 방식으로 투여될 수 있다.
- [0328] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 근육 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0329] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산을 포함하는 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 말초 주사 및/또는 비강내 전달에 의해 대상체에 투여된다.
- [0330] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산을 포함하는 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 두개내 전달(예를 들어, 척추강내 또는 뇌실내 투여, 예를 들어 미국 특허 제8,119,611호 참고; 이의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함됨)에 의해 대상체에 투여된다.
- [0331] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 대상체의 중추신경계(CNS)에 정맥내 또는 두개내로 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 CNS, 예컨대 뉴런, 운동 뉴런, 미세아교세포 및 별아교세포에 투여된다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 별아교세포에 투여된다.
- [0332] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 뉴런, 운동 뉴런; 희소돌기신경교, 별아교세포 및 미세아교세포를 포함하는 신경아교 세포; 및/또는 T 세포와 같은 뉴런을 둘러싼 다른 세포를 포함하여, 특정 유형의 표적화된 세포 내로 전달될 수 있다.
- [0333] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 치료적 유효량, 예를 들어 질환과 연관된 적어도 하나의 증상을 완화시키고/시키거나 예방하거나, 대상체의 병태에서 개선을 제공하기에 충분한 양으로 투여될 수 있다.
- [0334] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 치료적 유효량으로 CNS에 투여되어, SMA를 갖는 대상체에 대해 기능 및/또는 생존을 개선할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 조성물은 정맥내로 및/또는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0335] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 치료적 유효량으로 대상체(예를 들어, 대상체의 CNS)에 투여되어, 대상체의 기능적 감소를 늦추고/늦추거나(예를 들어, 알려진 평가 방법, 예컨대 SMA 기능적 평가 척도(SMAFRS)를 사용하여 결정됨) 대상체의 호흡기-독립적 생존을 연장(예를 들어, 사망률 또는 호흡 지지를 위한 필요성 감소)할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 조성물은 정맥내로 및/또는 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0336] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 치료적 유효량으로 대조에 투여되어, 척수 운동 뉴런 및/또는 별아교세포를 형질도입할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 조성물은 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0337] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 치료적 유효량으로 척추강내 주입을 사용하여 투여되어, 척수 운동 뉴런 및/또는 별아교세포를 형질도입할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 조성물은 척추강내로 투여될 수 있다.
- [0338] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 볼루스 주입을 사용하여 투여될 수 있다.
- [0339] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 분, 시간 또는 일의 기간에 걸친 지속 전달을 사용하

여 투여될 수 있다. 주입 속도는 대상체, 분배, 제형 또는 다른 전달 파라미터에 따라 변할 수 있다.

- [0340] 일부 실시양태에서, 카테터는 다중-부위 전달을 위해 척추에서 하나 초과 부위에 위치할 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 연속 및/또는 볼루스 주입으로 전달될 수 있다. 각각의 전달 부위는 상이한 투여 요법일 수 있거나 동일한 투여 요법이 각각의 전달 부위에 대해 사용될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 전달 부위는 경부 및 요추 영역에 있을 수 있다. 다른 비-제한적인 예로서, 전달 부위는 경부 영역에 있을 수 있다. 다른 비-제한적인 예로서, 전달 부위는 요추 영역에 있을 수 있다.
- [0341] 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 AAV 벡터 또는 AAV 입자의 전달 전에 척추 해부학 및 병리학에 대해 분석될 수 있다. 비-제한적인 예로서, 척추측만증을 갖는 대상체는 척추측만증이 없는 대상체와 비교하여 상이한 투여 요법 및/또는 카테터 위치를 가질 수 있다.
- [0342] 일부 실시양태에서, 본 AAV 벡터 또는 입자의 전달 동안 대상체의 척추의 방향은 지면에 대해 수직일 수 있다. 다른 실시양태에서, AAV 벡터 또는 AAV 입자의 전달 동안 대상체의 척추의 방향은 지면에 대해 수평일 수 있다.
- [0343] 일부 실시양태에서, 대상체의 척추는 본 AAV 벡터 또는 AAV 입자의 전달 동안 지면과 비교하여 각이 있을 수 있다. 지면과 비교한 대상체의 척추의 각은 적어도 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150 또는 180 도일 수 있다.
- [0344] 일부 실시양태에서, 전달 방법 및 기간은 척추에서 광범위한 형질도입을 제공하기 위해 선택된다. 비-제한적인 예로서, 척추강내 전달이 사용되어, 척추의 부리-꼬리 길이를 따라 광범위한 형질도입을 제공한다. 다른 비-제한적인 예로서, 다중-부위 주입은 척추의 부리-꼬리 길이를 따라 더욱 균일한 형질도입을 제공한다. 또 다른 비-제한적인 예로서, 연장된 주입은 척추의 부리-꼬리 길이를 따라 더욱 균일한 형질도입을 제공한다.
- [0345] 본 발명의 약학 조성물은 SMN 연관된 장애(예를 들어, SMA)를 감소, 예방 및/또는 치료하기 위해 효과적인 임의의 양을 사용하여 대상체에 투여될 수 있다. 요구되는 정확한 양은 대상체의 종, 연령, 및 일반 병태, 질환의 중증도, 특정 조성물, 이의 투여 방식, 이의 활성 방식 등에 따라 대상체 별로 달라질 수 있다.
- [0346] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 액체 용액 또는 현탁액, 액체 용액 또는 액체 용액 중 현탁액에 적합한 고체 형태와 같은 임의의 적합한 형태로 투여될 수 있고, 임의의 적절한 약학적 허용 부형제와 함께 제형화될 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 벡터 또는 입자는 제형화된다. 비-제한적인 예로서, 제형의 염기도 및/또는 삼투압농도는 최적화되어, 중추신경계 또는 중추신경계의 영역 또는 구성요소에서 최적 약물 분배를 보장할 수 있다.
- [0347] 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 약학 조성물은 현탁액, 예를 들어 냉장된 현탁액이다. 일부 실시양태에서, 방법은 현탁액을 교반하는 단계를 추가로 포함하여, 투여 단계 전에 현탁액의 일정한 분포를 보장한다. 일부 실시양태에서, 방법은 투여 단계 전에 실온으로 약학 조성물을 승온시키는 단계를 추가로 포함한다. 조성물은 또한 지속 방출 제형으로 투여될 수 있다. 지속 방출 장치(예컨대, 펠릿, 나노입자, 마이크로입자, 나노스피어, 마이크로스피어 등)는 주사에 의해 투여되거나 다양한 위치에서 수술 이식될 수 있다.
- [0348] 본 발명의 조성물은 통상적으로 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단위 투여량 형태로 제형화된다. 그러나, 본 발명의 조성물의 총 일일 용법은 건전한 의학적 판단의 범위 내에서 주치의에 의해 결정될 수 있다는 것이 이해될 것이다. 임의의 특정 환자에 대한 구체적 치료 효과성은 치료되는 장애 및 장애의 중증도; 이용되는 특정 화합물의 활성; 이용되는 특정 조성물; 환자의 연령, 체중, 일반 건강, 성별 및 식이요법; 투여의 시간; 투여의 경로; 치료의 기간; 이용되는 특정 화합물과 조합되거나 동시에 사용되는 약물; 및 의학 업계에 잘 알려진 유사 인자를 포함한 다양한 인자에 의존할 것이다.
- [0349] 일부 실시양태에서, 대상체의 연령 및 성별이 사용되어, 본 발명의 조성물의 용량을 결정할 수 있다. 비-제한적인 예로서, 늙은 대상체는 젊은 대상체와 비교하여 조성물의 많은 용량(예를 들어, 5-10%, 10-20%, 15-30%, 20-50%, 25-50% 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 다른 비-제한적인 예로서, 젊은 대상체는 늙은 대상체와 비교하여 조성물의 큰 용량(예를 들어, 5-10%, 10-20%, 15-30%, 20-50%, 25-50% 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 또 다른 비-제한적인 예로서, 암컷인 대상체는 수컷 대상체와 비교하여 조성물의 큰 용량(예를 들어, 5-10%, 10-20%, 15-30%, 20-50%, 25-50% 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 90% 초과)을 받을 수 있다. 또 다른 비-제한적인 예로서, 수컷인 대상체는 암컷 대상체와 비교하여 조성물의 큰 용량(예를 들어, 5-10%, 10-20%, 15-30%, 20-50%, 25-50% 또는 적어도 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% 또는 90% 초

과)을 받을 수 있다.

- [0350] 일부 실시양태에서, 본 발명의 핵산을 전달하기 위한 AAV 벡터 또는 AAV 입자의 용량은 질환 병태, 대상체 및 치료 전략에 따라 조정될 수 있다.
- [0351] 일부 실시양태에서, 투여되는 벡터 또는 바이러스 입자의 농도는 생산 방법에 따라 상이할 수 있고 특정 투여 경로에 대해 치료적으로 효과적인 것으로 결정된 농도에 기초하여 선택되거나 최적화될 수 있다.
- [0352] 일부 실시양태에 따르면, 밀리리터 당 벡터 계놈(vg/mL)의 농도는 약  $10^8$  vg/mL, 약  $10^9$  vg/mL, 약  $10^{10}$  vg/mL, 약  $10^{11}$  vg/mL, 약  $10^{12}$  vg/mL, 약  $10^{13}$  vg/mL, 약  $10^{14}$  vg/mL, 및 약  $10^{15}$  vg/mL로 이루어진 균으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 농도는  $10^{10}$  vg/mL -  $10^{14}$  vg/mL, 예를 들어  $10^{10}$  vg/mL -  $10^{15}$  vg/mL,  $10^{10}$  vg/mL -  $10^{14}$  vg/mL,  $0^{10}$  vg/mL -  $10^{13}$  vg/mL,  $10^{10}$  vg/mL -  $10^{12}$  vg/mL,  $10^{10}$  vg/mL -  $10^{11}$  vg/mL,  $10^{11}$  vg/mL -  $10^{14}$  vg/mL,  $10^{11}$  vg/mL -  $10^{13}$  vg/mL,  $10^{11}$  vg/mL -  $10^{12}$  vg/mL,  $10^{12}$  vg/mL -  $10^{14}$  vg/mL,  $10^{12}$  vg/mL -  $10^{13}$  vg/mL,  $10^{13}$  vg/mL -  $10^{14}$  vg/mL, 또는  $10^{14}$  vg/mL -  $10^{15}$  vg/mL의 범위 내에 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 벡터 또는 바이러스 입자는 정맥내, 두개내 주사, 또는 대조내 주사, 또는 척추강내 주사, 또는 근육내 주사, 또는 유리체내 주사에 의해 전달된다. 일부 실시양태에서, 본원에 제공된 벡터 또는 바이러스 입자는 약 0.1 mL 내지 약 20 mL, 예를 들어 약 0.1 mL 내지 약 20 mL, 약 0.5 mL 내지 약 20 mL, 약 1 mL 내지 약 20 mL, 약 5 mL 내지 약 20 mL, 약 0.1 mL 내지 약 5.0 mL, 약 0.1 mL 내지 약 2.0 mL, 약 0.1 mL 내지 약 1.0 mL, 약 0.1 mL 내지 약 0.8 mL, 약 0.1 mL 내지 약 0.6 mL, 약 0.1 mL 내지 약 0.4 mL, 약 0.1 mL 내지 약 0.2 mL, 약 0.2 mL 내지 약 1.0 mL, 약 0.2 mL 내지 약 0.8 mL, 약 0.2 mL 내지 약 0.6 mL, 약 0.2 mL 내지 약 0.4 mL, 약 0.4 mL 내지 약 1.0 mL, 약 0.4 mL 내지 약 0.8 mL, 약 0.4 mL 내지 약 0.6 mL, 약 0.6 mL 내지 약 1.0 mL, 약 0.6 mL 내지 약 0.8 mL, 약 0.8 mL 내지 약 1.0 mL, 또는 약 0.1 mL, 약 0.2 mL, 약 0.4 mL, 약 0.6 mL, 약 0.8 mL, 내지 약 1.0 mL의 부피로 주사된다.
- [0353] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산을 포함하는 rAAV는 예를 들어,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2 \times 10^{10}$ ,  $3 \times 10^{10}$ ,  $4 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $6 \times 10^{10}$ ,  $7 \times 10^{10}$ ,  $8 \times 10^{10}$ ,  $9 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $2 \times 10^{11}$ ,  $3 \times 10^{11}$ ,  $4 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $6 \times 10^{11}$ ,  $7 \times 10^{11}$ ,  $8 \times 10^{11}$ ,  $9 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$ ,  $2 \times 10^{12}$ ,  $3 \times 10^{12}$ ,  $4 \times 10^{12}$ ,  $5 \times 10^{12}$ ,  $6 \times 10^{12}$ ,  $7 \times 10^{12}$ ,  $8 \times 10^{12}$ ,  $9 \times 10^{12}$ ,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ ,  $9 \times 10^{14}$ ,  $1 \times 10^{15}$ ,  $2 \times 10^{15}$ ,  $3 \times 10^{15}$ ,  $4 \times 10^{15}$ ,  $5 \times 10^{15}$ ,  $6 \times 10^{15}$ ,  $7 \times 10^{15}$ ,  $8 \times 10^{15}$ ,  $9 \times 10^{15}$ ,  $1 \times 10^{16}$ ,  $2 \times 10^{16}$ ,  $3 \times 10^{16}$ ,  $4 \times 10^{16}$ ,  $5 \times 10^{16}$ ,  $6 \times 10^{16}$ ,  $7 \times 10^{16}$ ,  $8 \times 10^{16}$ ,  $9 \times 10^{16}$ ,  $1 \times 10^{17}$ ,  $2 \times 10^{17}$ ,  $3 \times 10^{17}$ ,  $4 \times 10^{17}$ ,  $5 \times 10^{17}$ ,  $6 \times 10^{17}$ ,  $7 \times 10^{17}$ ,  $8 \times 10^{17}$ , 또는  $9 \times 10^{17}$  벡터 계놈(vg)을 포함하여,  $1 \times 10^8$  내지  $1 \times 10^{17}$  벡터 계놈(vg), 예컨대  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{17}$  벡터 계놈(vg) 또는  $1 \times 10^{14}$  내지  $1 \times 10^{15}$  벡터 계놈(vg)의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다.
- [0354] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 핵산을 포함하는 rAAV는 예를 들어,  $1 \times 10^{13}$ ,  $2 \times 10^{13}$ ,  $3 \times 10^{13}$ ,  $4 \times 10^{13}$ ,  $5 \times 10^{13}$ ,  $6 \times 10^{13}$ ,  $7 \times 10^{13}$ ,  $8 \times 10^{13}$ ,  $9 \times 10^{13}$ ,  $1 \times 10^{14}$ ,  $2 \times 10^{14}$ ,  $3 \times 10^{14}$ ,  $4 \times 10^{14}$ ,  $5 \times 10^{14}$ ,  $6 \times 10^{14}$ ,  $7 \times 10^{14}$ ,  $8 \times 10^{14}$ , 또는  $9 \times 10^{14}$  vg/kg 을 포함하여,  $1 \times 10^8$  내지  $1 \times 10^{17}$  벡터 계놈/kg(vg/kg), 예컨대  $1 \times 10^{13}$  내지  $1 \times 10^{16}$  vg/kg의 용량으로 대상체에 투여될 수 있다.
- [0355] 일부 실시양태에서, 하나 이상의 추가 치료제가 대상체에 투여될 수 있다.
- [0356] 본원에 기재된 조성물의 효과성은 몇몇 기준에 의해 모니터링될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 방법을 사용한 대상체에서의 치료 후, 대상체는 예를 들어, 본원에 기재된 것을 포함한 하나 이상의 임상 파라미터에 의해 질환 상태의 하나 이상의 징후 또는 증상의 진행에서 개선 및/또는 안정화 및/또는 지연에 대해 평가될 수 있다. 이러한 시험의 예는 당업계에 알려져 있으며, 객관적 뿐 아니라, 주관적(예를 들어, 대상체 보고된) 측정을 포함한다.
- [0357] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 단일 경로 투여를 통해 대상체에 전달될 수 있다. 다른 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자는 예를 들어, 2, 3, 4, 5 또는 5 개 초과 부위에서 다중-부위 투여 경로를 통해 대상체에 전달될 수 있다.

- [0358] 본 AAV 벡터 또는 AAV 입자를 포함하는 약학 조성물은 단일 일일 용량으로 투여될 수 있거나, 일일 용량은 매일 2, 3, 또는 4 회의 나뉘어진 투여량으로 투여될 수 있다. 본원에 제공된 조성물은 또한 기간(예를 들어, 1 주, 2 주, 3 주, 1 개월, 2 개월, 3 개월, 4 개월, 5 개월, 6 개월, 7 개월, 8 개월, 9 개월, 10 개월, 11 개월, 1 년, 2 년, 또는 3 년) 내에 다중 회(예를 들어, 2 회, 3 회, 4 회, 또는 5 회) 투여될 수 있다.
- [0359] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 SMA의 치료를 위해 단일 치료제 또는 조합 치료제로서 투여된다.
- [0360] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자를 포함하는 조성물은 하나 이상의 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다. "조합하여"에 대해, 이는 약제가 함께 전달하기 위해 동시에 투여되고/되거나 제형화되어야 한다는 것을 의미하는 것으로 의도되지 않지만, 이들 전달 방법은 본 발명의 범위 내에 있다. 조성물은 하나 이상의 다른 소망하는 치료제 또는 의학적 절차와 동시에, 그 전에, 또는 그 후에 투여될 수 있다. 일반적으로, 각각의 약제는 상기 약제에 대해 결정된 용량으로 및/또는 시간 스케줄에 투여될 것이다.
- [0361] 일부 실시양태에서, 본 발명의 AAV 벡터 또는 입자와 조합하여 사용될 수 있는 치료제는 예를 들어, 면역억제제, 항산화제, 항-염증제, 항-아포토시스제, 칼슘 조절제, 항글루타메이트제, 구조 단백질 억제제, 및 금속 이온 조절에 관련된 화합물을 포함한 소분자 화합물일 수 있다.
- [0362] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자와 조합하여 사용될 수 있는 SMA를 치료하기 위한 화합물은, 비제한적으로, 항글루타메이트제, 예컨대 릴루졸, 토피라메이트, 탈람파넬, 라모트리진, 텍스트로메 토르판, 가바펜틴 및 AMPA 길항제; 항-아포토시스제, 예컨대 미노사이클린, 소듐 페닐 부티레이트 및 아리모클 로몰; 항-염증제, 예컨대 강글리오시드, 셀레콕시브, 사이클로스포린, 아자티오프린, 사이클로포스파미드, 플라 스마포레스스, 글라티라머 아세테이트 및 탈리도마이드; 세프리악손; 비트-락탐 항생제; 프라미펙솔(도파민 작용제); 니메솔리드; 다이족시드; 피라졸론 유도체; 산화 스트레스-유도된 세포 사멸을 억제하는 자유 라디칼 스 캐빈저, 예컨대 브로모크립틴; 페닐 카바메이트 화합물; 신경보호 화합물; 및 글리코펩티드를 포함한다.
- [0363] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터 또는 바이러스 입자와 병용 요법으로 사용될 수 있는 치료제는 뉴런 손 실을 보호할 수 있는 호르몬 또는 변이체, 예컨대 부신피질자극호르몬(ACTH) 또는 이의 단편(예를 들어, 미국 특허 공보 제20130259875호); 에스트로겐(예를 들어, 미국 특허 제6,334,998호 및 제6,592,845호)일 수 있으며; 이들 각각의 내용은 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0364] 일부 실시양태에서, 신경영양 인자가 SMA를 치료하기 위해 본 발명의 AAV 벡터 또는 AAV 입자와 병용 요법으로 사용될 수 있다. 일반적으로, 신경영양 인자는 뉴런의 생존, 성장, 분화, 증식 및/또는 성숙을 촉진하거나, 뉴런의 증가된 활성을 자극하는 물질로서 정의된다. 일부 실시양태에서, 본 방법은 치료를 필요로 하는 대상체 내 로의 하나 이상의 영양 인자의 전달을 추가로 포함한다. 영양 인자는, 비제한적으로, IGF-I, GDNF, BDNF, CNTF, VEGF, 콜리벨린, 자일리프로덴, 티로트로핀-방출 호르몬 및 ADNF, 및 이의 변이체를 포함할 수 있다.
- [0365] **5.6. 분석**
- [0366] **5.6.1. mRNA 수준의 분석**
- [0367] 유전자(예를 들어, *smn1* 핵산)의 수준 또는 발현의 향상은 당업계에 알려진 다양한 방식으로 분석될 수 있다.
- [0368] 예를 들어, mRNA 수준을 검출하거나 정량화하는 몇몇 방법이 당업계에 알려져 있다. 예시적 방법은, 비제한적으 로, 노던 블롯, 리보뉴클레아제 보호 분석, PCR-기반 방법 등을 포함한다. 유전자의 mRNA 서열이 사용되어, mRNA 서열에 대해 적어도 부분적으로 상보성인 프로브를 제조할 수 있다. 그 다음에, 프로브는 임의의 적합한 분석, 예컨대 PCR 기반 방법, 노던 블롯팅, 딥스틱(dipstick) 분석 등을 사용하여 샘플에서 mRNA를 검출하기 위 해 사용될 수 있다.
- [0369] 분석 방법은 소망하는 mRNA 정보의 유형에 따라 달라질 수 있다. 예시적 방법은, 비제한적으로, 노던 블롯 및 PCR-기반 방법(예를 들어, qRT-PCR)을 포함한다. 방법, 예컨대 qRT-PCR은 또한 샘플에서 mRNA의 양을 정확하게 정량화할 수 있다.
- [0370] 임의의 적합한 분석 플랫폼이 사용되어, 샘플에서 mRNA의 존재를 결정할 수 있다. 예를 들어, 분석은 딥스틱, 막, 칩, 원반, 시험 스트립, 필터, 마이크로스피어, 슬라이드, 다중-웰 플레이트, 또는 광학 섬유의 형태일 수 있다. 분석 시스템은 mRNA에 대응하는 핵산이 부착되는 고체 지지체를 가질 수 있다. 고체 지지체는 예를 들어, 플라스틱, 실리콘, 금속, 수지, 유리, 막, 입자, 침전물, 겔, 중합체, 시트, 스피어, 폴리사카라이드, 모세관, 필름, 플레이트, 또는 슬라이드를 포함할 수 있다. 분석 구성요소는 mRNA를 검출하기 위한 키트로서 함께 제조

되고 패키징될 수 있다.

- [0371] 핵산은 소망하는 경우, 표지되어, 표지된 mRNA의 집단을 제조할 수 있다. 일반적으로, 샘플은 당업계에 잘 알려진 방법을 사용하여(예를 들어, DNA 리가아제, 말단 전이효소를 사용하거나, RNA 백본 등을 표지함으로써) 표지될 수 있다. 예를 들어, Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley & Sons, 3rd ed. 1995); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, N.Y., 3rd ed. 2001)을 참고한다. 일부 실시양태에서, 샘플은 형광 표지로 표지된다. 예시적 형광 염료는, 비제한적으로, 크산틴 염료, 플루오레세인 염료(예를 들어, 플루오레세인 이소티오시아네이트(FITC), 6-카복시플루오레세인(FAM), 6-카복시-2',4',7',4,7-헥사클로로플루오레세인(HEX), 6-카복시-4',5'-디클로로-2',7'-디메톡시플루오레세인(JOE)), 로다민 염료(예를 들어, 로다민 110(R110), N,N,N',N'-테트라메틸-6-카복시로다민(TAMRA), 6-카복시-X-로다민(ROX), 5-카복시로다민 6G(R6G5 또는 G5), 6-카복시로다민 6G(R6G6 또는 G6)), 시아닌 염료(예를 들어, Cy3, Cy5 및 Cy7), Alexa 염료(예를 들어, Alexa-fluor-555), 쿠마린, 디에틸아미노쿠마린, 움벨리페론, 벤즈이미드 염료(예를 들어, Hoechst 33258), 페난트리딘 염료(예를 들어, 텍사스 레드), 에티뒴 염료, 아크리딘 염료, 카바졸 염료, 페녹사진 염료, 포르피린 염료, 폴리메틴 염료, BODIPY 염료, 퀴놀린 염료, 피렌, 플루오레세인 클로로트리아지닐, 예오신 염료, 테트라메틸로다민, 리사민, 나프토플루오레세인 등을 포함한다.
- [0372] 통상적인 mRNA 분석 방법은 1) 표면-결합된 대상체 프로브를 얻는 단계; 2) 특정 결합을 제공하기에 충분한 조건 하에 표면-결합된 프로브에 mRNA의 집단을 하이브리드화하는 단계; (3) 하이브리드화 후 세척하여, 표면-결합된 프로브에 특이적으로 결합되지 않은 핵산을 제거하는 단계; 및 (4) 하이브리드화된 mRNA를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 이들 단계 각각에서 사용되는 시약 및 사용을 위한 이들의 조건은 특정 적용에 따라 달라질 수 있다.
- [0373] 하이브리드화는 소망하는 바와 같은 엄격도로 달라질 수 있는 적합한 하이브리드화 조건 하에 수행될 수 있다. 통상적인 조건은 상보성 결합 멤버 사이, 즉 샘플에서 표면-결합된 대상체 프로브와 상보성 mRNA 사이의 고체 표면 상에 프로브/표적 복합체를 생산하기에 충분하다. 특정 실시양태에서, 엄격한 하이브리드화 조건이 이용될 수 있다.
- [0374] 하이브리드화는 통상적으로 엄격한 하이브리드화 조건 하에 수행된다. 표준 하이브리드화 기술(예를 들어, 프로브에 대한 샘플 내 표적 mRNA의 특이적 결합을 제공하기에 충분한 조건 하)이 Kallioniemi et al., *Science*, 258:818-821 (1992) 및 국제 특허 출원 공보 WO 93/18186호에 기재되어 있다. 일반 기술에 대한 몇몇 안내, 예를 들어 Tijssen, *Hybridization with Nucleic Acid Probes, Parts I and II* (Elsevier, Amsterdam 1993)가 이용가능하다. *제자리(in situ)* 하이브리드화에 적합한 기술의 설명에 대해, Gall et al., *Meth. Enzymol.* 1981, 21:470-480; Angerer et al., *Genetic Engineering: Principles and Methods*, Vol 7, pgs 43-65 (Plenum Press, New York, Setlow and Hollaender, eds. 1985)를 참고한다. 온도, 염 농도, 폴리뉴클레오티드 농도, 하이브리드화 시간, 세척 조건의 엄격성 등을 포함한 적절한 조건의 선택은 샘플의 공급원, 포획제의 정제, 예상되는 상보성의 정도 등을 포함한 실험 설계에 의존할 것이며, 통상의 기술자에 대해 일상적인 실험의 문제로서 결정될 수 있다.
- [0375] 통상의 기술자는 대안적이지만 유사한 하이브리드화 및 세척 조건이 이용되어, 유사한 엄격성의 조건을 제공할 수 있다는 것을 용이하게 인식할 것이다.
- [0376] mRNA 하이브리드화 절차 후, 표면 결합된 폴리뉴클레오티드는 통상적으로 세척되어, 비결합된 핵산을 제거한다. 세척은 임의의 편리한 세척 프로토콜을 사용하여 수행될 수 있으며, 세척 조건은 통상적으로 상기 기재된 바와 같이 엄격하다. 그 다음에, 프로브에 대한 표적 mRNA의 하이브리드화는 표준 기술을 사용하여 검출된다.
- [0377] 다른 방법, 예컨대 PCR-기반 방법이 또한 사용되어, 유전자의 발현을 검출할 수 있다. PCR 방법의 예는 미국 특허 제6,927,024호에서 찾아볼 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. RT-PCR 방법의 예는 미국 특허 제7,122,799호에서 찾아볼 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다. 형광 *제자리* PCR의 방법은 미국 특허 제7,186,507호에 기재되어 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.
- [0378] 일부 실시양태에서, 정량적 역전사-PCR(qRT-PCR)이 RNA 표적의 검출 및 정량화 둘 다를 위해 사용될 수 있다 (Bustin et al., *Clin. Sci.* 2005, 109:365-379). qRT-PCR에 의해 얻어진 정량적 결과는 일반적으로 정성적 데이터에 비해 더욱 정보적이다. 따라서, 일부 실시양태에서, qRT-PCR-기반 분석은 세포-기반 분석 동안 mRNA 수준을 측정하기 위해 유용할 수 있다. qRT-PCR 방법은 또한 환자 요법을 모니터링하기 위해 유용하다. qRT-PCR-기반 방법의 예는 예를 들어, 미국 특허 제7,101,663호에서 찾아볼 수 있으며, 이는 그 전체가 본원에 참고

로 포함된다.

