(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0105158
(43) 공개일자 2022년07월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/24 (2006.01) *A61K 38/47* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/2402 (2013.01)
A61K 38/47 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2022-7016895
(22) 출원일자(국제) 2020년10월22일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2022년05월19일
(86) 국제출원번호 PCT/US2020/056881
(87) 국제공개번호 WO 2021/081217
국제공개일자 2021년04월29일
(30) 우선권주장
PCT/US2019/067872 2019년12월20일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베니아
미국 펜실베니아 필라델피아 (우편번호 19104) 월넛 스트리트 3451 7플로어
(72) 발명자
호르도 줄리에트
미국 펜실베니아 19147 필라델피아 헤드 하우스 코트 203
윌슨 제임스 엠.
미국 펜실베니아 19103 필라델피아 델란시 스트리트 1831
(74) 대리인
특허법인와이에스장

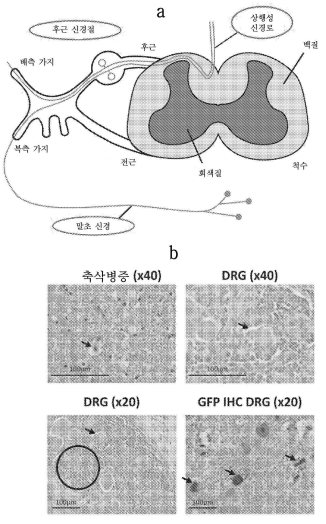
전체 청구항 수 : 총 36 항

(54) 발명의 명칭 **이식유전자 발현의 DRG-특이적 감소를 위한 조성물**

(57) 요 약

hIDUA를 암호화하는 핵산 서열 및 이들 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트가 본 명세서에 제공된다. 또한, hIDUA의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결된 hIDUA 코딩 서열을 포함하는 벡터 게놈을 갖는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터와 같은 벡터가 제공된다. 또한, 이들 발현 카세트 및 rAAV 벡터를 포함하는 조성물 MPS1 또는 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군과 같은 관련 증후군을 치료하는 방법이 제공된다. 제공된 조성물 및 방법은 후근 신경절에서 hIDUA의 발현을 선택적으로 억제하도록 추가로 설계된다.

대 표 도 - 도1ab



(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12Y 302/01076 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/934,915 2019년11월13일 미국(US)
63/005,894 2020년04월06일 미국(US)
62/924,970 2019년10월23일 미국(US)
63/023,602 2020년05월12일 미국(US)
62/972,404 2020년02월10일 미국(US)
63/038,514 2020년06월12일 미국(US)
63/043,600 2020년06월24일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

패키징된 벡터 게놈을 갖는 AAV 캡시드를 포함하는 재조합 AAV(rAAV)로서, 상기 벡터 게놈은 기능적 인간 알파-L-아이두로니데이스(human alpha-L-iduronidase: hIDUA)에 대한 코딩 서열 및 세포에서 hIDUA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하되, 상기 코딩 서열은 다음을 포함하는, rAAV:

a) 서열번호 22의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

b) 서열번호 23의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

c) 서열번호 24의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

d) 서열번호 25의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열; 또는

e) 서열번호 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 hIDUA는 적어도 서열번호 21의 28번 내지 653번 아미노산 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, rAAV.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 hIDUA는 천연 신호 펩타이드를 포함하는, rAAV.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hIDUA는 서열번호 21의 전장(1번 내지 653번 아미노산) 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, rAAV.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코딩 서열은 다음을 포함하는, rAAV:

a) 서열번호 22의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

b) 서열번호 23의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

c) 서열번호 24의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

d) 서열번호 25의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열; 또는

e) 서열번호 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 hIDUA는 이종 신호 펩타이드를 포함하는, rAAV.

청구항 7

제1항 내지 6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 조직-특이성 프로모터를 포함하는, rAAV.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 miR-183, miR-182 또는 miR-96 중 적어도 하나에 특이적인 적어도 하나의 후근 신경절(dorsal root ganglion: drg)-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하고, 상기 적어도 하나의 표적 서열은 hIDUA 코딩 서열의 3' 말단에 작동 가능하게 연결되는, rAAV.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 다음으로부터 선택되는 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하는, rAAV:

(a) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA(서열번호 1);

(b) AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(서열번호 2);

(c) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(서열번호 3); 및

(d) AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC(서열번호 4).

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 DRG-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하는, rAAV.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 캡시드는 AAV9, AAVhu68 또는 AAVrh91 캡시드인, rAAV.

청구항 12

발현 카세트로서, 기능적 인간 알파-갈락토시데이스 A(hIDUA)를 암호화하는 핵산 서열 및 상기 발현 카세트를 포함하는 세포에서 상기 hIDUA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하되, 상기 코딩 서열은 다음을 포함하는, 발현 카세트:

a) 서열번호 22의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

b) 서열번호 23의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

c) 서열번호 24의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

d) 서열번호 25의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열; 또는

e) 서열번호 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 hIDUA는 적어도 서열번호 21의 28번 내지 653번 아미노산 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, 발현 카세트.

청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 hIDUA는 천연 신호 펩타이드를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 15

제12항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 hIDUA는 서열번호 21의 전장(1번 내지 653번 아미노산) 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, 발현 카세트.

청구항 16

제12항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 코딩 서열은 다음을 포함하는, 발현 카세트:

a) 서열번호 22의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

b) 서열번호 23의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

c) 서열번호 24의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열;

d) 서열번호 25의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열; 또는

e) 서열번호 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열.

청구항 17

제12항 또는 제13항에 있어서, 상기 hIDUA는 이종 신호 펩타이드를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 18

제12항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 조직-특이성 프로모터를 포함하는, 발현 카세트.

청구항 19

제12항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 miR-183, miR-182 또는 miR-96 중 적어도 하나에 특이적인 적어도 하나의 후근 신경절(drg)-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하고, 상기 적어도 하나의 표적 서열은 상기 hIDUA 코딩 서열의 3' 말단에 작동 가능하게 연결되는, 발현 카세트.

청구항 20

제12항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 다음으로부터 선택되는 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하는, 발현 카세트:

(a) AGTGAATTCTACCAGTGCCATA(서열번호 1);

(b) AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(서열번호 2);

(c) AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(서열번호 3); 및

(d) AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC(서열번호 4).

청구항 21

제12항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 drg-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함하는, 발현 카세트.

청구항 22

제12항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현 카세트는 비-바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터에 의해 운반되는, 발현 카세트.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 비-바이러스 벡터는 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 무기 입자, 지질 입자, 중합체-기반 벡터 또는 키토산-기반 제형으로부터 선택되는, 발현 카세트.

청구항 24

제22항에 있어서, 상기 바이러스 벡터는 재조합 파보바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 재조합 아데노바이러스인, 발현 카세트.

청구항 25

기능적 hIDUA를 암호화하는 서열을 포함하는 재조합 핵산으로서, 상기 코딩 서열은 서열번호 22, 23, 24, 25 또는 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 26

기능적 hIDUA를 암호화하는 서열을 포함하는 재조합 핵산으로서, 상기 코딩 서열은 서열번호 22, 23, 24, 25 또는 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는, 재조합 핵산.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 재조합 핵산은 플라스미드인, 재조합 핵산.

청구항 28

숙주 세포로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 rAAV, 제12항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 재조합 핵산을 포함하는, 숙주 세포.

청구항 29

약제학적 조성물로서, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 rAAV, 제12항 내지 제24항 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트 또는 제25항 내지 제27항 중 어느 한 항에 따른 재조합 핵산 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 30

뮤코다당류축적증 I형(mucopolysaccharidosis type I: MPS I)으로 진단된 대상체를 치료하는 방법으로서, 제29항에 따른 약제학적 조성물을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 대상체는 헐러 증후군으로 진단된, 방법.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 대상체는 헐러-샤이에 증후군으로 진단된, 방법.

청구항 33

제30항에 있어서, 상기 대상체는 샤이에 증후군으로 진단된, 방법.

청구항 34

제30항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 병용 요법을 투여하는 단계를 더 포함하는, 방법.

청구항 35

뮤코다당류축적증 I형(MPS I), 헐러 증후군, 헐러-샤이에 증후군 및/또는 샤이에 증후군으로 진단된 대상체를 치료하기 위한, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 rAAV 또는 제29항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

청구항 36

뮤코다당류축적증 I형(MPS I), 헐러 증후군, 헐러-샤이에 증후군 및/또는 샤이에 증후군을 치료하기 위한 약제의 제조에서의, 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 rAAV 또는 제29항에 따른 약제학적 조성물의 용도.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 생체내 유전자 요법을 위한 벡터 플랫폼의 선택은 영장류-유래 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus: AAV)를 기반으로 한다. 1960년대에, 유전자-요법 제품은 아데노바이러스의 제제로부터 단리된 AAV로부터 유래되었다(문헌[Hoggan, M.D. et al. Proc Natl Acad Sci U S A 55:1467-1474, 1966]). 이러한 벡터는 안전했지만, 많은 프로그램이 잘못된 형질도입으로 인해 임상에서 실패하였다. 세기의 전환기에, 연구자들은 유리한 안전성 프로파일을 유지하면서 훨씬 더 높은 형질도입 효율을 달성한 내인성 AAV의 패밀리를 발견하였다(문헌[Gao, G., et al. J Virol 78:6381-6388, 2004]).

[0002] AAV 벡터에 대한 숙주의 부적당한 반응은 최소화되었다. 강력한 급성 염증성 반응을 유발하는 비-바이러스 및 아데노바이러스 벡터와 대조적으로(문헌[Raper, S.E., et al. Mol Genet Metab 80:148-158, 2003; Zhang, Y., et al. Mol Ther 3:697-707, 2001]), AAV 벡터는 전염증성이 아니다. 세포독성 T 세포와 같은 벡터-형질도입된

세포에 대한 파괴적 적응 면역 반응은 AAV 벡터 투여 후 최소화되었다. 동물 및 인간에서 AAV가 혈청형, 용량, 투여 경로 및 면역-억제 양생법에 따라 소정의 상황하에서 캡시드 또는 이식유전자 산물에 대한 내성을 유도할 수 있다는 증거가 있다(문헌[Gernoux, G., et al. Hum Gene Ther 28:338-349, 2017; Mays, L.E. & Wilson, J.M. Mol Ther 19:16-27, 2011; Manno, C.S., et al. Nat Med 12:342-347, 2006; Mingozzi, F., et al. Blood 110:2334-2341, 2007]). 그러나, 독성이 이러한 기술의 적용을 제한할 수 있다는 것이 현재 AAV 유전자 요법의 임상 적용이 폭발적으로 증가하는 동안 명백해졌다.

[0003] CNS 및 근골격계를 표적으로 하기 위해 고용량의 AAV를 정맥내 투여한 후 가장 심각한 독성이 발생하였다. 비인간 영장류(nonhuman primate: NHP)에서의 연구에 따르면 혈소판 감소증 및 트랜스아미네이스 증가증의 급성 발병이 나타났으며, 이는 일부 경우에 출혈 및 쇼크의 치명적인 증후군으로 발전하였다(문헌[Hordeaux, J., et al. Mol Ther 26:664-668, 2018; Hinderer, C., et al. Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018]). 대부분의 고용량 AAV 임상 시험에서 간 효소의 급성 상승 및/또는 혈소판 감소가 또한 관찰되었다(문헌[AveXis, I. ZOLGENSMA Prescribing Information, 2019; Solid Biosciences Provides SGT-001 Program Update, 2019; Pfizer, Pfizer Presents Initial Clinical Data on Phase 1b Gene Therapy Study for Duchenne Muscular Dystrophy (DMD), 2019; Flanigan, K.T. et al. Molecular Genetics and Metabolism 126:S54, 2019]). 드물지만 심각한 독성은 빈혈, 신부전 및 보체 활성화를 특징으로 한다(문헌[Solid Biosciences, 2019; Pfizer, 2019]).

[0004] 보다 최근에는, AAV 벡터를 뇌 척수액(cerebral spinal fluid: CSF)으로 또는 고용량으로 혈액에 투여받은 NHP 및 돼지의 후근 신경절(dosal root ganglia: DRG)에서 뉴런이 퇴화하는 문제가 관찰되었다(문헌[Hinderer, C., et al. Hum Gene Ther. 29(3):285-298, 2018; Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:68-78, 2018; Hordeaux, J., et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10:79-88, 2018]). 이러한 신경 독성은 말초 신경의 말초 축삭 및 척수의 후주를 통해 올라가는 중심 축삭의 변성과 관련이 있다.

[0005] 뮤코다당류축적증은 뮤코다당류라고도 하는 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan: GAG)의 분해와 관련된 특정 라이소솜 효소의 결핍으로 이해 발생하는 유전성 장애의 그룹이다. 부분적으로 분해된 GAG의 축적은 세포, 조직 및 장기 기능을 방해한다. 시간이 지남에 따라, GAG는 세포, 혈액 및 결합 조직 내에 축적되어 세포 및 장기 손상을 증가시킨다. 가장 심각한 뮤코다당류축적증(mucopolysaccharidosis: MPS) 장애 중 하나인 MPS I은 효소 알파-L-아이두로니데이스(IDUA)의 결핍으로 인해 발생한다. 구체적으로, IDUA는 헤파란 설페이트와 더마탄 설페이트라고 하는 두 개의 GAG에서 말단 아이두론산 잔기를 제거하는 것으로 보고되었다. IDUA는 다양한 유형의 분자를 소화하고 재사용하는 세포 내의 구획인 라이소솜에 위치한다. IDUA 유전자의 100개 초과의 돌연변이가 뮤코다당류축적증 I형(MPS I)을 일으키는 것으로 밝혀졌으며, 단일 염기 다형성(single nucleotide polymorphism: SNP)이 가장 흔하다.

[0006] MPSI로 진단된 환자를 안전하고 효과적으로 치료하기 위한 유전자 요법 조성물 및 방법에 대한 당업계의 요구가 존재한다.

발명의 내용

[0007] 일 양태에서, 벡터 게놈이 패키징된 AAV 캡시드를 포함하는 재조합 AAV(recombinant AAV: rAAV)가 제공되되, 벡터 게놈은 기능적 인간 알파-L-아이두로니데이스(hIDUA)에 대한 코딩 서열 및 세포에서 hIDUA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하고, 코딩 서열은 서열번호 22의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 23의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 24의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 25의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 또는 서열번호 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, rAAV는 적어도 서열번호 21의 28번 내지 653번 아미노산 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 기능적 hIDUA에 대한 코딩 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 천연 신호 펩타이드를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, hIDUA는 서열번호 21의 전장(1번 내지 653번 아미노산) 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 22의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 23의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 24의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 25의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 또는 서열번호 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 이종 신호 펩타이드

를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 조직-특이성 프로모터를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 miR-183, miR-182 또는 miR-96 중 적어도 하나에 특이적인 적어도 하나의 후근 신경절(drg)-특이적 miRNA 표적 서열을 포함하고, 적어도 하나의 표적 서열은 hIDUA 코딩 서열의 3' 말단에 작동 가능하게 연결된다. 소정의 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 서열번호 1, 2, 3 및 4로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 DRG-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 제공되는 rAAV는 AAV9, AAVhu68 또는 AAVrh91 캡시드이다.

[0008] 또 다른 양태에서, 기능적 인간 알파-갈락토시데이스 A(human alpha-galactosidase A: hIDUA)를 암호화하는 핵산 서열 및 발현 카세트를 포함하는 세포에서 hIDUA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공되되, 코딩 서열은 서열번호 22의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 23의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 24의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 25의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열; 또는 서열번호 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 적어도 서열번호 21의 28번 내지 653번 아미노산 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 갖는 기능적 hIDUA에 대한 코딩 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 천연 신호 펩타이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 서열번호 21의 전장(1번 내지 653번 아미노산) 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 발현 카세트는 서열번호 22의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 23의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 24의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 서열번호 25의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열, 또는 서열번호 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함하는 hIDUA 코딩 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, hIDUA는 이종 신호 펩타이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 조직-특이성 프로모터를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-183, miR-182 또는 miR-96 중 적어도 하나에 특이적인 적어도 하나의 후근 신경절(drg)-특이적 miRNA 표적 서열을 포함하고, 적어도 하나의 표적 서열은 hIDUA 코딩 서열의 3' 말단에 작동 가능하게 연결된다. 소정의 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 서열번호 1, 2, 3 및 4로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 DRG-특이적 miRNA 표적 서열을 추가로 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 비-바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터에 의해 운반된다. 소정의 실시형태에서, 비-바이러스 벡터는 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 무기 입자, 지질 입자, 중합체-기반 벡터 또는 키토산-기반 제형으로부터 선택된다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 재조합 파보바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 레트로바이러스, 재조합 아데노바이러스이다.

[0009] 일 양태에서, 기능적 hIDUA를 암호화하는 서열을 포함하는 재조합 핵산이 제공되되, 코딩 서열은 서열번호 22, 23, 24, 25 또는 26의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 핵산은 기능적 hIDUA를 암호화하는 서열을 포함하되, 코딩 서열은 서열번호 22, 23, 24, 25 또는 26의 1번 내지 1959번 뉴클레오타이드 또는 이에 대해 적어도 95% 동일한 서열을 포함한다. 추가의 실시형태에서, 재조합 핵산은 플라스미드이다.