[0379] 아가로오스 겔에 의한 규칙적 역전사-PCR 및 분석과 반대로, qRT-PCR은 정량적 결과를 제공한다. qRT-PCR의 추가 이점은 사용의 상대적 용이성 및 편리함이다. qRT-PCR을 위한 기구, 예컨대 Applied Biosystems 7500이 상업적으로 이용가능하며, 시약, 예컨대 TaqMan® 서열 검출 화학물질도 그러하다. 예를 들어, TaqMan® 유전자 발현 분석이 제조사의 지시에 따라 사용될 수 있다. 이들 키트는 인간, 마우스, 및 래트 mRNA 전사체의 신속하고, 신뢰가능한 검출 및 정량화를 위한 예비-제형화된 유전자 발현 분석이다. 특정 앰플리콘 축적과 연관된 형광 신호가 임계를 교차하는 사이클 수(CT로 지칭됨)를 결정하기 위해, 데이터는 예를 들어, 7500 실시간 PCR 시스템 서열 검출 소프트웨어 대 비교 CT 상대 정량화 계산 방법을 사용하여 분석될 수 있다. 이 방법을 사용하면, 출력은 발현 수준의 배수-변화로서 표현된다. 일부 실시양태에서, 임계 수준은 소프트웨어에 의해 자동으로 결정 되도록 선택될 수 있다. 일부 실시양태에서, 임계 수준은 기준선을 초과하지만, 증폭 곡선의 지수 성장 영역 내에 있도록 충분히 낮도록 설정된다.

[0380] 다른 실시양태에서, 표적 RNA는 차세대 서열분석(NGS)에 의해 검출되거나 정량화될 수 있다.

[0381] **5.6.2 단백질 수준의 분석**

[0382] *smn1* 핵산의 향상된 단백질 발현은 SMN 단백질 수준을 측정함으로써 평가될 수 있다. 단백질 수준은 당업계에 잘 알려진 다양한 방식, 예컨대 면역침강, 웨스턴 블롯(Western blot) 분석(면역블롯팅), 효소-결합 면역흡착 분석(ELISA), 정량적 단백질 분석, 단백질 활성 분석(예를 들어, 카스파제 활성 분석), 면역조직화학, 면역세포 화학 또는 형광-활성화 세포 분류(FACS), LC-MS(액체-크로마토그래피-MassSpec), 및 다른 방법으로 평가되거나 정량화될 수 있다. 표적에 대해 지시된 항체는 다양한 공급원, 예컨대 항체의 MSRS 카탈로그(Aerie Corporation, Birmingham, Mich.)로부터 확인되고 얻어질 수 있거나, 당업계에 잘 알려진 편리한 단클론 또는 다클론 항체 생성 방법을 통해 제조될 수 있다. 마우스, 래트, 원숭이, 및 인간 *smn1*의 검출을 위해 유용한 항체는 상업적으로 이용가능하다. MassSpec의 경우에, 단백질 수준은 표지되거나 비표지된 방법을 사용하여 측정될 수 있다.

[0383] **5.6.3. 생체내 분석**

[0384] 생체내 분석이 사용되어, *smn1*의 향상된 발현, 예컨대 개선된 운동 기능 및 호흡을 평가하는 한편, 간 및/또는 심장에서 비-표적 독성을 감소시킬 수 있다.

[0385] 일부 실시양태에서, 운동 기능은 동물에서의 정확한 개방 필드 수행에 의해 측정된다. 특정 실시양태에서, 호흡은 동물에서의 전신 혈량계, 침습성 저항, 및 준수 측정에 의해 측정된다.

[0386] 일부 실시양태에서, 전체 생존(OS) 및 무병생존(DFS)은 살아있는 동물에서 매일 2 회 체중, 건강 상태 관찰에 의해 측정된다.

[0387] 시험은 정상 동물에서, 또는 실험 질환 모델에서 수행될 수 있다. 동물에 대한 투여를 위해, 올리고뉴클레오티드는 약학적 허용 희석제, 예컨대 포스페이트-완충 생리식염수에서 제형화될 수 있다. 투여는 비경구적 투여 경로, 예컨대 복강내, 정맥내, 및 피하를 포함한다. 올리고뉴클레오티드 투여량 및 투여 빈도의 계산은 통상의 기술자의 능력 내에 있으며, 인자, 예컨대 투여 경로 및 동물 체중에 의존한다. 올리고뉴클레오티드를 이용한 치료의 기간 후, RNA는 간, 심장, 비장, CNS 조직 또는 CSF를 포함한 관심 조직으로부터 단리될 수 있고 *smn1* 핵산 발현에서의 변화는 예를 들어, NGS를 사용하여 측정된다.

[0388] **5.7. 키트 및 제조 물품**

[0389] 본원에 기재된 조성물 중 임의의 것을 포함하는 키트, 단위 투여량, 및 제조 물품이 추가로 제공된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 약학 조성물 중 어느 하나를 함유하고 바람직하게는 이의 사용 설명서를 제공하는 키트가 제공된다.

[0390] 본 출원의 키트는 적합한 패키징 내에 있다. 적합한 패키징은, 비제한적으로, 바이알, 병, 통, 가요성 패키징(예를 들어, 실링된 마일라(Mylar) 또는 비닐 봉지) 등을 포함한다. 키트는 선택적으로 추가 구성요소, 예컨대 완충제 및 해석 정보를 제공할 수 있다. 따라서, 본 출원은 또한 바이알(예컨대, 실링된 바이알), 병, 통, 가요성 패키징 등을 포함하는 제조 물품을 제공한다.

[0391] 제조 물품은 용기 및 용기 상의 또는 이와 연합된 표지 또는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 적합한 용기는 예를 들어, 병, 바이알, 시린지 등을 포함한다. 용기는 다양한 물질, 예컨대 유리 또는 플라스틱으로부터 형성

될 수 있다. 일반적으로, 용기는 본원에 기재된 질환 또는 장애(예컨대, SMA)를 치료하기 위해 효과적인 조성물을 유지하고, 멸균 접속 포트를 가질 수 있다(예를 들어, 용기는 피하 주사 바늘에 의해 찌를 수 있는 스톱퍼를 갖는 정맥내 용액 백 또는 바이알일 수 있음). 표지 또는 패키지 삽입물은 조성물이 개체에서 특정 병태를 치료하기 위해 사용된다는 것을 나타낸다. 표지 또는 패키지 삽입물은 개체에 조성물을 투여하기 위한 설명서를 추가로 포함할 것이다. 표지는 재구성 및/또는 사용을 위한 지시를 나타낼 수 있다. 약학 조성물을 유지하는 용기는 다중-사용 바이알일 수 있으며, 이는 재구성된 제형의 반복 투여(예를 들어, 2-6 회 투여)를 허용한다. 패키지 삽입물은 치료 제품의 사용에 관한 표시, 용도, 투여량, 투여, 금기 및/또는 경고에 대한 정보를 함유하는 치료 제품의 상업적 패키지에 관례상 포함된 설명서를 지칭한다. 또한, 제조 물품은 약학적-허용 완충제, 예컨대 주사용 정균수(BWFI), 포스페이트-완충 생리식염수, 링거액(Ringer's solution) 및 텍스트로오스 용액을 포함하는 제2 용기를 추가로 포함할 수 있다. 이는 다른 완충제, 희석제, 필터, 바늘, 및 시린지를 포함하여, 상업적 및 사용자 관점으로부터 바람직한 다른 재료를 추가로 포함할 수 있다.

[0392] 키트 또는 제조 물품은 저장 및 약국, 예를 들어 병원 약국 및 조제 약국에서의 사용을 위해 충분한 정량으로 패키징된 약학 조성물의 다중 단위 용량 및 사용 설명서를 포함할 수 있다.

[0393] 간결함을 위해, 특정 약어가 본원에 사용된다. 하나의 예는 아미노산 잔기를 나타내기 위한 단일 문자 약어이다. 아미노산 및 이의 대응하는 3 문자 및 단일 문자 약어는 다음과 같다:

알라닌	Ala	(A)
아르기닌	Arg	(R)
아스파라긴	Asn	(N)
아스파르트산	Asp	(D)
시스테인	Cys	(C)
글루탐산	Glu	(E)
글루타민	Gln	(Q)
글리신	Gly	(G)
히스티딘	His	(H)
이소류신	Ile	(I)
류신	Leu	(L)
리신	Lys	(K)
메티오닌	Met	(M)
페닐알라닌	Phe	(F)
프롤린	Pro	(P)
세린	Ser	(S)
트레오닌	Thr	(T)
트립토판	Trp	(W)
티로신	Tyr	(Y)
발린	Val	(V)

[0394]

[0395] 본 발명은 일반적으로 많은 실시양태를 기재하기 위해 긍정적 언어를 사용하여 본원에 개시된다. 본 발명은 또

한 구체적으로 특정 주제, 예컨대 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜, 절차, 분석 또는 분석이 전체적으로 또는 부분적으로 배제되는 실시양태를 포함한다. 따라서, 본 발명은 일반적으로 본 발명이 포함하지 않는 것의 측면에서 본원에 표현되지 않더라도, 본 발명에 명확히 포함되지 않는 양태가 그럼에도 불구하고 본원에 개시된다.

[0396] 본 발명의 다수의 실시양태가 기재되었다. 그럼에도 불구하고, 다양한 변형이 본 발명의 의의 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 따라서, 다음 실시예는 청구항에 기재된 발명의 범위를 나타내지만 제한하지 않는 것으로 의도된다.

[0397] **6. 실시예**

[0398] 다음은 연구에서 사용되는 다양한 방법 및 물질의 설명이고, 본 발명을 어떻게 제조하고 사용하는지의 완전한 개시 및 설명을 통상의 기술자에게 제공하도록 제시되고, 발명자들이 이의 개시내용으로서 간주하는 것의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않을 뿐 아니라, 이들은 하기 실험이 수행되고 수행될 수 있는 모든 실험이라는 것을 나타내는 것으로 의도되지 않는다. 현재 시제로 작성된 예시적 설명은 반드시 수행된 것은 아니지만, 설명은 본 발명의 교시와 연관된 데이터 등을 생성하기 위해 수행될 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 사용된 수(예를 들어, 양, 비율 등)에 대해 정확성을 보장하기 위한 노력이 이루어졌지만, 일부 실험 오차 및 편차가 고려되어야 한다.

[0399] **6.1. 실시예 1-SMN을 코딩하는 핵산의 구축**

[0400] 이 실시예는 SMN을 코딩하는 제1 핵산 영역 및 다중 내인성 마이크로RNA(miRNA)의 다중 표적 세그먼트를 포함하는 제2 핵산 영역을 포함하는 본원에 제공된 예시적 핵산의 구축을 나타낸다(도 1a 참고).

[0401] 인간 SMN1(hSMN1)의 코딩 서열의 최적화를 GPS 기술(ATUM Inc., USA), OptimWiz(GeneWiz, USA), OptimumGene(GenScript, USA), 및 PyCUB(J. Kalfon, 2018)을 포함한 알고리즘 및 플랫폼을 사용하여 야생형 SMN1 단백질 서열(서열번호 33)을 기초로 하여 수행하였다. 야생형 hSMN1 코딩 서열(서열번호 34) 및 코돈 최적화된 hSMN1 코딩 서열(예를 들어, 서열번호 35)을 그 후에 본원에 제공된 최적화된 프로모터 서열(서열번호 36 또는 서열번호 37)을 함유하는 발현 벡터 내로 클로닝하였다. 코돈 최적화는 하기 더욱 상세히 기재된 웨스턴 블롯을 사용한 단백질 발현 분석(도 2a)과 일치하는, 전사체 분석(도 2b)에 의해 측정된 바와 같은 시험관내에서 hSMN1 mRNA 발현을 증가시켰다. 또한, 하기 더욱 상세히 논의된 바와 같이, 주사된 동물의 증가된 중간 생존을 생체내 효능 분석에서 나타낸 바와 같이 관찰하였다.

[0402] 본 핵산 구축물에서 사용되는 각각의 표적 세그먼트의 mRNA 전사체는 조직-특이적 내인성 miRNA, 예를 들어 간 특이적 miRNA, 예컨대 hsa-mir-122, 및 심장-특이적 내인성 miRNA, 예컨대 hsa-mir-1-5p, hsa-mir-208a, hsa-mir-208b, hsa-mir-133a, 및 hsa-mir-448-5p에 의해 특이적으로 하이브리드화가능하다. 상술한 miRNA 각각에 대한 예시적 표적 세그먼트를 상기 표 2에 나타내었다. 도 1b는 다중 표적 세그먼트를 포함하는 특정 핵산 영역을 나타낸다. 다중 내인성 miRNA의 다중 표적 세그먼트를 포함하는 예시적 제2 핵산 영역의 서열을 또한 하기 표 6에 나타내었으며, 각각의 핵산 서열에 대한 구성요소 표적 세그먼트를 나타내었다. 도 1a, 도 1b, 및 표 6에서, miR-1은 hsa-mir-1-5p의 표적 세그먼트를 나타내고, miR-208a는 hsa-mir-208a-5p의 표적 세그먼트를 나타내고, miR-208b는 hsa-mir-208b-5p의 표적 세그먼트를 나타내고, miR-122는 hsa-mir-122의 표적 세그먼트를 나타내고, miR-133은 hsa-mir-133a-1의 표적 세그먼트를 나타내고, miR-488은 hsa-mir-488-5p의 표적 세그먼트를 나타낸다. 이들 예시적 구축물의 5'(좌측)은 SMN 코딩 서열 및 이의 완충 서열과 일치하고, 이들 예시적 구축물의 3'(우측)은 polyA 서열 및 이의 완충 서열과 일치한다. 링커는 특정 표적 세그먼트 사이에 존재한다. 나타낸 바와 같이, 구축물은 다중 반복 서열을 가질 수 있다. 서열은 예시적 구축물로서 제공된다. 이들 표적 세그먼트의 순서는 변경될 수 있고 본 발명에 포함된다.

표 5. SMN 및 프로모터에 대한 서열

영역	서열	서열번호
SMN 단백질 (wt) 아미노산 서열	MAMSSGGSGGGVPEQEDSVLFRRGTGQSDSDI WDDTALIKAYDKAVASFKHALKNGDICETSGKPK TTPKRKPAKKNKSQKKNTAASLQQWKVGDKCSA IWSEDCIYPATIASIDFKRETCVVVYTYGNREE QNLSDLLSPICEVANNIEQNAQENENESQVSTDES ENSRSPGNKSDNIKPKSAPWNSFLPPPPMPGPRL GPGKPLKFNGLPPPPPPPHLLSCWLPFPSPGPI IPPPPICPDSLDDADALGSMLISWYMSGYHTGY MGFRQNQKEGRCSHSLN	서열번호 33
SMN 핵산 서열 (wt)	ATGGCGATGAGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGG CGTCCCGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCG GCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACAT TTGGGATGATACAGCACTGATAAAAGCATATGAT AAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAG AATGGTGACATTTGTGAAACTTCGGGTAAACCA AAAACCACACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAA GAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTC CTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTT TGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTACCCA GCTACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGAGAAA CCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGGAAATAG AGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCC AATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAAT GCTCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCA	서열번호 34

[0403]

	<p>ACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGA  AATAAATCAGATAACATCAAGCCCAAATCTGCTC  CATGGAACTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCCCAT  GCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAG  GTCTAAAATTCAATGGCCCACCACCGCCACCGC  CACCACCACCACCCACTTACTATCATGCTGGCT  GCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCC  CCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATG  ATGCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTAATTCATG  GTACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGG  GTTTTAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCT  CACATTCCTTAAAT</p>	
<p>코돈 최적화된  SMN 핵산  서열</p>	<p>ATGGCCATGAGCAGCGGAGGAAGCGGAGGAGG  AGTGCCCGAGCAAGAGGACAGCGTGTGTTTAG  GAGAGGAACCGGACAGAGCGATGACTCCGATAT  CTGGGACGACACCGCTCTGATCAAGGCCATGA  CAAAGCCGTGGCCTCCTTCAAGCACGCTCTGAA  GAATGGCGATATCTGTGAGACCTCCGGCAAACC  TAAGACCACCCCAAGAGGAAGCCCGCCAAGA  AGAACAAGTCCCAGAAGAAGAATACCGCCGCT  AGCCTCCAGCAGTGGAAAAGTGGGCGATAAGTGC  AGCGCCATTTGGAGCGAGGATGGATGCATCTAC  CCCGCCACCATTGCCAGCATCGACTTCAAGAGG  GAGACATGCGTGGTGGTGTATACCGGATACGGA  AATAGAGAGGAGCAGAATCTGAGCGATCTGCTG  TCCCCATCTGCGAGGTGGCCAATAATATCGAGC  AGAACGCCCAAGAGAACGAGAACGAAAGCCAA  GTGTCCACCGATGAGAGCGGAGAACTCCAGAAG  CCCCGAAACAAGTCCGACAACATCAAACCCA  AGAGCGCCCCCTTGGAACAGCTTTCTGCCTCCTC  CCCCCCCATGCCCGGCCCTAGACTGGGACCCG  GCAAGCCCGGACTGAAGTTCAACGGACCCCCC  CCTCCTCCTCCCCCCCCTCCTCCTCATCTGCTGA  GCTGCTGGCTCCCCCCTTCCCTAGCGGCCCCCC  CATTATCCCCCCCCCTCCCCCTATCTGTCCCGAC  AGCCTCGATGACGCTGACGCCCTCGGAAGCATG  CTGATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCACACC  GGATACTACATGGGCTTCAGACAGAACCAGAAG  GAGGGCAGATGCTCCACTCTCTGAAC</p>	<p>서열번호 35</p>
<p>예시적  프로모터  서열 (1)</p>	<p>CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGG  CTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTC  AATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAAT</p>	<p>서열번호 36</p>

[0404]

	<p>AGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA                  TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA                  AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGA                  CGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATT                  TGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTAC                  TTGGCAGTACATCTACTCGAGGCCACGTTCTGC                  TTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCTCCCCACCC                  CAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGT                  GCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGGG                  GCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGG                  CGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGGC                  AGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAAGTTTCC                  TTTTATGGCGAGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTA                  TAAAAAGCGAAGCGCGCGGGCGGGGAGCGG                  GATCAGCCACCGCGGTGCGGCCTAGAGTCGA                  CGAGGAACTGAAAAACCAGAAAGTAACTGGT                  AAGTTTAGTCTTTTTGTCTTTTATTTACAGTCCC                  GGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGAAGTGT                  CCTCAGTGGATGTTGCCTTACTTCTAGGCCTGT                  ACGGAAGTGTACTTCTGCTCTAAAAGCTGCGG                  AATTGTACCCGCGCCGATCCACCGGTCCGGAA                  TTCCCGGATATCGTTCGACCCACGCGTCCGGGC                  CCCACGCTGCGCACCCGCGGGTTTGCT</p>	
<p>예시적                  프로모터                  서열 (2)</p>	<p>CCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTG                  GCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGT                  CAATAGTAACCCAATAGGGACTTTCATTGAC                  GTC AATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCC                  ACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAA                  GTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAAT                  GGCCCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACCT                  TATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACG                  TATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGA                  GCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCC                  CCCCTCCCCACCCCAATTTTGTATTTATTTATT                  TTTAATTATTTTGTGCAGCGATGGGGGCGGGG                  GGGGGGGGGGGGCGCGGCCAGGCGGGGCGGG                  GCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGG                  AGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGC                  GCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGCG                  GCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGC                  GCGGGGCGGGAGTCGCTGCGACGCTGCCTTCGC                  CCCGTGCCCCGCTCCGCCGCGCCTCGCGCCGC                  CCGCCCCGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCCA</p>	<p>서열번호 37</p>

	<p>CAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCG                  GGCTGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTTT                  AAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAATGTTT                  AATTACCTGGAGCACCTGCCTGAAATCACTTTT                  TTTCAGG</p>	
--	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0405]

[0406]

표 6. 다중 표적 세그먼트를 포함하는 예시적 miRNA 스펠지 영역

서열 (서열번호)	표적 세그먼트
TTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGAAACACTTGCTGGGATTACTTCT TCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTAT ATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTACATACTTCTTTAT ATGCCATGTGAAGCCACAGATGATGGGCATATAA AGAAGTATGTATTGCCTACTGCCTCGGAATTCAAG GGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAA ACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTAC AAAGCTGAATTAATAATGGTATAAATTAATCACTT TTTTCTAGTATAACCCGGGCCAAAAGCTCAGTAT <u>AAACCCGGGCCAAAAGCTCGACATAATTCGAGCA</u> AAAAGCTAACATAATTCGAGCAAAAAGCTCTTGAC AAACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGT CACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCA ( 서열번호 18)	1x hsa-mir-1; 2x hsa-mir-208a; 3x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122 (EXG202 예서와 같음)
GTATAACCCGGGCCAAAAGCTCAGTATAACCCGGG CCAAAAGCTCGACATAATTCGAGCAAAAAGCTAA CATAATTCGAGCAAAAAGCTCTTGACAAACACCAT TGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCA ACAAACACCATTGTCACACTCCACCATAGACAGCT GGTTGAAGGGGACCAAAACAGCTGGTTGAAGGGG ACCAAAACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA ( 서열 번호 19)	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a (EXG204 예서와 같음)
GTATAACCCGGGCCAAAAGCTCAGTATAACCCGGG CCAAAAGCTCGACATAATTCGAGCAAAAAGCTAA CATAATTCGAGCAAAAAGCTCTTGACAAACACCAT TGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCA ACAAACACCATTGTCACACTCCACCATAGATTGAG AGTGCCATTATCTGGGATTGAGAGTGCCATTATCT GGGAATGGGCATATAAAGAAGTATGTAATGGGCA TATAAAGAAGTATGT ( 서열번호 20)	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 2x hsa-mir-488; 2x hsa-mir-1 (EXG205 예서와 같음)
TTGAATGAGGCTTCAGTACTTTACAGAATCGTTGC CTGCACATCTTGAAACACTTGCTGGGATTACTTCT TCAGGTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTAT ATTGCTGTTGACAGTGAGCGCTTTTGGTCCCCTTCA ACCAGCTGGTGAAGCCACAGATGCAGCTGGTTGAA GGGGACCAAAAATTGCCTACTGCCTCGGAATTCAAG GGGCTACTTTAGGAGCAATTATCTTGTTTACTAAA ACTGAATACCTTGCTATCTCTTTGATACATTTTAC AAAGCTGAATTAATAATGGTATAAATTAATCACTT TTTTCTAGTATAACCCGGGCCAAAAGCTCAGTATA ACCCGGGCCAAAAGCTCGACATAATTCGAGCAAAA AAGCTAACATAATTCGAGCAAAAAGCTCTTGACAA ACACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCA CACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCA ( 서열 번호 21)	1x hsa-mir-133a; 2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122 (EXG206 예서와 같음)

[0407]

[0408]

[0409]

[0410]

6.2. 실시예 2-핵산을 포함하는 AAV 벡터의 구축

섹션 6.1에 기재된 것을 포함한 핵산 서열을 이 실시예에서 AAV9로부터 유래된 예시적 rAAV 벡터 내로 도입하여, 예를 들어 도 1a에 나타난 바와 같이 EXG202, EXG204, EXG205, EXG206, EXG207, EXG209, 및 EXG211을 포함한 rAAV 벡터를 생성하였다. 예시적 rAAV 벡터(즉, EXG204, EXG207, EXG209 및 EXG211)의 핵산 서열을 하기 표에 나타내었다. 이들 rAAV 벡터 내의 표적 세그먼트를 표 6 및 표 7에 나타내었다. 본원에 제공된 예시적 rAAV 벡터의 구성요소가 또한 표 8에 제공된다.

표 7. 예시적 rAAV 벡터

AAV 게놈 명칭 (ITR-에 서-ITR)	서열 (서열번호)	표적 세그먼트
EXG204-LmiR122-HmiR133	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAATGCACG CGTGGATCTGAGTTCAATTCACGCGTGGT ACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC CCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT ATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa- mir-133a-1

[0411]

	CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACC TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATC TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTC GAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTACTCT CCCCATCTCCCCCCTCCCCACCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGT GCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGG GGCGCGCGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGG CGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGA GGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGG CGGCGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGC GAAGCGCGCGGCGGGCGGGAGTCGCTGC GACGCTGCCTTCGCCCCGTCCCCGCTCC GCCGCCGCTCGCGCCGCCCGCCCGGCT CTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCTCCGGGC TGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTT TAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAA TGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAA ATCACTTTTTTTCAGGAATCCCAGGATAT CGTCGACCCACGCGTCCGGGCCCCACGCT GCGCACCCGCGGGTTGCTATGGCGATGA GCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCC GGAGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCGGC GCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGAC ATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAAGC ATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGC ATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGAA ACTTCGGGTAAACCAAAAACCACACCTAA AAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAAGC CAAAAGAAGAATACTGCAGCTTCCTTACA ACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTG CCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTAC CCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTAAG AGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGG ATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTG TCCGATCTACTTCCCAATCTGTGAAGTA GCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGA GAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACA GATGAAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGG AAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAAT	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0412]

	<p>CTGCTCCATGGAACCTCTTTCTCCCTCCAC                  CACCCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGA                  CCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATCAATGG                  CCCACCACCGCCACCGCCACCACCACCAC                  CCCACTTACTATCATGCTGGCTGCCTCCAT                  TTCCTTCTGGACCACCAATAATCCCCCAC                  CACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATG                  ATGCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTAATT                  TCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTGG                  CTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCAAA                  AAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAAT                  TAAGGAGAAAATGCTGGCATAGAGCAGCA                  CTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCA                  GACAGATCTAGTATAACCCGGGCCAAAA                  GCTCAGTATAACCCGGGCCAAAAGCTCGA                  CATAATTCGAGCAAAAAGCTAACATAATT                  CGAGCAAAAAGCTCTTGACAAACACCATT                  GTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACA                  CTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCAC                  CATAGACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA                  ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAAACAGC                  TGGTTGAAGGGGACCAAAACAAGCTTATCG                  ATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGC                  CTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC                  TGTGTTTGCCCCTCCCCGTGCCTTCCTT                  GACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCC                  TTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCG                  CATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTG                  GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG                  GGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCA                  TGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAACCC                  CTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCT                  GCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGC                  GACCAAAGGTCGCCCACGCCCAGGCTTT                  GCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAG                  CGCGCAGAGAGGGAGTGCC ( 서열번호                  22)</p>	
<p>EXG207-LmiR122- HmiR133</p>	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC                  CCGGGCAAAGCCCAGGCGTCGGGCGACC                  TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG                  AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAATGCACG                  CGTGGATCTGAGTTCAATTCACGCGTGGT                  ACCTCTGGTCGTTACATAACTTACGGTAA</p>	<p>2x hsa-mir-208a; 2x                  hsa-mir-208b; 3x                  hsa-mir-122; 3x hsa-                  mir-133a-1</p>

[0413]

	<p>                     ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC                      CCCC GCCCATTGACGTCAATAATGACGTA                      TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTT                      TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA                      CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA                      AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA                      TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCC                      TGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG                      GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACTC                      GAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATC                      TCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTAT                      TTATTTATTTTTAATTATTTTGTGCAGCG                      ATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCG                      CGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG                      GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCG                      GCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC                      GAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGG                      CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG                      CGCGGGCGGGGAGCGGGATCAGCCAC                      CGCGGTGGCGGCCTAGAGTCGACGAGGA                      ACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAA                      GTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTTCAAGTC                      CCGGATCCGGTGGTGGTCAAATCAAAGA                      ACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTACTT                      CTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGC                      TCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC                      CGATCCACCGGTCCGGAATTCCCGGGATA                      TCGTCGACCCACGCGTCCGGGCCCCACGC                      TGCGCACCCGCGGGTTTGCTATGGCCATG                      AGCAGCGGAGGAAGCGGAGGAGGAGTGC                      CCGAGCAAGAGGACAGCGTGCTGTTTAGG                      AGAGGAACCGGACAGAGCGATGACTCCG                      ATATCTGGGACGACACCGCTCTGATCAAG                      GCCTATGACAAAGCCGTGGCCTCCTTCAA                      GCACGCTCTGAAGAATGGCGATATCTGTG                      AGACCTCCGGCAAACCTAAGACCACCCCC                      AAGAGGAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGT                      CCCAGAAGAAGAATACCGCCGCTAGCCTC                      CAGCAGTGGAAAGTGGGCGATAAGTGCA                      GCGCCATTTGGAGCGAGGATGGATGCATC                      TACCCCGCCACCATTGCCAGCATCGACTT                      CAAGAGGGAGACATGCGTGGTGGTGTAT                      ACCGGATACGAAAATAGAGAGGAGCAGA                 </p>	
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0414]

	<p>ATCTGAGCGATCTGCTGTCCCCATCTGC          GAGGTGGCCAATAATATCGAGCAGAACG          CCAAGAGAACGAGAACGAAAGCCAAGT          GTCCACCGATGAGAGCGAGAACTCCAGA          AGCCCCGAAACAAGTCCGACAACATCA          AACCCAAGAGCGCCCCTTGGAACAGCTTT          CTGCCTCCTCCCCCCCCATGCCCGGCCCT          AGACTGGGACCCGGCAAGCCCGGACTGA          AGTTCAACGGACCCCCCTCCTCCTCCC          CCCCCTCCTCCTCATCTGCTGAGCTGCTGG          CTCCCCCTTTCCTAGCGGCCCCCCCATT          ATCCCCCCCCCTCCCCCTATCTGTCCCGAC          AGCCTCGATGACGCTGACGCCCTCGGAAG          CATGCTGATCAGCTGGTACATGAGCGGCT          ACCACACCGGATACTACATGGGCTTCAGA          CAGAACCAGAAGGAGGGCAGATGCTCCC          ACTCTCTGAACTGAGGAGAAATGCTGGCA          TAGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAA          GAAACGATCAGACAGATCTAGTATAACCC          GGGCAAAAAGCTCAGTATAACCCGGGCC          AAAAGCTCGACATAATTCGAGCAAAAAG          CTAACATAATTCGAGCAAAAAGCTCTGA          CAAACACCATTGTCACACTCCAACAAACA          CCATTGTCACACTCCAACAAACACCATTG          TCACACTCCACCATAGACAGCTGGTTGAA          GGGGACCAAAAACAGCTGGTTGAAGGGGA          CCAAAAACAGCTGGTTGAAGGGGACAAA          CAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCT          CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAG          TTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCC          CGTGCCTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCA          CTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAG          GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTG          TCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGC          AGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGT          CTAGAGCAGGCATGCTGGGGAGAGATCG          ATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGG          CCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCA          CTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCCCCG          ACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAG          TGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT          GGCC ( 서열번호 23)</p>	
--	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0415]

<p>EXG209-LmiR122-HmiR133</p>	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC                  CCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACC                  TTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG                  AGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAATTCACG                  CGTGGATCTGAATTCAATTCACGCGTGGT                  ACCTCTGGTCGTTACATAACTTACGGTAA                  ATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGAC                  CCCC GCCCATTGACGTCAATAATGACGTA                  TGTTC CATAGTAACGCCAATAGGGACTT                  TCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTA                  CGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCA                  AGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTA                  TTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCC                  TGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG                  GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACTC                  GAGGCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCATC                  TCCCCCCCCTCCCCACCCCAATTTTGTAT                  TTATTTATTTTTTAATTTTGTGCAGCG                  ATGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCG                  CGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGG                  GCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCG                  GCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCC                  GAAAGTTTCCTTTATGGCGAGGCGGCGG                  CGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCG                  CGCGGCGGGGCGGGAGCGGGATCAGCCAC                  CGCGGTGGCGGCCTAGAGTCGACGAGGA                  ACTGAAAAACCAGAAAGTTAACTGGTAA                  GTTTAGTCTTTTGTCTTTTATTCAGGTC                  CCGGATCCGGTGGTGGTGCAAATCAAAGA                  ACTGCTCCTCAGTGGATGTTGCCTTACTT                  CTAGGCCTGTACGGAAGTGTACTTCTGC                  TCTAAAAGCTGCGGAATTGTACCCGCGGC                  CGATCCACCGGTCCGGAATCCCGGGATA                  TCGTCGACCCACGCGTCCGGGCCCCACGC                  TGCGCACCCGCGGGTTTGTATGGCGATG                  AGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCC                  CGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCGG                  CGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGA                  CATTGGGATGATACAGCACTGATAAAAAG                  CATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAG                  CATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTGA                  AACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTA                  AAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAAG</p>	<p>2x hsa-mir-208a; 2x                  hsa-mir-208b; 3x                  hsa-mir-122; 3x hsa-                  mir-133a-1</p>
-------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0416]

	<p>                     CAAAAAGAAGAATACTGCAGCTTCCTTAC                      AACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCT                      GCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTA                      CCCAGCTACCATTGCTTCAATTGATTTAA                      GAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACTG                      GATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCT                      GTCCGATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGT                      AGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAG                      AGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAAC                      AGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTG                      GAAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAA                      ATCTGCTCCATGGAACCTTTTTCTCCCTCC                      ACCACCCCATGCCAGGGCCAAGACTGG                      GACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAAT                      GGCCACCACCGCCACCGCCACCACCACC                      ACCCACTTACTATCATGTGGCTGCCTCC                      ATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCCC                      ACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTGA                      TGATGCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTAA                      TTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACT                      GGCTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCA                      AAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCTTAA                      ATTAAGGAGAAATGCTGGCATAGAGCAG                      CACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATC                      AGACAGATCTAGTATAACCCGGGCCAAA                      AGCTCAGTATAACCCGGGCCAAAAGCTCG                      ACATAATTCGAGCAAAAAGCTAACATAAT                      TCGAGCAAAAAGCTCTTGACAAACACCAT                      TGTCACACTCCAACAAACACCATTGTCAC                      ACTCCAACAAACACCATTGTCACACTCCA                      CCATAGACAGCTGGTTGAAGGGGACCAA                      AACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAAACAG                      CTGGTTGAAGGGGACCAAAACAGCTTATC                      GATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAG                      CCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT                      CTGTTGTTTGCCTTCCCCGTGCCTTCT                      TGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTC                      CTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATC                      GCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCT                      GGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAG                      GGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGC                      ATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAAC                      CCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCT                 </p>	
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0417]

	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGG GCGACCAAAGGTCGCCCACGCCCGGGCT TTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGCGA GCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열 번호 24)</p>	
<p>EXG211-LmiR122- HmiR133</p>	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGC CCGGGCAAAGCCCCGGGCGTCGGGCGACC TTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCG AGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACG CGTGGATCTGAGTTCAATCACGCGTGGT ACCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCC CGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGC CCATTGACGTCAATAGTAACGCCAATAGG GACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGT ATTTACGGTAAACTGCCCCTTGGCAGTA CATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGC CCGCCTGGCATTGTGCCAGTACATGACC TTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATC TACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTC GAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCT CCCCATCTCCCCCCTCCCCACCCCAAT TTTGTATTTATTTATTTTAAATTATTTGT GCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG GGCGCGGCCAGGCGGGGCGGGGCGGGG CGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGA GGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCG CGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGG CGGCGGCGGGCGGGCCCTATAAAAAGC GAAGCGCGGGCGGGCGGGAGTCGCTGC GACGCTGCCTTCGCCCCGTCCCCGCTCC GCCGCCCTCGCGCCCGCCCGCCCGGCT CTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTGA GCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCCGGGC TGTAATTAGCTGAGCAAGAGGTAAGGGTT TAAGGGATGGTTGGTTGGTGGGGTATTAA TGTTTAATTACCTGGAGCACCTGCCTGAA ATCACTTTTTTTCAGGAATCCCGGGATAT CGTCGACCCACGCGTCCGGGCCACGCT GCGCACCCGGGGCCACCATGGCCATGAGC AGCGGAGGAAGCGGAGGAGGAGTGCCCG AGCAAGAGGACAGCGTGCTGTTTAGGAG AGGAACCGGACAGAGCGATGACTCCGAT</p>	<p>2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa- mir-133a-1</p>

[0418]

	<p>ATCTGGGACGACACCGCTCTGATCAAGGC                  CTATGACAAAGCCGTGGCCTCCTCAAGC                  ACGCTCTGAAGAATGGCGATATCTGTGAG                  ACCTCCGGCAAACCTAAGACCACCCCAA                  GAGGAAGCCCGCAAGAAGAACAAGTCC                  CAGAAGAAGAATACCGCCGCTAGCCTCCA                  GCAGTGGAAAGTGGGCGATAAGTGCAGC                  GCCATTTGGAGCGAGGATGGATGCATCTA                  CCCC GCCACCATTGCCAGCATCGACTTCA                  AGAGGGGAGACATGCGTGGTGGTGTATACC                  GGATACGGAAATAGAGAGGAGCAGAATC                  TGAGCGATCTGCTGTCCCCCATCTGCGAG                  GTGGCCAATAATATCGAGCAGAACGCCCA                  AGAGAACGAGAACGAAAGCCAAGTGTC                  ACCGATGAGAGCGAGAACTCCAGAAGCC                  CCGGAAACAAGTCCGACAACATCAAACC                  CAAGAGCGCCCCTTGGAACAGCTTTCTGC                  CTCCTCCCCCCCCCATGCCGGCCCTAGA                  CTGGGACCCGGCAAGCCCGGACTGAAGTT                  CAACGGACCCCCCCTCCTCCTCCCCC                  CTCCTCCTCATCTGCTGAGCTGCTGGCTCC                  CCCCTTTCCCTAGCGGCCCCCCATTATCC                  CCCCCCTCCCCTATCTGTCCCGACAGCC                  TCGATGACGCTGACGCCCTCGGAAGCATG                  CTGATCAGCTGGTACATGAGCGGCTACCA                  CACCGGATACTACATGGGCTTCAGACAGA                  ACCAGAAGGAGGGCAGATGCTCCACTCT                  CTGAACTGAGGAGAAATGCTGGCATAGA                  GCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAA                  CGATCAGACAGATCTAGTATAACCCGGGC                  CAAAAGCTCAGTATAACCCGGGCCAAAA                  GCTCGACATAATTCGAGCAAAAAGCTAAC                  ATAATTCGAGCAAAAAGCTCTTGACAAAC                  ACCATTGTCACACTCCAACAAACACCATT                  GTCACACTCCAACAAACACCATTGTCACA                  CTCCACCATAGACAGCTGGTTGAAGGGGA                  CAAAACAGCTGGTTGAAGGGGACCAAA                  ACAGCTGGTTGAAGGGGACCAACAAGC                  TTATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTG                  ATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCC                  AGCCATCTGTTGTTGCCCTCCCCGTGC                  CTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCC                  ACTGTCCTTTCCTAATAAAATGAGGAAAT</p>	
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0419]

	<p>TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATT                  CTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC                  AGCAAGGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGA                  GCAGGCATGCTGGGGAGAGATCGATCTG                  AGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT                  CCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGA                  GGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCGACGC                  CCGGGCTTTGCCGGGGCGGCCTCAGTGAG                  CGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGCC                  ( 서열번호 25)</p>	
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--

[0420]

표 8. 예시적 rAAV 벡터의 구성요소

	SMN 코딩 서열	프로모터	표적 세그먼트
EXG101-01	서열번호 34	서열번호 36	--
EXG101-01M2	서열번호 34	서열번호 36	--
EXG101-01-03	서열번호 35	서열번호 36	--
EXG101-02M	서열번호 34	서열번호 37	--
EXG101-05M	서열번호 35	서열번호 37	--
EXG202	서열번호 34	서열번호 36	1x hsa-mir-1; 2x hsa-mir-208a; 3x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122
EXG204	서열번호 34	서열번호 36	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a-1
EXG205	서열번호 34	서열번호 36	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 2x hsa-mir-488; 2x hsa-mir-1
EXG206	서열번호 34	서열번호 36	1x hsa-mir-133a; 2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122

[0421]

EXG207	서열번호 35	서열번호 36	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a-1
EXG209	서열번호 34	서열번호 36	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a-1
EXG211	서열번호 35	서열번호 37	2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a-1

[0422]

[0423]

[0424]

### 6.3. 실시예 3-단백질 발현 분석

HEK 293 세포를 10%의 소태아혈청이 보충된 DMEM을 갖는 12-웰 플레이트에서 배양하고, 감염되기 전에 24 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온처리기에서 항온처리하였다. HEK 293 세포를 1 mL DMEM, 10% FBS에서 감염 전에 24 시간 동안 웰 당 4 x 10<sup>5</sup> HEK 293 세포를 갖는 12-웰 플레이트에 시딩하고, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온처리기에서 항온처리하였다. 그 다음에, HEK 293 세포를 본원에 제공된 rAAV-SMN(10<sup>5</sup>GC/세포) 및 인간 아데노 바이러스 5(Ad5) 헬퍼 바이러스(10 iu/세포)로 공동-감염시키고 72 시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 항온처리기에서 항온처리하였다. 정상

293FT 세포를 블랭크 대조군으로서 사용하였다. 세포를 72 시간에 수집하고, PBS에 의해 세척하고, 원심분리에 의해 펠릿화하고, 세포 용해 완충액에서 용해시켰다. BCA 분석으로부터 계산된 총 단백질 농도를 기초로 하여, 동등한 양의 단백질(1.25 ug/샘플)을 함유한 샘플을 제조사의 권고(Invitrogen)에 따라 4%-12% Bis-Tris 겔 전기영동에 의해 별도로 용해시킨 다음에, 25 V에서 7 분 동안 파워 블롯터 스테이션(power blotter station)을 사용하여 니트로셀룰로오스 막 상으로 이동시키고, SMN 항체 및 튜블린 항체로 탐색하였다.

[0425] 본 실시예에서 시험된 rAAV 벡터를 상기 표 8에 나타내었다. 예를 들어, EXG101-01-03은 프로모터 서열(서열번호 35) 구동된 hSMN1 서열(서열번호 36)을 포함하고; EXG101-05M은 프로모터 서열(서열번호 35) 구동된 hSMN1 서열(서열번호 37)을 포함하고; EXG101-02M은 프로모터 서열(서열번호 34) 구동된 hSMN1 서열(서열번호 37)을 포함하고; EXG101-01M2는 프로모터 서열(서열번호 34) 구동된 hSMN1 서열(서열번호 36)을 포함한다.

[0426] 발현 강도를 SMN/튜블린의 비에 의해 측정하였으며, 결과를 도 2a에 나타내었다.

[0427] **6.4. 실시예 4-생체내 효능 분석**

[0428] 본원에 제공된 구축물을, 생존 운동 뉴런 *I(smn1)* 유전자에서 이중-대립유전자 돌연변이를 갖는 척수성 근위축(SMA)을 갖는 P0-2 세의 마우스를 처치함으로써 생체내 효능 분석에서 시험하고 분석하였다. 생체내 효능 분석은 *smn1*<sup>-/-</sup> 결핍 마우스 모델에서의 구제 실험, 중간 생존 및 다른 관련 생체내 파라미터의 측정, 예컨대 올바른 체중 측정을 지칭한다. SMA 1 형 마우스 모델을 독립적으로 우측 또는 뒤쪽에 대한 능력을 얻기 전에 낮은 운동 뉴런의 손실과 연관된 진행성 근력 약화의 개시에 의해 정의한다.

[0429] 도 3-6에 나타난 바와 같이, 본 구축물, 예를 들어 EXG204로 처치된 마우스는 처치가 없는 대조군 야생형 마우스에 대해 우수한 생존율, 유사한 개방 필드 활성, 및 매우 일정한 체중 분포를 나타내었다.

[0430] 결과는 또한 hsa-mir-133a(예를 들어, EXG204 및 EXG206에서와 같음)의 표적 세그먼트가 다른 miRNA, 예컨대 hsa-mir-1 및 hsa-mir-488a(예를 들어, EXG202 및 EXG205에서와 같음)의 표적 세그먼트에 비해 더욱 효과적이라는 것을 나타낸다(도 6 참고). 또한, hsa-mir-133a의 표적 세그먼트의 다중 반복부, 예를 들어 3 개 반복부는 EXG204 및 EXG206을 비교함으로써 예시된 바와 같이 hsa-mir-133a의 단일 표적 세그먼트와 비교하여 양호한 결과를 나타내었다.

[0431] 요약하면, *smn1* 유전자의 전달을 위한 본 rAAV9 바이러스 벡터는 최적화된 프로모터 서열에 의해 구동된 인간 SMN1 단백질을 발현하고, 내인성 마이크로RNA의 3'-표적화 서열에 의한 전사후 조절을 통해 생체내 용인된 간독성 및 심장 독성을 동시에 달성하고(> 60% 양호), 간 및 심장에서 SMN1의 조직 특이적 하향-조절을 최대화하는 것으로 나타났다.

[0432] **6.5. 실시예 5-합성 프로모터를 포함하는 구축물**

[0433] 합성 프로모터를 포함하는 다양한 핵산 구축물을 이 연구에서 생성하고 시험하였다. 구체적으로, 도 7a 및 도 7b에 나타난 바와 같이, 특정 구축물에서, 다양한 인헨서를 코어 프로모터(hSyn)와 조합하였다. 예를 들어, EXG304는 proC3 인헨서 및 hSyn 프로모터를 포함하고; EXG305는 proB15 인헨서 및 hSyn 프로모터를 포함하고; EXG306은 proA5 인헨서 및 hSyn 프로모터를 포함하고; EXG307은 CMV 인헨서 및 hSyn 프로모터를 포함하고; EXG340은 SMN1 단백질 코딩 서열을 인간 SMN1의 코돈 최적화된 서열로 치환함으로써 설계되는 한편, 다른 요소는 EXG307과 동일하다. 다양한 인헨서 및 프로모터를 표 9에 나타내었다. rAAV 벡터에 대한 서열을 도 7b에 나타내었고(즉, EXG301, EXG302, EXG303, EXG304, EXG305, EXG306 및 EXG307), EXG340, 및 EXG341을 하기 표 10에 나타내었다.