[0010] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공되는 바와 같은 rAAV, 발현 카세트 또는 재조합 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다.

[0011] 또 다른 양태에서, 본 명세서에 제공되는 바와 같은 rAAV, 발현 카세트 또는 재조합 핵산을 포함하는 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0012] 또한, 또 다른 양태에서, 뮤코다당류축적증 I형(MPS I)으로 진단된 대상체를 치료하는 방법이 제공되되, 방법은 본 명세서에 제공된 약제학적 조성물을 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 대상체는 헐러 증후군(Hurler syndrome), 헐러-샤이에 증후군(Hurler-Scheie syndrome) 및/또는 샤이에 증후군(Scheie syndrome)으로 진단되었다. 또한, MPS I, 헐러 증후군, 헐러-샤이에 증후군 및/또는 샤이에 증후군으로 진단된 대상체를 치료하기 위한 본 명세서에 제공되는 바와 같은 AAV, 발현 카세트, 재조합 핵산 또는 약제학적 조성물의 용도가 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a 내지 도 1c는 AAV ICM 투여 후 DRG 독성 및 2차 축삭병증을 보여준다. (도 1a) DRG는 말초 신경에 위치한 말초 축삭 및 척수의 상행성 배측 백질 신경로에 위치한 중심 축삭을 통해 말초에서 CNS로 감각 메시지를 전달

하는 감각 유사-단극성 뉴런의 세포체를 포함한다. (도 1b) 축삭병증 및 DRG 신경 변성. 축삭병증(왼쪽 위)은 비어 있거나 또는 대식세포 및 세포 찌꺼기로 채워진 투명한 액포를 나타낸다(화살표). DRG 병변(오른쪽 위 및 왼쪽 아래): 화살표는 신경 세포체 변성을 나타내는 반면, 원은 단핵 세포 침윤을 나타낸다. 오른쪽 아래 그림은 AAV에 의해 암호화된 이식유전자에 대한 면역염색(이 경우 녹색 형광 단백질(green fluorescent protein: GFP))을 보여준다. (도 1c) 1등급에서 5등급의 DRG 병변 및 1등급에서 4등급의 배측 척수 축삭병증뿐만 아니라 정상 범위 내(within normal limits: WNL) 절편의 예. 중증도 등급은 다음과 같이 정의된다: 1 초경도(minimal)(10% 미만), 2 경도(mild)(10% 내지 25%), 3 중등도(moderate)(25% 내지 50%), 4 위중(marked)(50% 내지 95%) 및 5 중증(severe)(95% 초과). 5등급은 척수에서 관찰되지 않았다. 화살표 및 원은 DRG(왼쪽 열) 및 축삭병증(오른쪽 열)에서 단핵 세포 침윤이 있는 신경 변성을 나타낸다.

도 2a 내지 도 2f는 AAV ICM 투여 후 척수의 배측 백질 신경로에서 DRG 독성 및 2차 축삭병증의 고배율 이미지를 보여준다. (도 2a) 초기 병변, 신경 세포체(원)는 미세아교 세포(신경세포포식증) 및 침윤 단핵 세포와 함께 증식하는 위성 세포로 둘러싸여 있다. (도 2c) 병변이 진행됨에 따라, 신경 세포체는 퇴색하기 쉽거나(fading) 또는 핵이 없는 작은 불규칙하거나 또는 각진 모양의 세포 및 세포질 과호산구증가증을 특징으로 하는 변성(원)의 증거를 나타낸다. (도 2e) 말기, 위성 세포, 미세아교 세포 및 단핵 세포에 의한 완전한 소멸(별)과 함께 신경 세포체 변성(원). (도 2b, 도 2d 및 도 2f) 확장된 수초가 있는(수직 화살표) 그리고 없는(가로 화살표) 골수대식세포, 팽창된 축삭(별표) 및 축삭 찌꺼기(화살촉)가 있는 배측 백질 신경로의 축삭 변성. (헤마톡실린 및 에오신; 40×, 스케일 바 = 50㎛).

도 3a 및 도 3b는 DRG-특이적 miRNA-유도성 침묵을 사용한 과발현-관련 독성 모델 및 완화 전략을 보여준다. (도 3a) 유사-단극성 감각 뉴런 세포체는 DRG 내에 위치하며, 위성 세포 및 유창 모세관으로 둘러싸여 있다. 유사-단극성 감각 뉴런의 말초 축삭은 말초 신경에 위치하고, 중심 축삭은 척수의 배측로에 위치한다. AAV 벡터는 전사 및 단백질-합성 기구를 가로채고 과부하를 일으켜, 분비된 단백질에 대한 소포체(endoplasmic reticulum: ER) 스트레스와 같은 세포 스트레스 및 원위 축삭을 유지하지 못하는 이차적 실패로 이어진다. 위성 세포는 반응성 증식을 하고 사이토카인을 분비하여 림프구와 같은 염증성 세포를 유인한다. 이러한 가역적 변화는 세포 사멸로 이어질 수 있다. 그 후에, 아교 세포 및 대식세포가 신경 세포체에 침투하여 식균한다. (도 3b) DRG-특이적 침묵을 위한 AAV 발현 카세트 설계. DRG-특이적 miRNA 역-상보 서열(miR 표적)의 4개의 짧은 탠덤 반복부가 종결 코돈과 폴리-A 사이에 도입된다. DRG 뉴런에서, DRG-특이적 miRNA(예컨대, miRNA183)와 mRNA의 3' 비번역 영역에 있는 이의 표적 사이의 정확한 염기 페어링은 RNA-유도성 침묵 복합체(RNA-induced silencing complex: RISC)를 동원하고, 이는 차례로 mRNA 절단을 통한 침묵으로 이어진다. miRNA183을 발현하지 않는 다른 세포 유형에서는, 3' UTR 영역으로부터의 임의의 영향 없이 번역 및 단백질 합성이 발생한다.

도 4a 및 도 4b는 qRT-PCR에 의한 miR-183 존재비의 측정을 보여준다. (도 4a) 조직은 미경험(AAV로 처리되지 않음) 또는 miR 표적을 포함하지 않은 벡터로 처리된 NHP 레서스 원숭이로부터 유래하였다. 전두엽 피질(피질), 심장, 비장, 소뇌, 간, 수질 및 척수(SC)에 대해 n=3. 대퇴사두근(Quad) 및 DRG-경추 분절에 대해 n=2. miR-183 발현 데이터는 피질과 비교하여 배수 변화로 표시된다. SD는 생물학적 복제물로부터 계산되었다. 일원 ANOVA에 이어서 Tukey의 다중 비교 테스트. $^{*}p<0.05$, 다른 조직과 비교하여 DRG에서 miR183 발현. (도 4b) 신경병성 통증의 병력이 없는 25세 남성 백인 장기 기증자로부터의 인간 SC 및 DRG에서 miR-183 발현. 데이터는 SC와 비교하여 배수 변화로 표시된다. SD는 qRT-PCR 웰의 3회 반복으로부터 계산하였다.

도 5a 내지 도 5d는 miR183 표적이 시험관내 및 마우스 DRG 뉴런에서 이식유전자 발현을 특이적으로 침묵시킴을 보여준다. (도 5a) miR183 또는 miR145 표적을 보유하는 GFP-발현 플라스미드, 및 대조군 또는 miR183-발현 플라스미드로 공동 형질감염된 293 세포의 GFP 웨스턴 블롯. 실험은 3회 반복으로 수행되었다. 데이터는 평균으로 표시되고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. (도 5b) IHC에 의한 DRG GFP 양성 뉴런은 4×10^{12} GC의 용량으로 AAV9.GFP 대조군 벡터 또는 AAV9.GFP-miR 벡터가 IV 주사된 C57BL6/J 마우스로부터의 절편에서 정량화되었다(그룹당 n=3 내지 4의 마우스). 3개의 DRG가 풍부한 miR: miR183, miR145 및 miR182가 스크리닝되었다. 데이터 포인트는 마우스당 총 DRG 뉴런에 대한 GFP-발현 뉴런의 평균 백분율을 나타낸다. 데이터는 평균으로 표시되고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. Wilcoxon 테스트, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. (도 5c) 패널 B에서 정량화된 DRG의 GFP 면역염색의 대표적인 사진. (도 5d) AAV-PHP.B.GFP 대조군 벡터 또는 AAV-PHP.B.GFP-miR(miR183, miR145, miR182)가 IV 주사된 C57BL6/J 마우스로부터의 소뇌, 피질 및 간의 대표적인 사진.

도 6a 내지 도 6c는 마우스로부터의 뇌 및 말초 기관에서의 GFP 발현을 보여준다. (도 6a) 1×10^{12} GC의 용량으

로 AAV-PHP.B.GFP 대조군 벡터 또는 AAV-PHP.B.GFP-miR 벡터가 IV 주사된 C57BL6/J 마우스로부터의 뇌 피질에서의 GFP 직접 형광(노출 시간 3초), 그룹당 n=4. 4개의 DRG가 풍부한 miR: miR183, miR182, miR96 및 miR145가 처음에 스크리닝되었다. (도 6b) 4×10^{12} GC의 용량으로 AAV9.GFP 대조군 벡터 또는 AAV9.GFP-miR 벡터가 IV 주사된 C57BL6/J 마우스로부터의 간(노출 시간 1초), 심장(노출 시간 3초) 및 근육(노출 시간 10초)에서의 GFP 직접 형광, 그룹당 n=3 내지 4. (도 6c) 모든 마우스(그룹당 n=3 내지 4)로부터의 GFP 직접 형광 강도의 정량화. 일원 ANOVA에 이어서 Tukey의 다중 비교 테스트. $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$.

도 7a 내지 도 7c는 miR183 표적이 NHP에 대한 AAVhu68.GFP ICM 투여 후 DRG에서 GFP 발현을 특이적으로 침묵시키고 독성을 감소시킴을 보여준다. (도 7a) 3.5×10^{13} GC의 AAVhu68.GFP 대조군 벡터(n=2) 또는 AAVhu68.GFP-miR183(n=4)이 ICM 주사된 성체 레서스 마카크로부터의 DRG, 척수 운동 뉴런, 소뇌, 피질, 심장 및 간의 GFP-면역 염색된 절편의 대표적인 사진. (도 7b) DRG(동물당 2개 내지 4개의 별개의 요추 DRG, 그룹당 n=2 내지 4의 동물), 척수(하부 운동 뉴런, 동물당 2 내지 5개의 별개의 절편, 그룹당 n=2 내지 4의 동물), NHP의 소뇌 및 피질(영역당 5개의 20× 배율 필드, 그룹당 n=2 내지 4의 동물)에서 GFP-양성 세포의 정량화. 데이터는 평균으로 표시되고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. Wilcoxon 테스트, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. (도 7c) 주사 후 2개월의 조직병리학은 배측 척수 축삭병증, 말초 신경 축삭병증(정중, 비골 및 요골 신경), DRG 신경 변성 및 단핵 세포 침윤의 중증도 등급을 보여준다. 1 초경도(10% 미만), 2 경도(10% 내지 25%), 3 중등도(25% 내지 50%), 4 위중(50% 내지 95%) 및 5 중증(95% 초과 - 관찰되지 않음). 각 막대는 한 동물을 나타낸다. 0은 병변이 없음을 나타낸다.

도 8a 내지 도 8d는 NHP에서 hIDUA에 대한 T 세포 및 항체 반응을 보여준다. (도 8a 내지 도 8c) 주사 90일 후 PBMC, 비장, 간 및 심부 경추 림프절로부터 단리된 림프구에서 인터페론 감마 ELISPOT 반응. 각 동물은 hIDUA 서열을 포괄하는 3개의 중첩 펩타이드 풀을 나타내는 3개의 값을 갖는다. 적색은 106개의 림프구당 55개 초과의 반점-형성 단위로 정의되는 양성 ELISPOT 반응 및 자극이 없을 때 중간 음성 대조군의 3배를 나타낸다. (도 8d) 항-hIDUA 항체 ELISA 검정, 혈청 희석 1:1,000.

도 9는 CSF에서 사이토카인/케모카인의 농도를 보여준다. 샘플은 벡터 투여 시점(D0) 및 벡터 투여 후 24시간(24h), 21일(D21) 및 35일(D35)에서 수집되었다. 다음 분석물을 포함하는 Milliplex MAP 키트로부터의 농도를 보여주는 히트 맵: sCD137, 에오탁신(Eotaxin), sFasL, FGF-2, 프랙탈카인(Fractalkine), 그랜자임 A, 그랜자임 B, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-16, IL-17A, IL- 17E/IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL-28A, IL-31, IL-33, IP-10, MIP-3α, 퍼포린(Perforin) 및 TNFβ.

도 10은 miR183 표적이 NHP에 대한 AAVhu68.hIDUA ICM 투여 후 DRG에서 hIDUA 발현을 특이적으로 침묵시킴을 보여준다. 항-hIDUA 항체 면역형광(DRG, 첫 번째 줄; 도 13a에 제공된 정량화 데이터), 항-hIDUA IHC(하부 운동 뉴런, 소뇌, 피질) 및 항-IDUA ISH(DRG, 마지막 줄; 도 13a에 제공된 정량화 데이터)에 의한 hIDUA 발현의 대표적인 사진. hIDUA ISH: 스테로이드가 있거나 없는 AAVhu68.hIDUA에 대한 노출 시간은 200ms이다. 감각 뉴런은 대규모 이식유전자 mRNA 발현을 보여준다. AAV.hIDUA-miR183에 대한 노출 시간은 1초이다. 감각 뉴런은 핵과 세포질에서 낮은 ISH 신호(mRNA)를 갖는다. mRNA는 이 더 높은 노출 시간에서 뉴런을 둘러싸고 있는 위성 세포에서 볼 수 있다.

도 11a 내지 도 11c는 miR183-매개성 침묵이 DRG 뉴런에 특이적이며, AAVhu68.hIDUA ICM-투여된 NHP에서 DRG 독성을 완전히 예방함을 보여준다. (도 11a) DRG(동물당 5개의 별개의 DRG, 그룹당 n=3의 동물), 척수(하부 운동 뉴런, 동물당 2개 내지 5개의 별개의 절편, 그룹당 n=3의 동물), NHP의 소뇌 및 피질(영역당 5개의 20× 배율 필드, 그룹당 n=3의 동물)에서 hIDUA-양성 세포의 정량화. 데이터는 평균으로 표시되고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. Wilcoxon 테스트, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$, $^{****}p<0.0001$. (도 11b) 주사 후 3개월 동안 채점되는 조직병리학: 0에서 5의 DRG 중증도 등급(모든 DRG의 점수를 보여주는 플롯 - 동물당 최소 3개의 경추, 3개의 흉추 및 3개의 요추); 0에서 5의 배측 축삭병증 등급(모든 별개의 절편의 점수를 보여주는 플롯 - 동물당 최소 3개의 경추, 3개의 흉추 및 3개의 요추); 및 정중 신경 점수 - 동물당 4개의 절편(오른쪽, 왼쪽 근위 및 원위 정중 신경)에 대해 확립된 축삭병증과 섬유증 중증도 등급의 합(0 내지 10). 중증도 등급은 다음과 같이 정의된다: 0 병변 없음, 1 초경도(10% 미만), 2 경도(10% 내지 25%), 3 중등도(25% 내지 50%), 4 위중(50% 내지 95%) 및 5 중증(95% 초과 - 관찰되지 않음). 데이터는 평균으로 표시되고; 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. Wilcoxon 테스트, $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, $^{***}p<0.001$. (도 11c) hIDUA 이식유전자-특이적 프로브를 사용하는 ISH, DRG 감각 뉴런 및 위성 세포의 고배율; 청색 DAPI 핵 대비염색으로 노출 시간 1초. 화살표: DRG 감각

뉴런; 화살촉: 위성 세포.

도 12는 NHP의 뇌, 척수 및 DRG에서의 벡터 체내 분포(biodistribution)를 보여준다. 벡터의 rBG 폴리아데닐화 서열을 표적으로 하는 Taqman 시약 및 프라이머/프로브를 사용하는 실시간 중합효소 연쇄반응에 의한 벡터 게놈 정량화. 결과는 이배체 게놈당 게놈 카피로 나타내었다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다(그룹당 n=3의 동물).

도 13a 내지 도 13f는 양성 대조군으로서 비장을 이용한 DRG의 세포자멸 마커인 활성화된 카스페이스-3에 대한 IHC를 보여준다. (도 13a 및 도 13b) 퇴화하는 신경 세포체(원) 및 주변 세포 침윤(화살촉)은 AAVhu68.eGFP 및 AAVhu68.hIDUA가 각각 주사된 동물에서 활성화된 카스페이스-3에 대해 양성이다. (도 13c) AAVhu68.eGFP.miR183이 주사된 동물은 퇴화하는 신경 세포체(원)에서 드문 양성 카스페이스-3 면역염색을 나타낸다; 삽도: AAVhu68.eGFP.miR183이 주사된 동물로부터의 대다수의 DRG 절편은 활성화된 카스페이스-3에 대해 음성이다. (도 13d) AAVhu68.hIDUA.miR183이 주사된 동물로부터의 뉴런도 또한 활성화된 카스페이스-3에 대해 음성이다. (도 13e) 정상적인 DRG를 갖는 미경험의 AVV가 주사되지 않은 대조군 NHP의 신경 세포체는 전체적으로 옅은 갈색이며, 배경 염색과 일치하는 음성으로 간주된다. (도 13f) 양성 대조군으로서 AAVhu68이 주사된 NHP로부터의 비장은 배중심의 세포 찌꺼기에서 활성화된 카스페이스-3에 대해 강력하게 양성인 다초점 신호를 나타내며, 적색 속질의 백혈구 내에서는 다초점 양성 신호를 나타낸다(화살표). 주변의 백색 속질 및 적색 속질은 배경 염색과 일치하는 전체적으로 옅은 갈색이다. 활성화된 카스페이스-3 IHC; 20×, 스케일 바 = 100㎛.