표 9. 코어 프로모터 및 인핸서 서열

요소 명칭	서열 (5'-에서-3')
코어 프로모터 (hSyn) 서열	AGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGG GTGCCTACCTGACGACCGACCCGACCCACTGGACAAGCACC CAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGG GGAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGGCGGTGCGCACTGCCA GCTTCAGCACCCGCGGACAGTGCCCTCGCCCCCGCCTGGCGGC GCGCGCCACCGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCA CTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTC GCGTCCGCGCCGCCGCCGGCCAGCCGGACCGCACCACGCGA GGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGC GGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGC GGAGGAGTCGTGTCGTGCTGAGAGCGCAG ( 서열번호 38)
CMV 인핸서	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC CAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCC CATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGT GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGT GTATCATATGCCAAGTACGCCCTATTGACGTCAATGACGG TAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT ATTACCATG ( 서열번호 39)
ProC3 인핸서	GATGAATTCCGCGGAAACTAGGTCCGGAGGACTGCCGAA ACACCTGTAATCAAGCCGCGGAAACCTGTTGTGGCCGTATG CCGGAACCGTCTTAATTGGACGTGCCGAAACTCTTTAATG AGTTCGCCGAAACCAGACCAGCCGAGCTGCCGAAACCGG TTATATAGAACGGCCGAAACGGTCCACAGGAAAAAGCCGG AAACACCCAAACGGTTAGCGCCGAAACGACTGGGGAGGAC GTGCCGAAACGTACTATCTGAAGATGCCGAAACACTTGAA AGCTCCAAGCCGAAACGGGCCCGTGC GGATAGCCGAAAC TGACGGTACACGGCCCGGAAACACTACTTGTATGGTAGCC GGAAACTTGGGCGTGGCTGGGGCCGAAACGCTCGAGATCTG CGATC ( 서열번호 40)
ProA5 인핸서	CCTGGAGGCCTTCCTGGAAGAAGAGATCCTGGCACCGCACA AGAGAAGCACAGGCTTTCCAGGGCTGAGGAGAGGGAGGTCA AGTGAGGCCAGGTGCCCTGCCTGAGCCTGTGTCCCAGAA ACCTCCTCTCCTCTCATCACCCACATCCTCCTGCCACTC CCCGCAGCTCCCTGTGGCCAAGTGCAGTGCAGCACTCGGCTC TGCTCCACAAACGGTCTGCTCCACTCCAGGAAGGCCACCTCC

[0434]

	TCCCCCCCCCCCCACCTCCGGCTGTCACCACTACCCGCTCTAG CCTCCAGGGGGTGGGGACCCAGAGCTGGACACACCCCATCG AAGCCCCACAGCTCAGCCAGCCGGACAGACTACGGTCCGGAC TCAAGACCCCGGAGCCCTGAGGTGGGCAGCGCGCCAGGGTTC CTCGCAGCCTCTCAAGGTCAGTGCAAGT ( 서열번호 41)
ProB15 인핸서	CAGCCCCGGGCCCTCCTCCTCCTCTGCCTTTTAAAGGACG CCCTCCAGGGGACCCCGGAGGGCGGACTTGCCAAGCTGAAG AGAATCAGTCAAAAATCCGCCACAGGGGACACATCATTAA ATAAATGTGTTTCTTTGCCCGAACAGAAGTTCAGATAGGCTC GATTATCATTAAATTCTGGGTTTCACGTAACGAGAGGAAACAC AGGTTGCAATAAAAATAAAAAAATGGTTTGAAATCAATTTA ACTCATTTGACGTCCTCACACGTTTGACAAACCGATTTGTT TCAGGAGACTTGCTAATATCTAAATCGGTGACAGGGTGTGTTG CTGTGAGTGTGGCTCTGGAAAAGTTATTAAGCGTTATAAAAA AAATGATGTAATGAAATTCTAATTAATGGGAGGGAAGTGCCA ACAAATCACTCCTTAAAATATTAACGCTATCAAAGAACAGCT GGAGAAGG ( 서열번호 42)
ProC3 프로모터	GAAACAGCTGAGGGTGCCAGCCGAAACTCGAAATCAACG TAGGCCGAAACTATTCGATGAATTCGCCGAAACTAGGTC CGGAGGACTGCCGAAACACCTGTAATCAAGCCGCCGAAA CCTGTTGTGGCCGTATGCCGAAACGTCTTAATTGGACGTGC CGGAAACTCTTTAATGAGTTCGCCGAAACCAGACCAGCCG AGCTGCCGAAACCGTTATATAGAACGGCCGAAACGGTCC ACAGGAAAAAGCCGAAACACCCAAACGGTTAGCGCCGGAA ACGACTGGGGAGGACGTGCCGAAACGTAATCTGAAGAT GCCGAAACACTTGAAAGCTCCAAGCCGAAACGGGCCCGT GCGGATAGCCGAAACTGACGGTACACGGCCGCCGAAACA CTACTTGTATGGTAGCCGAAACTTGGGCGTGGCTGGGGCCG GAAACGCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCA ACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCTAACTC CGCCAGTTCGCCCATCTCCGCCCATCGCTGACTAATTT TTTTATTTATGCAGAGCCGAGGCCCTCGGCCTCTGAGCTA TTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTT GCAAA ( 서열번호 43)
EF1a 프로모터	GGCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACA GTCCCCGAGAAGTTGGGGGGAGGGGTGGCAATTGAACCGG TGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGTAAACTGGGAAAGTGATG TCGTGTACTGGCTCCGCTTTTTCCCGAGGGTGGGGGAGAAC CGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACGTTCTTTTTCGCAA CGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGCCGTGTGTGGTTC CCGCGGGCCTGGCCTTTTACGGGTTATGGCCCTTGCGTGCCT TGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATTCTTGATCCCGA GCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGAGGCCTTGCGC

[0435]

	TTAAGGAGCCCCCTTCGCCTCGTGCTTGAGTTGAGGCCTGGCCT GGGCGCTGGGGCCGCCGCTGCGAATCTGGTGGCACCTTCGC GCCTGTCTCGCTGCTTTTCGATAAGTCTCTAGCCATTTAAAATT TTTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTTCTGGCAAGATAGTCT TGTAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTTCGGTTTTT GGGGCCGCGGGCGGCGACGGGGCCCCTGCGTCCCAGCGCAC ATGTTTCGGCGAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCACCGAGAA TCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTCTGGTGC CTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGCGCAA GGCTGGCCCCGGTCCGACCAGTTGCGTGAGCGGAAAGATGGC CGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTAAAATGGAGGACGC GCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACAAAGG AAAAGGGCCTTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGACTCCA CGGAGTACGGGGCGCCGTCAGGCACCTCGATTAGTCTCGA GCTTTTGAGTACGTCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTTTTA TGCGATGGAGTTTCCCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAAGT TAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCCTTGAATTTGCC CTTTTGAGTTTGGATCTTGGTTCATTCTCAAGCCTCAGACAG TGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTCAGGTGTCGTGA ( 서열 번호 44)
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0436]

표 10. 다양한 프로모터를 갖는 예시적 rAAV 벡터

구축물 명칭	서열 (5'-에서-3')
EXG301	CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT TCAATTCACGCGTGCTGCGTATGGCGTATAGTGCAAGTGGGTT TTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGTGCCTACCTGACGA CCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCATTCCTCA AATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGAAACAGGAT GCGGCGAGGCGCGTGCGCACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGAC AGTGCTTCGCCCCCGCCTGGCGGCGCGGCCACCGCCGCCTC AGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAA ACTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCCGCCGCCG GCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGC ACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGC TGCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCT GAGAGCGCAGTCGAATCAAGCTGCTAGCCACCATGGCGATG AGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGAT TCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTG

[0437]

	<p>ACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAAGCATATGATAAAG                  CTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTG                  TGAAACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAGAAAACC                  TGCTAAGAAGAATAAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTC                  CTTACAACAGTGGAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCCATTTGG                  TCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTG                  ATTTTAAGAGAGAAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGG                  AAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATC                  TGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGAGAAT                  GAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCC                  AGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAAATCT                  GCTCCATGGAACCTTTTTCTCCCTCCACCACCCCATGCCAG                  GGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATG                  GCCCACCACCGCCACCGCCACCACCACCACCCCACTTACTATC                  ATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCC                  CACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATGCT                  TTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATA                  CTGGCTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCAAAAAGAAGGAA                  GGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAATGCTGGCATAGAG                  CAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGATCT                  ACAAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCC                  TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTC                  CCCCCTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTC                  CTTTCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA                  GGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA                  AGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGGGGAGA                  GATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT                  CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT                  CGCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGA                  GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열번호 45)</p>
EXG302	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCG                  GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC                  GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT                  TCAACCGCTAAAAGCTGGAACCTGGGGCCGAAACAGCTGAGGG                  TGCCAGCCGGAAACTCGAAATCAACGTAGGCCGGAAACTAT                  TCGATGAATTCGCCGGAAACTAGGTCCGGAGGACTGCCGGA                  AACACCTGTAATCAAGCCGCCGGAAACCTGTTGTGGCCGTATG                  CCGGAAACGCTTAATTGGACGTGCCGGAAACTCTTTTAATGA                  GTTCGCCGGAAACCAGACCAGCCGAGCTGCCGAAACCGGTT                  ATATAGAACGGCCGGAAACGGTCCACAGGAAAAAGCCGGAA                  ACACCCAAACGGTTAGCGCCGGAAACGACTGGGGAGGACGTG                  CCGGAAACGTAATCTGAAGATGCCGGAAACACTTGAAAGC                  TCCAAGCCGGAAACGGGCCCGTGCAGATAGCCGGAAACTGAC</p>

[0438]

	<p>GGTACACGGCCGCCGAAACACTACTTGTATGGTAGCCGGAA  ACTTGGGCGTGGCTGGGGCCGAAACGCTCGAGATCTGCGAT  CTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTC  CGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTCTCC  GCCCCATCGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAG  GCCGCCCTCGGCCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCT  TTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAGGATCCGCCACCATGGC  GATGAGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGA  GGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGA  TTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAAGCATATGAT  AAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACA  TTTGTGAAACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAGAA  AACCTGCTAAGAAGAATAAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAG  CTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCCAT  TTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCA  ATTGATTTTAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTACTGCGAT  ATGGAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCC  AATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGA  GAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAA  CTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAA  ATCTGTCCATGGAACTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCCCATGC  CAGGCCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCA  ATGGCCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCACCCTACT  ATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCCTTCTGGACCACCAATAATTC  CCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGAT  GCTTTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATC  ATACTGGCTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCAAAAAGAAG  GAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAATGCTGGCATA  GAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGA  TCTACAAAGCTTATCGATAACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCA  GCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCC  CTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCT  GTCCCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGA  GTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACA  GCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGGGG  AGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACT  CCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAA  AGGTCGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGA  GCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열번호 46)</p>
EXG303	<p>CCTGCGGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCC  GGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAG  CGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAG  TTCAATTCACGCGTGTGGCTCCGGTGCCCGTCACTGGGCAGAG</p>

[0439]

	<p>CGCACATCGCCACAGTCCCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTC  GGCAATTGAACCGGTGCCTAGAGAAGGTGGCGCGGGGTAAC  TGGGAAAGTGATGTCGTGACTGGCTCCGCCTTTTCCCGAGG  GTGGGGGAGAACCGTATATAAGTGCAGTAGTCGCCGTGAACG  TTCTTTTCGCAACGGGTTTGCCGCCAGAACACAGGTAAGTGC  CGTGTGTGGTTCCCGCGGGCCTGGCCTCTTACGGGTTATGGC  CCTTGCCTGCCTTGAATTACTTCCACTGGCTGCAGTACGTGATT  CTTGATCCCGAGCTTCGGGTTGGAAGTGGGTGGGAGAGTTCGA  GGCCTTGCCTTAAGGAGCCCTTCGCCTCGTGTGAGTTGA  GGCCTGGCCTGGGCGCTGGGGCCGCCGCGTGCGAATCTGGTG  GCACCTTCGCGCCTGTCTCGCTGCTTCGATAAGTCTCTAGCCA  TTTAAAATTTTGTGATGACCTGCTGCGACGCTTTTTTCTGGCAA  GATAGTCTTGAAATGCGGGCCAAGATCTGCACACTGGTATTT  CGGTTTTTGGGGCCCGGGCGGCGACGGGGCCCGTGCCTCC  AGCGCACATGTTCCGGCAGGCGGGGCCTGCGAGCGCGGCCAC  CGAGAATCGGACGGGGGTAGTCTCAAGCTGGCCGGCCTGCTC  TGGTGCCTGGCCTCGCGCCGCCGTGTATCGCCCCGCCCTGGGC  GGCAAGGCTGGCCCGTCCGACACAGTTGCGTGAGCGGAAAG  ATGGCCGCTTCCCGGCCCTGCTGCAGGGAGCTCAAAATGGAG  GACGCGGCGCTCGGGAGAGCGGGCGGGTGAGTCACCCACACA  AAGGAAAAGGGCCTTCCGTCCTCAGCCGTCGCTTCATGTGAC  TCCACGGAGTACCGGGCGCCGTCCAGGCACCTCGATTAGTTCT  CGAGCTTTTGGAGTACGTGCTCTTAGGTTGGGGGGAGGGGTT  TTATGCGATGGAGTTTCCACACTGAGTGGGTGGAGACTGAA  GTTAGGCCAGCTTGGCACTTGATGTAATTCTCCTTGAATTTG  CCTTTTTGTGATTGGATCTTGGTTCAATTCTCAAGCCTCAGACA  GTGGTTCAAAGTTTTTTTCTTCCATTTAGGTGTCGTGACGCCA  CCATGGCGATGAGCAGCGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGG  AGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGA  GCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAGC  ATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAAT  GGTGACATTTGTGAAACTTCGGGTAAACCAAAAACACACCT  AAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAA  TACTGCAGCTTCCCTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGT  TCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCA  TTGCTTCAATTGATTTAAGAGAGAAACCTGTGTTGTGGTTTA  CACTGGATATGGAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCT  ACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAAT  GCTCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAA  AGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATC  AAGCCCAAATCTGCTCCATGGAACCTTTTCTCCCTCCACCAC  CCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTC  TAAAATTCAATGGCCCACCACCACCACCACCACCACCACCACC</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

[0440]

	<p>CCACTTACTATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCAC          CAATAATTCCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGAT          GATGCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTAATTCATGGTACATGA          GTGGCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTAGACAAAATCA          AAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAAT          GCTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGA          TCAGACAGATCTACAAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCT          CGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTG          TTGTTTGCCCCCTCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCC          ACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGC          ATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGG          GCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGC          ATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAG          TTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG          GCGGACCAAGGTGCGCCGACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCGG          CCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열          번호 47)</p>
EXG304	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG          GCGTGGGGCAGCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC          GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT          TCAACGCGTAAAGCTGGAAGTGGGGCCGAAACAGCTGAGGG          TGCCAGCCGAAACTCGAAATCAACGTAGCCGAAACTAT          TCGATGAATTCGCCGAAACTAGGTCCGGAGGACTGCCGGA          AACACCTGTAATCAAGCCGCCGAAACCTGTTGTGGCCGTATG          CCGGAAACGCTCTTAATTGGACGTGCCGAAACTCTTTAATGA          GTTCGCCGAAACCAGACCAGCCGAGCTGCCGAAACCGGTT          ATATAGAACGGCCGAAACGGTCCACAGGAAAAAGCCGGAA          ACACCCAAACGGTTAGCGCCGAAACGACTGGGGAGGACGTG          CCGGAAACGTAATCTGAAGATGCCGAAACACTTGAAAGC          TCCAAGCCGAAACGGGCCCGTGCAGATAGCCGAAACTGAC          GGTACACGCGCCCGGAAACACTACTTGTATGGTAGCCGAA          ACTTGGGCGTGGCTGGGGCCGAAACGCTCGAGATCTGCGAT          CAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGG          GTGCCTACCTGACGACCGACCCGACCCACTGGACAAGCACC          CAACCCCAATCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGG          GAGGGGAAACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGACTGCCAGC          TTCAGCACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCTGGCGGCGCG          CGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTCG          CCGGTCCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGT          CCGCGCCCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACCACGCGAGGCG          CGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGC          CGGCGACTCAGCGCTGCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGG          AGTCGTGCTGCTGAGAGCGCAGGGATACACGCCACCATG</p>

[0441]

	<p>GCGATGAGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAG  GAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGAT  GATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAGCATATG  ATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGA  CATTTGTGAAACTTCGGGTAAACCAAAAACCACACCTAAAAG  AAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGC  AGCTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCC  ATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTT  CAATTGATTTTAAGAGAGAAAACCTGTGTTGTGGTTTACTG  ATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCC  CCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAA  GAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAG  AACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATCAAGCCC  AAATCTGCTCCATGGAACCTTTTCTCCCTCCACCACCCCAT  GCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATT  CAATGGCCCACCACCGCCACCACCACCACCCCACTTA  CTATCATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAAT  TCCCCACCACCTCCATATGTCCAGATTCTTGTGATGATGCTG  ATGCTTTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTA  TCATACTGGCTATTATATGGGTTTATAGACAAAATCAAAAAGAA  GGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAAATGCTGGCAT  AGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAG  ATCTACAAAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATC  AGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGC  CCTCCCCCGTGCCTTCCCTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCAC  TGTCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTG  AGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGAC  AGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGGG  GAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCAC  TCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCA  AAGGTGCCCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTG  AGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGGAGTGGCC ( 서열번호 48)</p>
EXG305	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCG  GGCGTCGGGGCAGCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC  GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT  TCGCGTGCCCCCTGCCTGCGCGAGGGCGGGAAGACAGCCCCG  GGCCCTCCTCCTCCCTCGCTTTTAAAGGGACGCCCTCCAGG  GCGACCCCGGAGGGCGGACTTGCCAAGCTGAAGAGAATCAGT  CAAAAATCCGCCCACAGGGGACACATCATTTAAATAAATGTG  TTTCTTTGCCGAACAGAAGTTCAGATAGGCTCGATTATCATT  AATTCTGGGTTTACGTAACGAGAGGAAACACAGGTTGCAAT  AAAAATAAAAAAATGGTTTGAAATCAATTTAACTATTTTGA  ACGTCTCACACGTTTGACAAACCGATTTGTTTCAGGAGACTT</p>

[0442]

GCTAATATCTAAATCGGTGACAGGGTGTGTTGCTGTGAGTGTGG  
 CTCTGGAAAAGTTATTAAGCGTTATAAAAAAATGATGTAATG  
 AAATTCTAATTAATGGGAGGGAAGTGCCAACAATCACTCCTT  
 AAAATATTAACGCTATCAAAGAACAGCTGGAGAAGGAGTGCA  
 AGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTA  
 CCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCC  
 CATTCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGG  
 AAACAGGATGCGGGCAGGCGCGTGCCTGCGCAGCTTCAGC  
 ACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCCTGGCGGCGCGGCCAC  
 CGCCGCCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCACTCGCCGGTC  
 CCCCCAAACCTCCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGC  
 CGCCCGCGCCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGAT  
 AGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGA  
 CTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGT  
 GTCGTGCCTGAGAGCGCAGGGATACACGCCACCATGGCGATG  
 AGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCAGGAGCAGGAGGAT  
 TCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTG  
 ACATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAAGCATATGATAAAG  
 CTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTG  
 TGAACCTTCGGGTAAACCAAAAACACACCTAAAAGAAAACC  
 TGTAAGAAGAATAAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTC  
 CTTACAACAGTGGAAAAGTTGGGGACAATGTTCTGCCATTTGG  
 TCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTG  
 ATTTTAAGAGAGAAAACCTGTGTTGTGGTTTACACTGGATATGG  
 AAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATC  
 TGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGAGAAT  
 GAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCC  
 AGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAAATCT  
 GCTCCATGGAACCTTTTTCTCCCTCCACCACCCCATGCCAG  
 GGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATG  
 GCCCACCACCGCCACCGCCACCACCACCACCCCACTTACTATC  
 ATGCTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCCC  
 CACCACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTTGATGATGCTGATGCT  
 TTGGGAAGTATGTTAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATA  
 CTGGCTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCAAAAAGAAGGAA  
 GGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGGAGAAATGCTGGCATTAGAG  
 CAGCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGATCT  
 ACAAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCC  
 TCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTC  
 CCCCCTGCCTTCTTACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTC  
 CTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTA  
 GGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCA  
 AGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGGGGAGA

[0443]

	<p>GATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCT                  CTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGT                  CGCCCGACGCCCCGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGA                  GCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열번호 49)</p>
<p>EXG306</p>	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGCCGGGCAAAGCCCG                  GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC                  GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT                  TCGCGTGGTGCCAGGCAGTGGGAGCAGGGCTGACCAGAGTT                  CTGCAGAGATTGCTGGAGGCCTTCTGGAAGAAGAGATCCT                  GGCACCGCACAAAGAGAAGCACAGGCTTTCCAGGGCTGAGGA                  GAGGGAGGTCAAGTGAGGCCAGGTGCCCTGCTGAGCCTG                  TGTCCCCAGAAACCTCCTCTCCCTTCATCACCCCCACATCCTC                  CCTGCCACTCCCCGAGCTCCCTGTGGCCAAGTGCCTGCAGC                  ACTCGGCTCTGCTCCACAAACGGTCTGCTCCACTCCAGGAAGG                  CCACCTCCTCCCCCCCCCCCCACCTCCGGCTGTCACCACTCACC                  GCTCTAGCCTCCAGGGGGTGGGGACCCCAGAGCTGGACACAC                  CCCATCGAAGCCCCACAGCTCAGCCAGCCGGACAGACTCACG                  GTCGGACTCAAGACCCCGGAGCCCTGAGGTGGGCAGCGCGCC                  AGGGTTCTCGCAGCCTCTTCAAGGTCAGTGCAAGTAGTGCAA                  GTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCGGGGTGGGGGTGCCTAC                  CTGACGACCCGACCCCGACCCACTGGACAAGCACCCAACCCCC                  ATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCAGAGAGGGGGAGGGGA                  AACAGGATGCGGCGAGGCGCGTGCCTGCTGCAAGTTCAGCA                  CCGCGGACAGTGCTTCGCCCCGCTGGCGGCGCGGCCACC                  GCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTGACGTCCTCGCCGGTCC                  CCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACCTTGGTCGCGTCCGCGCC                  GCCGCCGGCCAGCCGGACCGCACACGCGAGGCGCGAGATA                  GGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCGCTGCGGCGCCGGCGAC                  TCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGCAGCGGAGGAGTCGTGT                  CGTGCTGAGAGCGCAGGGATACACGCCACCATGGCGATGAG                  CAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCCCGGAGCAGGAGGATTC                  CGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGAC                  ATTTGGGATGATACAGCACTGATAAAAGCATATGATAAAGCT                  GTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAATGGTGACATTTGTG                  AAACCTCGGGTAAACCAAAAAACACACCTAAAAAGAAAACCTG                  CTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGAAGAATACTGCAGCTTCCT                  TACAACAGTGGAAAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCCATTTGGTC                  AGAAGACGGTTGCATTTACCCAGCTACCATTGCTTCAATTGAT                  TTTAAGAGAGAAAACCTGTGTTGTGGTTTACTGGATATGGAA                  ATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCCGATCTACTTTCCCAATCTG                  TGAAGTAGCTAATAATATAGAACAGAATGCTCAAGAGAATGA                  AAATGAAAGCCAAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAG                  GTCTCCTGGAATAAATCAGATAACATCAAGCCCAAATCTGCT</p>

[0444]

	<p>CCATGGAACTCTTTTCTCCCTCCACCACCCCCCATGCCAGGGC          CAAGACTGGGACCAGGAAAAGCCAGGTCTAAAATTCAATGGCC          CACCACCGCCACCGCCACCACCACCACCCCACTTACTATCATG          CTGGCTGCCTCCATTTCTTCTGGACCACCAATAATTCCCCAC          CACCTCCCATATGTCCAGATTCTCTGATGATGCTGATGCTTTG          GGAAGTATGTAAATTTTCATGGTACATGAGTGGCTATCATACTG          GCTATTATATGGGTTTTAGACAAAATCAAAAAGAAGGAAGGT          GCTCACATTTCCTAAATTAAGGAGAAATGCTGGCATAGAGCA          GCACTAAATGACACCACTAAAGAAACGATCAGACAGATCTAC          AAAGCTTATCGATACCGTCGACTAGAGCTCGCTGATCAGCCTC          GACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCTCCC          CCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCCTT          TCCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGT          GTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGG          GGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGGGGAGAGAT          CGATCTGAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTC          TGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCG          CCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCCTCAGTGAGCGAGC          GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열번호 50)</p>
EXG307	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG          GCGTCCGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGACGAGC          GAGCGTCGACAGAGGGAGTGGAAATGCACGCGTGGATCTGAGT          TCGCGTGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA          CCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG          TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG          GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAA          GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG          GTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG          GGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT          ATTACCATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCG          GGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGA          CAAGCACCAACCCCAATTCCCAAATTGCGCATCCCCTATCA          GAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGGCAGGCGCGTGCGC          ACTGCCAGCTTACGACCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCCGCCT          GGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTG          ACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTCCCAGGCCACC          TTGGTCGCGTCCGCGCCCGCCCGGCCAGCCGGACCGCACCA          CGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCG          CTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGC          AGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGGGATACACG          CCACCATGGCGATGAGCAGCGGCGGCAGTGGTGGCGGCGTCC          CGGAGCAGGAGGATTCCGTGCTGTTCCGGCGCGGCACAGGCC          AGAGCGATGATTCTGACATTTGGGATGATACAGCACTGATAA</p>

[0445]

	<p>AAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAA          GAATGGTGACATTTGTGAAACTTCGGGTAAACCAAAAACCAC          ACCTAAAAGAAAACCTGCTAAGAAGAATAAAAGCCAAAAGA          AGAATACTGCAGCTTCCTTACAACAGTGGAAAGTTGGGGACA          AATGTTCTGCCATTTGGTCAGAAGACGGTTGCATTTACCCAGC          TACCATTGCTTCAATTGATTTTAAGAGAGAAAACCTGTGTTGTG          GTTTACTGATGATATGGAAATAGAGAGGAGCAAAATCTGTCC          GATCTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAAC          AGAATGCTCAAGAGAATGAAAATGAAAGCCAAGTTTCAACAG          ATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCAGATA          ACATCAAGCCCAATCTGCTCCATGGAACCTTTTTCTCCCTCC          ACCACCCCCCATGCCAGGGCCAAGACTGGGACCAGGAAAGCC          AGGTCTAAAATTCAATGGCCACCACCGCCACCACCACCA          CCACCCCACTTACTATCATGCTGGCTGCCATTTTCTTCTGG          ACCACCAATAATTTCCCCACCACCTCCCATATGTCCAGATTCT          CTTGATGATGCTGATGCTTTGGGAAGTATGTTAATTTTATGGT          ACATGAGTGGCTATCATACTGGCTATTATATGGGTTTTAGACA          AAATCAAAAAGAAGGAAGGTGCTCACATTCCTTAAATTAAGG          AGAAATGCTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAAG          AAACGATCAGACAGATCTACAAAGCTTATCGATAACCGTCGACT          AGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC          CATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGAA          GGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCCTAATAAAAATGAGGAAATTG          CATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGG          GGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGA          GCAGGCATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTG          ATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTACTG          AGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCCCACGCCCGGGCTTTGCC          GGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTG          GCC ( 서열번호 51)</p>
EXG340	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCG          GCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC          GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGAATGCACGCGTGGATCTGAGT          TCGCGTCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGA          CCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG          TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG          GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAA          GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG          GTAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATG          GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT          ATTACCATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCG          GGGTGGGGGTGCCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGA          CAAGCACCAACCCCAATTCCCAAAATTGCGCATCCCCTATCA</p>

[0446]

	<p>GAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGGCAGGCGCGTGCGC  ACTGCCAGCTTCAGCACCGCGGACAGTGCCCTTCGCCCCCGCCT  GGCGGCGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTG  ACGTCACTCGCCGGTCCCCGCAAACCTCCCTTCCCGGCCACC  TTGGTCGCGTCCGCGCCGCGCCGCGCCAGCCGGACCGCACCA  CGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCG  CTGCGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGC  AGCGGAGGAGTCGTGCTGCTGAGAGCGCAGGGATACACG  CCACCATGGCCATGAGCAGCGGAGGAAGCGGAGGAGGAGTGC  CCGAGCAAGAGGACAGCGTGCTGTTTAGGAGAGGAACCGGAC  AGAGCGATGACTCCGATATCTGGGACGACACCGCTCTGATCA  AGGCCTATGACAAAGCCGTGGCCTCCTTCAAGCACGCTCTGAA  GAATGGCGATATCTGTGAGACCTCCGGCAAACCTAAGACCAC  CCCCAAGAGGAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGTCCCAGAAGA  AGAATACCGCCGCTAGCCTCCAGCAGTGGAAAAGTGGGCGATA  AGTGCAGCGCCATTTGGAGCGAGGATGGATGCATCTACCCCG  CCACCATTGCCAGCATCGACTTCAAGAGGGAGACATGCGTGG  TGGTGTATACCGGATACGGAAATAGAGAGGAGCAGAATCTGA  GCGATCTGCTGTCCCCATCTGCGAGGTGGCCAATAATATCGA  GCAGAACGCCAAGAGAACGAGAACGAAAGCCAAGTGTCCAC  CGATGAGAGCGAGAACTCCAGAAGCCCGGAAACAAGTCCGA  CAACATCAAACCCAAGAGCGCCCTTGGAACAGCTTTCTGCCT  CCTCCCCCCCCATGCCCGGCCCTAGACTGGGACCCGGCAAGC  CCGGACTGAAGTTCAACGGACCCCCCCTCCTCCTCCCCCCCC  TCCTCCTCATCTGCTGAGCTGCTGGCTCCCCCTTTCCCTAGCG  GCCCCCATTATCCCCCCCCCTCCCCCTATCTGTCCCGACAGC  CTCGATGACGCTGACGCCCTCGGAAGCATGCTGATCAGCTGGT  ACATGAGCGGCTACCACACCGGATACTACATGGGCTTCAGAC  AGAACCAGAAGGAGGGCAGATGCTCCCACTCTCTGAACTGAG  GAGAAATGCTGGCATAGAGCAGCACTAAATGACACCACTAAA  GAAACGATCAGACAGATCTACAAAGCTTATCGATACCGTCGA  CTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCA  GCCATCTGTTGTTTGCCCCCTCCCCGTCCTTCCCTGACCCTGG  AAGGTGCCACTCCCCTGTCTTTCCTAATAAAAATGAGGAAAT  TGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGT  GGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTA  GAGCAGGCATGCTGGGGAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAG  TGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCAC  TGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGC  CCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGT  GGCC ( 서열번호 52)</p>
EXG341	<p>CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCG  GGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGC</p>

[0447]

GAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGAAATGCACGCGTGGATCTGAGT  
 TCGCGTCGTTACATAAATTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGA  
 CCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATG  
 TTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATG  
 GGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCACTTGGCAGTACATCAA  
 GTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
 GTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATG  
 GGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT  
 ATTACCATGAGTGCAAGTGGGTTTTAGGACCAGGATGAGGCG  
 GGGTGGGGGTGCCTACCTGACGACCGACCCCGACCCACTGGA  
 CAAGCACCAACCCCCATTCCCCAAATTGCGCATCCCCTATCA  
 GAGAGGGGGAGGGGAAACAGGATGCGGGCAGGCGCGTGGCG  
 ACTGCCAGCTTACGACCCGCGGACAGTGCCTTCGCCCCGCT  
 GCGGGCGCGCCACCGCCGCTCAGCACTGAAGGCGCGCTG  
 ACGTCACTCGCCGGTCCCCCGCAAACCTCCCCTCCCAGGCCACC  
 TTGGTCCGCTCCGCGCCGCGCCGCGCCAGCCGGACCCGACCA  
 CGCGAGGCGCGAGATAGGGGGGCACGGGCGCGACCATCTGCG  
 CTGCGGGCGCCGGCGACTCAGCGCTGCCTCAGTCTGCGGTGGGC  
 AGCGGAGGAGTCGTGTCGTGCCTGAGAGCGCAGGGATACACG  
 CCACCATGGCCATGAGCAGCGGAGGAAGCGGAGGAGGAGTGC  
 CCGAGCAAGAGGACAGCGTGTGTTAGGAGAGGAACCGGAC  
 AGAGCGATGACTCCGATATCTGGGACGACACCGCTCTGATCA  
 AGGCCTATGACAAAAGCCGTGGCCTCCTTCAAGCACGCTCTGAA  
 GAATGGCGATATCTGTGAGACCTCCGGCAAACCTAAGACCAC  
 CCCCAGAGGAAGCCCGCCAAGAAGAACAAGTCCCAGAAGA  
 AGAATACCGCCGCTAGCCTCCAGCAGTGGAAAAGTGGGCGATA  
 AGTGCAGCGCCATTTGGAGCGAGGATGGATGCATCTACCCCG  
 CCACCATTGCCAGCATCGACTTCAAGAGGGAGACATGCGTGG  
 TGGTGTATAACCGGATACGGAATAGAGAGGAGCAGAATCTGA  
 GCGATCTGCTGTCCCCATCTGCGAGGTGGCCAATAATATCGA  
 GCAGAACGCCAAGAGAACGAGAACGAAAGCCAAGTGTCCAC  
 CGATGAGAGCGAGAACTCCAGAAGCCCCGAAACAAGTCCGA  
 CAACATCAAACCCAAGAGCGCCCTTGGAAACAGCTTTCTGCCT  
 CCTCCCCCCCCATGCCCGGCCCTAGACTGGGACCCGGCAAGC  
 CCGGACTGAAGTTCAACGGACCCCCCCCCCTCCTCCTCCCCCCC  
 TCCTCCTCATCTGCTGAGCTGCTGGCTCCCCCCTTCCCTAGCG  
 GCCCCCCCATTATCCCCCCCCCTCCCCCTATCTGTCCCGACAGC  
 CTGATGACGCTGACGCCCTCGGAAGCATGCTGATCAGCTGGT  
 ACATGAGCGGCTACCACACCCGGATACTACATGGGCTTCAGAC  
 AGAACCGAAGGAGGGCAGATGCTCCACTCTGAACTGAG  
 GAGAAATGCTGGCATAAGCAGCACTAAATGACACCACTAAA  
 GAAACGATCAGACAGATCTATAATCAACCTCTGGATTACAAA  
 ATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATGTTGCTCCTTT

[0448]

TACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTA  
 TTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTCTCCTCCTTGATAAATCCT  
 GGTTAGTTCTTGCCACGGCGGAACATCAGCCGCTGCCTTGC  
 CCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCC  
 GTGGTGTTAAGCTTATCGATACCGTCTGACTAGAGCTCGCTGAT  
 CAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGC  
 CCTCCCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCA  
 CTGTCTTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCATCGCATTGTCT  
 GAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGA  
 CAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGTCTAGAGCAGGCATGCTGG  
 GGAGAGATCGATCTGAGGAACCCCTAGTGTGGAGTTGGCCA  
 CTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACC  
 AAAGGTGCGCCGACGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGT  
 GAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCC ( 서열번호 53)

[0449]

[0450] 실시예 4에 기재된 생체내 효능 분석을 사용하여,  $1.98 \times 10^{14}$  또는  $3.96 \times 10^{14}$  vg/kg의 용량 수준의 단일 IV 투여로 상기 기재된 상이한 프로모터를 갖는 다양한 구축물을 시험하였다. 도 8a 및 도 8b에 나타낸 바와 같이,

EXG303, EXG307, 및 EXG340은 생존에서 용량-의존적 개선을 나타내었다. EXG 후보 전부는 GFP 대조군 - EXG100-07과 비교하여 일관되게 치료 효과를 나타내었으나, EXG-307은 EXG301, EXG204 및 EXG101-01에 비해 상당히 양호하게 수행하였다. 놀랍게도, 상이한 합성 프로모터를 갖는 구축물이  $3.96 \times 10^{14}$  vg/kg의 용량 수준의 단일 IV 투여로서 투여되었을 때, 구축물 EXG307 및 EXG340을 함유하는 합성 프로모터는 다른 합성 프로모터, 예컨대 EXG-304, EXG-305, 및 EXG-306을 포함한 다른 프로모터와 비교하여 생존에서 상당한 개선을 나타내었다. 이들 결과는 특히 AAV 벡터 매개된 유전자 요법에서 SMN1을 이용한 사용에서 특이적 인핸서와 특이적 코어 프로모터, 예컨대 CMV 인핸서와 hSyn 프로모터의 특정 특이적 조합의 우수한 효과를 나타내었다.

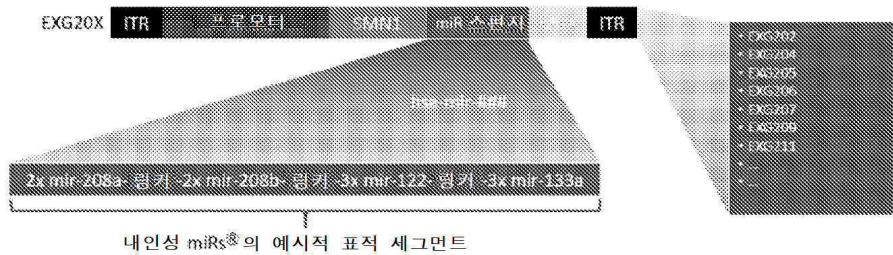
[0451] 본원에 인용된 모든 특허, 공개된 출원 및 참고문헌의 교시는 그 전체가 참고로 포함된다.

[0452] 예시적 실시양태가 특히 나타나고 기재된 한편, 형태 및 상세내용에서 다양한 변화가 첨부된 청구항에 의해 포함되는 실시양태의 범위를 벗어나지 않으면서 그 내부에서 이루어질 수 있다는 것이 통상의 기술자에 의해 이해될 것이다.

[0453] 상기로부터, 특정 실시양태가 예시의 목적을 위해 본원에 기재되었으나, 다양한 변형이 본원에 제공되는 것의 의의 및 범위를 벗어나지 않으면서 이루어질 수 있다는 것이 인식될 것이다. 상기 지칭된 참고문헌 전부는 그 전체가 본원에 참고로 포함된다.

**도면**

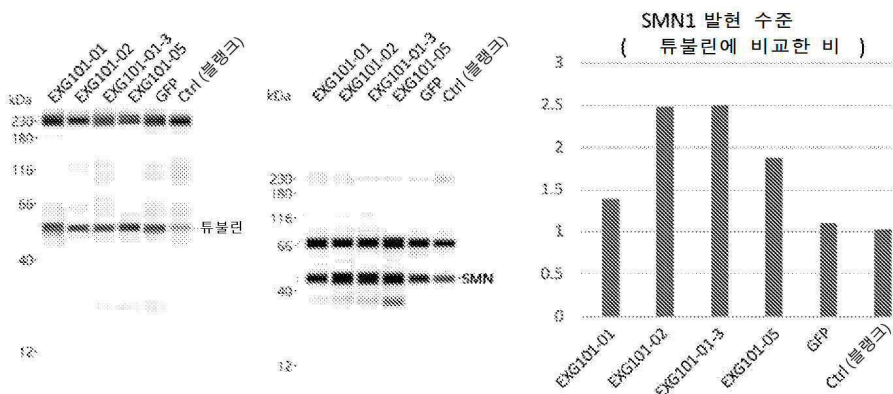
**도면1a**



**도면1b**

Mir-208a	Mir-208a	링커	Mir-208b	Mir-208b	링커	Mir-122	Mir-122	Mir-122	링커	Mir-133a	Mir-133a	Mir-133a
----------	----------	----	----------	----------	----	---------	---------	---------	----	----------	----------	----------

**도면2a**

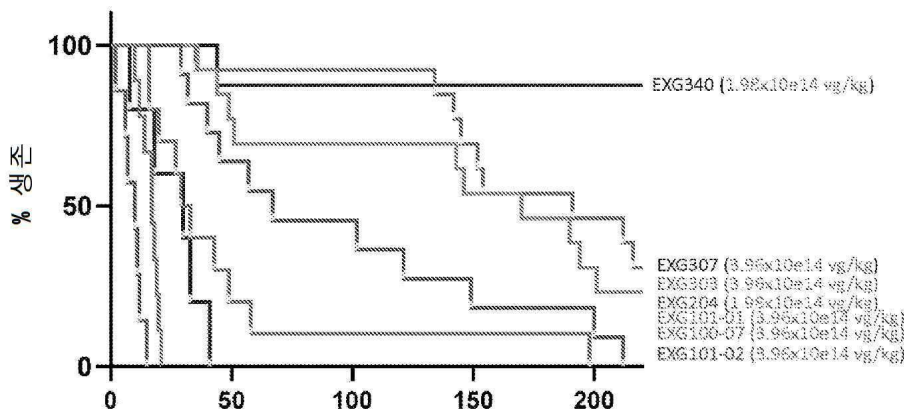


도면2b

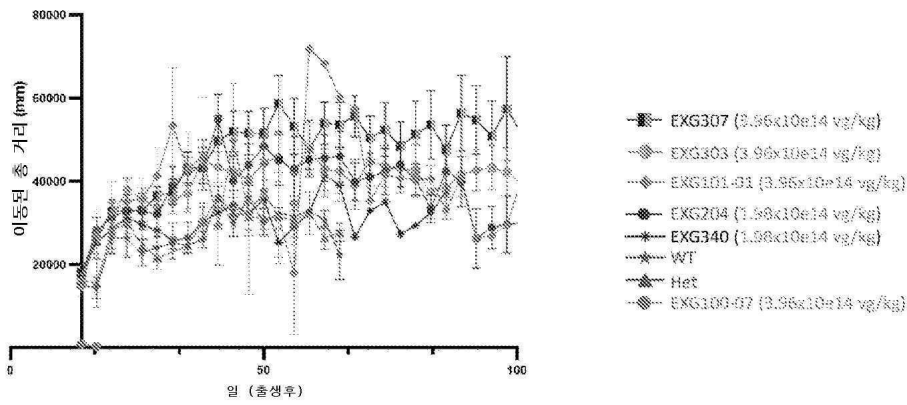
전사체 데이터 세트

유전자 ID	길래	경산	HKK1.gpm	ASST1.gpm	ASST2.gpm	PSG10.gpm	ASG11.gpm	ASG12.gpm
ENSG00000167996	2004	PTH1	45.91297301	21.26636608	42.63907812	42.81251681	37.62019766	43.9208288
ENSG00000138182	6851	KIF20B	9.028990263	20.01010964	17.79157426	17.49871494	17.66061043	14.68774185
ENSG00000138778	9928	CENPE	5.70898826	16.4715147	14.21816299	14.54274907	14.14330042	9.892489186
ENSG00000144674	10737	GOLGA4	7.551143576	16.65846574	13.51469055	13.15104523	14.59929749	11.74854357
ENSG00000198707	10443	CEP290	5.069776645	11.90306923	10.68167931	10.88888543	9.884251681	8.255844266
ENSG00000127914	18210	AKAP9	3.200989043	8.671896692	8.701324219	8.78209565	7.901825731	5.946582648
ENSG00000102189	10156	EEA3	3.526216964	8.139703363	7.162877962	6.648425758	5.940845125	6.127814009
ENSG00000119938	2541	PPP1R3C	2.830675173	4.181136099	6.5388232656	5.888939897	3.821693132	3.157620465
ENSG00000205573	3011	SMN2	6.918030987	19.44676116	32.63170104	5.67966837	4.881305896	6.090820212
ENSG00000133863	11864	TEX15	2.725774131	6.48732041	5.532899806	5.429823993	5.287197284	5.405241203
ENSG00000101745	12248	ANKRD12	1.376534395	3.671786297	3.371019224	3.23122661	3.230359792	2.955282655
ENSG00000177888	8562	ZBTB41	1.868332895	3.687336454	3.368597569	3.205238931	3.05004755	2.839505896
ENSG00000122035	1624	RASEL1A	4.889649729	3.717066036	3.279301124	2.348009953	3.393845147	4.457672655
ENSG00000170122	1974	FOXD4	2.477744184	2.232348595	1.151897311	2.019500501	2.958295956	2.567113614
ENSG00000278828	1237	HIST1H3H	2.046763306	1.024792402	1.11239077	1.868238487	0.954776161	0.633996127
ENSG00000184786	2631	TCTE3	2.646361747	1.078358861	1.637528867	1.603038803	1.172129972	2.017784475
ENSG00000178343	2322	SHISA3	1.908153014	1.03988204	1.159651822	1.468019482	0.762957436	1.039227733
ENSG00000103089	3279	FA2H	1.912800908	0.920481129	1.89788214	1.42720259	1.340701661	2.023784292
ENSG00000144488	8179	ESPNL	1.711037381	0.699345269	1.941067718	1.416771568	1.064221765	1.281326258
ENSG00000180425	2203	C1orf71	2.794820811	1.890692473	2.254451576	1.311286319	1.429636086	1.916886925
ENSG00000172638	5397	EFEMP2	0.991551369	0.704651585	1.153076809	1.295313748	0.802398816	0.480650048
ENSG00000205359	2960	SLCO6A1	0.330477501	0.489447182	0.687328769	0.975933703	0.532008158	0.61142402
ENSG00000204334	601	ERICH2	0.382974808	2.109264894	1.294333514	0.86518715	1.637629106	2.308693691
ENSG00000178297	4328	TMPRSS9	0.943964767	0.390532409	0.829547606	0.814300321	0.621577616	0.459980732
ENSG00000189057	3865	FAM111B	0.327535317	1.124525479	1.05277783	0.762364563	0.713014815	1.201860824
ENSG00000161082	6066	CELF5	1.015000041	0.497569671	0.690514735	0.752431049	0.951873043	0.74588489
ENSG00000111886	4974	GABRR2	0.462741978	0.76457672	0.565417692	0.720158235	0.461701223	0.958151674
ENSG00000170634	4964	ACYP2	1.031675036	0.680992856	0.675046314	0.512109611	0.436195247	0.583340886
ENSG00000183977	2494	PP2D1	0.207649432	0.387266415	0.791762278	0.509645571	0.526177542	0.411211663
ENSG00000239264	4361	TXNDC5	0.237504097	0.276840873	0.658616288	0.503430511	0.270822773	0.249000013
ENSG00000173406	7548	DAB1	0.739476762	0.51184019	0.420166375	0.466917301	0.321638919	0.615420255
ENSG00000105519	2551	CAPS	0.699255552	0.212969962	0.187653576	0.452961781	0.308652322	0.141890639
ENSG00000187688	3381	TRPV2	0.850960735	0.357084605	0.263474862	0.393029083	0.368728912	0.32117393
ENSG0000015479	12064	MAIR3	0.491281697	0.435325618	0.357123545	0.387914232	0.228431885	0.385045763
ENSG00000118939	1905	UCHL3	0.815555408	0.095063232	0.785276037	0.363938741	0.516648343	0.538352698
ENSG00000164188	3363	RANBP3L	0.923956618	1.076987554	0.231309676	0.326413984	0.565809053	0.609908944
ENSG00000101812	1882	H2BFM	0.672647837	0.064150003	0.22256442	0.276289839	0.174320774	0.352603012
ENSG00000147256	3071	ARHGAP36	0.730751101	0.275191187	0.136394086	0.225758158	0.470047369	0.412527049
ENSG00000183785	3642	TUBA8	0.363389674	0.049724178	0.246449893	0.174499733	0.180160185	0.231900189
ENSG00000188107	17071	EYS	0.094380822	0.233384105	0.210314688	0.165836125	0.196024329	0.208499972

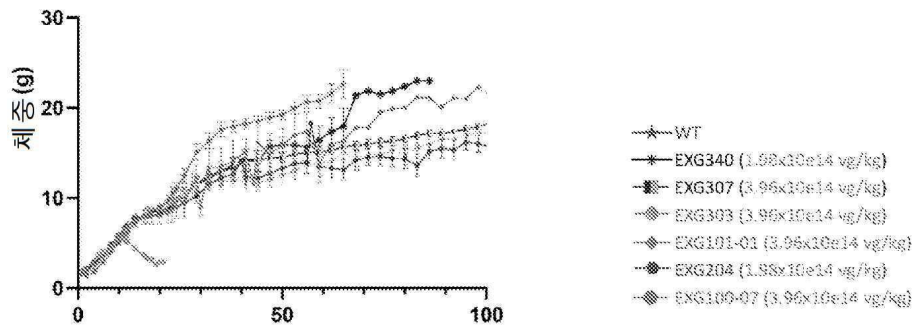
도면3



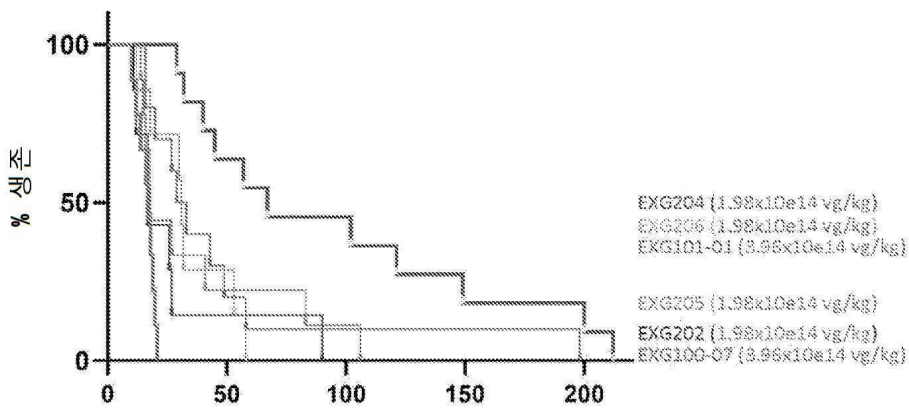
도면4



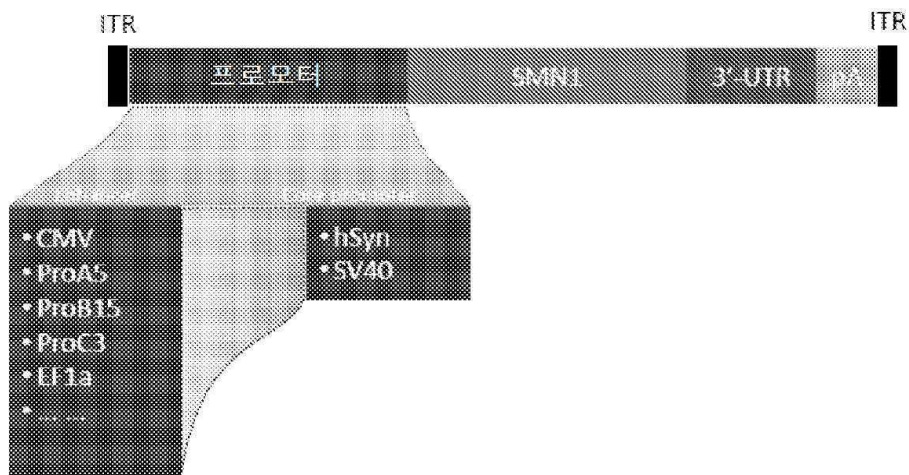
도면5



도면6



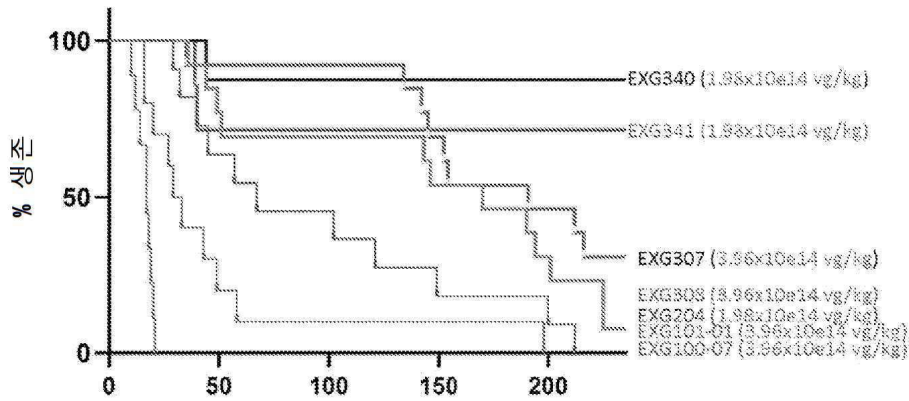
도면7a



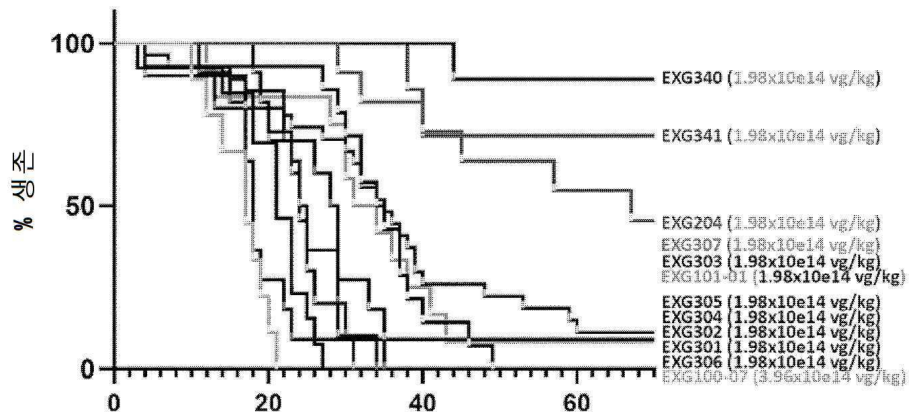
도면 7b



도면8a



도면8b



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> HANGZHOU JIAYIN BIOTECH LTD.  
HANGZHOU EXEGENESIS BIO LTD.