도 14a 내지 도 14e는 DRG에서 UPR-조절된 ATF6에 대한 IHC를 보여준다. (도 14a) AAVhu68.eGFP가 주사된 동물에서 퇴화하는 신경 세포체(원)는 ATF6에 대해 약간 양성이고; 대부분의 신경 세포체를 둘러싸고 있는 위성 세포(수직 화살표), 가장 두드러지게는 신경 세포체가 없는 클러스터(가로 화살표)는 강력하게 ATF6-양성이다. (도 14b) AAVhu68.hIDUA가 주사된 동물로부터의 퇴화하는 신경 세포체(원)는 퇴화하는 뉴런에서 ATF6에 대해 음성이고; 위성 세포는 세포질에서 강력하게 양성이다(가로 화살표). (도 14c) AAVhu68.eGFP.miR183이 주사된 동물에서 신경 세포체가 없는 클러스터(가로 화살표)의 위성 세포는 ATF6에 대해 양성이고; 퇴화하는 신경 세포체(원)는 음성이다. AAVhu68.eGFP.miR183이 주사된 동물로부터의 대부분의 DRG 절편은 ATF6에 대해 음성이다(삽도). (도 14d) AAVhu68.hIDUA.miR183이 주사된 동물로부터의 신경 세포체 및 위성 세포는 ATF6에 대해 음성이다. (도 14e) 정상적인 DRG를 갖는 미경험의 AVV가 주사되지 않은 대조군 NHP의 신경 세포체도 또한 ATF6에 대해 음성이다. ATF6 IHC; 20×, 스케일 바 = 100㎛.

도 15a 내지 도 15E는 DRG에서 외인성(extrinsic) 세포자멸 마커인 활성화된 카스페이스-8에 대한 IHC를 보여준다. AAVhu68.eGFP(도 15a), AAVhu68.hIDUA(도 15b) 및 AAVhu68.eGFP.miR183(도 15c)이 주사된 동물에서 퇴화하는 신경 세포체(원)는 카스페이스 8-음성이다. 주변 세포 침윤은 강력하게 양성이다(화살표). (도 15d) AAVhu68.hIDUA.miR183이 주사된 동물로부터의 뉴런은 카스페이스 8-음성이고, 카스페이스 8-양성 사이질 세포(interstitial cell)는 드물다(화살표). (도 15E) 정상적인 DRG를 갖는 미경험의 AVV가 주사되지 않은 대조군 NHP의 신경 세포체는 카스페이스 8-음성이며, 카스페이스 8-양성 사이질 세포는 드물다(화살표). 활성화된 카스페이스-8 IHC; 40×, 스케일 바 = 50㎛.

도 16a 내지 도 16f는 DRG의 내인성(intrinsic) 세포자멸 마커인 활성화된 카스페이스-9에 대한 IHC를 보여준다. (도 16a) AAVhu68.eGFP가 주사된 동물에서 퇴화하는 신경 세포체(원)는 카스페이스-9-양성이고, 세포 침윤에서 양성이 증가하였다(가로 화살표). (도 16b) AAVhu68.hIDUA가 주사된 동물에서 퇴화하는 신경 세포체는 카스페이스 9-음성이고, 세포 침윤에 카스페이스-9-양성 세포가 거의 없다(가로 화살표). (도 16c) AAVhu68.eGFP.miR183이 주사된 동물로부터의 뉴런은 양성 침윤 세포와 함께 음성이다(가로 화살표). (도 16d) AAVhu68.hIDUA.miR183이 주사된 동물로부터의 뉴런은 음성이고; 퇴화하는 신경 세포체는 관찰되지 않았다. (도 16e) 정상적인 DRG를 갖는 미경험의 AVV가 주사되지 않은 대조군 NHP의 신경 세포체는 드문 양성 사이질 세포와 함께 음성이다(가로 화살표). (도 16f) 양성 대조군인 AAVhu68이 주사된 NHP로부터의 비장은 배중심의 세포 찌꺼기 및 적색 속질의 백혈구에서 양성이다(수직 화살표). 활성화된 카스페이스-9 IHC; 40×, 스케일 바 = 50㎛.

도 17a 내지 도 17d는 hIDUA를 암호화하는 조작된 서열의 투여 후 IDUA 활성의 비교를 보여준다. 야생형 수컷 마우스에 hIDUA 서열(hIDUACoV1 - 서열번호 22; hIDUACoV2 - 서열번호 23; hIDUACoV3 - 서열번호 24; hIDUACoV4 - 서열번호 25; hIDUACoV5 - 서열번호 26) 또는 최적화되지 않은 천연 코딩 서열(hIDUAnat)의 전달을 위해 1×10^{11} GC의 AAVhu68을 IV 주사하였다. IDUA 활성은 제7일 및 제8일에 혈청에서(도 17a) 그리고 제7일에 뇌(도 17b), 심장(도 17c) 및 간(도 17d)에서 측정되었다.

도 18a 내지 도 18f는 miR183 표적 서열(4× 반복부)이 있거나 없는 AAVhu68.hIDUAcoV1을 마우스에 투여한 후

결과를 보여준다. (도 18a) MPS I 마우스(IDUA KO)에게 1×10^{11} GC를 ICV 주사하고, 주사 후 제30일 또는 제90일에 희생시켰다. 변형되지 않은 hIDUA(벡터 1)를 사용한 첫 번째 연구에서, 어린 마우스의 코호트(치료시 1 내지 2개월령)를 치료시 질환이 진행된 노령 마우스의 코호트(6 내지 8개월령)와 비교하였다. miR183 표적-변형 벡터를 사용한 두 번째 연구는 1 내지 3개월령의 어린 마우스만을 사용하였다. (도 18b 내지 도 18d) 뇌 및 척수에서 IDUA 활성을 비교하였다. 뇌 및 흉추-요추 척수의 한쪽 입쪽 두정 부분은 급속하게 동결시켰다. 조직 용해 및 정화 후, IDUA 효소 활성은 인공 기질 4-메틸움벨리페론(4-methylumbelliferone: 4-MU) 기반 형광 검정을 사용하여 측정되었다. 결과는 단백질의 ㎎에 대하여 정규화되었다. (도 18e 및 도 18f) 조직은 치료적 효능의 마커로서 LAMP1 면역형광을 사용하여 보관 감소를 평가하기 위해 처리되었다.

도 19a 및 도 19b는 NHP(AAV-IDUA 대 AAV- IDUA-4XmiR183)에서 miR183 클러스터-조절된 유전자 발현의 분석을 포함하는 스펀지 효과 연구로부터의 결과를 보여준다. 도 19a는 후근 신경절(DRG)에서의 miR183 클러스터 조절된 유전자 mRNA 정량화를 제공한다. 도 19b는 피질에서의 결과를 제공한다. DRG(높은 miR183 존재비) 또는 전두엽 피질(낮은 miR183 존재비)에서 AAV-IDUA 및 AAV-IDUA-miR183 동물로부터의 결과와 비교하여 miR183 클러스터-조절된 유전자(CACNA2D1 또는 CACNA2D2)의 발현 증가는 없었다.

도 20은 낮은(5×10^{5}) 또는 높은(2.5×10^{8}) 농도에서 miR183 표적 서열의 4개의 카피가 있거나 없는 eGFP 이식유전자를 운반하는 다양한 벡터의 AAV9 형질도입의 결과를 보여준다. miR183이 없는 저용량 및 고용량이 100(저용량 AAV9-eGFP의 경우) 또는 10(고용량 AAV9-eGFP)의 감염 다중도(multiplicity of infection: MOI)로 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 헬퍼 공동 형질감염 유무에 관계없이 테스트되었다. 모든 DRG 뉴런은 형질도입되었고, 독성의 가시적인 징후는 관찰되지 않았다. DRG 뉴런에서 GFP 발현이 관찰되지 않은 반면, 섬유아세포 유사 세포에서는 일부 발현이 관찰되었다. 결과는 4xmiR183 표적 발현 카세트를 이용한 GFP 전사의 억제를 확인시켜 준다.

도 21은 래트 DRG 세포에서의 스펀지 효과 연구의 결과를 보여준다. 데이터는 세포가 AAV9-eGFP-mir183으로 형질도입될 때 래트 DRG 세포에서의 miR183 수준이 감소함을 보여준다. AAF9-eGFP-miR183은 GFP-miR183 mRNA에 대한 표적 결합을 보여준다.

도 22a 내지 도 22c는 3개의 공지된 miR183-조절된 전사체에서 평가된 래트 DRG 세포에서의 miR183 스펀지 효과 연구의 효과를 보여준다. 도 22a는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV-GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서의 CACANA2D1 상대 발현의 결과를 보여준다. 도 22b는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV-GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서의 CACANA2D2 상대 발현의 결과를 보여준다. 도 22c는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV-GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서의 ATF3 발현의 결과를 보여준다. 이들 3개의 miR183 조절된 전사체의 mRNA 수준의 상대 발현의 변화는 관찰되지 않았다.

도 23은 신경해부학 및 현미경 소견을 보여준다. DRG의 신경 세포체(A)는 척수의 상행성(감각) 배측 백질 신경로(C) 및 말초 신경계(D)로 축삭을 중심으로 돌출한다. (A1-D1) DRG 병리와 관련된 현미경 병변의 신경해부학적 관계. DRG에서 신경 세포체 변성(원, A1)은 신경근에서 중심 및 말초로 확장되는 축삭주위 섬유증(가로 화살표, B1)이 있거나 없는 축삭 변성(수직 화살표, B1)을 초래한다. DRG 신경근의 축삭 변성은 척수의 상행성 배측 백질 신경로(수직 화살표, C1) 및 축삭주위 섬유증(가로 화살표, D1)이 있거나 없는 말초 신경(수직 화살표, D1)으로 중심으로 확장된다. (A2 내지 D2) 정상적인 DRG, DRG 신경근, 척수의 배측 백질 및 말초 신경. (헤마톡실린 및 에오신; 20×, 스케일 바 = 100㎛). (E 내지 H) 다양한 DRG 병리 단계의 고배율 이미지. (E) 퇴행 과정의 초기에, 신경 세포체는 미세아교 세포 및 침윤 단핵 세포(신경세포 포식증)와 함께 증식하는 위성 세포만 있는 비교적 정상(원)으로 나타난다. (F) 병변이 진행됨에 따라, 신경 세포체는 핵의 쇠퇴 또는 소실 및 세포질 과호산구증가증을 나타내는 작고, 불규칙하거나 또는 각진 모양의 세포를 특징으로 하는 변성의 증거(수직 화살표)를 나타낸다. (G) 신경 세포체 변성(원)은 위성 세포, 미세아교 세포 및 단핵 세포에 의해 완전히 소멸(별)될 수 있다; 이는 말기 변성으로 간주된다. (H) 정상적인 DRG. (헤마톡실린 및 에오신; 40×, 스케일 바 = 50㎛).

도 24a 내지 도 24d는 DRG 병리의 중증도에 대한 연구 특성의 효과를 보여준다. 상이한(도 24a) 투여 경로, (도 24b) 벡터 용량, (도 24c) 조직 수집을 위한 주사 후 시간을 이용한 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색), 및 (도 24d) GLP 지침을 준수한 연구 수행에서의 평균 병리학 점수. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. 그룹 간 비교는 각 DRG 및 척수 영역(즉, 경추, 흉추, 요추) 내에서 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 수행되었으며, 조합된 p-값은 0.05 수준에서 평가된 통계적 유의성과 함께 Fisher의 방법을 사용하여 전체 DRG 또는 척수 그룹간 비교에 대해 계산되었다. *는 그룹간 비교에 대한 유의성을 나타내고, #는 비히클 대조군 그룹과의 비교에 대한 유의성(도 24a)

또는 180+일 시점과의 비교에 대한 유의성(도 23c)을 나타낸다. *, # p<0.05; **, ## p<0.01; ***, ### p<0.001; ****, #### p<0.0001. 통계 기호에 대한 색상 코드: DRG의 경우 검정색, SC의 경우 회색.

도 25a 및 도 25b는 DRG 병리의 중증도에 대한 동물 특성의 효과를 보여준다. 주사시 동물의 상이한 연령(도 25a) 및 동물(레서스 마카크만)의 성별(도 25b)에 대한 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색)에서의 평균 병리학 점수. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. 그룹 간 비교는 각 DRG 및 척수 영역(즉, 경추, 흉추, 요추) 내에서 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 수행되었으며, 조합된 p-값은 0.05 수준에서 평가된 통계적 유의성과 함께 Fisher의 방법을 사용하여 전체 DRG 또는 척수 그룹간 비교에 대해 계산되었다. *는 그룹간 비교에 대한 유의성을 나타내고, #는 영아 연령 그룹과의 비교를 위한 유의성을 나타낸다(도 25a). *, # p<0.05; **, ## p<0.01; ***, ### p<0.001; ****, #### p<0.0001. 통계 기호에 대한 색상 코드: DRG의 경우 검정색, SC의 경우 회색.

도 26a 내지 도 26d는 DRG 병리의 중증도에 대한 벡터 특성의 효과를 보여준다. 상이한(도 26a) 캡시드, (도 26b) 프로모터 및 (도 26c) 이식유전자를 갖는 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색), 및 분비된 대 분비되지 않은 이식유전자(도 26d)에서의 평균 병리학 점수. 이식유전자는 SC 병리의 중증도에 기초하여 1에서 20까지 배열되었다. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. (도 26a, 도 26b 및 도 26d). 그룹 간 비교는 각 DRG 및 척수 영역(즉, 경추, 흉추, 요추) 내에서 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 수행되었으며, 조합된 p-값은 0.05 수준에서 평가된 통계적 유의성과 함께 Fisher의 방법을 사용하여 전체 DRG 또는 척수 그룹간 비교에 대해 계산되었다. *는 그룹간 비교에 대한 유의성을 나타낸다: *p<0.05; **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. 통계 기호에 대한 색상 코드: DRG의 경우 검정색, SC의 경우 회색. C = 경추, T = 흉추, L = 요추 영역.

도 27은 중증도 등급의 분포와 함께 영역의 병리학 점수를 보여준다. 평균의 표준 오차(적색 점 및 막대) 및 영역별 중증도 등급의 분포(누적 열)가 있는 병리학 점수의 평균 백분율 비율. 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. 평균 간의 비교는 TRG와 DRG의 사이 및 DRG와 SC 각각의 영역(즉, 경추, 흉추 및 요추) 사이의 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 수행되었다. 통계적 유의성은 0.05 수준에서 평가되었다. *는 DRG 비교에 대한 삼차 신경절(TRG)에 대한 유의성을 나타내고; #는 SC 영역 비교에 대한 DRG의 유의성을 나타낸다. **p<0.01; #### p<0.0001.

도 28a 및 도 28b는 말초 신경 병리를 보여준다. 평균의 표준 오차(적색 점 및 막대) 및 말초 신경별 중증도 등급의 분포(누적 열)가 있는 병리학 점수의 평균 백분율 비율. 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. 대부분의 연구에서 일부 말초 신경이 수집되지 않았기 때문에 통계적 분석은 수행되지 않았다.

도 29a 내지 도 29d는 척추 영역에 의해 분할된 DRG 병리의 중증도에 대한 연구 특성의 효과를 보여준다. 상이한 (도 29a) 투여 경로, (도 29b) 벡터 용량, (도 29c) 조직 수집을 위한 조사 후 시간을 이용한 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색) 영역 및 (도 29d) GLP 지침을 준수한 연구 수행에서의 평균 병리학 점수. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. C = 경추, T = 흉추, L = 요추 영역.

도 30a 및 도 30b는 척추 영역에 의해 분할된 DRG 병리의 중증도에 대한 동물 특성의 효과를 보여준다. 상이한 (도 30a) 주사시 동물의 연령, 및 (도 30b) 동물의 성별(레서스 마카크만)에 대한 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색) 영역에서의 평균 병리학 점수. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. C = 경추, T = 흉추, L = 요추 영역.