<120> NUCLEIC ACID CONSTRUCTS AND USES THEREOF FOR TREATING SPINAL  
MUSCULAR ATROPHY

<130> 14652-017-228

<140><141><150> PCT/CN2020/138056

<151> 2020-12-21

<150> PCT/CN2020/107173

<151> 2020-08-05

<160> 53

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 71

<212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-1-5p  
 <400> 1  
 ugggaacau acuucuuuau augcccauau ggaccugcua agcuauggaa uguaaagaag 60  
 uauguauauc a 71  
 <210> 2  
 <211> 71  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-208a-5p  
 <400> 2  
 ugacgggcga gcuuuuggcc cggguuuuac cugaugcuca cguauaagac gagcaaaaag 60  
 cuuguugguc a 71  
 <210> 3  
 <211> 77  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-208b-5p  
 <400> 3  
 ccucucaggg aagcuuuuug cucgaauuau guuucugauc cgaauuaaag acgaacaaaa 60  
 gguuugucug agggcag 77  
 <210> 4  
 <211> 85  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-122  
 <400> 4  
 ccuuagcaga gcuguggagu gugacaaugg uguuuguc uaaacuauc aacgccauua 60  
 ucacacuaaa uagcuacugc uaggc 85  
 <210> 5  
 <211> 88  
 <212> RNA

<213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-133a-1  
 <400> 5  
 acaaugcuuu gcuagagcug guaaaaugga accaaaucgc cucuucuaug gauuuggucc 60  
  
 ccuucaccca gcuguagcua ugcauuga 88  
 <210> 6  
 <211> 83  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> hsa-mir-488-5p  
 <400> 6  
 gagaaucauc ucucccagau aauggcacuc ucaacaagu uuccaaauug uuugaaaggc 60  
 uauuuucuugg ucagaugacu cuc 83  
 <210> 7  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> target segment of hsa-mir-1-5p  
 <400> 7  
 atgggcatat aaagaagtat gt 22  
  
 <210> 8  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> target segment of hsa-mir-208a-5p  
 <400> 8  
 gtataaccgg ggccaaaagc tc 22  
 <210> 9  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> target segment of hsa-mir-208b-5p  
 <400> 9

acataattcg agcaaaaagc t 21

<210> 10

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> target segment of hsa-mir-122

<

400> 10

caaacaccat tgtcacactc ca 22

<210> 11

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> target segment of hsa-mir-133a-1

<400> 11

cagctggttg aagggacca aa 22

<210> 12

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> target segment of hsa-mir-488-5p

<400> 12

ttgagagtgc cattatctgg g 21

<210> 13

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG-Link01

<400> 13

cttgac 6

<210> 14

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG-Link02  
 <400> 14  
 ccatag 6  
 <210> 15  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG-Link03  
 <400> 15  
 tttcta 6  
  
 <210> 16  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG-Link04  
 <400> 16  
 caagct 6  
 <210> 17  
 <211> 6  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG-Link05  
 <400> 17  
 gatcta 6  
 <210> 18  
 <211> 486  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA Sponge Region-1x hsa-mir-1; 2x hsa-mir-208a; 3x  
 hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122 (as in EXG202)  
  
 <400> 18  
 ttgaatgagg cttcagtact ttacagaatc gttgcctgca catcttgaa acacttgctg 60  
 ggattacttc ttcaggtaa cccaacagaa ggctcgagaa ggtatattgc tgttgacagt 120

gagcgctaca tacttcttta tatgcccatag tgaagccaca gatgatgggc atataaagaa 180  
 gtatgtattg cctactgctt cggaattcaa ggggctactt taggagcaat tatcttgttt 240  
 actaaaactg aataccttgc tatctctttg atacatTTTT acaaagctga attaaaatgg 300  
 tataaattaa atcactTTTT tctagtataa cccgggccaa aagctcagta taaccggggc 360  
 caaaagctcg acataattcg agcaaaaagc taacataatt cgagcaaaaa gctcttgaca 420

aacaccattg teacactcca acaaacacca ttgtcacact ccaacaaca ccattgtcac 480  
 actcca 486

<210> 19  
 <211> 237  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA Sponge Region-2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x  
 hsa-mir-122; 3x hsa-mir-133a (as in EXG204)  
 <400> 19

gtataaccgg ggccaaaagc tcagtataac cggggccaaa agctcgacat aattcgagca 60  
 aaaagctaac ataattcgag caaaaagctc ttgacaaaca ccattgtcac actccaacaa 120  
 acaccattgt cacactcca caaacacat tgtcacactc caccatagac agctggttga 180

aggggaccaa aacagctggt tgaaggggac caaacagct ggttgaaggg gaccaa 237  
 <210> 20  
 <211> 258  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> miRNA Sponge Region-2x hsa-mir-208a; 2x hsa-mir-208b; 3x  
 hsa-mir-122; 2x hsa-mir-488; 2x hsa-mir-1 (as in EXG205)  
 <400> 20

gtataaccgg ggccaaaagc tcagtataac cggggccaaa agctcgacat aattcgagca 60  
 aaaagctaac ataattcgag caaaaagctc ttgacaaaca ccattgtcac actccaacaa 120  
 acaccattgt cacactcca caaacacat tgtcacactc caccatagat tgagagtgcc 180

attatctggg attgagagtg ccattatctg ggaatgggca tataaagaag tatgtaatgg 240  
 gcatataaag aagtatgt 258

<210> 21  
 <211> 486

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miRNA Sponge Region-1x hsa-mir-133a; 2x hsa-mir-208a; 2x  
hsa-mir-208b; 3x hsa-mir-122 (as in EXG206)

<400> 21

```

ttgaatgagg cttcagtact ttacagaatc gttgcctgca catcttgaa acacttgctg      60
ggattacttc ttcaggtaa cccaacagaa ggctcgagaa ggtatattgc tgttgacagt      120
gagcgccttt ggtccccttc aaccagctgg tgaagccaca gatgcagctg gttgaagggg      180

acaaaaattg cctactgect cggaattcaa ggggctactt taggagcaat tatcttgttt      240
actaaaactg aataccttgc tatctctttg atacattttt acaaagctga attaaaatgg      300
tataaattaa atcacttttt tctagtataa cccgggccaa aagctcagta taaccggggc      360
caaaagctcg acataattcg agcaaaaagc taacataatt cgagcaaaaa gctcttgaca      420
aacaccattg tcacactcca acaaacacca ttgtcacact ccaacaaaca ccattgtcac      480
actcca                                           486
    
```

<210> 22

<211> 2596

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG204-LmiR122-HmiR133

<400> 22

```

ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cgggcgtcg ggcgaccttt      60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga      120
tctgatttca attcacgctt ggtaccggtt acataactta cggtaaatgg cccgcctggc      180
tgaccgcca acgacccccg cccattgacg tcaatagtaa cgccaatagg gactttccat      240
tgacgtcaat gggaggagta tttacggtaa actgcccact tggcagtaca tcaagtgtat      300
catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattgt      360
gcccagtaca tgaccttatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac      420

getattacca tggtcgaggt gagecccaag tctctgttca ctctcccac ctccccccc      480
tccccaccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg      540
gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg      600
aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt tccctttatg      660
gcgaggcggc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtcgct      720
    
```

gcgacgctgc cticgccccg tgccccgctc cgccgcccgc tcgcccgcgc gcccccgct 780  
 ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg 840  
  
 taattagctg agcaagaggt aagggtttaa gggatggttg gttggtgggg tattaatgtt 900  
 taattacctg gagcacctgc ctgaaatcac tttttttcag gaattcccgg gatatcgtcg 960  
 acccagcgt cggggcccca cgctgcgcac ccgcggtttt gctatggcga tgagcagcgg 1020  
 cggcagtggg ggcggcgtcc cggagcagga ggattccgtg ctgttccggc gcggcacagg 1080  
 ccagagcgat gattctgaca tttgggatga tacagcactg ataaaagcat atgataaagc 1140  
 tgttgcttca tttaaagcat ctctaaagaa tggtagacatt tgtgaaactt cgggtaaac 1200  
 aaaaaccaca cctaaaagaa aacctgctaa gaagaataaa agccaaaaga agaatactgc 1260  
  
 agcttcctta caacagtgga aagttgggga caaatgttct gccatttggg cagaagacgg 1320  
 ttgcatttac ccagctacca ttgcttcaat tgattttaag agagaaacct gtgttgtggt 1380  
 ttacactgga tatgaaata gagaggagca aatctgtcc gatctacttt cccaatctg 1440  
 tgaagtagct aataatatag aacagaatgc tcaagagaat gaaaatgaaa gccaaagttc 1500  
 aacagatgaa agtgagaact ccaggtctcc tggaaataaa tcagataaca tcaagcccaa 1560  
 atctgtcca tggaaacttt ttctcctcc accaccccc atgccagggc caagactggg 1620  
 accaggaaag ccaggtctaa aattcaatgg ccaccaccg ccaccgccac caccaccacc 1680  
  
 ccacttacta tcatgctggc tgccctccatt tccttctgga ccaccaataa tccccccacc 1740  
 acctcccata tgtccagatt ctcttgatga tgctgatgct ttgggaagta tgtaatttc 1800  
 atggtacatg agtggctatc atactggcta ttatatgggt tttagacaaa atcaaaaaga 1860  
 aggaaggtgc tcacattcct taaattaagg agaaatgctg gcatagagca gcactaaatg 1920  
 acaccactaa agaaacgatc agacagatct agtataacc gggccaaaag ctcagtataa 1980  
 cccgggccaa aagctcgaca taattcgagc aaaaagctaa cataattcga gcaaaaagct 2040  
 cttgacaaac accattgtca cactccaaca aacaccattg tcacactcca acaaacacca 2100  
  
 ttgtcacact ccacataga cagctggttg aaggggacca aaacagctgg ttgaagggga 2160  
 ccaaaacagc tggttgaagg ggaccaaaca agcttatcga taccgtcgac tagagctcgc 2220  
 tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgcc ctccccctg 2280  
 ccttccttga ccttgaaggg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 2340  
 gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtggggtggg gcaggacagc 2400  
 aagggggagg attgggaagt ctagagcagg catgctgggg agagatcgat ctgaggaacc 2460

cctagtgatg gagttagcca ctccctctct gcgcgctcgc tcgctcactg aggccgggcg 2520

accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc cggggcggcc tcagtgagcg agcgagcgcg 2580

cagagagga gtggcc 2596

<210> 23

<211> 2595

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG207-LmiR122-HmiR133

<400> 23

ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccggcgctcg ggcgacctt 60

ggtcgcccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga 120

tctgattca attcacgct ggtacctctg gtcgttacct aacttacgtt aatggcccc 180

cctggctgac cgcccaacga ccccccca ttgacgtcaa taatgacgta tgttccata 240

gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatctacg gtaaaactgcc 300

cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac 360

ggtaaatggc ccgctggca ttatgccag tacatgacct tatgggactt tctacttgg 420

cagtacatct actcgaggcc acgttctgct tctctctccc catctcccc ccctcccac 480

cccaatttt gtatttattt attttttaat tttttgtgc agcgatgggg gcggggggggg 540

ggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgagcgga 600

gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgtccgaaa gtttctttt atggcgaggc 660

ggcggcgggc gcggccctat aaaaagcgaa gcgcgcggcg ggcgggagcg ggatcagcca 720

ccgcggtggc ggcttagagt cgacgaggaa ctgaaaaacc agaaagttaa ctggtaagtt 780

tagtctttt gtcttttatt tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg 840

ctctcagtg gatgttgctt ttacttctag gcctgtacgg aagtgttact tctgctctaa 900

aagctgcgga attgtaccg cggecgatcc accggtccgg aattcccggg atatcgtcga 960

cccacgctc cgggccccac gctgcgcacc cgcgggtttg ctatggccat gacgagcgga 1020

ggaagcggag gaggagtgc cagcaagag gacagcgtgc tgtttaggag aggaaccgga 1080

cagagcagtg actccgatat ctgggacgac accgctctga tcaaggccta tgacaaagcc 1140

gtggcctcct tcaagcacgc tctgaagaat ggcgatatct gtgagacctc cggcaaacct 1200

aagaccacce ccaagaggaa gcccgccaag aagaacaagt ccagaagaa gaataccgcc 1260

gctagcctcc agcagtggaa agtggcgat aagtgcagcg ccatttgag cgaggatgga 1320

tgcactacc ccgccacat tgccagcat gacttcaaga gggagacatg cgtggtggtg 1380  
 tataccggat acggaaatag agaggagcag aatctgagcg atctgctgtc ccccatctgc 1440  
 gaggtggcca ataatatcga gcagaacgcc caagagaacg agaacgaaag ccaagtgtcc 1500  
  
 accgatgaga gcgagaactc cagaagcccc gaaacaagt ccgacaacat caaacccaag 1560  
 agcgcacctt ggaacagctt tctgctctct cccccccca tgcccggccc tagactggga 1620  
 cccggcaage cgggactgaa gttcaacgga cccccctc ctcctcccc cctcctctct 1680  
 catctgctga gctgctggct ccccccttc cctagcggcc ccccattat cccccctt 1740  
 cccctctat gtcccacag cctcgatgac gctgacgcc tcggaagcat gctgatcagc 1800  
 tggatcatga gcggctacca caccggatac tacatgggct tcagacagaa ccagaaggag 1860  
 ggcagatgct cccactctct gaactgagga gaaatgctgg catagagcag cactaatga 1920  
  
 caccactaaa gaaacgatca gacagatcta gtataaccg ggccaaaagc tcagtataac 1980  
 ccgggcaaaa agctcgacat aattcgagca aaaagctaac ataattcgag caaaaagctc 2040  
 ttgacaaaca ccattgtcac actccaaca acaccattgt cacactcaa caaacacat 2100  
 tgtcacactc caccatagac agctggttga aggggaccaa aacagctggt tgaaggggac 2160  
 caaaacagct ggttgaagg gaccaaaca gcttatcgat accgtcgact agagctcgct 2220  
 gatcagctc gactgtgct tctagttgcc agccatctgt tgtttgccc tccccgtgc 2280  
 ctctctgac ctggaagg gccaactcca ctgtccttc ctaataaaat gaggaattg 2340  
  
 catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctggggg tgggtgggg caggacagca 2400  
 agggggagga ttgggaagtc tagagcagc atgctgggga gagatcgatc tgaggaaacc 2460  
 ctagtgatgg agttggccac tcctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccggcgca 2520  
 ccaaaggtcg cccgacgcc gggctttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc 2580  
 agagaggag tggcc 2595  
  
 <210> 24  
 <211> 2595  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG209-LmiR122-HmiR133  
 <400> 24  
 ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccggcgctc ggcgacctt 60  
  
 ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagc gcgagagagg gactggaatt cacgctgga 120  
 tctgaattca attcacgct ggtacctctg gtcgttacat aacttacgt aatggcccc 180

cctggctgac cgcccaacga cccccgcca ttgacgtcaa taatgacgta tgttccata 240  
 gtaacgcaa tagggacttt ccattgacgt caatgggtgg agtatttacg gtaaactgcc 300  
 cacttggcag tacatcaagt gtatcatatg ccaagtacgc ccctattga cgtcaatgac 360  
 ggtaaatggc ccgcctggca ttatgcccag tacatgacct tatgggactt tcctacttgg 420  
 cagtacatct actcgaggcc acgttctgct tcaactctcc catctcccc ccctccccac 480  
  
 ccccaatfff gtatffatff atffttffaat taffttfgtc agcgatgggg gcggggggggg 540  
 gggggggggcg cgcgccaggc ggggcggggc ggggcgaggg gcggggcggg gcgaggcgga 600  
 gaggtgcggc ggcagccaat cagagcggcg cgctccgaaa gtttcctfff atggcgaggc 660  
 ggcggcggcg gcggccctat aaaaagcga gcgcgcggcg ggccggagcg ggatcagcca 720  
 ccgcggtggc ggcctagagt cgacaggaa ctgaaaaacc agaaagftaa ctggtaagtt 780  
 tagtctffff gtctffatff tcaggtcccg gatccggtgg tggtgcaaat caaagaactg 840  
 ctctcagtg gatgttgctt ttacttctag gcctgtacgg aagtgttact tctgctctaa 900  
  
 aagctgcgga atgtaccg cgcccgatcc accggtccgg aattcccggg atatcgtcga 960  
 cccacgcgtc cgggccccac gctgcgcacc cgcgggtttg ctatggcgat gagcagcggc 1020  
 ggcagtggtg gcggcgctcc ggagcaggag gattccgtgc tgttccggcg cggcacaggc 1080  
 cagagcgatg atctgacat ttgggatgat acagcactga taaaagcata tgataaagct 1140  
 gtggcttcat ttaagcatgc tctaaagaat ggtgacatff gtgaaacttc gggtaaacca 1200  
 aaaaccacac ctaaaagaaa acctgctaag aagaataaaa gccaaaagaa gaatactgca 1260  
 gcttccttac aacagtggaag agttggggac aatgttctg ccatttggtc agaagacggt 1320  
  
 tgcatttacc cagctacat tgcctcaatt gattttaaga gagaacctg tgttfggtt 1380  
 tacactggat atggaaatag agaggagcaa aatctgtccg atctactffc cccaatctgt 1440  
 gaagtagcta ataatataga acagaatgct caagagaatg aaaatgaaag ccaagtttca 1500  
 acagatgaaa gtgagaactc caggtctcct gaaataaat cagataacat caagcccaaa 1560  
 tctgctccat ggaactctff tctccctcca ccacccccca tgccagggcc aagactggga 1620  
 ccaggaaage caggtctaaa attcaatggc ccaccaccgc caccgccacc accaccacc 1680  
 cacttactat catgctggct gcctccatff ccttctggac caccaataat tccccacca 1740  
  
 cctcccatat gtccagatfc tcttgatgat gctgatgctt tgggaagtat gftaatttca 1800  
 tggatcatga gtggctatca tactggctat tatatgggtt ttagacaaaa tcaaaaagaa 1860  
 ggaaggtgct cacattcctt aaattaagga gaaatgctgg catagagcag cactaaatga 1920  
 caccactaaa gaaacgatca gacagatctc gtataaccgg ggccaaaagc tcagtataac 1980  
 ccgggcaaaa agctcgacat aattcgagca aaaagctaac ataattcgag caaaaagctc 2040

ttgacaaaca ccattgtcac actccaacaa acaccattgt cactcctcaa caaacaccat 2100  
 tgtcacactc caccatagac agctggttga aggggaccaa aacagctggt tgaaggggac 2160  
  
 caaaacagct ggttgaaggg gaccaaacaa gcttatcgat accgtcgact agagctcgct 2220  
 gatcagcctc gactgtgcct tctagttgcc agccatctgt tgtttgcccc tccccctgac 2280  
 ctctcttgac cctggaaggt gccactccca ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg 2340  
 catcgattg tctgagtagg tgtcattcta ttctgggggg tggggtgggg caggacagca 2400  
 agggggagga ttggaagtc tagagcaggc atgctgggga gagatcgatc tgaggaacct 2460  
 ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcca 2520  
 ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcccct cagtgagcga gcgagcgcgc 2580  
  
 agagagggag tggcc 2595  
 <210> 25  
 <211> 2594  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG211-LmiR122-HmiR133  
 <400> 25  
 ctgcgcgctc gctcgtcac tgagccgcc cgggcaaagc cgggcgctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgctgga 120  
 tctgattca attcacgct ggtaccgctt acataactta cggtaaatgg cccgctggc 180  
 tgaccccca acgaccccc cccattgacg tcaatagtaa cgccaatagg gactttccat 240  
 tgacgtcaat gggaggagta ttacggtaa actgccact tggcagtaca tcaagtgtat 300  
  
 catatgcaa gtacgcccc tattgacgtc aatgacggta aatggcccgc ctggcattgt 360  
 gccagtaca tgacctatg ggactttcct acttggcagt acatctacgt attagtcac 420  
 gctattacca tggctgaggt gagccccacg ttctgcttca ctctcccat ctccccccc 480  
 tccccaccc caattttgta tttatttatt ttttaattat tttgtgcagc gatgggggcg 540  
 gggggggggg gggggcgcgc gccaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg 600  
 aggcggagag gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcgc tccgaaagt tccctttatg 660  
 gcgagggcgc ggcggcggcg gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtcgct 720  
  
 gcgacgtgc cttgccccg tgccccgctc cgcccgccc tcgcgcccgc gccccggct 780  
 ctgactgacc gcgttaactc cacagtgag cgggcccggc ggcccttctc ctccgggctg 840  
 taattagctg agcaagaggt aagggtttaa gggatggttg gttggtgggg tattaatgtt 900

taattacctg gagcacctgc ctgaaatcac ttttttcag gaattcccgg gatatcgtcg 960  
 acccacgcgt ccgggcccc cgcctgcgcac ccggggccac catggccatg agcagcggag 1020  
 gaagcggagg aggagtgcc gagcaagagg acagcgtgct gtttaggaga ggaaccggac 1080  
 agagcgatga ctccgatatc tgggacgaca ccgctctgat caaggcctat gacaaagccg 1140  
  
 tggcctcctt caagcacgct ctgaagaatg gcgatatctg tgagacctcc ggcaaacctt 1200  
 agaccacccc caagaggaag cccgccaaaga agaacaagtc ccagaagaag aataccgccc 1260  
 ctacgctcca gcagtggaaa gtgggcgata agtgcagcgc catttggagc gaggatggat 1320  
 gcatctacce cgccaccatt gccagcatcg acttcaagag ggagacatgc gtggtggtgt 1380  
 ataccggata cggaaataga gaggagcaga atctgagcga tctgctgtcc cccatctgcg 1440  
 aggtggccaa taatctcgag cagaacgccc aagagaacga gaacgaaagc caagtgtcca 1500  
 ccgatgagag cgagaactcc agaagccccg gaaacaagtc cgacaacatc aaaccaaga 1560  
  
 gcgccccctt gaacagcttt ctgcctctc cccccccat gcccggcct agactgggac 1620  
 ccggcaagcc cggactgaag ttcaacggac cccccctcc tctcccccc cctctctctc 1680  
 atctgctgag ctgctgctc ccccccttc ctgagggccc cccattatc cccccctc 1740  
 ccctatctg tcccgacagc ctcgatgacg ctgacgcct cggaagcatg ctgatcagct 1800  
 ggtacatgag cggctaccac accgatact acatgggctt cagacagaac cagaaggagg 1860  
 gcagatgctc cactctctg aactgaggag aatgctggc atagagcagc actaatgac 1920  
 accactaaag aaacgatcag acagatctag tataaccgg gccaaaagct cagtataacc 1980  
  
 cgggcaaaa gctcgacata attcgagcaa aaagctaaca taattcgagc aaaaagctct 2040  
 tgacaaacac cattgtcaca ctccaacaaa caccattgtc aactccaac aaacaccatt 2100  
 gtcacactcc accatagaca gctggttgaa ggggacaaa acagctggtt gaaggggacc 2160  
 aaaacagctg gttgaagggg accaaacaag ctatcgata ccgtcgacta gagctcgctg 2220  
 atcagcctcg actgtgcctt ctagttgcca gccatctgtt gtttggcct cccccgtgcc 2280  
 ttcttgacc ctggaagggt ccactcccac tgcctttcc taataaaatg aggaaattgc 2340  
 atcgcatgtt ctgagtaggt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa 2400  
  
 gggggaggat tggaagctt agagcaggca tgctggggag agatcgatct gaggaacccc 2460  
 tagtgatgga gttggccact ccctctctgc gcgctcctc gctcactgag gccgggcgac 2520  
 caaagctgc ccgacgccc ggctttgcc gggcggcctc agtgagcagc cgagcgcgca 2580  
 gagagggagt ggcc 2594

<210> 26

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV2 (UniProt: P03135-1)

<400> 26

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                    40                    45

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

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

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

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

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

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

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145                    150                    155                    160

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

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

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

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



Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ser Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495

Asn Ser Glu Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510

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

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Arg Gly Asn Arg Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590

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

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

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

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

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

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

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

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



Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Glu Pro  
 180 185 190  
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly  
 195 200 205  
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser  
 210 215 220  
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val  
 225 230 235 240  
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His  
 245 250 255  
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ala Thr Asn Asp  
 260 265 270  
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn  
 275 280 285  
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala  
 325 330 335  
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln  
 340 345 350  
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe  
 355 360 365  
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn  
 370 375 380  
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Thr Tyr  
 405 410 415  
 Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser



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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Asn Leu

<210> 28

<211> 736

<212>

> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVrh8 (Uniprot Q808Y3\_9VIRU)

<400> 28

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



Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn  
 370 375 380  
 Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400  
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr  
 405 410 415  
 Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430  
 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val  
 435 440 445  
 Arg Thr Gln Thr Thr Gly Thr Gly Gly Thr Gln Thr Leu Ala Phe Ser  
 450 455 460  
 Gln Ala Gly Pro Ser Ser Met Ala Asn Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro  
 465 470 475 480  
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn  
 485 490 495  
 Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn  
 500 505 510  
 Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys  
 515 520 525  
 Asp Asp Asp Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly  
 530 535 540  
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile  
 545 550 555 560  
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu  
 565 570 575  
 Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln  
 580 585 590  
 Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln  
 595 600 605  
 Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His



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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn  
260 265 270

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

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
305 310 315 320

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



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> 30

<211> 738

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVrh10 (Uniprot Q808W5\_9VIRU)

<400> 30

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 Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro



Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn  
 305 310 315 320  
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala  
 325 330 335  
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln  
 340 345 350  
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe  
 355 360 365  
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn  
 370 375 380  
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr  
 405 410 415  
 Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser  
 420 425 430  
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 435 440 445  
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His  
 500 505 510  
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr  
 515 520 525  
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met



<400> 31

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
                   20                    25                    30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                    40                    45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                   50                    55                    60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
                   85                    90                    95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                   100                    105                    110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                   115                    120                    125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                   130                    135                    140  
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
                   165                    170                    175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
                   180                    185                    190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
                   195                    200                    205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
                   210                    215                    220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile  
                   225                    230                    235                    240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Phe Leu Ser Arg Thr  
 435 440 445  
 Asn Thr Pro Ser Gly Thr Thr Thr Gln Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Gly Val Ser Lys Val Ser Ala Asp Asn Asn



<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV44-9

<400> 32

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

                  180                    185                    190

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

                  195                    200                    205

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

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn  
 260 265 270

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

Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn  
 290 295 300

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile  
 305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn  
 325 330 335

Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu  
 340 345 350

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro  
 355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn  
 370 375 380

Gly Ser Gln Ala Leu Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe  
 385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr  
 405 410 415

Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu  
 420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Val  
 435 440 445

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

450                      455                      460  
 Gln Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Ser Gln Ala Arg Asn Trp Val Pro  
 465                      470                      475                      480  
 Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Thr Asn Gln Asn  
                                  485                      490                      495  
 Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Ala Lys Phe Lys Leu Asn  
                                  500                      505                      510  
  
 Gly Arg Asp Ser Leu Met Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Ser His Lys  
                                  515                      520                      525  
 Asp Asp Glu Asp Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly  
                                  530                      535                      540  
 Lys Gln Gly Ala Gly Asn Asp Gly Val Asp Tyr Ser Gln Val Leu Ile  
 545                      550                      555                      560  
 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Lys Ala Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Glu  
                                  565                      570                      575  
  
 Tyr Gly Ala Val Ala Ile Asn Asn Gln Ala Ala Asn Thr Gln Ala Gln  
                                  580                      585                      590  
 Thr Gly Leu Val His Asn Gln Gly Val Ile Pro Gly Met Val Trp Gln  
                                  595                      600                      605  
 Asn 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 Leu  
 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 Leu Thr Phe Asn Gln Ala 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 Thr Asn Val Asp 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> 33

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> SMN protein (wt) amino acid sequence

<400> 33

Met Ala Met Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Pro Glu Gln Glu  
 1                      5                      10                      15

Asp Ser Val Leu Phe Arg Arg Gly Thr Gly Gln Ser Asp Asp Ser Asp  
                                  20                      25                      30

Ile Trp Asp Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Tyr Asp Lys Ala Val Ala  
                                  35                      40                      45

Ser Phe Lys His Ala Leu Lys Asn Gly Asp Ile Cys Glu Thr Ser Gly  
                                  50                      55                      60

Lys Pro Lys Thr Thr Pro Lys Arg Lys Pro Ala Lys Lys Asn Lys Ser  
 65                      70                      75                      80

Gln Lys Lys Asn Thr Ala Ala Ser Leu Gln Gln Trp Lys Val Gly Asp  
                                  85                      90                      95