도 31a 내지 도 31c는 척추 영역에 의해 분할된 DRG 병리의 중증도에 대한 벡터 특성의 효과를 보여준다. 상이한 (도 31a) 캡시드, (도 31b) 프로모터 및 (도 31c) 이식유전자에 대한 DRG(검정색) 및 배측 척수(SC) 축삭(회색) 영역에서의 평균 병리학 점수. 이식유전자는 SC 병리의 중증도에 기초하여 1에서 20으로 배열된다. 평균의 표준 오차가 있는 평균 결과; 표는 각 그룹에서 동물의 수(n) 및 점수를 매긴 조직학적 절편의 수(개수)를 나타낸다. C = 경추, T = 흉추, L = 요추 영역.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 인간 대상체에게 인간 알파-L-아이두로니데이스(hIDUA) 유전자를 전달하기 위한 발현 카세트 및 복제 결핍 아데노-관련 바이러스("AAV")가 본 명세서에 제공된다. hIDUA 유전자("rAAV.hIDUA")를 전달하기 위해 사용되는 재조합 AAV("rAAV") 벡터는 CNS(예를 들어, AAVhu68 캡시드를 보유하는 rAAV)에 대해 지향성을 가지며, hIDUA 이식유전자는 특정 발현 제어 요소(예를 들어, CB7, 사이토메갈로바이러스 인핸서 요소가 있는 닭 β-액틴 프로모터)에 의해 제어된다. 소정의 실시형태에서, 척수강내, 수조내 및 전신 투여에 적합한 약제학적 조성물이 제공되며, 이는 생리학적으로 적합한 수성 완충액, 계면활성제 및/또는 선택적 부형제를 포함하는 제형 완충액 중 발현 카세트 또는 rAAV.hIDUA 벡터의 현탁액을 포함한다.

[0015] 소정의 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물 및 방법은 벡터 게놈 또는 발현 카세트에의 miRNA 표적 서열의 포함을 통해 이식유전자 발현이 DRG 뉴런에서 억제되는 기능적 hIDUA의 전달을 위한 요법에 유용하다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "억제된" 및 "억제"는 이식유전자 발현의 부분적 감소 또는 완전한 소멸 또는 침묵을 포함한다. 이식유전자 발현은 선택된 이식유전자에 적합한 검정을 사용하여 평가될 수 있다. 제공된 조성물 및 방법은 신경 변성, 2차 배측 척수 축삭 변성 및/또는 단핵 세포 침윤을 특징으로 하는 DRG의 독성을 감소시킨다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트 또는 벡터 게놈은 유전자 산물 코딩 서열에 대한 비번역 영역(UTR) 3'에 하나 이상의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 적합하게는, 2개 이상의 miRNA 표적 서열이 선택적으로 스페이서 서열에 의해 분리되어 탠덤으로 제공된다. 소정의 실시형태에서, 3개 이상의 miRNA 표적 서열이 선택적으로 스페이서 서열에 의해 분리되어 탠덤으로 제공된다. 소정의 실시형태에서, 8개의 miRNA 서열이 선택적으로 스페이서 서열에 의해 분리되어 탠덤으로 제공된다.

[0016] 본 명세서에서 사용되는 "치료학적 유효량"은 MPSI 및/또는 헐러 및/또는 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군의 증상 중 하나 이상을 개선 또는 치료하는데 충분한 양의 효소를 표적 세포에 전달하고 발현시키는 조성물(예를 들어, rAAV.hIDUA 조성물)의 양을 지칭한다. "치료"는 MPSI 증후군 중 하나의 증상의 악화를 예방하고, 이의 증상 중 하나 이상을 가능한 역전시키는 것을 포함할 수 있다. 치료적 효과(효능)을 평가하는 방법은 아래에 자세히 설명되어 있다. 인간 환자에 대한 "치료학적 유효량"은 동물 모델을 기반으로 예측될 수 있다. 적합한 고양이 모델 및 적합한 개 모델의 예는 이전에 설명되었다. 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[C. Hinderer et al, Molecular Therapy (2014); 22 12, 2018-2027; A. Bradbury, et al, Human Gene Therapy Clinical Development. March 2015, 26(1): 27-37] 참조. 개 모델과 관련하여, 모델은 전형적으로 면역 억제 동물 모델 또는 내성이 있는 동물이며, 개에서 정맥내 투여는 인간 IDUA에 대한 강력하고 지속적인 항체 반응을 유도하는 것으로 관찰된 반면, 인간 환자에서 투여는 내약성이 좋다. 이들 모델에서, 소정의 증상의 역전이 관찰될 수 있고/있거나 소정의 증상의 진행의 예방이 관찰될 수 있다. 예를 들어, 각막 혼탁의 교정이 관찰될 수 있고/있거나 중추 신경계(CNS)에서의 병변의 교정이 관찰될 수 있고/있거나 혈관주위 및/또는 뇌막 가스 축적의 역전이 관찰된다.

[0017] 치료의 목표는 질환을 치료하기 위한 실행 가능한 접근법으로서 rAAV-기반 CNS-유도 유전자 요법을 통해 환자의 결함성 알파-L-아이두로니데이스를 기능적으로 대체하는 것이다. 본 명세서에 기재된 rAAV 벡터로부터 발현되는 바와 같이, CSF, 혈청, 뉴런 또는 기타 조직 또는 체액에서 검출되는 정상적인 수준의 적어도 약 2%의 발현 수준이 치료적 효과를 제공할 수 있다. 그러나, 더 높은 발현 수준이 달성될 수 있다. 이러한 발현 수준은 정상적인 기능적 인간 IDUA 수준의 2% 내지 약 100%일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 정상적인 발현 수준보다 높은 발현 수준이 CSF, 혈청 또는 기타 조직 또는 체액에서 검출될 수 있다.

[0018] 본 명세서에서 사용되는 용어 "NAb 역가"는 표적화된 에피토프(예를 들어, AAV)의 생리학적 효과를 중화시키는 중화 항체(예를 들어, 항-AAV Nab)가 생성되는 정도의 척도이다. 항-AAV NAb 역가는, 예를 들어, 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[Calcedo, R., et al., Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390]에 기술된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0019] "포함하는"은 다른 구성 요소 또는 방법 단계를 포함하는 것을 의미하는 용어이다. "포함하는"이 사용되는 경우, 관련 실시형태는 다른 구성 요소 또는 방법 단계를 배제하는 "~로 구성되는"이라는 용어 및 실시형태 또는 발명의 특성을 실질적으로 변경하는 임의의 구성 요소 또는 방법 단계를 배제하는 "~로 본질적으로 구성되는"이라는 용어를 사용하는 설명을 포함한다는 것을 이해하여야 한다. 명세서의 다양한 실시형태가 "포함하는"이라는 언어를 사용하여 제시되지만, 다양한 상황하에서 관련 실시형태는 또한 "~로 구성되는" 또는 "~로 본질적으로 구성되는"이라는 언어를 사용하여 설명된다는 것을 이해하여야 한다.

[0020] 용어의 단수형은 하나 이상을 지칭하며, 예를 들어, "벡터"는 하나 이상의 벡터(들)를 나타내는 것으로 이해된

다는 점에 유의하여야 한다. 이와 같이, 용어의 단수형, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한 주어진 참조로부터 10% 안팎의 변동성을 의미한다.

[0022] **인간 알파-L-아이두로니데이스(hIDUA)**

[0023] 본 명세서에서 사용되는 용어 "인간 알파-L-아이두로니데이스" 및 "hIDUA"는 인간 알파-L-아이두로니데이스 효소를 지칭하기 위해 상호교환적으로 사용된다. 그리스 문자 "알파" 및 기호 "α"는 본 명세서 전반에 걸쳐 상호교환적으로 사용되는 것으로 이해될 것이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, hIDUA는 천연(야생형) hIDUA 단백질, 및 또한 본 명세서에 제공되는 바와 같은 조성물로 또는 방법에 의해 전달될 때 목적하는 기능을 회복하고, 증상을 완화시키고, MPSI, 헐러 및/또는 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군 중 하나 이상과 관련된 증상을 개선시키는 본 명세서에 제공된 핵산 서열로부터 발현된 변이체 hIDUA 단백질 또는 이의 기능적 단편을 지칭한다.

[0024] "인간 알파-L-아이두로니데이스" 또는 "hIDUA"는, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 전장 단백질(신호 펩타이드 및 성숙 단백질을 포함), 성숙 단백질, 변이체 단백질, 또는 이들의 기능적 단편일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 용어 "기능적 hIDUA"는 전장 천연(야생형) 단백질의 아미노산 서열(서열번호 21 및 UniProtKB 등록번호: P35475-1로 나타냄)을 갖는 효소, 천연(야생형) hIDUA의 생물학적 활성 수준의 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 또는 약 100% 또는 100% 초과를 제공하는 이의 변이체(본 명세서에 기재된 것을 포함), 보존적 아미노산 치환을 갖는 이의 돌연변이체, 이의 단편, 보존적 아미노산 치환을 갖는 변이체 및 돌연변이체의 임의의 조합의 전장 또는 단편을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 기능적 hIDUA는 천연 hIDUA의 기질 결합 영역(305번 및 306번 아미노산)을 포함한다. hIDUA의 여러 자연 발생적 기능적 다형성(변이체)이 기술되어 있으며, 본 발명의 범위 내에 포함될 수 있다. 이러한 변이체는 기술되어 있으며; 예를 들어, 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 WO 2014/151341뿐만 아니라, 예를 들어, 참조에 의해 원용되어 있는 UniProtKB/Swiss-Prot; uniprot.org/uniprot/P35475를 참조한다.

[0025] 인간 알파-L-아이두로니데이스-(서열번호 21)(신호 펩타이드 - 1번 내지 27번 아미노산)

```
         10         20         30         40         50
MRPLRPRAAL LALLASLLAA PPVAPAEAPH LVHVDAARAL WPLRRFWRST
         60         70         80         90        100
GFCPPLPHSQ ADQYVLSWDQ QLNLAYVGAV PHRGIKQVRT HWLLELVTTR
        110        120        130        140        150
GSTGRGLSYN FTHLDGYLDL LRENQLLPGF ELMGSASGHF TDFEDKQQVF
        160        170        180        190        200
EWKDLVSSLA RRYIGRYGLA HVSKWNFETW NEPDHHDFDN VSMTMQGFLN
        210        220        230        240        250
YYDACSEGLR AASPALRLGG PGDSFHTPPR SPLSWGLLRH CHDGTNFFTG
        260        270        280        290        300
EAGVRLDYIS LHRKGARSSI SILEQEKVVA QQIRQLFPKF ADTPIYNDEA
        310        320        330        340        350
DPLVGWSLPQ PWRADVTYAA MVVKVIAQHQ NLLLANTTSA FPYALLSNDN
        360        370        380        390        400
AFLSYHPHPF AQRTLTARFQ VNNTRPPHVQ LLRKPVLTAM GLLALLDEEQ
        410        420        430        440        450
LWAEVSQAGT VLDSNHTVGV LASAHRPQGP ADAWRAAVLI YASDDTRAHP
        460        470        480        490        500
NRSVAVTLRL RGVPPGPGLV YVTRYLDNGL CSPDGEWRRL GRPVFPTAEQ
        510        520        530        540        550
FRRMRAAEDP VAAAPRPLPA GGRLTLRPAL RLPSLLLVHV CARPEKPPGQ
        560        570        580        590        600
VTRLRALPLT QGQLVLVWSD EHVGSKCLWT YEIQFSQDGK AYTPVSRKPS
        610        620        630        640        650
TFNLFVFSPD TGAVSGSYRV RALDYWARPG PFSDPVPYLE VPVPRGPPSP

GNP
```

[0026]

[0027] 천연 인간 IDUA 코딩 서열(서열번호 20)(NCBI 참조 서열: NM_000203.5); (신호 펩타이드 - 1번 내지 81번 뉴클

레오타이드)

atgcgtcccctgcgccccgcgccgcgctgctggcgctcctggcctcgctcctggccgcgcccccggtggccccggccgag
gccccgcacctggtgcatgtggacgcggcccgcgcgctgtggcccctgcggcgcttctggaggagcacaggcttctgcccc
ccgctgccacacagccaggctgaccagtacgtcctcagctgggaccagcagctcaacctcgcctatgtgggcgccgtccctc
accgcggcatcaagcaggtccggacccactggctgctggagcttgtcaccaccaggggtccactggacggggcctgagct
acaacttcacccacctggacgggtacctggaccttctcagggagaaccagctcctcccagggtttgagctgatgggcagcgcc
tcgggccacttcactgactttgaggacaagcagcaggtgtttgagtggaaggacttggtctccagcctggccaggagatacatc
ggtaggtacggactggcgcatgtttccaagtggaacttcgagacgtggaatgagccagaccaccacgactttgacaacgtctcc
atgaccatgcaaggcttcctgaactactacgatgcctgctcggagggtctgcgcgccgccagccccgccctgcggctgggag
gccccggcgactccttccacaccccaccgcgatccccgctgagctggggcctcctgcgccactgccacgacggtaccaactt
cttcactggggaggcgggcgtgcggctggactacatctccctccacaggaagggtgcgcgcagctccatctccatcctggag
caggagaaggtcgtcgcgcagcagatccggcagctcttccccaagttcgcggacacccccatttacaacgacgaggcggac
ccgctggtgggctggtccctgccacagccgtggagggcggacgtgacctacgcggccatggtggtgaaggtcatcgcgcag
catcagaacctgctactggccaacaccacctccgccttcccctacgcgctcctgagcaacgacaatgccttcctgagctaccac
ccgcacccccttcgcgcagcgcacgctcaccgcgcgcttccaggtcaacaacacccgcccgccgcacgtgcagctgttgcgc
aagccggtgctcacggccatggggctgctggcgctgctggatgaggagcagctctgggccgaagtgtcgcaggccgggac
cgtcctggacagcaaccacacggtgggcgtcctggccagcgcccaccgcccccagggcccggccgacgcctggcgcgcc
gcggtgctgatctacgcgagcgacgacacccgcgcccacccccaaccgcagcgtcgcggtgaccctgcggctgcgcggggt
gccccccggcccgggcctggtctacgtcacgcgctacctggacaacgggctctgcagccccgacggcgagtggcggcgcc
tgggccggcccgtcttccccacggcagagcagttccggcgcatgcgcgcggctgaggacccggtggccgcggcgccccgc
cccttacccgccggcggccgcctgaccctgcgccccgcgctgcggctgccgtcgcttttgctggtgcacgtgtgtgcgcgccc
cgagaagccgcccgggcaggtcacgcggctccgcgccctgccccctgacccaagggcagctggttctggtctggtcggatga
acacgtgggctccaagtgcctgtggacatacgagatccagttctctcaggacggtaaggcgtacaccccggtcagcaggaag
ccatcgaccttcaacctctttgtgttcagcccagacacaggtgctgtctctggctcctaccgagttcgagccctggactactgggc
ccgaccaggcccccttctcggaccctgtgccgtacctggaggtccctgtgccaagagggcccccatccccgggcaatccatga

[0028]

[0029] 서열번호 20의 전장 천연 hIDUA의 넘버링을 참조하면, 1번 내지 27번 아미노산 위치에 신호 펩타이드가 있고, 성숙 단백질은 28번 내지 653번 아미노산을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 "신호 펩타이드"는 새롭게 합성된 단백질의 N-말단에 존재하는 짧은 펩타이드(일반적으로 약 16번 내지 35번 아미노산)를 지칭한다. 신호 펩타이드, 및 일부 경우에 이러한 펩타이드를 암호화하는 핵산 서열은 또한 신호 서열, 표적화 신호, 국부화 신호, 국부화 서열, 수송 펩타이드, 리더 서열 또는 리더 펩타이드로 지칭될 수 있다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 성숙 단백질(신호 펩타이드 서열이 결여됨)이다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, hIDUA는 천연 신호 펩타이드(즉, 서열번호 21의 1번 내지 27번 아미노산) 또는 대안적으로 이종 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, hIDUA는 이종 신호 펩타이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 이러한 이종 신호 펩타이드는 바람직하게는 인간 기원이며, 예를 들어, IL-2 신호 펩타이드를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 이용할 수 있는 특정 이종 신호 펩타이드는 키모트립시노겐 B2로부터의 1번 내지 20번 아미노산, 인간 알파-1-안티트립신의 신호 펩타이드, 아이두로네이트-2-설파테이스로부터의 1번 내지 25번 아미노산 및 프로테이스 CI 저해제롤부터의 1번 내지 23번 아미노산을 포함한다. 예를 들어, WO2018046774를 참조. 다른 신호/리더 펩타이드는 면역글로불린(예를 들어, IgG), 사이토카인(예를 들어, IL-2, IL12, IL18 등), 인슐린, 알부민, β-글루쿠로니데이스, 온코스타틴, 알칼리 프로테이스 또는 피브로넥틴 분비 신호 펩타이드 등에서 천연적으로 발견될 수 있다. 또한, 예를 들어, signalpeptide.de/index.php?m=listspdb_mammalia 참조. 이러한 키메라 hIDUA는 천연 신호 펩타이드 대신에 이종 리더를 가질 수 있다. 선택적으로, hIDUA 효소의 N-말단 절단은 신호 펩타이드의 일부만(예를 들어, 약 2번 내지 약 25번 아미노산 또는 그 사이 값의 결실), 전체 신호 펩타이드 또는 신호 펩타이드(예를 들어, 서열번호 21의 넘버링에 기초하여 70번 아미노산까지)보다 긴 단편이 결여될 수 있다. 선택적으로, 이러한 효소는 약 5개, 10개, 15개 또는 20개의 아미노산 길이의 C-말단 절단을 포함할 수 있다.

[0030] 소정의 실시형태에서, 서열번호 21의 전장(1번 내지 653번 아미노산)과 적어도 95% 동일한, 적어도 97% 동일한

또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는 hIDUA가 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 서열번호 21의 성숙 단백질(28번 내지 653번 아미노산)과 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열이 제공된다. 소정의 실시형태에서, 전장(1번 내지 653번 아미노산) 또는 성숙 단백질(32번 내지 653번 아미노산)의 hIDUA에 대해 적어도 95% 내지 적어도 99%의 동일성을 갖는 서열은 적절한 동물 모델에서 테스트될 때 참조(즉, 천연) hIDUA보다 개선된 생물학적 효과 및 더 나은 안전성 프로파일을 갖는 것을 특징으로 한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 효소는 hIDUA 아미노산 서열의 지정된 위치에 변형을 포함한다.

[0031] 본 명세서에서 사용되는 "보존적 아미노산 대체" 또는 "보존적 아미노산 치환"은 당업계의 의사들이 알고 있는 유사한 생화학적 특성(예를 들어, 전하, 소수성 및 크기)을 갖는 다른 아미노산으로의 아미노산의 변경, 대체 또는 치환을 지칭한다. 또한, 예를 들어, 각각 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[FRENCH et al. What is a conservative substitution? Journal of Molecular Evolution, March 1983, Volume 19, Issue 2, pp 171-175 및 YAMPOLSKY et al. The Exchangeability of Amino Acids in Proteins, Genetics. 2005 Aug; 170(4): 1459-1472] 참조한다.

[0032] 일 양태에서, 본 명세서에서는 기능적 hIDUA 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및, 예를 들어, 이를 포함하는 발현 카세트 및 벡터를 제공한다. 일 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 20에서 복제된 야생형 코딩 서열이다. 추가의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 20의 야생형 hIDUA 서열과 적어도 약 60%, 적어도 약 65%, 적어도 약 70%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80% 동일하며, 기능적 hIDUA를 암호화한다.

[0033] 본 명세서에서 사용되는 "핵산"은 뉴클레오타이드 중합체 형태를 지칭하며, RNA, mRNA, cDNA, 게놈 DNA, 펩타이드 핵산(PNA) 및 위의 합성 형태 및 혼합된 중합체를 포함한다. 뉴클레오타이드는 리보뉴클레오타이드, 데옥시뉴클레오타이드 또는 두 유형의 뉴클레오타이드의 변형된 형태(예를 들어, 펩타이드 핵산 올리고머)를 지칭한다. 용어는 또한 DNA의 단일-가닥 및 이중-가닥 형태를 포함한다. 당업자는 이들 핵산 분자의 기능적 변이체가 본 명세서에 기재되어 있음을 이해할 것이다. 기능적 변이체는 표준 유전자 코드를 사용하여 직접 번역되어 모 핵산 분자로부터 번역된 것과 동일한 아미노산 서열을 제공할 있는 핵산 서열이다.

[0034] 소정의 실시형태에서, 기능적 hIDUA를 암호화하는 핵산 분자 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 기타 작제물은 발현 카세트 및 벡터 게놈을 생성하는데 유용하며, 효모 세포, 곤충 세포 또는 포유동물 세포, 예컨대, 인간 세포에서의 발현을 위해 조작될 수 있다. 방법은 공지되어 있으며, 이전에 기술되어 있다(예를 들어, WO 96/09378). 야생형 서열과 비교하여 적어도 하나의 바람직하지 않은 코돈이 보다 바람직한 코돈으로 대체되는 경우, 서열은 조작된 것으로 간주된다. 본 명세서에서, 바람직하지 않은 코돈은 동일한 아미노산을 코딩하는 또 다른 코돈보다 유기체에서 덜 자주 사용되는 코돈이고, 보다 바람직한 코돈은 바람직하지 않은 코돈보다 유기체에서 더 자주 사용되는 코돈이다. 특정 유기체에 대한 코돈 사용의 빈도는 www.kazusa.jp/codon에 있는 것과 같은 코돈 빈도 표에서 찾을 수 있다. 바람직하게는 하나 초과의 바람직하지 않은 코돈, 바람직하게는 대부분의 또는 모든 바람직하지 않은 코돈이 보다 바람직한 코돈으로 대체된다. 바람직하게는 유기체에서 가장 빈번하게 사용되는 코돈은 조작된 서열에 사용된다. 바람직한 코돈에 대한 대체는 일반적으로 더 높은 발현을 유도한다. 또한, 다수의 상이한 핵산 분자가 유전자 코드의 축퇴성의 결과로서 동일한 폴리펩타이드를 암호화할 수 있다는 것을 당업자는 이해할 것이다. 또한, 당업자는 일상적인 기법을 사용하여 핵산 분자에 의해 암호화된 아미노산 서열에 영향을 미치지 않는 뉴클레오타이드 치환을 만들어 폴리펩타이드가 발현될 임의의 특정 숙주 유기체의 코돈 사용을 반영할 수 있음을 이해한다. 따라서, 달리 명시되지 않는 한, "아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열"은 서로의 축퇴 버전이며 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 모든 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 핵산 서열은 일상적인 분자 생물학 기법을 사용하여 클로닝되거나 또는 DNA 합성에 의해 데노보(de novo)로 생성될 수 있으며, 이는 DNA 합성 및/또는 분자 클로닝 분야의 사업을 하는 서비스 회사(예를 들어, GeneArt, GenScript, 라이프 테크놀로지스(Life Technologies), 유로핀즈(Eurofins))에 의해 일상적인 절차를 사용하여 수행될 수 있다.

[0035] 소정의 실시형태에서, 핵산, 발현 카세트, 본 명세서에 기재된 벡터 게놈은 조작된 서열인 hIDUA 코딩 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 조작된 서열은 대상체에서의 생산, 전사, 발현 또는 안전성을 개선하는데 유용하다. 소정의 실시형태에서, 조작된 서열은 생성된 치료 조성물 또는 치료의 효능을 증가시키는데 유용하다. 추가의 실시형태에서, 조작된 서열은 발현될 기능적 hIDUA 단백질의 효능을 증가시키는데 유용하며, 또한 기능적 hIDUA를 전달하는 치료 시약의 더 낮은 용량을 허용할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조작된 hIUDA 코딩 서열은 야생형 hIDUA 코딩 서열과 비교하여 개선된 번역을 특징으로 한다.

[0036] "조작된"은 본 명세서에 기재된 기능적 hIDUA 효소를 암호화하는 핵산 서열이 조립되어, 예를 들어, 비-바이러

스 전달 시스템(예를 들어, RNA-기반 시스템, 네이키드 DNA 등)을 생성하거나, 또는 패키징 숙주 세포에서 바이러스 벡터를 생성하기 위해, 그리고/또는 대상체의 숙주 세포에 전달하기 위해, 숙주 세포에 운반된 hIDUA 서열을 전달하는 임의의 적합한 유전적 요소, 예를 들어, 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜 등에 배치되는 것을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 유전적 요소는 벡터이다. 일 실시형태에서, 유전적 요소는 플라스미드이다. 이러한 조작된 작제물을 제조하는데 사용되는 방법은 핵산 조작의 당업자에게 공지되어 있으며, 유전 공학, 재조합 공학 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)] 참조.

[0037] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "동일성 백분율(%)", "서열 동일성", "서열 동일성 백분율" 또는 "동일성 백분율"은 관련성을 위해 정렬될 때 동일한 2개의 서열 내의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 작제물의 전장, 유전자 코딩 서열의 전장 또는 적어도 약 500개 내지 1000개의 뉴클레오타이드의 단편에 걸쳐 있을 수 있다. 그러나, 예를 들어, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 일반적으로 적어도 약 20개 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28개 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 이상의 뉴클레오타이드의 더 작은 단편 간의 동일성이 또한 요구될 수 있다.

[0038] 동일성 백분율은 단백질, 폴리펩타이드, 약 100개의 아미노산, 약 300개의 아미노산 또는 이의 펩타이드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 서열의 전장에 걸친 아미노산 서열에 대해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 적어도 약 8개의 아미노산 길이일 수 있고, 최대 약 50개의 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 사이의 "동일성", "상동성" 또는 "유사성"을 언급할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열과 관련하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 종종 참조 서열과 비교하여 누락되거나 또는 추가적인 염기 또는 아미노산에 대한 교정을 포함하는 다중 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다.

[0039] 동일성은 서열의 정렬을 준비하고, 당업계에 공지되어 있거나 또는 상업적으로 이용 가능한 다양한 알고리즘 및/또는 컴퓨터 프로그램(예를 들어, BLAST, ExPASy; Clustal Omega; FASTA; 예를 들어, Needleman-Wunsch 알고리즘, Smith-Waterman 알고리즘을 사용)의 사용을 통해 결정될 수 있다. 정렬은 임의의 다양한 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램은 아미노산 서열에 이용 가능한, 예를 들어, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램이다. 일반적으로, 당업자가 필요에 따라 이러한 설정을 변경할 수 있지만, 임의의 이들 프로그램은 기본 설정으로 사용된다. 대안적으로, 당업자는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 것과 적어도 동일성 또는 정렬 수준을 제공하는 또 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)] 참조.

[0040] 서열에 대한 동일성 또는 유사성은 본 명세서에서 최대 서열 동일성 백분율을 달성하기 위해 필요한 경우 서열을 정렬하고 갭을 도입한 후, 본 명세서에 제공된 펩타이드 및 폴리펩타이드 영역을 갖는 동일한(즉, 동일한 잔기) 또는 유사한(즉, 공통 측쇄 특성에 기초한 동일한 그룹으로부터의 아미노산 잔기, 아래 참조) 후보 서열의 아미노산 잔기의 백분율로 정의된다. 동일성 백분율(%)은 각각 뉴클레오타이드 또는 아미노산 서열을 비교함으로써 결정되는 2개의 폴리뉴클레오타이드 또는 2개의 폴리펩타이드 사이의 관계의 척도이다. 일반적으로, 비교될 2개의 서열은 서열 간의 최대 상관관계를 제공하도록 정렬된다. 2개의 서열의 정렬을 조사하고, 2개의 서열 사이의 정확한 아미노산 또는 뉴클레오타이드 사이의 일치를 제공하는 위치의 수를 결정하고, 정렬의 총 길이로 나누고 100을 곱하여 동일성 % 수치를 얻는다. 이러한 동일성 % 수치는 비교될 서열의 전체 길이에 걸쳐 결정될 수 있고, 이는 동일하거나 또는 매우 유사한 길이의 서열 및 고도로 상동성이거나 또는 더 짧은 정의된 길이를 초과하는 서열에 특히 적합하고, 길이가 동일하지 않거나 더 낮은 수준의 상동성을 갖는 서열에 더 적합하다. 정렬 및 동일성 백분율을 수행하기 위해 문헌 및/또는 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다수의 알고리즘 및 이를 기반으로 하는 컴퓨터 프로그램이 있다. 알고리즘 또는 프로그램의 선택은 본 발명을 제한하지 않는다.

[0041] 적합한 정렬 프로그램의 예는, 예를 들어, 유닉스(Unix)의 소프트웨어 CLUSTALW를 Bioedit 프로그램으로 불러오는 것(문헌[Hall, T. A. 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98]); Wisconsin 서열 분석 패키지, 버전 9.1(문헌[Devereux J. et al., Nucleic Acids Res., 12:387-395, 1984], 미국 위스콘신주 매디슨 소재 제네틱스 컴퓨터 그룹(Genetics Computer Group)으로부터 입수 가능함)을 포함한다. 프로그램 BESTFIT 및 GAP이 2개의 폴리뉴클레오타이드 사이의 동일성 % 및 2개의 폴리펩타이드 서열 사이의 동일성 %를 결정하는데 사용될

수 있다.

[0042] 서열 사이의 동일성 및/또는 유사성을 결정하기 위한 다른 프로그램은, 예를 들어, 미국 메릴랜드주 베데스다 소재의 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information: NCB)에서 이용 가능하며 NCBI의 홈페이지(www.ncbi.nlm.nih.gov)를 통해 액세스할 수 있는 BLAST 제품군 프로그램인 CG 서열 정렬 소프트웨어 패키지의 일부인 ALIGN 프로그램(버전 2.0)을 포함한다. 아미노산 서열을 비교하기 위해 ALIGN 프로그램을 이용할 때, PAM120 중량 잔기 표, 12의 갭 길이 패널티 및 4의 갭 패널티가 사용될 수 있다; FASTA(문헌 [Pearson W. R. and Lipman D. J., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444-2448, 1988], Wisconsin 서열 분석 패키지의 일부로서 이용 가능함). SeqWeb 소프트웨어(GCG Wisconsin 패키지: Gap 프로그램에 대한 웹-기반 인터페이스).

[0043] 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 20의 천연 hIDUA 서열과 80% 미만 동일하고, 서열번호 21의 아미노산 서열을 암호화한다. 추가의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 20의 88번 내지 1959번 뉴클레오타이드(nt)와 80% 미만 동일하고, 서열번호 21의 28번 내지 635번 아미노산을 암호화하는 서열을 포함한다.

[0044] 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 천연 hIDUA 코딩 서열(서열번호 20)과 약 99% 미만, 약 98% 미만, 약 97% 미만, 약 96% 미만, 약 95% 미만, 약 94% 미만, 약 93% 미만, 약 92% 미만, 약 91% 미만, 약 90% 미만, 약 89% 미만, 약 88% 미만, 약 87% 미만, 약 86% 미만, 약 85% 미만, 약 84% 미만, 약 83% 미만, 약 82% 미만, 약 81% 미만, 약 80% 미만, 약 79% 미만, 약 78% 미만, 약 77% 미만, 약 76% 미만, 약 75% 미만, 약 74% 미만, 약 73% 미만, 약 72% 미만, 약 71% 미만, 약 70% 미만, 약 69% 미만, 약 68% 미만, 약 67% 미만, 약 66% 미만, 약 65% 미만, 약 64% 미만, 약 63% 미만, 약 62% 미만, 약 61% 미만의 동일성을 공유한다. 다른 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 천연 hIDUA 코딩 서열(서열번호 20)과 약 99%, 약 98%, 약 97%, 약 96%, 약 95%, 약 94%, 약 93%, 약 92%, 약 91%, 약 90%, 약 89%, 약 88%, 약 87%, 약 86%, 약 85%, 약 84%, 약 83%, 약 82%, 약 81%, 약 80%, 약 79%, 약 78%, 약 77%, 약 76%, 약 75%, 약 74%, 약 73%, 약 72%, 약 71%, 약 70%, 약 69%, 약 68%, 약 67%, 약 66%, 약 65%, 약 64%, 약 63%, 약 62%, 약 61% 또는 그 이하의 동일성을 공유한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 20과 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 동일하며, 기능적 인간 알파-L-아이두로니데이스를 암호화한다. 추가의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 23, 24, 25, 26 또는 27과 적어도 약 80%, 적어도 약 81%, 적어도 약 82%, 적어도 약 83%, 적어도 약 84%, 적어도 약 85%, 적어도 약 86%, 적어도 약 87%, 적어도 약 88%, 적어도 약 89%, 적어도 약 90%, 적어도 약 91%, 적어도 약 92%, 적어도 약 93%, 적어도 약 94%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 동일하며, 기능적 인간 알파-L-아이두로니데이스를 암호화한다.

[0045] 동일성은 전장 hIDUA(예를 들어, 서열번호 20의 1번 nt 내지 1959번 nt)를 암호화하는 서열에 관한 것이거나 또는 성숙 hIDUA(예를 들어, 서열번호 20의 82번 nt 내지 1959번 nt)를 암호화하는 서열에 관한 것일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 전장 hIDUA는 서열번호 20의 약 1번 내지 약 81번에 상응하는 인간 알파-L-아이두로니데이스의 리더 펩타이드 서열(즉, 서열번호 21의 1번 내지 약 27번 아미노산을 암호화함)을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, hIDUA 유전자는 기능적 알파-L-아이두로니데이스 효소의 분비된 부분, 즉, 서열번호 21의 약 28번 내지 약 653번 아미노산 또는 본 명세서에서 확인된 이의 기능적 변이체 중 하나에 융합된 이종 리더 서열을 포함하는 합성 펩타이드인 기능적 합성 인간 알파-L-아이두로니데이스 효소를 암호화한다. 또 다른 실시형태에서, hIDUA 유전자는 서열번호 21의 기능적 합성 인간 알파-L-아이두로니데이스 효소를 암호화하되, 리더 서열은 서열번호 21의 1번 내지 27번 아미노산을 암호화하는 서열번호 20의 1번 내지 81번 뉴클레오타이드에 의해 암호화되며, 28번 내지 653번 아미노산은 서열번호 20의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드와 적어도 85%, 95% 또는 99% 동일한 서열, 또는 서열번호 22의 82번 내지 1959번 뉴클레오타이드와 적어도 85%, 95% 또는 99% 동일한 서열에 의해 암호화된다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 20의 1번 nt 내지 1959번 nt, 또는 전장 hIDUA를 암호화하는 것에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 20의 82번 nt 내지 1959번 nt, 또는 기능적 hIDUA를 암호화하는 것에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 23, 24, 25 또는 26의 1번 nt 내지 1959번 nt, 또는 전장 hIDUA를 암호화하는 것에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 23, 24, 25 또는 26의 82번 nt 내지 1959번 nt, 또는 성숙 hIDUA(예를 들어, 서열번호 21의 27번 내지 653번 아미노산)를 암호화하는 것

에 대해 적어도 85%, 90%, 95% 또는 99% 동일한 서열을 포함한다.