Lys Cys Ser Ala Ile Trp Ser Glu Asp Gly Cys Ile Tyr Pro Ala Thr  
                                  100                      105                      110

Ile Ala Ser Ile Asp Phe Lys Arg Glu Thr Cys Val Val Val Tyr Thr  
                                  115                      120                      125

Gly Tyr Gly Asn Arg Glu Glu Gln Asn Leu Ser Asp Leu Leu Ser Pro  
                                  130                      135                      140

Ile Cys Glu Val Ala Asn Asn Ile Glu Gln Asn Ala Gln Glu Asn Glu  
 145                      150                      155                      160

Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro  
                                  165                      170                      175

Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser  
 180 185 190

Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly  
 195 200 205

Lys Pro Gly Leu Lys Phe Asn Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro  
 210 215 220

Pro Pro His Leu Leu Ser Cys Trp Leu Pro Pro Phe Pro Ser Gly Pro  
 225 230 235 240

Pro Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp  
 245 250 255

Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr  
 260 265 270

His Thr Gly Tyr Tyr Met Gly Phe Arg Gln Asn Gln Lys Glu Gly Arg  
 275 280 285

Cys Ser His Ser Leu Asn  
 290

<210> 34

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> SMN nucleic acid sequence (wt)

<400> 34

atggcgatga gcagcggcgg cagtgggtggc ggcgtcccgg agcaggagga ttccgtgctg 60  
 ttccggcgcg gcacaggcca gagcgatgat tctgacattt gggatgatac agcactgata 120  
 aaagcatatg ataaagctgt ggcttcattt aagcatgctc taaagaatgg tgacatttgt 180  
  
 gaaacttcgg gtaaaccaaa aaccacacct aaaagaaaac ctgctaagaa gaataaaagc 240  
 caaaagaaga atactgcagc ttcttataca cagtggaaag ttggggacaa atgttctgcc 300  
 atttggtcag aagacggttg catttaccce gctaccattg cttcaattga ttttaagaga 360  
 gaaacctgtg ttgtggttta cactggatat ggaatatagag aggagcaaaa tctgtccgat 420  
 ctactttccc caatctgtga agtagctaat aatatagaac agaatgctca agagaatgaa 480  
 aatgaaagcc aagtttcaac agatgaaagt gagaactcca ggtctcctgg aaataaatca 540

gataacatca agcccaaadc tgctccatgg aactcttttc tccctccacc acccccatg 600  
 ccagggccaa gactgggacc aggaaagcca ggtctaaaat tcaatggccc accaccgcca 660  
 ccgccaccac caccacccca cttactatca tgetggetgc ctecatctcc ttctggacca 720  
 ccaataatc ccccaccacc tcccatatgt ccagattctc ttgatgatgc tgatgctttg 780  
 ggaagtatgt taatttcatg gtacatgagt ggctatcata ctggctatta tatgggtttt 840  
 agacaaaadc aaaaagaagg aagggtctca cttccttaa at 882

<210> 35

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Codon optimized SMN nucleic acid sequence

<400>

35

atggccatga gcagcggagg aagcggagga ggagtgcccg agcaagagga cagcgtgctg 60  
 tttaggagag gaaccggaca gagcgtatgac tccgatatct gggacgacac cgctctgac 120  
 aaggcctatg acaaagccgt ggcctccttc aagcacgctc tgaagaatgg cgatatctgt 180  
 gagacctccg gcaaacctaa gaccaccccc aagaggaagc ccgccaagaa gaacaagtcc 240  
 cagaagaaga ataccgccc tagcctccag cagtggaaag tgggcgataa gtgcagcgcc 300  
 atttggagcg aggatggatg catctacccc gccaccattg ccagcatcga cttcaagagg 360  
 gagacatgcg tgggtgtgta taccggatac ggaatatagag aggagcagaa tctgagcgt 420

ctgctgtccc ccatctgca ggtggccaat aatctgagc agaacgcca agagaacgag 480  
 aacgaaagcc aagtgtccac cgatgagagc gagaactcca gaagccccgg aaacaagtcc 540  
 gacaacatca aaccaagag cgccccttgg aacagctttc tgcctctcc ccccccatg 600  
 cccggcccta gactgggacc cggcaagccc ggactgaagt tcaacggacc cccccctct 660  
 cctccccccc ctctctctca tctgtgagc tgetggetcc cccctttccc tagcggcccc 720  
 cccattatcc cccccctcc ccctatctgt cccgacagcc tcgatgacgc tgacgcctc 780  
 ggaagcatgc tgatcagctg gtacatgagc ggctaccaca ccgatacta catgggcttc 840

agacagaacc agaaggaggg cagatgctcc cactctctga ac 882

<210> 36

<211> 850

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary Promoter Sequence (1)

<400> 36

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60  
 gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120  
 atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180  
 aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240  
 catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac tcgaggccac gttctgcttc 300

actctcccca tctcccccc ctecccaccc ccaatthtgt atttatttat tttttaatta 360  
 ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg ggcgggcgcg 420  
 ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg 480  
 ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cgcgggcggc ggccctataa aaagcgaagc 540  
 gcgcggcggg cgggagcggg atcagccacc gcggtggcgg cctagagtgc acgaggaact 600  
 gaaaaaccag aaagttaact ggtaagtta gtctttttgt cttttatttc aggtcccga 660  
 tccggtggtg gtgcaaatca aagaactgct cctcagtgga tgttgctttt acttctaggc 720

ctgtacggaa gtgttacttc tgctctaaaa gctgcggaat tgtaccgcg gccgatccac 780  
 cgttccggaa ttcccgggat atcgtcgacc cacgcgtccg ggccccacgc tgcgcaccgc 840  
 cgggtttgct 850

<210> 37

<211> 796

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Exemplary Promoter Sequence (2)

<400> 37

ccgttacata acttacggtg aatggcccgc ctggctgacc gccaacgac ccccgccat 60  
 tgacgtcaat agtaacgcca atagggactt tccattgacg tcaatgggtg gagtatttac 120  
 ggtaaaactgc ccaacttggca gtacatcaag tgtatcatat gccaagtacg ccccctattg 180

acgtcaatga cggtaaatgg cccgctggc attgtgcca gtacatgacc ttatgggact 240  
 ttcttacttg gcagtacatc tacgtattag tcatcgctat taccatggtc gaggtgagcc 300  
 ccacgttctg cttactctc cccatctcc ccccctccc accccaatt ttgtatttat 360  
 ttatttttta attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg gggggggggg gcgcgccag 420  
 gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg gagaggtgcg gcggcagcca 480  
 atcagagcgg cgcgctccga aagtttctt ttatggcgag gcggcggcgg cggcggccct 540

ataaaaagcg aagcgcgcgg cgggcgggag tcgctgcgac gctgccttcg ccccgtgcc 600

cgctccgccg ccgectcgcg ccgcccgcc cgctctgac tgaccgcgtt actcccacag 660

gtgagcgggc gggacggccc ttctctccg gctgttaatt agctgagcaa gagtaaggg 720

tttaagggat ggttggttgg tgggtatta atgtttaatt acctggagca cctgcctgaa 780

atcacttttt ttcagg 796

<210> 38

<211> 448

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Core promoter (hSyn) sequences

<400> 38

agtgcaagtg ggttttagga ccaggatgag gcggggtggg ggtgcctacc tgacgaccga 60

ccccgacca ctggacaagc acccaacccc cattcccacaa attgcgcatc ccctatcaga 120

gagggggagg ggaaacagga tgcggcgagg cgcgtgcgca ctgccagctt cagcaccgcg 180

gacagtgcct tcgccccgc ctggcggcgc gcgccaccgc cgcctcagca ctgaaggcgc 240

gctgacgtca ctgcccgtc ccccgaaac tcccctccc ggccaccttg gtcggtccg 300

cgcccggcc ggcccagccg gaccgacca cgcgaggcgc gagatagggg ggcacgggcg 360

cgaccatctg cgctgcggcg ccggcgactc agcgtgcct cagtctgcgg tgggcagcgg 420

aggagtctg tcgtgcctga gagcgcag 448

<210> 39

<211> 304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CMV enhancer

<400> 39

cgttacataa cttacggtaa atggcccgc tggtgaccg cccaacgacc cccgccatt 60

gacgtcaata atgacgtatg ttccatagt aacccaata gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta 240

catgacctta tgggacttcc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgtattac 300

catg 304

<210> 40

<211> 420

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ProC3 enhancer

<400> 40

```

gatgaattcc gccggaact aggtccgag gactgccgga aacacctgta atcaagccgc      60
cggaaacctg ttgtggccgt atgccgaaa cgtcttaatt ggacgtgccg gaaactcttt    120
taatgagttc gccggaacc agaccagccg agctgccgga aaccggttat atagaacggc    180
cggaaacggt ccacaggaaa aagccgaaa cacccaaacg gttagcgccg gaaacgactg    240
gggaggacgt gccgaaaacg tactatctga agatgccgga aaccttgaa agctccaagc    300
cggaaacggg cccgtgcgga tagccgaaa ctgacggtac acggccgccc gaaacactac    360

```

```

ttgtatggta gccggaact tgggcgtggc tggggccgga aacgctcgag atctgcgatc    420

```

<210> 41

<211> 450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ProA5 enhancer

<400> 41

```

cctggaggcc ttctggaag aagagatcct ggcaccgcac aaagagaagc acaggctttc    60
cagggctgag gagaggagg tcaagtgagg cccaggtgcc cctgcctgag cctgtgtccc    120
cagaaacctc ctctccctct caccacccc acatcctccc tgccactccc cgcagctccc    180
tgtggccaag tgcactgcag cactcggtc tgctccaaa acggtctgct cactccagg    240
aaggccacct cctcccccc ccccacctc cggtgtcac cactaccgc tctagcctcc    300

aggggtggg gaccccagag ctggacacac cccatcgaag cccacagct cagccagccg    360
gacagactca cgtcggact caagacccc gagccctgag gtgggcagcg cgccagggtt    420
cctgcagcc tcttcaaggt cagtcaagt    450

```

<210> 42

<211> 472

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> ProB15 enhancer

<400> 42  
cagccccgg gccctcctcc tccctctgcc tttttaaggg acgccctcca gggcgacccc 60  
ggagggcgga cttgccaagc tgaagagaat cagtcaaaaa tccgcccaca ggggacacat 120  
catttaaata aatgtgtttc tttgcccga cagaagtca gataggctcg attatcatta 180  
  
attctgggtt tcacgtaacg agaggaaaca caggttgcaa taaaataaa aaaatggttt 240  
gaaatcaatt ttaactcatt ttgaacgtcc tcacacgttt gacaaaccga tttgtttcag 300  
gagacttgct aatatctaaa tcggtgacag ggtgtttgct gtgagtgtgg ctctggaaaa 360  
gttattaagc gttataaaaa aaatgatgta atgaaattct aattaatggg agggaagtgc 420  
caacaaatca ctcttaaaa tattaacgct atcaaagaac agctggagaa gg 472  
<210> 43  
<211> 675  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> ProC3 promoter  
<400> 43  
gaaacagctg agggtgccca gccggaaact cgaatcaac gtaggccgga aactattcga 60  
  
tgaattccgc cgaaaactag gtccggagga ctgccgaaa cacctgtaat caagecccg 120  
gaaacctgtt gtggccgtat gccgaaacg tcttaattgg acgtgccgga aactctttta 180  
atgagttcgc cgaaaccag accagccgag ctgccgaaa ccggttatat agaacggccg 240  
gaaacggtcc acaggaaaaa gccggaaaca ccaaacggt tagcgcgga aacgactggg 300  
gaggacgtgc cgaaacgta ctatctgaag atgccgaaa cacttgaaag ctccaagccg 360  
gaaacgggcc cgtgcggata gccggaaact gacggtacac ggccgccgga aacactactt 420  
gtatggtagc cgaaaacttg ggcgtggctg gggccgaaa cgctcgagat ctgcgatctg 480  
  
catctcaatt agtcagcaac catagtcccg ccctaactc cgcccatccc gccctaact 540  
ccgccagtt ccgccatc tccgcccat cgtgactaa tttttttat ttatgcagag 600  
gccgaggccg cctcggcctc tgagctattc cagaagtagt gaggaggctt ttttgaggc 660  
ctaggctttt gcaaa 675  
<210> 44  
<211> 1178  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> EF1a promoter

<400> 44

ggctccggtg cccgtcagtg ggcagagcgc acatcgccca cagtccccga gaagttgggg 60  
 ggaggggtcg gcaattgaac cgggtcctag agaaggtggc gcggggtaaa ctgggaaagt 120  
  
 gatgtcgtgt aciggctccg cctttttccc gagggtgggg gagaaccgta tataagtgca 180  
 gtagtccgcc tgaactttct ttttcgcaac gggtttgccg ccagaacaca ggtaagtgcc 240  
 gtgtgtgggt cccgcgggcc tggcctcttt acgggttatg gcccttgcgt gccttgaatt 300  
 acttccactg gctgcagtac gtgattcttg atcccagct tcgggttgga agtgggtggg 360  
 agagtccgag gccttgcgt taaggagccc cttcgcctcg tgcttgagtt gaggcctggc 420  
 ctgggcgctg gggccgccc gtgcgaatct ggtggcacct tcgcgcctgt ctcgctgctt 480  
 tcgataagtc tctagccatt taaaatttt gatgacctgc tgcgacgctt tttttctggc 540  
  
 aagatagtct tgtaaatcgg ggccaagatc tgcacactgg tatttcggtt ttggggccg 600  
 cgggcggcga cggggcccgt gcgtcccagc gcacatgttc ggcgagggcg gcctgcgag 660  
 cgcgccacc gagaatcgga cgggggtagt ctcaagctgg ccggcctgct ctggtgcctg 720  
 gcctcgccc gccgtgtatc gcccgcctt gggcggcaag gctggcccgg tcggcaccag 780  
 ttgctgagc ggaagatgg ccgcttccc gcctgtctgc agggagctca aatggagga 840  
 cgcgcgctc gggagagcgg gcgggtgagt cacccacaca aaggaaaagg gcctttccgt 900  
 cctcagccgt cgttcatgt gactccaggg agtaccgggc gccgtccagg cacctcgatt 960  
  
 agttctcgag cttttgagt acgtcgtctt taggttgggg ggaggggtt tatgcatgg 1020  
 agtttccca cactgagtgg gtggagactg aagttaggcc agcttggcac ttgatgtaat 1080  
 tctccttga atttgcctt tttgagttg gatcttgggt cattctcaag cctcagacag 1140  
 tggttcaaag ttttttctt ccatttcagg tgtcgtga 1178

<210> 45

<211> 1984

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG301

<400> 45

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc ccggcgctcg ggcgacctt 60  
 ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gagtggaatg cacgcgtgga 120  
  
 tctgagttea attcacgct gctgcgtatg gcgtatagtg caagtgggtt ttaggaccag 180  
 gatgaggcgg ggtgggggtg cctactgac gaccgacccc gaccactgg acaagcacc 240

aacccccatt ccccaaattg cgcatcccct atcagagagg gggaggggaa acaggatgcg 300  
 gcgaggcgcg tgcgcactgc cagcttcagc accgcggaca gtgccttcgc ccccgcctgg 360  
 cggcgcgcgc caccgccgcc tcagcaactga aggcgcgctg acgtcactcg cgggtcccc 420  
 gcaaaactccc ctccccggcc accttggctg cgtccgcgcc gccgccggcc cagccggacc 480  
 gcaccacgcg aggcgcgaga taggggggca cgggcgcgac catctgcgct gcggcgccgg 540

cgactcagcg ctgcctcagt ctgcggtggg cagcggagga gtcgtgtcgt gcctgagagc 600  
 gcagtcgaat tcaagctgct agccacatg gcgatgagca gcggcggcag tgggtggcggc 660  
 gtccccgagc aggaggattc cgtgtctgtc cggcgcggca caggccagag cgatgattct 720  
 gacatttggg atgatacagc actgataaaa gcatatgata aagctgtggc ttcatttaag 780  
 catgctctaa agaatggtga catttgtgaa acttcgggta aacaaaaac cacacctaaa 840  
 agaaaacctg ctaagaagaa taaaagccaa aagaagaata ctgcagcttc cttacaacag 900  
 tggaaagtgg gggacaaatg ttctgccatt tggtcagaag acggttgcat ttaccagct 960

accattgctt caattgattt taagagagaa acctgtgttg tggtttacac tggatatgga 1020  
 aatagagagg agcaaaatct gtccgatcta ctttcccaa tctgtgaagt agctaataat 1080  
 atagaacaga atgctcaaga gaatgaaaat gaaagccaag tttcaacaga tgaagttag 1140  
 aactccaggt ctctggaaa taaatcagat aacatcaagc ccaaatctgc tccatggaac 1200  
 tctttctec ctccaccacc ccccatgcca gggccaagac tgggaccagg aaagccaggt 1260  
 ctaaaattca atggcccacc accgccaccg ccaccaccac caccacctt actatcatgc 1320  
 tggctgcctc catttcttc tggaccacca ataattcccc caccacctcc catatgtcca 1380

gattctcttg atgatgctga tgctttggga agtatgttaa tttcatggta catgagtggc 1440  
 tatcatactg gctattatat gggttttaga caaaatcaaa aagaaggaag gtgctcacat 1500  
 tccttaaat aaggagaaat gctggcatag agcagcacta aatgacacca ctaaagaaac 1560  
 gatcagacag atctacaaag cttatcgata ccgtcgacta gagctcgctg atcagcctcg 1620  
 actgtgcctt ctagtggcca gccatctgtt gtttgcctt ccccgtgcc ttccttgacc 1680  
 ctggaagggt ccacteccac tgctctttcc taataaaatg aggaattgc atcgattgt 1740  
 ctgagttagt gtcattctat tctggggggt ggggtggggc aggacagcaa gggggaggat 1800

tgggaagtct agagcaggca tgctggggag agatcgatct gaggaacccc tagtgatgga 1860  
 gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccggcgac caaaggtcgc 1920  
 ccgaccccc ggctttgccc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcga gagaggaggt 1980  
 ggcc 1984

<210> 46

<211> 2199

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG302

<400> 46

```

ctgcgcgctc gctcgcctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt      60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga      120

tctgagttca acgcgtaaag ctggaactgg ggccggaaac agctgagggt gcccagccgg      180
aaactcgaaa tcaacgtagg ccggaacta ttcgatgaat tccgccgga actaggtccg      240
gaggactgcc gaaacacct gtaatcaagc cgccggaac ctgttgtggc cgtatgccgg      300
aaacgtctta attggacgtg ccggaactc ttttaatgag ttcgccgga accagaccag      360
ccgagctgcc gaaaccggt tatatagaac ggccggaac ggtccacagg aaaaagccgg      420
aaacaccaa acggttagcg ccggaacga ctggggagga cgtgccgga acgtactatc      480
tgaagatgcc gaaacactt gaaagctcca agccggaac gggcccgtgc ggatagccgg      540

aaactgacgg tacacggccg ccggaacac tacttgtatg gtagccgga acttgggcgt      600
ggctggggcc gaaacgctc gagatctcg atctgcatc caattagtca gcaaccatag      660
tcccgccctt aactccgcc atcccgcc taactccgc cagttccgc cattctccg      720
cccatcgctg actaattttt tttattatg cagaggccga ggcccctcg gcctctgagc      780
tattccagaa gtagtgagga ggctttttg gaggcctagg cttttgcaa ggatccgcca      840
ccatggcgat gagcagcggc ggcagtggtg gcggcgtccc ggagcaggag gattccgtgc      900
tgttccggcg cggcacaggc cagagcgatg attctgacat ttgggatgat acagactga      960

taaaagcata tgataaagct gtggettcac ttaagcatgc tctaaagaat ggtgacattt     1020
gtgaaacttc gggtaaacca aaaaccacac ctaaaagaaa acctgctaag aagaataaaa     1080
gccccaaaga gaatactgca gtttccttac aacagtggaa agttggggac aatgtttctg     1140
ccatttggte agaagacggt tgcatttacc cagctacat tgcttcaatt gattttaaga     1200
gagaaacctg tgttgtggtt tacctggat atggaaatag agaggagcaa aatctgtccg     1260
atctactttc ccaatctgt gaagttagta ataatataga acagaatgct caagagaatg     1320
aaaatgaaag ccaagtttca acagatgaaa gtgagaactc caggtctcct ggaaataaat     1380

cagataacat caagccaaa tctgctccat ggaactcttt tctcctcca ccaccccca     1440
tgccagggcc aagactggga ccaggaaagc caggtctaaa attcaatgac ccaccaccg     1500
caccgccacc accaccacc cacttactat catgctggct gcctccattt ccttctggac     1560

```

caccaataat tccccacca cctcccatat gtccagattc tcttgatgat gctgatgctt 1620  
 tgggaagtat gtaatttca tggatcatga gtggctatca tactggctat tatatgggtt 1680  
 ttagacaaaa tcaaaaagaa ggaaggtgct cacattcctt aaattaagga gaaatgctgg 1740  
 catagagcag cactaaatga caccactaaa gaaacgatca gacagatcta caaagcttat 1800

cgataccgtc gactagagct cgctgatcag cctcgactgt gccttctagt tgccagccat 1860  
 ctgttgtttg ccctccccc gtgccttctt tgaccctgga aggtgccact cccactgtcc 1920  
 tttcctaata aaatgaggaa attgcatcgc attgtctgag taggtgtcat tctattctgg 1980  
 ggggtgggtt ggggcaggac agcaaggggg aggattggga agtctagagc aggcattgctg 2040  
 gggagagatc gatctgagga acccctagtg atggagtggg ccaactccctc tctgcgcgct 2100  
 cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccgc gcccgggctt tgcccgggcg 2160  
 gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcc 2199

<210> 47

<211> 2685

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG303

<400> 47

cctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgct gggcgacctt 60  
 tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggaat gcacgcgtgg 120  
 atctgagttc aattcacgcg tgtggctccg gtccccgtca gtgggcagag cgacatcgc 180  
 ccacagtccc cgagaagttg gggggagggg tcggcaattg aaccgggtcc tagagaaggt 240  
 ggcgcggggt aaactgggaa agtgatgtcg tgtactggct ccgccttttt cccgaggggtg 300  
 ggggagaacc gtatataagt gcagtagtgc ccgtgaacgt tctttttcgc aacgggtttg 360

ccgccagaac acaggttaagt gccgtgtgtg gttcccgcgg gcctggcctc tttacgggtt 420  
 atggcccttg cgtgccttga attaactcca ctggctgcag tacgtgattc ttgatcccga 480  
 gcttcgggtt ggaagtgggt gggagagttc gaggccttgc gcttaaggag ccccttcgcc 540  
 tcgtgcttga gttgaggcct ggccctggcg ctggggccgc cgcgtgcgaa tctggtggca 600  
 ccttcgcgcc tgctcctctg ctttcgataa gtctctagcc atttaaaatt tttgatgacc 660  
 tgctgcgacg ctttttttct ggcaagatag tcttgtaaat gcgggccaag atctgcacac 720  
 tggtatttcg gtttttgggg ccgcgggcgg cgacggggcc cgtgcgtccc agcgcacatg 780

ttcggcgagg cggggcctgc gagcgcggcc accgagaatc ggacgggggt agtctcaagc 840

tggccggcct gcictgggtgc ctggcctcgc gccgccgtgt atcgccccgc cctgggcggc 900  
 aaggctggcc cggctggcac cagttgcgtg agcggaaaga tggccgcttc ccggccctgc 960  
 tgcagggagc tcaaaatgga ggacgcggcg ctcgggagag cgggcgggtg agtcacccac 1020  
 acaaaggaaa agggcctttc cgtcctcagc cgtcgcttca tgtgactcca cggagtaccg 1080  
 ggcgccttcc aggcacctcg attagttctc gagcttttgg agtacgtcgt ctttaggttg 1140  
 gggggagggg ttttatgcga tggagtttcc ccacactgag tgggtggaga ctgaagttag 1200  
  
 gccagcttgg cacttgatgt aattctcctt ggaatttggc cttttttagt ttggatcttg 1260  
 gttcattctc aagcctcaga cagtggttca aagttttttt cttccatttc aggtgtcgtg 1320  
 acgccacat ggcgatgagc agcggcggca gtggtggcgg cgtcccggag caggaggatt 1380  
 ccgtgctgtt ccggcgcggc acaggccaga gcgatgattc tgacatttgg gatgatacag 1440  
 cactgataaa agcatatgat aaagctgtgg cttcatttaa gcatgctcta aagaatggtg 1500  
 acatttgtga aacttcgggt aaaccaaaaa ccacaccta aagaaaacct gctaagaaga 1560  
 ataaaagcca aaagaagaat actgcagctt ccttacaaca gtggaaagt ggggacaaat 1620  
  
 gttctgccat ttggtcagaa gacggttgca ttaccacgc taccattgct tcaattgatt 1680  
 ttaagagaga aacctgtgtt gtggtttaca ctggatatgg aaatagagag gagcaaaatc 1740  
 tgtccgatct actttccca atctgtgaag tagctaataa tatagaacag aatgctcaag 1800  
 agaatgaaaa tgaaagcaa gtttcaacag atgaaagtga gaactccagg tctcctggaa 1860  
 ataaatcaga taacatcaag cccaatctg ctccatggaa ctcttttctc cctccaccac 1920  
 ccccatgcc agggccaaga ctgggaccag gaaagccagg tctaaaatc aatggccacc 1980  
 caccgccacc gccaccacca ccacccact tactatcatg ctggctgcct ccatttcctt 2040  
  
 ctggaccacc aataattccc ccaccactc ccatatgtcc agattctctt gatgatgctg 2100  
 atgctttggg aagtatgta atttcatggt acatgagtgg ctatcact ggctattata 2160  
 tgggttttag acaaaatcaa aaagaaggaa ggtgctcaca ttccttaaat taaggagaaa 2220  
 tgctggcata gacagcact aatgacacc actaaagaaa cgatcagaca gatctacaaa 2280  
 gcttatcgat accgtgact agagetcgt gatcagctc gactgtgcct tetagtggc 2340  
 agccatctgt tgttgcccc tccccgtgc cttccttgac cctggaaggt gccactcca 2400  
 ctgtccttc ctaataaaat gaggaattg catcgattg tctgagtagg tgtcattcta 2460  
  
 ttctgggggg tgggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagtc tagagcaggc 2520  
 atgctgggga gagatcgtc tgaggaacc ctagtgatgg agttggccac tcctctctg 2580  
 cgcgtcgtc cgtcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgcc gggctttgcc 2640  
 cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc agagaggag tggcc 2685