[0046] 추가의 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열은 서열번호 22, 23, 24, 25 또는 26을 포함한다.

[0047]

hIDUAcoV1 **서열번호: 22**	atgaggcctctcagacctagagctgctctgctggcactgctggcttctctgcttgctgctcctc ctgtggctcctgccgaagctcctcatctggtgcacgtggatgccgccagagcactgtggccc ctgagaagattttggcggagcaccggcttttgccctccactgcctcattctcaggccgaccag tacgtgctgagctgggaccagcaactgaacctggcctacgtgggagccgtgcctcacagag gcattaagcaagtgcggacccactggctgctggaactggtcacaacaagaggcagcacag gcagaggcctgagctacaacttcacccacctggacggctacctggacctgctgagagagaa tcagctgctgcctggcttcgagctgatgggctctgcctctggccacttcaccgacttcgagga caagcagcaggttttcgagtggaaggacctggtgtccagcctggccagacggtacatcggc
	agatacggactggcccacgtgtccaagtggaacttcgagacctggaacgagcccgaccac cacgacttcgacaacgtgtcaatgaccatgcagggctttctgaactactacgacgcctgcag cgagggcctgagagctgcttctcctgctctgagacttggcggccctggcgactcttttcacac ccctccaagaagccctctgtcctggggactgctgagacactgtcacgacggcaccaatttctt caccggcgaggctggcgtgcggctggattatatcagcctgcacagaaagggcgccagaag cagcatcagcatcctggaacaagagaaggtggtggcccagcagatcagacagctgttcccc aagttcgccgacacacccatctacaacgacgaggccgatcctctcgttggctggtcacttcct cagccttggagagccgatgtgacctatgccgccatggtggtcaaagtgatcgcccagcacc agaatctgctgctcgccaataccaccagcgcctttccatacgctctgctgagcaacgacaac gccttcctgagctatcaccctcatcctttcgctcagcggaccctgaccgccagattccaagtg aacaacacccggcctccacacgtgcagctgctgagaaaaccagtgctgacagccatgggc ctgctcgccctgctggacgaagaacaactgtgggccgaagtgtcccaggccggaacagtg ctggatagcaatcacacagtgggcgtgctggcctccgctcatagacctcaaggaccagccg atgcttggagggctgccgtgctgatctacgccagcgacgatacaagggctcaccccaacag atccgtggccgtgacactgagactgagaggcgttccaccaggacctggcctggtgtacgtg accagatacctggacaacggcctgtgcagccctgatggcgaatggcgtagactaggcaga cctgtgtttcctaccgccgagcagttcagacggatgagagccgctgaagatcccgtggctgc tgctccaagacctcttccagctggtggcagactgactctgaggcctgcactcagactgcctag tctgctgctggtgcacgtctgtgccagacctgagaagcctcctggccaagtgacaagactga gggccctgccactgacacagggacagctggttcttgtttggagcgacgagcacgtgggcag caagtgtctgtggacctacgagatccagttcagccaggacggcaaggcctacacacccgtg tctagaaagcctagcaccttcaacctgttcgtgttcagccccgatacaggcgccgtgtctggc agctatagagtcagagccctggactactgggccagaccaggaccatttttctgaccccgtgcc ttacctggaagtgcccgttcctagaggccctccttctcctggaaatccc
hIDUAcoV2 **서열번호: 23**	atgaggcctctcagacctagagctgctctgctggcactgctggcttctctgcttgctgctcctc ctgtggctcctgccgaagctcctcatctggtgcacgtggatgccgccagagcactgtggccc ctgagaagattttggcggagcaccggcttttgccctccactgcctcattctcaagccgaccaat acgtgctgagctgggaccagcaactgaacctggcctacgtgggagccgtgcctcacagag gcattaagcaagtgcggacccactggctgctggaactggtcacaacaagaggcagcacag gcagaggcctgagctacaacttcacccacctggacggctacctggacctgctgagagagaa tcagctgctgcctggcttcgagctgatgggctctgcctctggccacttcaccgacttcgagga caagcagcaggttttcgagtggaaggacctggtgtccagcctggccagacgctacatcggc agatacggactggcccacgtgtccaagtggaacttcgagacctggaacgagcccgaccac cacgacttcgacaacgtgtcaatgaccatgcagggctttctgaactactacgacgcctgcag cgagggcctgagagctgcttctcctgctctgagacttggcggccctggcgactcttttcacac ccctccaagaagccctctgtcctggggactgctgagacactgtcacgacggcaccaatttctt caccggcgaggctggcgtgcggctggattatatcagcctgcacagaaagggcgccagaag cagcatcagcatcctggaacaagagaaggtggtggcccagcagatcagacagctgttcccc aagttcgccgacacacccatctacaacgacgaggccgatcctctcgttggctggtcacttcct cagccttggagagccgatgtgacctatgccgccatggtggtcaaagtgatcgcccagcacc agaatctgctgctcgccaataccaccagcgcctttccatacgctctgctgagcaacgacaac gccttcctgagctatcaccctcatcctttcgctcagcggaccctgaccgccagattccaagtg aacaacacccggcctccacacgtgcagctgctgagaaaaccagtgctgacagccatgggc ctgctcgccctgctggacgaagaacaactgtgggccgaagtgtcccaggccggaacagtg ctggatagcaatcacacagtgggcgtgctggcctccgctcatcgacctcaaggaccagccg atgcttggagggctgccgtgctgatctacgccagcgacgatacaagggctcaccccaacag atccgtggccgtgacactgagactgagaggcgttccaccaggacctggcctggtgtacgtg

[0048]

	accagatacctggacaacggcctgtgcagccctgatggcgaatggcgtagactaggcaga cctgtgtttcctaccgccgagcagttcagacggatgagagccgctgaagatcccgtggctgc tgctccaagacctcttccagctggtggcagactgactctgaggcctgcactcagactgcctag tctgctgctggtgcacgtctgtgccagacctgagaagcctcctggccaagtgacaagactga gggccctgccactgacacagggacagctggttcttgtttggagcgacgagcacgtgggcag caagtgtctgtggacctacgagatccagttcagccaggacggcaaggcctacacacccgtg tctagaaagcctagcaccttcaacctgttcgtgttcagccccgatacaggcgccgtgtctggc agctatagagtcagagccctggactactgggccagaccaggaccattttctgaccccgtgcc ttacctggaagtgcccgttcctagaggccctccttctcctggaaatccc
hIDUAcoV3 서열번호: 24	atgcgaccettgcgaccaagagccgccctgcttgcgttgttggcttccctttggctgcaccac ccgtcgccccggcagaggcgcctcacctcgtgcatgtagacgcagcccgcgccctctggc cattgcggcgattctggaggtctaccggtttctgcccaccccctgcctcattcacaagccgacc aatacgttttgtcctgggatcaacagctcaaccttgcgtatgtaggcgctgttccacaccgggg aattaagcaggtccggactcactggcttcttgagttggttacgacgaggggttcaacaggga gagggttgtcctacaactttacacatctggatggttatttagacctgctccgagaaaaccaactt ctccctggattcgagctcatgggctctgcctctggtcactttacggatttcgaggataaacagc aagtcttcgagtggaaggatcttgtgagcagccttgccagaagatatataggaagatacggg ttggcacacgtatctaaatggaactttgagacttggaacgaacccgaccatcacgactttgac aacgtatctatgacgatgcaaggcttcctcaactattatgacgcgtgcagtgaaggtctgagg gctgcgtctccggcgctcagattgggaggtcctggagacagctttcatacgcctccgcgatc ccctcttagctgggggttgctcagacattgccacgacggtacaaacttcttcaccggcgagg caggtgttaggctcgactacatctccctgcaccgaaagggcgcgcgatcttctatcagtatatt ggaacaagagaaagttgtggctcaacaaattcgccaacttttcccaaattcgctgatacccc gatttacaacgacgaagccgacccattggtaggttggagtcttccccagccttggcgagcgg atgtcacctacgcagctatggtagttaaagtgattgcgcaacaccaaaatctccttcttgccaa cacgacttctgcgtttccatacgcgttgttgtctaacgacaacgccttttgtcctatcacccgca cccgtttgcgcagcgaactctgaccgcaagatttcaggttaacaatactcggccaccacacgt acagcttttgcgcaaacctgtattgactgccatgggattgttggcactgttggatgaagaacaa ctgtgggctgaagtgagccaggcgggtacagttctggacagtaatcacactgtaggcgtgct cgccagtgctcaccgaccacaggggccggcagacgcctggagagctgctgtactcatcta cgcatcagacgataccagggcgcatcccaatagatccgtcgccgtaactcttcggcttcggg gcgtcccgccagggccgggccttgtttatgttactcgatacttagacaacggactttgtagtcc tgatggtgaatggcgtagattagggcggcctgtctttcctactgcggagcagttcagacgaat gagggctgctgaggacccagttgcagctgcaccccgcccgcttccggccggtggcagact tacgctcaggcccgcgcttaggttgccgtccttgttgcttgtccacgtttgcgctcgcccagaa aagccgccgggacaggttacacgacttcgggctctgccccctgacgcagggacaactggtg cttgtttggagtgatgaacacgtaggaagcaagtgcttgtggacttacgagatacaattcagc caagacggcaaggcttatacccctgtttcacgcaaaccttctacttttaatttgtttgtcttttctcc ggatacgggggcggtctctgggtcatatcgcgtgagagcactcgattactgggctagacca gggccatttagcgatcccgttccttatctggaggtgcccgtcccgaggggtccaccaagccc cggaaatccg
hIDUAcoV4 서열번호: 25	atgaggcccctgaggcccagggccgccctgctggccctgctggcctccctgctggccgctc ctcccgtggccccagccgaggctcctcacctggtgcacgtggacgccgccagggccctgt ggcccctgaggaggttctggaggtccaccggcttctgtcctcctctgccccactcccaagcc gaccaatacgtgctgtcctgggaccagcagctgaacctggcctatgtgggagctgtgcccc acaggggcatcaagcaagtgaggacccactggctgctggagctggtgaccaccaggggct ccaccggcaggggcctgtcctacaacttcacccacctggacggctacctggacctgctgag

[0049]

	ggagaaccagctgctgcccggcttcgagctgatgggctccgcctccggccacttcaccgac ttcgaggacaagcagcaggtgttcgagtggaaggacctggtgtcctccctggccaggagat acatcggcagatacggcctggcccacgtgtccaagtggaacttcgagacctggaacgagc ccgaccaccacgacttcgacaacgtgtccatgaccatgcagggcttcctgaactactacgac gcctgctccgagggcctgagggccgcctctcctgccctgaggctgggaggacctggcgac tccttccacacacctccaaggtctccccctgtcctggggcctgctgaggcactgccacgacgg caccaacttcttcaccggagaggctggagtgaggctggactacatctccctgcaccggaag ggcgccaggtcctccatctccatcctggagcaggagaaggtggtggcccagcagatcagg cagctgttccccaagttcgccgacacacctatctacaacgacgaggccgatcctctggtggg ctggtccctgccccagccctggagggctgatgtgacctatgctgccatggtggtgaaggtga tcgcccagcaccagaacctgctgctggccaacaccacctccgccttccctacgccctgctg tccaacgacaacgccttcctgtcctaccatcctcacccccttcgcccaaaggaccctgaccgc caggttccaagtgaacaacaccaggcctcctcacgtgcagctgctgaggaagcccgtgctg accgccatgggcctgctggccctgctggacgaggagcagctgtgggccgaggtgtcccag gccggcaccgtgctggactccaaccacaccgtgggcgtgctggcctccgcccaccggccc cagggccccgccgacgcctggagggccgccgtgctgatctacgcctccgacgacaccag ggcccacccccaacaggtccgtggccgtgaccctgaggctgaggggcgtgcctcccggcc ccggcctggtgtacgtgaccaggtatctggacaacggcctgtgctctcctgacggcgagtg gaggaggctgggcaggcccgtgttccccaccgccgagcagttcaggaggatgagggccg ccgaggacccccgtggccgccgctcctcgacccctgcctgctggaggcaggctgaccctga ggcccgccctgaggctgccctccctgctgctggtgcacgtgtgcgccaggcccgagaagc ctcctggccaggtgaccaggctgagggccctgccccctgacccagggccagctggtgctgg tgtggtccgacgagcacgtgggctccaagtgcctgtggacctacgagatccagttctcccag gacggcaaggcctacacacctgtgtccaggaagccctccacttcaacctgttcgtgttctct cctgacaccggcgccgtgtccggctcctaccgagtgagggccctggactactgggccagg cccggccccttctccgacccccgtgccctacctggaggtgcccgtgcccaggggacctcctt ctcctggcaacccc
hIDUAcoV5 서열번호: 26	atgagacctttaagaccacgtgctgctctgctggctttactcgcttctttactggcgctcctccc gtggcccccgctgaagctcctcacttagtgcacgtggatgccgccagagctctgtggcctct gaggagattttggaggtccactggtttctgccctcctttaccccatagccaagctgatcagtac gtgctgagctgggatcagcaactgaatttagcctacgtcggcgctgtgcctcacagaggcatt aagcaagtgaggacccactggctgctggaactggtcaccactcgtggcagcactggtagag gactcagctacaatttcacacatttagacggctatctggatttactgagagagaatcagttatta cccggtttcgagctcatgggaagcgcctccggccatttcaccgacttcgaggacaagcagc aagttttcgaatggaaagatttagtgtcctccctcgctcgtaggtacatcggaagatacggttta gcccacgtcagcaagtggaacttcgagacttggaatgagcccgatcaccacgattttgacaa tgtcagcatgaccatgcaaggttttttaaactactacgatgcttgtagcgaaggcctcagagct gccagccccgctctgagactcggcggacccggtgactccttccacacacctcctagaagcc ctttaagctggggtttactgagacactgtcacgacggcaccaacttctttaccggcgaggccg gcgttcgtctcgactatatctctttacatcgtaagggcgctcgttcctccatttccatcctcgaac aagaaaaggtggtggctcagcagattaggcaactcttccccaagttcgccgacaccccctatc tataatgacgaggctgatcctctggtcggctggtctttaccccaaccttggagagctgatgtca cctacgctgccatggtggtgaaggtgatcgcccagcaccagaatttattattagctaacacca catccgccttcccttacgctctgctgtccaacgataacgccttcctcagctatcaccctcaccc ctttgcccagagaactttaaccgctagattccaagttaataacaccagaccccccccacgtcca gttattacgtaagcccgttctgacagccatgggtttactcgctttactggacgaagagcagctg tgggctgaagtgagccaagctggcaccgtgctggatagcaaccacacagtgggcgtgctc

[0050]

	gccagcgctcataggcctcaaggacccgctgatgcttggagggctgccgtgctgatctacg ccagcgacgacacaagggctcaccccaataggtccgtggctgttacactgagactcagagg cgtcccccccggtcccggtttagtgtatgtgaccagatatttagacaacggactgtgctcccc cgacggagagtggagaagactgggtcgtcccgtgtttcctaccgccgagcagtttaggagg atgagagctgccgaggatcccgttgccgccgccccacgtcctttacccgccggcggaagg ctgacattaagacccgctttaagactgccctctttactgctcgtgcatgtgtgtgccagacccg aaaagcctcccggacaagttaccagactgagagccctccctctgacccaaggtcagctggt gctggtgtggtccgacgaacacgtgggcagcaagtgtttatggacctatgagatccagttctc ccaagatggcaaagcttacaccccccgtgtctcgtaaacctagcaccttcaatttattcgtgttta gccccgacaccggagccgtgtccggcagctatcgtgtgagagctttagactactgggctag gcccggccctttttagcgatcccgtgccttatttagaagtgcccgttcccagaggaccccccag ccccggaaatcct

[0051]

[0052] 본 명세서에서 사용되는 "목적하는 기능"은 건강한 대조군의 적어도 약 20%, 약 25%, 약 30%, 약 35%, 약 40%, 약 45%, 약 50%, 약 55%, 약 60%, 약 65%, 약 70%, 약 75%, 약 80%, 약 85%, 약 90%, 약 95% 또는 약 100%의 hIDUA 효소 활성을 지칭한다.

[0053] 본 명세서에서 사용되는 어구 "증상을 완화시키다" 및 "증상을 개선하다" 및 이들의 문법적 변형은 MPSI, 헐러 및/또는 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군-관련 증상의 역전, MPSI, 헐러 및/또는 헐러-샤이에 및/또는 샤이

에 증후군-관련 증상의 진행의 둔화 또는 예방을 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 완화 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 환자에서 증상의 총 수가 투여 또는 사용 이전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 감소된 것을 지칭한다. 또 다른 실시형태에서, 완화 또는 개선은 기재된 조성물(들)의 투여 또는 기재된 방법의 사용 후 증상의 중증도 또는 진행이 투여 또는 사용 이전과 비교하여 약 5%, 약 10%, 약 20%, 약 30%, 약 40%, 약 50%, 약 60%, 약 70%, 약 80%, 약 90%, 약 95% 감소된 것을 지칭한다.

[0054] 본 명세서에 기재된 기능적 hIDUA 또는 hIDUA 코딩 서열의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0055] **발현 카세트**

[0056] 소정의 실시형태에서, 기능적 hIDUA를 암호화하는 핵산 서열 및 이의 발현을 지시하는 조절 서열을 갖는 발현 카세트가 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 "발현 카세트"는 hIDUA 유전자, 프로모터를 암호화하는 서열을 포함하며 이에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있는 핵산 분자를 지칭하고, 카세트는 유전적 요소(예를 들어, 플라스미드)를 통해 패키징 숙주 세포에 전달되고 바이러스 벡터(예를 들어, 바이러스 입자)의 캡시드로 패키징될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성하기 위한 이러한 발현 카세트는 바이러스 게놈의 패키징 신호 및 본 명세서에 기재된 것과 같은 다른 발현 제어 서열의 측면에 있는 본 명세서에 기재된 hIDUA 코딩 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 서열 및 3' 및/또는 5' UTR의 miRNA 표적 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 유전자 산물(예를 들어, hIDUA)을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, miRNA 표적 서열은 이식유전자 발현이 바람직하지 않고/않거나 감소된 수준의 이식유전자 발현이 요구되는 세포에 존재하는 miRNA에 의해 특이적으로 인식되도록 설계된다. 소정의 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 후근 신경절에서 이식유전자의 발현을 특이적으로 감소시킨다. 소정의 실시형태에서, miRNA 표적 서열은 3' UTR, 5' UTR 및/또는 3' 및 5' UTR 둘 다에 위치한다.

[0057] 본 명세서에서 사용되는 용어 "발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자로부터의 정보가 기능적 유전자 산물의 합성에 사용되는 과정을 지칭한다. 유전자 산물은 단백질, 펩타이드 또는 핵산 중합체(예컨대, RNA, DNA 또는 PNA)일 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 사용되는 용어 "조절 서열" 또는 "발현 제어 서열"은 개시 서열, 인핸서 서열 및 프로모터 서열과 같은 핵산 서열을 지칭하며, 이는 작동 가능하게 연결된 핵산 서열을 암호화하는 단백질의 전사를 유도, 억제 또는 그렇지 않으면 조절한다.

[0059] 본 명세서에서 사용되는 용어 "작동 가능하게 연결된"은 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열과 인접한 발현 제어 서열 및/또는 이의 전사 및 발현을 제어하기 위해 트랜스로(in trans) 또는 거리를 두고 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 지칭한다.

[0060] "5' UTR"은 유전자 산물 코딩 서열에 대한 개시 코돈의 상류이다. 5' UTR은 일반적으로 3' UTR보다 더 짧다. 일반적으로, 5' UTR은 약 3개의 뉴클레오타이드 내지 약 200개의 뉴클레오타이드 길이이지만, 선택적으로 더 길 수 있다.

[0061] "3' UTR"은 유전자 산물에 대한 코딩 서열의 하류이며, 일반적으로 5' UTR보다 길다. 소정의 실시형태에서, 3' UTR은 약 200개의 뉴클레오타이드 내지 약 800개의 뉴클레오타이드 길이이지만, 선택적으로 더 길거나 또는 더 짧을 수 있다.

[0062] 핵산 서열 또는 단백질을 설명하는데 사용되는 용어 "외인성"은 핵산 또는 단백질이 염색체 또는 숙주 세포에 존재하는 위치에서 자연적으로 발생하지 않는 것을 의미한다. 외인성 핵산 서열은 또한 동일한 숙주 세포 또는 대상체로부터 유래되고 삽입된 서열을 지칭하지만, 비-천연 상태, 예를 들어, 상이한 카피 수로 존재하거나 또는 상이한 조절 요소의 제어하에 있다.

[0063] 핵산 서열 또는 단백질을 설명하는데 사용되는 용어 "이종"은 핵산 또는 단백질이 발현되는 숙주 세포 또는 대상체와 상이한 유기체 또는 동일한 유기체의 상이한 종으로부터 유래되었음을 의미한다. 플라스미드, 벡터 게놈, 발현 카세트 또는 벡터에서 단백질 또는 핵산과 관련하여 사용될 때 용어 "이종"은 단백질 또는 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계로 발견되지 않는 또 다른 서열 또는 하위서열과 함께 존재함을 나타낸다.

[0064] 일 실시형태에서, 제공된 발현 카세트는 뇌 척수액 및 뇌를 포함하는 중추 신경계(CNS)에서의 발현 및 분비를 위해 설계된다. 특히 목적하는 실시형태에서, 발현 카세트는 CNS 및 간 모두에서의 발현에 유용하므로, MPSI,

헐러, 헐러-샤이에 및 샤이에 증후군의 전신 및 CNS-관련 효과 둘 다를 모두 치료할 수 있다. 예를 들어, 본 발명자들은 소정의 구성적 프로모터(예를 들어, CMV)가 척수강내로 전달될 때 목적하는 수준으로 발현을 유도하지 않아 차선의 hIDUA 발현 수준을 제공한다는 것을 관찰하였다. 그러나, 닭 베타-액틴 프로모터는 척수강내 전달 및 전신 전달 둘 다에서 발현을 잘 유도한다. 따라서, 이는 특히 바람직한 프로모터이다. 다른 프로모터가 선택될 수 있지만, 이를 포함하는 발현 카세트는 닭 베타-액틴 프로모터가 있는 것의 모든 이점을 갖지 않을 수 있다. 다양한 닭 베타-액틴 프로모터가 단독으로 또는 다양한 인핸서 요소(예를 들어, CB7은 프로모터, 닭 베타 액틴의 제1 엑손과 제1 인트론 및 토끼 베타-글로빈 유전자의 스플라이스 수용체(splice acceptor)를 포함하는 CAG 프로모터인 사이토메갈로바이러스 인핸서 요소가 있는 닭 베타-액틴 프로모터임), CBh 프로모터와 조합하여 설명되었다(문헌[SJ Gray et al, Hu Gene Ther, 2011 Sep; 22(9): 1143-1153]). 다른 실시형태에서, 적합한 프로모터는 제한 없이 신장 인자 1 알파(elongation factor 1 alpha: EF1 alpha) 프로모터(예를 들어, 문헌[Kim DW et al, Use of the human elongation factor 1 alpha promoter as a versatile and efficient expression system. Gene. 1990 Jul 16;91(2):217-23] 참조), 시냅신 1 프로모터(예를 들어, 문헌[Kügler S et al, Human synapsin 1 gene promoter confers highly neuron-specific long- term transgene expression from an adenoviral vector in the adult rat brain depending on the transduced area. Gene Ther. 2003 Feb;10(4):337-47] 참조), 뉴런-특이적 에놀레이스(neuron-specific enolase: NSE) 프로모터(예를 들어, 문헌[Kim J et al, Involvement of cholesterol-rich lipid rafts in interleukin-6-induced neuroendocrine differentiation of LNCaP prostate cancer cells. Endocrinology. 2004 Feb;145(2):613-9. Epub 2003 Oct 16] 참조) 또는 CB6 프로모터(see, 예를 들어, 문헌[Large-Scale Production of Adeno-Associated Viral Vector Serotype-9 Carrying the Human Survival Motor Neuron Gene, *Mol Biotechnol*. 2016 Jan;58(1):30-6. doi:10.1007/s12033-015-9899-5] 참조)를 포함할 수 있다.

[0065] 조직-특이적인 프로모터의 예는 간 및 기타 조직(알부민, 문헌[Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71:5124-32]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, 문헌[Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9]; 알파-태아단백질(alpha-fetoprotein: AFP), 문헌[Arbuthnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14]), 뼈 오스테오칼신(문헌[Stein et al., (1997) Mol. Biol. Rep., 24:185-96]); 뼈 시알로단백질(문헌[Chen et al., (1996) J. Bone Miner. Res., 11:654-64]), 림프구(CD2, 문헌[Hansal et al., (1998) J. Immunol., 161:1063-8]; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런-특이적 에놀레이스(NSE) 프로모터와 같은 뉴런(문헌[Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15]), 신경미세섬유 경쇄 유전자(문헌[Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5]) 및 뉴런-특이적 vgf 유전자(문헌[Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84]) 등에 대해 잘 알려 있다. 대안적으로, 조절 가능한 프로모터가 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 원용되어 있는 WO 2011/126808B2 참조.

[0066] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 하나 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 2개 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 이러한 인핸서는 동일할 수 있거나, 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서 또는 CMV 인핸서를 포함할 수 있다. 이러한 인핸서는 서로 인접하게 위치한 2개의 카피로 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 카피는 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 인트론, 예를 들어, 닭 베타-액틴 인트론, 인간 β-글로불린 인트론 및/또는 상업적으로 이용 가능한 Promega® 인트론을 추가로 포함한다. 다른 적합한 인트론은, 예를 들어, WO 2011/126808에 기술되어 있는 것과 같은 당업계에 공지된 것을 포함한다.

[0067] 또한, 제공된 발현 카세트는 적합한 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 일 실시형태에서, 폴리A 서열은 토끼 글로불린 폴리 A이다. 예를 들어, WO 2014/151341 참조. 대안적으로, 또 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열, SV50 폴리A 또는 합성 폴리A. 또 다른 종래의 조절 요소는 발현 카세트 또는 벡터 게놈에 추가되거나 또는 선택적으로 포함될 수 있다.

[0068] 일 실시형태에서, 조절 서열은 인핸서를 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 조절 서열은 하나의 인핸서를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 조절 서열은 2개 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 이러한 인핸서는 동일할 수 있거나 또는 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 알파 mic/bik 인핸서 또는 CMV 인핸서를 포함할 수 있다. 이러한 인핸서는 서로 인접한 위치에 있는 2개의 카피로 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 카피는 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다.

[0069] 일 실시형태에서, 조절 서열은 인트론을 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 인트론은 닭 베타-액틴 인트론이다. 다른 적합한 인트론은 인간 β-글로불린 인트론 및/또는 상업적으로 이용 가능한 Promega® 인트론으로

당업계에 공지된 것 및 WO 2011/126808에 기술된 것을 포함한다.

[0070] 일 실시형태에서, 조절 서열은 폴리아데닐화 신호(폴리A)를 추가로 포함한다. 추가의 실시형태에서, 폴리A는 토끼 글로빈 폴리 A이다. 예를 들어, WO 2014/151341 참조. 대안적으로, 또 다른 폴리A, 예를 들어, 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열, SV40 폴리A 또는 합성 폴리A는 발현 카세트에 포함될 수 있다.

[0071] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 산물의 DRG-발현을 감소시키거나 또는 제거하면서 인간 대상체에서의 발현을 위해 설계된다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 뇌 척수액 및 뇌를 포함하는 중추 신경계(CNS)에서의 발현을 위해 설계된다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 신경 세포(예컨대, 추상 세포, 푸르키네 세포, 과립 세포, 방추 세포 및 신경간 세포) 및 아교 세포(예컨대, 성상세포, 희소돌기 아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포)를 포함하여 CNS(후근 신경절 제외)에 존재하는 하나 이상의 세포 유형에서 이식유전자의 발현 또는 향상된 발현을 위해 설계된다. 소정의 실시형태에서, 이식유전자의 향상된 발현은 CNS의 또 다른 세포 유형에서 이식유전자의 발현이 거의 없거나 전혀 없이 하나 이상의 세포 유형에서 달성된다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 CNS 이외의 세포에서의 발현에 유용하다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 "miRNA"는 mRNA를 조절하고 단백질로 번역되는 것을 중지시키는 작은 논-코딩 RNA 분자인 마이크로RNA를 지칭한다. miRNA는 상보적 염기 페어링에 의해 mRNA에 특이적으로 결합하여 mRNA를 파괴하거나 또는 침묵시키는 뉴클레오타이드 영역인 "시드 서열"을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 시드 서열은 성숙 miRNA(5'에서 3')에 위치하며, 일반적으로 miRNA의 2번 내지 7번 또는 2번 내지 8번 위치(센스(+) 가닥의 5' 말단으로부터)에 위치하지만, 이는 일정 길이보다 길 수 있다. 소정의 실시형태에서, 시드 서열의 길이는 적어도 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드 길이, 적어도 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드 길이, 7개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 8개의 뉴클레오타이드 내지 18개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드 길이, 약 20개 내지 약 26개의 뉴클레오타이드, 약 22개의 뉴클레오타이드, 약 24개의 뉴클레오타이드 또는 약 26개의 뉴클레오타이드일 수 있는 miRNA 서열의 길이의 약 30% 이상이다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 "miRNA 표적 서열"은 DNA 양성 가닥 (5'에서 3')에 위치한 서열이며, miRNA 시드 서열을 포함하는 miRNA 서열에 대해 적어도 부분적으로 상보적이다. miRNA 표적 서열은 암호화된 이식유전자 산물의 비번역 영역에 대해 외인성이며, 이식유전자 발현의 억제가 요구되는 세포에서 miRNA에 의해 특이적으로 표적화되도록 설계된다. 용어 "miR183 클러스터 표적 서열"은 miR-183, miR--96 및 miR--182(참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[Dambal, S. et al. Nucleic Acids Res 43:7173-7188, 2015]에 기술된 바와 같음)를 포함하는 miR183 클러스터(대안적으로 패밀리라고 함) 중 하나 또는 이의 구성원에 반응하는 표적 서열을 지칭한다. 이론에 얽매이지 않고, 이식유전자(유전자 산물을 암호화함)에 대한 메신저 RNA(mRNA)는 3' UTR miRNA 표적 서열에 대한 miRNA의 특이적 결합이 mRNA 침묵 및 절단을 초래하여 miRNA를 발현하는 세포에서만 이식유전자 발현을 감소시키거나 또는 제거하도록 miRNA를 포함하는 발현 카세트가 전달되는 세포 유형에 존재한다.

[0074] 전형적으로, miRNA 표적 서열은 적어도 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드 길이, 7개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 8개의 뉴클레오타이드 내지 18개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드 길이, 약 20개 내지 약 26개의 뉴클레오타이드, 약 22개의 뉴클레오타이드, 약 24개의 뉴클레오타이드 또는 약 26개의 뉴클레오타이드 길이이며, miRNA 시드 서열에 상보적인 적어도 하나의 연속 영역(예를 들어, 7개 또는 8개의 뉴클레오타이드)을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열은 일부 불일치가 있는 miRNA 시드 서열에 대해 정확한 상보성(100%) 또는 부분적 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열은 miRNA 시드 서열에 100% 상보적인 적어도 7개 내지 8개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열은 miRNA 시드 서열에 100% 상보적인 서열로 구성된다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열은 시드 서열에 100% 상보적인 서열의 다중 카피(예를 들어, 2개 또는 3개의 카피)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 100% 상보성 영역은 표적 서열의 길이의 적어도 30%를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열의 나머지는 miRNA에 대해 적어도 약 80% 내지 약 99%의 상보성을 갖는다. 소정의 실시형태에서, DNA 양성 가닥을 포함하는 발현 카세트에서, miRNA 표적 서열은 miRNA의 역 보체이다.

[0075] 소정의 실시형태에서, DRG에서 이식유전자의 발현을 억제하고/하거나 DRG 독성 및/또는 축삭병증을 감소시키거나 제거하기 위해 이식유전자에 작동 가능하게 연결된 miR-183 패밀리 또는 클러스터의 하나 이상의 구성원에 대한 miR 표적 서열의 적어도 하나의 카피를 포함하는 조작된 발현 카세트가 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 조작된 발현 카세트는 miRNA 표적 서열의 수가 DRG에서 이식유전자 발현을 감소시키거나 또는 최소

화하고/하거나 DRG 독성 및/또는 축삭병증을 제거하기에 충분하도록 다중 miRNA 표적 서열을 포함한다. 발현 카세트는 임의의 적합한 담체 시스템, 바이러스 벡터 또는 비-바이러스 벡터를 통해, 임의의 경로를 통해 전달될 수 있지만, 척수강내 투여에 특히 유용하다.

[0076] 예기치 않게, DRG에서 발현을 억제하기 위해 본 명세서에 기재된 miR-183 표적 서열을 포함하는 조성물은 뉴런(예를 들어, 추상 세포, 푸르키네 세포, 과립 세포, 방추 세포 및 신경간 세포 포함) 또는 아교 세포(예를 들어, 성상세포, 희소돌기 아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포 포함)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 중추 신경계 내의 하나 이상의 상이한 세포 유형(DRG 이외)에서 향상된 이식유전자 발현을 제공하는 것으로 관찰되었다. 이러한 관찰은 처음에 척수강내 전달 경로 후에 이루어졌지만, 이러한 발현-향상 효과는 CNS-전달 경로에 제한되지 않는다. 향상된 발현이 또한 정맥내 전달 후에 관찰되었으며, 다른 경로, 예를 들어, 정맥내(예를 들어, 특히 고용량 전달), 근육내(특히 고용량 전달) 또는 기타 전신 전달 경로를 사용하여 달성될 수도 있다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 miR-183 표적 서열을 포함하는 조성물은 심장 조직에서 향상된 이식유전자 발현을 제공한다. 예를 들어, 아래에 설명된 연구에서, 대조군 벡터와 비교하여 mir183-표적을 포함하는 벡터를 사용한 배측 경로 신경절에서 이식유전자 발현의 통계적으로 유의한 감소가 관찰되었다. 예기치 않게, 요추 운동 뉴런 및 소뇌에서 발현이 향상되었다. 소정의 실시형태에서, DRG 및/또는 8개의 다른 영역에 걸쳐 병리, 경추, 흉추 및 요추의 배측 척추 축삭병증 및 정중, 비골 및 요골 신경의 축삭병증의 감소가 달성될 수 있다.