<210> 48

<211> 2452

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG304

<400> 48

```

ctgcgcctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cgggctgc ggcgacctt      60
ggtcgccccg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagggaatg cacgcgtgga    120

tctgagttca acgcgtaaag ctggaactgg ggccggaaac agctgagggt gccagccgg     180
aaactcgaaa tcaacgtagg ccggaacta ttcgatgaat tccccggaa actaggtccg     240
gaggactgcc ggaaacacct gtaatcaagc cgcgggaaac ctgttgtggc cgtatgccgg     300
aaacgtctta attggactg ccggaactc ttttaatgag ttcgccgaa accagaccag     360
ccgagctgcc gaaaccggt tataatagaac ggccggaaac ggtccacagg aaaaagccgg     420
aaacacccaa acggttagcg ccggaacga ctggggagga cgtgccggaa acgtactatc     480
tgaagatgcc ggaaacactt gaaagctcca agccggaaac gggcccgtgc ggatagccgg     540

aaactgacgg tacacggccg ccggaaacac tacttgtatg gtagccgaa acttgggcgt     600
ggctggggcc ggaacgctc gagatctgag atcagtcaa gtgggtttta ggaccaggat     660
gaggcggggg gggggtgctt acctgacgac cgaccccgac cactggaca agcacccaac     720
ccccattccc caaattgctc atcccctatc agagaggggg aggggaaaca ggatgcggcg     780
aggcgcgtgc gactgccag cttcagcacc gcggacagtg ctttcgccc cgcctggcgg     840
cgcgcgccac cgcgcctca gcaactgaag cgcgctgacg tcaactgccc gtccccgca     900
aactcccctt cccggccacc ttggtcgcgt ccgcccgcgc gccggcccag cggaccgca     960

ccacgcgagg cgcgagatag gggggcacgg gcgcgacat ctgcctgctg gcgccggcga    1020
ctcagcgtg cctcagtctg ccgtgggcag cggaggagtc gtgtcgtgcc tgagagcga    1080
gggatacacg ccacatggc gatgagcagc ggcggcagtg gtggcggcgt cccggagcag    1140
gaggattccg tgctgttccg gcgcggcaca ggccagagcg atgattctga catttgggat    1200
gatacagcac tgataaaagc atatgataaa gctgtggctt catttaagca tgctctaaag    1260
aatggtgaca tttgtgaaac ttcgggtaa ccaaaaacca cacctaaaag aaaacctgct    1320
aagaagaata aaagccaaaa gaagaatact gcagcttctt tacaacagtg gaaagtggg    1380

gacaaatggt ctgccatttg gtcagaagac ggttgcattt acccagctac cattgcttca    1440
attgatttta agagagaaac ctgtgttggg gtttacctg gatatgaaa tagagaggag    1500

```

caaaatctgt ccgatctact ttccccaatc tgtgaagtag ctaataatat agaacagaat 1560  
 gctcaagaga atgaaaatga aagccaagt tcaacagatg aaagtgagaa ctccaggtct 1620  
 cctggaata aatcagataa catcaagccc aaatctgctc catggaactc ttttctcct 1680  
 ccaccacccc ccatgccagg gccaaagactg ggaccaggaa agccaggtct aaaattcaat 1740  
 ggcccaccac cgccaccgcc accaccacca ccccacttac tatcatgctg gctgcctcca 1800

tttctttctg gaccaccaat aattecccca ccacctecca tatgtccaga ttctcttgat 1860  
 gatgctgatg ctttgggaag tatgttaatt tcatggtaca tgagtggcta tcatactggc 1920  
 tattatatgg gttttagaca aaatcaaaaa gaaggaaggt gctcacattc cttaaattaa 1980  
 ggagaaatgc tggcatagag cagcactaaa tgacaccact aaagaaacga tcagacagat 2040  
 ctacaaagct tatcgatacc gtcgactaga gctcgctgat cagcctcgac tgtgccttct 2100  
 agttgccagc catctgttgt ttgccctcc cccgtgcctt ccttgaccct ggaaggtgcc 2160  
 actcccactg tcctttccta ataaaatgag gaaattgcat cgcattgtct gagtaggtgt 2220

cattctattc tgggggtgg ggtggggcag gacagcaagg gggaggattg ggaagtctag 2280  
 agcaggcatg ctggggagag atcgatctga ggaaccecta gtgatggagt tggccactec 2340  
 ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cggcgacca aaggtcgccc gacgcccggg 2400  
 ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcaga gagggagtgg cc 2452

<210> 49

<211> 2451

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG305

<400> 49

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60  
 ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga 120

tctgagttcg cgtgccctg cctgcgag ggcgggaaga cagccccgg gecctctec 180  
 tccctctgcc ttttaagg acgccctcca gggcgacccc ggaggcgga cttgccaagc 240  
 tgaagagaat cagtcaaaaa tccgccaca ggggacacat catttaata aatgtgttc 300  
 ttgcccga cagaagtca gataggctcg attatcatta attctgggtt tcacgtaacg 360  
 agaggaaaca caggttgcaa taaaataaa aaaatggttt gaaatcaatt ttaactcatt 420  
 ttgaacgtcc tcacacgttt gacaaaccga ttgtttcag gagacttget aatatctaaa 480  
 tcggtgacag ggtgtttgct gtgagtgtgg ctctggaaaa gttattaagc gttataaaaa 540

aaatgatgta atgaaattct aattaatggg agggaagtgc caacaaatca ctcttataaa 600  
 tattaacgct atcaaagaac agctggagaa ggagtgaag tgggttttag gaccaggatg 660  
 aggcggggtg ggggtgccta cctgacgacc gaccccgacc cactggacaa gcaccaacc 720  
 cccattcccc aaattgcgca tcccctatca gagaggggga ggggaaacag gatgcggcga 780  
 ggcgctgctg cactgccagc ttcagcaccg cggacagtgc cttcgcccc gcctggcggc 840  
 gcgcgccacc gccgcctcag cactgaaggc gcgctgacgt cactcgccgg tccccgcaa 900  
 actccccttc ccggccacct tggctgcgtc cgcgccgccg ccggcccagc cggaccgcac 960  
  
 cagcgaggc gcgagatagg ggggcacggg cgcgaccatc tgcgctgcgg cgcggcgac 1020  
 tcagcgtgct ctcagtctgc ggtgggcagc ggaggagtgc tgtcgtgcct gagagcgag 1080  
 ggatacacgc caccatggcg atgagcagcg gcggcagtgg tggcggcgtc ccggagcagg 1140  
 aggatccgt gctgttccgg cgcggcacag gccagagcga tgattctgac atttgggatg 1200  
 atacagcact gataaaagca tatgataaag ctgtggcttc atttaagcat gctctaaaga 1260  
 atggtgacat ttgtgaaact tcgggtaaac caaaaaccac acctaaaaga aaacctgcta 1320  
 agaagaataa aagccaaaag aagaatactg cagcttcctt acaacagtgg aaagtgggg 1380  
  
 acaaatgttc tgccatttgg tcagaagacg gttgcattta cccagctacc attgcttcaa 1440  
 ttgattttaa gagagaaacc tgtgttgtgg tttacactgg atatggaaat agagaggagc 1500  
 aaaatctgct cgatctactt tcccgaatct gtgaagtage taataatata gaacagaatg 1560  
 ctcaagagaa tgaaatgaa agccaagtth caacagatga aagtgagaac tccaggtctc 1620  
 ctggaataa atcagataac atcaagccca aatctgctcc atggaactct tttctccctc 1680  
 caccaccccc catgccaggg ccaagactgg gaccaggaaa gccaggtcta aaattcaatg 1740  
 gccaccacc gccaccgcca ccaccaccac cccacttact atcatgctgg ctgcctccat 1800  
  
 ttcttctg accaccaata attccccac cacctccat atgtccagat tetcttgatg 1860  
 atgctgatgc ttgggaagt atgttaattt catggtacat gagggtat catactggct 1920  
 attatatggg ttttagacaa aatcaaaaag aaggaagggtg ctcacattcc ttaaattaag 1980  
 gagaaatgct ggcatagagc agcaactaat gacaccacta aagaaacgat cagacagatc 2040  
 tacaagctt atcgataccg tcgactagag ctgctgac agcctcgact gtgccttcta 2100  
 gttgccagcc atctgttgtt tgcccctccc ccgtgccttc cttgacctg gaaggtgcca 2160  
 ctcccactgt ccttctctaa taaaatgagg aaattgcatc gcattgtctg agtaggtgtc 2220  
  
 attctattct ggggggtggg gtggggcagg acagcaaggg ggaggattgg gaagtctaga 2280  
 gcaggcatgc tggggagaga tcgatctgag gaaccctag tgatggagtt ggccactccc 2340  
 tctctgcgct ctcgctcgt cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgccc acgcccgggc 2400

tttgcctggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcagag agggagtggc c 2451

<210> 50

<211> 2450

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG306

<400> 50

ctgcgcgctc gctcgtcac tgagccgcc cgggcaaagc cgggctcg ggcgacctt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga 120

tctgagttcg cgtggtgcc aggcagtggg agcagggctg accagagttc tgcagagatt 180

gcctggaggc cttcctggaa gaagagatcc tggcaccgca caaagagaag cacaggcttt 240

ccagggtga ggagagggag gtcaagtgag gccaggtgc ccctgcctga gcctgtgtcc 300

ccagaaacct cctctcctc tcatcacc caccatctcc ctgccactcc ccgcagctcc 360

ctgtggccaa gtgcaactga gcaactggct ctgctccaca aacggtctgc tccactccag 420

gaagggcacc tctcccccc cccccacct ccggtgtca ccaactaccg ctctagcctc 480

caggggtgg ggacccaga gctggacaca cccatcgaa gcccacagc tcagccagcc 540

ggacagactc acggtcgac tcaagacccc ggagccctga ggtgggcagc gcgccagggt 600

tcctcgagc ctctcaagg tcagtgaag tagtgcaagt gggttttagg accaggatga 660

ggcgggtgg ggtgcttac ctgacgaccg acccgacc actggacaag cacccaacc 720

ccattcccca aattgcgat ccctatcag agagggggag gggaaacagg atgcgagcag 780

gcgctgctgc actgccagt tcagcaccgc ggacagtcc ttcgccccg cctggcggcg 840

cgccaccg ccgctcagc actgaaggcg cgtgacgtc actcgccgt cccccgaaa 900

ctccccttc cggccacctt ggtcgcgtcc gcgccgccc cggcccagcc ggaccgacc 960

acgcgaggcg cgagatagg gggcacggc gcgaccatct gcgctgcg gcggcgact 1020

cagcgtgcc tcagtctggt gtggcagcg gaggagtcgt gtcgtgcctg agagcagcagg 1080

gatacacgcc accatggcga tgagcagcg cggcagtggg ggccgctcc cggagcagga 1140

ggattccgtg ctgtccggc cgggcacagg ccagagcagc gattctgaca tttgggatga 1200

tacagcactg ataaaagcat atgataaagc tttggcttca ttttaagcat ctctaaagaa 1260

tggtagcatt tgtgaaactt cgggtaaac aaaaaccaca cctaaaagaa aacctgctaa 1320

gaagaataaa agccaaaaga agaatactgc agcttcctta caacagtgga aagttgggga 1380

caaatgttct gccatttggc cagaagacgg ttgcatttac ccagctacca ttgcttcaat 1440

tgattttaag agagaaacct gtgttgtggt ttacactgga tatggaaata gagaggagca 1500  
 aaatctgtcc gatctacttt cccaatctg tgaagtagct aataatatag aacagaatgc 1560  
 tcaagagaat gaaaatgaaa gccaagtffc aacagatgaa agtgagaact ccaggtctcc 1620  
 tggaaataaa tcagataaca tcaagcccaa atctgctcca tggaaactctt ttctccctcc 1680  
 accaccccc atgccagggc caagactggg accaggaag ccaggtctaa aattcaatgg 1740  
 cccaccaccg ccaccgccac caccaccacc ccacttacta tcatgctggc tgcctccatt 1800

tccttctgga ccaccaataa ttccccacc acctccata tgtccagatt ctcttgatga 1860  
 tgctgatgct ttgggaagta tgttaatttc atggtacatg agtggctatc atactggcta 1920  
 ttatatgggt tttagacaaa atcaaaaaga aggaaggtgc tcacattcct taaattaagg 1980  
 agaaatgctg gcatagagca gcaactaatg acaccactaa agaaacgatc agacagatct 2040  
 acaaagctta tcgataccgt cgactagagc tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag 2100  
 ttgccagcca tcgtttgitt gccctcccc cgtgccttcc ttgacctgg aaggtgccac 2160  
 tcccactgtc ctttctaata aaaatgagga aattgcatcg cattgtctga gtaggtgtca 2220

ttctattctg gggggtgggg tggggcagga cagcaagggg gaggattggg aagtctagag 2280  
 caggcatgct ggggagagat cgatctgagg aaccctagt gatggagtg gccactccct 2340  
 ctctgcgcgc tcgctcgctc actgaggccg ggcgacaaa ggtcgcccga cgccccggct 2400  
 ttgccgggic ggcctcagtg agcgagcgag cgcgagaga gggagtggcc 2450

<210> 51

<211> 2256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG307

<400> 51

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60  
 ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggaatg cacgcgtgga 120

tctgagttcg cgtcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga ccgccaacg 180  
 acccccgcce attgacgtca ataatgacgt atgttcccat agtaacgcca atagggactt 240  
 tcattgacg tcaatgggtg gagtatttac ggtaaactgc ccaacttgca gtacatcaag 300  
 tgtatcatat gccaaagtacg ccccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc 360  
 attatgccc gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacatc tacgtattag 420  
 tcatcgctat taccatgagt gcaagtgggt tttaggacca ggatgaggcg ggtgggggt 480

gcctacctga cgaccgacct cgaccactg gacaagcacc caacccccat tccccaaatt 540

gcgcatcccc tatcagagag ggggagggga aacaggatgc ggcgaggcgc gtgcgactg 600

ccagcttcag caccgaggac agtgccttcg cccccgectg gcgcgcgcg ccaccgccgc 660

ctcagactg aaggcgcgct gacgtcactc gccggtcccc cgaaactcc cttcccggc 720

caccttggtc gcgtccgcbc gccccggc ccagccggac cgcaccacgc gaggcgcgag 780

ataggggggc acgggcgcga ccatctgcgc tgcggcgccg gcgactcagc gctgcctcag 840

tctgcggtgg gcagcggagg agtctgtctg tgctgagag cgcagggata cacgccacca 900

tggcgatgag cagcggcggc agtgggtggc gcgtcccgga gcaggaggat tccgtgctgt 960

tccggcgcgg cacaggccag agcgatgatt ctgacatttg ggatgataca gcaactgataa 1020

aagcatatga taaagctgtg gcttcattta agcatgctct aaagaatggt gacatttgtg 1080

aaacttcggg taaacaaaa accacacctt aaagaaaacc tgctaagaag aataaaagcc 1140

aaaagaagaa tactgcagct tcttacaac agtggaaagt tggggacaaa tgttctgcca 1200

tttggtcaga agacggttgc atttaccag ctaccattgc ttcaattgat ttaagagag 1260

aaacctgtgt tgtggtttac actggatatg gaaatagaga ggagcaaat ctgtccgatc 1320

tactttcccc aatctgtgaa gtagctaata atatagaaca gaatgctcaa gagaatgaaa 1380

atgaaagcca agtttcaaca gatgaaagtg agaactccag gtctcctgga aataaatcag 1440

ataacatcaa gcccaaatct gctccatgga actcttttct ccctccacca cccccatgc 1500

cagggccaag actgggacca ggaaagccag gtctaaaatt caatggcca ccaccgccac 1560

cgccaccacc accaccacc ttaactatcat gctggctgcc tccatttctct tetggaccac 1620

caataatcc cccaccact cccatatgc cagattctct tgatgatgct gatgctttgg 1680

gaagtatgtt aatttcatgg tacatgagtg gctatcatac tggtctattat atgggtttta 1740

gacaaaaatca aaaagaagga aggtgctcac attccttaaa ttaaggagaa atgctggcat 1800

agagcagcac taaatgacac cactaaagaa acgatcagac agatctaca agcttatcga 1860

taccgtcgac tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg 1920

ttgtttgccc ctccccgtg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt 1980

cctaataaaa ttaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 2040

gtggggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaagt ctagagcagg catgctgggg 2100

agagatcgat ctgaggaacc cctagtgatg gaggttggcca ctcctctct gcgcgctcgc 2160

tcgctcactg aggccgggcb accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc ccgggcggcc 2220

t c a g t g a g c g a g c g a g c g c g c a g a g a g g g a g t g g c c 2256

<210> 52

<211> 2256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EXG340

<400> 52

c t g c g c g c t c g t c g c t c a c t g a g c c c g c g g c a a a g c c c g g g c g t c g g c g c a c t t t 60

g g t c g c c c g g c c t c a g t g a g c g a g c g a g c g c a g a g a g g a g t g g a a t g c a c g c g t g g a 120

t c t g a g t t c g c g t c g t t a c a t a a c t t a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c t g a c g c c c a a c g 180

a c c c c g c c c a t t g a c g t c a a t a a t g a c g t a t g t t c c c a t a g t a a c g c c a a t a g g g a c t t 240

t c c a t t g a c g t c a a t g g g t g a g a t a t t t a c g g t a a a c t g c c c a c t t g g c a g t a c a t c a a g 300

t g t a t c a t a t g c c a a g t a c g c c c c t a t t g a c g t c a a t g a c g g t a a a t g g c c c g c c t g g c 360

a t t a t g c c c a g t a c a t g a c c t t a t g g g a c t t t c c t a c t t g g c a g t a c a t c t a c g t a t t a g 420

t c a t c g c t a t t a c c a t g a g t g c a a g t g g g t t t t a g g a c c a g g a t g a g g c g g g t g g g g g t 480

g c c t a c c t g a c g a c c g a c c c g a c c c a c t g g a c a a g c a c c c a a c c c c c a t t c c c c a a a t t 540

g c g c a t c c c c t a t c a g a g a g g g g g a g g g a a c a g g a t g c g g c g a g g c g c g t g c g c a c t g 600

c c a g c t t c a g c a c g c g g a c a g t g c c t t c g c c c c c g c c t g g c g c g c g c c a c c g c c g c 660

c t c a g c a c t g a a g g c g c g c t g a c g t c a c t c g c c g g t c c c c g c a a a c t c c c t t c c c g g c 720

c a c c t t g g t c g c g t c c g c g c c g c c c c g c c c a g c c g g a c c g c a c c a c g c g a g g c g c g a g 780

a t a g g g g g g c a c g g g c g c a c c a t c t g c g c t g c g c g c g c g a c t c a g c g t g c c t c a g 840

t c t g c g g t g g g c a g c g g a g g a g t c g t g t c g t g c c t g a g a g c g a g g a t a c a c g c c a c c a 900

t g g c c a t g a g c a g c g g a g g a g c g g a g g a g a g t g c c c g a g c a a g a g g a c a g c g t g c t g t 960

t t a g g a g a g g a a c c g g a c a g a g c g a t g a c t c c g a t a t c t g g a c g a c a c c g c t c t g a t c a 1020

a g g c c t a t g a c a a g c c g t g g c c t c c t t c a a g c a c g c t c t g a a g a a t g g c g a t a t c t g t g 1080

a g a c c t c c g g c a a a c c t a a g a c c a c c c c c a a g a g g a a g c c g c c a a g a a g a a c a a g t c c c 1140

a g a a g a a g a a t a c c g c c g c t a g c c t c c a g c a g t g g a a a g t g g g c g a t a a g t g c a g c g c c a 1200

t t t g g a g c g a g g a t g g a t g c a t c t a c c c c g c c a c c a t t g c c a g c a t c g a c t t c a a g a g g g 1260

a g a c a t g c g t g g t g g t g t a t a c c g g a t a c g a a a t a g a g a g a c a g a t c t g a g c g a t c 1320

t g t g t c c c c a t c t g c g a g t g g c c a a t a t a t c g a g c a g a a c g c c c a a g a g a a c g a g a 1380

a c g a a a g c c a a g t g t c c a c c g a t g a g a g c g a g a a c t c c a g a a g c c c c g g a a a c a a g t c c g 1440

a c a a c a t c a a a c c c a a g a g c g c c c c t t g g a a c a g c t t t c t g c c t c c t c c c c c c c a t g c 1500

ccggccctag actgggaccc ggcaagcccg gactgaagtt caacggaccc cccctcctc 1560  
  
 ctccccccc tctctctcat ctgtgagct gctggctccc ccttttcct agcggccccc 1620  
 ccattatccc cccccctccc cctatctgtc cggacagcct cgatgacget gacgccteg 1680  
 gaagcatgct gatcagctgg tacatgagcg gctaccacac cggatactac atgggcttca 1740  
 gacagaacca gaaggagggc agatgtccc actctctgaa ctgaggagaa atgctggcat 1800  
 agagcagcac taaatgacac cactaaagaa acgatcagac agatctaaa agcttatcga 1860  
 taccgtcgac tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg 1920  
 ttgtttgccc ctccccgtg ccttcttga ccttgggaagg tgccactccc actgtccttt 1980  
  
 cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgatt gtctgagtag gtgtcattct attctggggg 2040  
 gtgggtggg gcaggacagc aagggggagg attgggaagt ctagagcagg catgctgggg 2100  
 agagatgat ctgaggaacc cctagtgatg gatttgcca ctcctctct gcgcgctcgc 2160  
 tcgctcactg aggccggcg accaaaggtc gcccgacgcc cgggctttgc cgggcggcc 2220  
 tcagtgagcg agcgagcgcg cagagagga gtggcc 2256  
  
 <210> 53  
 <211> 2503  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> EXG341  
 <400> 53  
  
 ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccgc cgggcaaagc cgggctcgc gcgcacctt 60  
  
 ggtcgcggg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagggaatg cagcgtgga 120  
 tctgattcg cgtcgttaca taacttacgg taaatggccc gcctggctga cgcceaacg 180  
 accccgccc attgacgtca ataatgacgt atgttccat agtaacgcca atagggactt 240  
 tcattgacg tcaatgggtg gattatttac ggtaaactgc cacttgga gtacatcaag 300  
 tgtatcatat gccaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg ccgcctggc 360  
 attatgcca gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcaglacatc tacgtattag 420  
 tcatcgtat taccatgagt gcaagtgggt ttaggacca ggatgagcgc ggtgggggt 480  
  
 gcctacctga cgaccgacc cgaccactg gacaagcacc caaccccat tccccaaatt 540  
 gcgcacccc tctcagagag ggggagggga aacaggatgc ggcgagcgc gtgcgactg 600  
 ccagcttcag caccgaggac agtgcttcg cccccgctg gcggcgcgcg ccaccgccc 660  
 ctcagcactg aaggcgcgct gacgtcact gccggtcccc cgcaaactcc cttcccggc 720

caccttggtc gcgtccgcgc cgcccccgc ccagccggac cgcaccacgc gaggcgcgag 780  
ataggggggc acgggcgcga ccatctgcgc tgcggcggc gcgactcagc gctgcctcag 840  
tctgcggtgg gcagcggagg agtcgtgtcg tgcctgagag cgcagggata cacgccacca 900  
  
tggccatgag cagcggagga agcggaggag gagtgccca gcaagaggac agcgtgctgt 960  
ttaggagagg aaccggacag agcgatgact ccgatatctg ggacgacacc gctctgatca 1020  
aggcctatga caaagccgtg gcctccttca agcacgctct gaagaatggc gatatctgtg 1080  
agacctccgg caaacctaag accaccccca agaggaagcc cgccaagaag aacaagtccc 1140  
agaagaagaa taccgccgt agcctccagc agtggaaagt gggcgataag tgcagcgcca 1200  
tttggagcga ggatggatgc atctacccc ccaccattgc cagcatcgac ttcaagaggg 1260  
agacatgcgt ggtggtgtat accggatacg gaaatagaga ggagcagaat ctgagcgatc 1320  
  
tgctgtcccc catctgcgag gtggccaata atatcgagca gaacgcccga gagaacgaga 1380  
acgaaagcca agtgtccacc gatgagagcg agaactccag aagccccgga aacaagtccg 1440  
acaacatcaa acccaagagc gccccttga acagctttct gcctcctccc cccccatgc 1500  
ccggccctag actgggacc ggcaagccc gactgaagtt caacggacce cccctcctc 1560  
ctccccccc tcctcctcat ctgctgagct gctggctccc cctttccct agcggcccc 1620  
ccattatccc cccccctccc cctatctgtc ccgacagcct cgatgacgct gacgcctcg 1680  
gaagcatgct gatcagctgg tacatgagcg gctaccacac cggatactac atgggcttea 1740  
  
gacagaacca gaaggagggc agatgctccc actctctgaa ctgaggagaa atgctggcat 1800  
agagcagcac taaatgacac cactaaagaa acgatcagac agatctataa tcaacctctg 1860  
gattacaaaa ttigtgaaag attgactggt attcttaact atgttgctcc ttttacgcta 1920  
tgtggatacg ctgctttaat gcctttgtat catgctattg cttcccgtat ggctttcatt 1980  
ttctcctcct tgtataaatc ctggttagtt cttgccacgg cggaactcat cggcctgctgc 2040  
cttgcccgt gctggacagg ggctcggctg ttgggactg acaattccgt ggtgttaagc 2100  
ttatcgatac cgtcgactag agctcgtga tcagcctcga ctgtgccttc tagttgccag 2160  
  
ccatctgttg ttgcccctc ccccgctcct tccttgacc tggaaggtgc cactcccact 2220  
gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgattgtc tgagtaggtg tcattctatt 2280  
ctgggggggtg ggggtgggca ggacagcaag ggggaggatt gggaaagtcta gacagggcat 2340  
gctggggaga gatcgatctg aggaaccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg 2400  
cgctcgtcgc ctactgagg ccggcgacc aaaggtcgcc cgacccccg gctttgcccg 2460  
ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg gcc 2503