[0077] 소정의 실시형태에서, (DRG 발현을 억제하면서) CNS 이식유전자의 발현을 향상시키는 것을 피하기 위해, CNS를 표적으로 하지 않는 이식유전자를 포함하는 발현 카세트에 대한 miR-182 표적 서열 및/또는 miR-96 표적 서열을 선택하기를 원할 수 있다. 예를 들어, 골격근 또는 간에 전달하기 위한 이식유전자를 포함하는 발현 카세트는 CNS 발현의 임의의 향상을 피하고자 할 수 있지만, 요구될 수 있는 고용량과 관련될 수 있는 DRG-독성 및/또는 축삭병증을 예방할 수 있다.

[0078] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-183 표적 서열인 적어도 하나의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 AGTGAATTCTACCAGTGCCATA(서열번호 1)를 포함하는 miR-183 표적 서열을 포함하며, 여기에서 miR-183 시드 서열에 상보적인 서열은 밑줄이 그어져 있다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-183 시드 서열에 100% 상보적인 서열의 하나 초과의 카피(예를 들어, 2개 또는 3개의 카피)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열은 약 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드 길이이며, miR-183 시드 서열에 적어도 100% 상보적인 적어도 하나의 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열은 서열번호 1에 부분적인 상보성을 갖는 서열을 포함하므로, 서열번호 1에 대해 정렬될 때, 하나 이상의 불일치가 있다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열은 서열번호 1에 대해 정렬될 때 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 불일치를 갖는 서열을 포함하되, 불일치는 비-연속적일 수 있다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열은 miR-183 표적 서열의 길이의 적어도 30%를 또한 포함하는 100% 상보성의 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 100% 상보성의 영역은 miR-183 시드 서열에 100% 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열의 나머지는 miR-183에 대해 적어도 약 80% 내지 약 99%의 상보성을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 절단된 서열번호 1, 즉, 서열번호 1의 5' 또는 3' 말단 중 하나 또는 둘 다에 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드가 결여되어 있는 서열을 포함하는 miR-183 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 및 하나의 miR-183 표적 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개 또는 적어도 7개 또는 적어도 8개의 miR-183 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 8개의 miR-183 표적 서열을 포함한다.

[0079] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miRNA 표적 서열의 조합을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 표적 서열의 조합은 동일한 miRNA(예컨대, miR-183)에 대해 적어도 부분적으로 상보성을 갖는 상이한 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 본 명세서에 제공되는 바와 같은 miR-183, miR-182 및/또는 miR-96 표적 서열로부터 선택되는 miRNA 표적 서열의 조합을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 및 2개, 3개 또는 4개의 miR-96 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 및 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개 또는 8개의 miR-182 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 8개의 miR-182 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miR-183 표적 서열을 선택적으로 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miR-182 표적 서열과 조합하여 그리고/또는 선택적으로 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miR-96 표적 서열과 조합하여 포함한다.

[0080] 이식유전자 및 miR-182를 포함하는 조성물은 후근 신경절 독성을 최소화하거나 또는 제거하고/하거나 축삭병증을 예방하는 것으로 관찰되었다. 그러나, 이러한 목적에 효과적이지만, miR-182 표적 서열을 포함하는 발현 카세트는 miR-183 표적 서열을 갖는 합성물에서 예기치 않게 발견된 바와 같이 CNS 발현을 향상시키는 것으로 관찰되지 않았다. 따라서, 이들 조성물은 CNS 외부에서 표적화되기 위해 바람직할 수 있다.

[0081] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 miR-183 패밀리 표적 서열을 포함하고 이식유전자가 결여되어 있는(즉, miR-183 패밀리 표적 서열(들)은 이종 유전자 산물을 암호화하는 서열에 작동 가능하게 연결되지 않음) 발현 카세트가 본 명세서에 제공된다.

[0082] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-182 표적 서열인 적어도 하나의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(서열번호 3)를 포함하는 miR-182 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-182 시드 서열에 100% 상보적인 서열의 하나 초과의 카피(예를 들어, 2개 또는 3개의 카피)를 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-182 표적 서열은 약 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드 길이이며, miR-182 시드 서열에 적어도 100% 상보적인 적어도 하나의 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-182 표적 서열은 서열번호 3에 부분적으로 상보성을 갖는 서열을 포함하므로, 서열번호 3에 대해 정렬될 때, 하나 이상의 불일치가 있다. 소정의 실시형태에서, miR-183 표적 서열은 서열번호 3에 대해 정렬될 때 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 불일치를 갖는 서열을 포함하되, 불일치는 비-연속적일 수 있다. 소정의 실시형태에서, miR-182 표적 서열은 miR-182 표적 서열의 길이의 적어도 30%를 또한 포함하는 100% 상보성 영역을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 100% 상보성의 영역은 miR-182 시드 서열에 100% 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, miR-182 표적 서열의 나머지는 miR-182에 대해 적어도 약 80% 내지 약 99%의 상보성을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 절단된 서열번호 3을 포함하는 miR-182 표적 서열, 즉, 서열번호 3의 5' 또는 3' 말단 중 하나 또는 둘 다에 적어도 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드가 결여되어 있는 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 및 하나의 miR-182 표적 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 적어도 2개, 3개 또는 4개의 miR-182 표적 서열을 포함한다.

[0083] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 스페이서에 의해 분리되지 않고 연속적인 2개 이상의 연속적인 miRNA 표적 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 2개 이상의 miRNA 표적 서열은 스페이서에 의해 분리된다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 약 1개 내지 약 12개의 뉴클레오타이드, 또는 약 2개 내지 약 10개의 뉴클레오타이드 길이, 또는 약 3개 내지 약 10개의 뉴클레오타이드, 약 4개 내지 약 6개의 뉴클레오타이드 길이 또는 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 11개의 뉴클레오타이드 길이의 논-코딩 서열이다. 선택적으로, 단일 발현 카세트는 3개 이상의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있으며, 선택적으로 그 사이에 상이한 스페이서 서열을 가질 수 있다. 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 스페이서는 (i) GGAT(서열번호 5); (ii) CACGTG(서열번호 6); 또는 (iii) GCATGC(서열번호 7)로부터 독립적으로 선택된다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 첫 번째 miRNA 표적 서열의 3'에 위치하고/하거나 마지막 miRNA 표적 서열의 5'에 위치한다. 소정의 실시형태에서, miRNA 표적 서열 사이의 스페이서는 동일하다.

[0084] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자 및 하나의 miR-183 표적 서열 및 하나 이상의 상이한 miRNA 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 miR-96 표적 서열을 포함한다: mRNA 및 DNA 양성 가닥(5'에서 3'): AGCAAAAATGTGCTAGTGCCAAA(서열번호 2); miR-182 표적 서열: mRNA 및 DNA 양성 가닥 (5'에서 3'): 및/또는 AGTGTGAGTTCTACCATTGCCAAA(서열번호 3).

[0085] miR-145는 문헌에서 뇌와 관련이 있지만, 현재까지의 연구에 따르면 miR-145 표적 서열은 후근 신경절에서 이식유전자 발현을 감소시키는데 효과가 없다. miR-145 표적 서열: mRNA 및 DNA 양성 가닥 (5'에서 3'): AGGGATTCCTGGGAAAACTGGAC(서열번호 4).

[0086] 본 명세서에 제공되는 바와 같이, 발현 카세트는 표적 세포에서 이식유전자의 발현 산물을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되거나 또는 이의 제어하에 있는 이식유전자를 함유한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 본 명세서에 제공된 하나 이상의 miRNA 표적 서열에 작동 가능하게 연결된 이식유전자를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트 또는 다중 miRNA 표적 서열을 포함하도록 설계되었다. miRNA 표적 서열은 이식유전자의 UTR(즉, 유전자 오픈 리딩 프레임의 3' 또는 하류)에 혼입된다.

[0087] 용어 "탠덤 반복부"는 2개 이상의 연속적인 miRNA 표적 서열의 존재를 지칭하기 위해 본 명세서에서 사용된다. 이러한 miRNA 표적 서열은 연속적일 수 있고, 즉, 하나의 3' 말단이 개재 서열 없이 다음의 5' 말단의 바로 상류에 오도록 서로 바로 뒤에 위치하거나 또는 그 반대의 경우도 마찬가지이다. 또 다른 실시형태에서, 2개 이상

의 miRNA 표적 서열은 짧은 스페이서 서열에 의해 분리된다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 "스페이서"는 2개 이상의 연속 miRNA 표적 서열 사이에 위치하는, 예를 들어, 1개, 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개의 뉴클레오타이드 길이의 임의의 선택된 핵산 서열이다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 1개 내지 8개의 뉴클레오타이드 길이, 2개 내지 7개의 뉴클레오타이드 길이, 3개 내지 6개의 뉴클레오타이드 길이, 4개의 뉴클레오타이드 길이, 4개 내지 9개의 뉴클레오타이드, 3개 내지 7개의 뉴클레오타이드 또는 더 긴 값이다. 적합하게는, 스페이서는 논-코딩 서열이다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 네(4)개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 GGAT이다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 여섯(6)개의 뉴클레오타이드이다. 소정의 실시형태에서, 스페이서는 CACGTG 또는 GCATGC이다.

[0089] 소정의 실시형태에서, 탠덤 반복부는 2개, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개 이상의 동일한 miRNA 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 탠덤 반복부는 서로 다를 수 있는 최대 8개의 miRNA 표적 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 탠덤 반복부는 적어도 2개의 상이한 miRNA 표적 서열, 적어도 3개의 상이한 miRNA 표적 서열 또는 적어도 4개의 상이한 miRNA 표적 서열 등을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 탠덤 반복부는 2개 또는 3개의 동일한 miRNA 표적 서열 및 상이한 네 번째 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다.

[0090] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트에는 적어도 2개의 상이한 탠덤 반복부 세트가 있을 수 있다. 예를 들어, 3' UTR은 이식유전자의 바로 하류에 탠덤 반복부, UTR 서열 및 UTR의 3' 말단에 더 가까운 2개 이상의 탠덤 반복부를 포함할 수 있다. 또 다른 예에서, 5' UTR은 1개, 2개 이상의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다. 또 다른 예에서 3'는 탠덤 반복부를 포함할 수 있고, 5' UTR은 적어도 하나의 miRNA 표적 서열을 포함할 수 있다.

[0091] 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자에 대한 종결 코돈의 약 0개 내지 20개의 뉴클레오타이드 내에서 시작하는 2개, 3개, 4개 이상의 탠덤 반복부를 포함한다. 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 이식유전자에 대한 종결 코돈으로부터 적어도 100개 내지 약 4000개의 뉴클레오타이드로부터 miRNA 탠덤 반복부를 포함한다.

[0092] 본 명세서에서 사용되는 "벡터 게놈"은 바이러스 벡터 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 일례에서, "벡터 게놈"은 최소한 5'에서 3'로, 벡터-특이적 서열, 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열 및 비번역 영역(들) 및 벡터-특이적 서열의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 예를 들어, AAV 벡터 게놈은 역 말단 반복 서열 및, 예를 들어, 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열 및 비번역 영역(들)의 miRNA 표적 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, miRNA 표적 서열은 이식유전자 발현이 바람직하지 않고(예를 들어, 후근 신경절)/않거나 감소된 수준의 이식유전자 발현이 요구되는 세포에서 miRNA 서열에 의해 특이적으로 인식되도록 설계된다.

[0093] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공되는 바와 같은 hIDUA 서열을 포함하는 벡터 게놈을 갖는 rAAV가 제공된다. 추가의 실시형태에서, 벡터 게놈은 서열번호 14 또는 서열번호 16을 포함한다. 각각에서, 벡터 게놈은 5' 및 3' ITR을 포함한다. 또한, 각각 프로모터, 인핸서, hIDUA 유전자 및 폴리A를 포함한다.

[0094] 본 명세서에 기재된 발현 카세트는 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해하여야 한다.

[0095] **벡터**

[0096] 일 양태에서, 기능적 hIUDA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 벡터가 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 hIDUA 코딩 서열을 전달하기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트를 포함한다.

[0097] 본 명세서에서 사용되는 "벡터"는 상기 핵산 서열의 복제 또는 발현을 위한 적절한 표적 세포에 도입될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 생물학적 또는 화학적 모이어티이다. 벡터의 예는 재조합 바이러스, 플라스미드, 리포플렉스, 폴리머솜, 폴리플렉스, 덴드리머, 세포 투과성 펩타이드(cell penetrating peptide: CPP) 접합체, 자성 입자 또는 나노입자를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 기능적 hIDUA를 암호화하는 조작된 핵산이 삽입된 다음 적절한 표적 세포에 도입될 수 있는 핵산 분자이다. 이러한 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제 기점, 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 종종 벡터가 있는 세포가, 예를 들어, 약물 저항성 유전자를 암호화하지 않는 세포로부터 선택될 수 있는 수단을 가지고 있다. 일반적인 벡터는 플라스미드, 바이러스 게놈 및 "인공 염색체"를 포함한다. 벡터의 생성, 생산, 특성화 또는 정량화의 종래의 방법은 당업자가 이용 가능하다.

[0098] 소정의 실시형태에서, 벡터는 본 명세서에 기재된 발현 카세트(예를 들어, "네이키드 DNA", "네이키드 플라스미

드 DNA", RNA 및 mRNA, 이는, 예를 들어, 미셀, 리포솜, 양이온성 지질 - 핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 기타 중합체, 지질 및/또는 콜레스테롤-기반-핵산 접합체를 포함하는 다양한 조성물 및 나노 입자와 커플링될 수 있음) 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 다른 작제물을 포함하는 비-바이러스 플라스미드이다. 예를 들어, 모두 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 문헌[X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787]; 웹 공개: 2011년 3월 21일; WO2013/182683, WO 2010/053572 및 WO 2012/170930 참조.

[0099] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터는 hIDUA를 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 바이러스 캡시드 또는 외피에 패키징된 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하는 "복제-결함 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"이되, 바이러스 캡시드 또는 외피 내에 또한 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제-결핍성이고; 즉, 이는 자손 비리온은 생성할 수 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력은 보유한다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제에 필요한 효소를 암호화하는 유전자를 포함하지 않지만(게놈은 "무기력(gutless)"하도록 조작될 수 있음 - 인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호의 측면에 있는 hIDUA를 암호화하는 핵산 서열만을 포함함), 이들 유전자는 생산 중에 공급될 수 있다. 따라서, 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재하지 않는 한 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 일어나지 않으므로, 유전자 요법에서 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

[0100] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 재조합 바이러스 벡터는 임의의 적합한 바이러스 벡터이다. 예는 예시적인 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV)를 제공한다. 다른 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어, 아데노바이러스, 폭스바이러스, 보카바이러스, 하이브리드 AAV/보카바이러스, 단순 포진 바이러스 또는 렌티바이러스를 포함할 수 있다. 바람직한 실시형태에서, 이들 재조합 바이러스는 복제 불능이다.

[0101] 발현 카세트는 임의의 적합한 비-바이러스 벡터 전달 시스템을 통해 또는 적합한 바이러스 벡터에 의해 전달될 수 있다. 적합한 비-바이러스 벡터 전달 시스템은 당업계에 공지되어 있고(예를 들어, 문헌[Ramamoorth and Narvekar. J Clin Diagn Res. 2015 Jan; 9(1):GE01-GE06] 참조, 참조에 의해 본 명세서에 원용됨), 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있으며, 예를 들어, 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 덴드리머, PLGA, 폴리메타크릴레이트, 무기 입자, 지질 입자, 중합체-기반 벡터 또는 키토산-기반 제형을 포함할 수 있다.

[0102] 소정의 실시형태에서, hIDUA 서열을 암호화하는 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 hIDUA-코딩 서열을 갖는 플라스미드를 포함한다.

[0103] 본 명세서에서 사용되는 용어 "숙주 세포"는 벡터(예를 들어, 재조합 AAV)가 생성되는 패키징 세포주를 지칭할 수 있다. 숙주 세포는 임의의 수단, 예를 들어, 전기천공, 칼슘 포스페이트 침전, 미세주입, 형질전환, 바이러스 감염, 형질감염, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합에 의해 세포 내로 도입된 외인성 또는 이종 DNA를 포함하는 원핵 또는 진핵 세포(예를 들어, 인간, 곤충 또는 효모)일 수 있다. 숙주 세포의 예는 단리된 세포, 세포 배양물, 대장균 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 비-포유동물 세포, 곤충 세포, HEK-293 세포, 간 세포, 신장 세포, 중추 신경계의 세포, 뉴런, 아교 세포 또는 줄기 세포를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다.

[0104] 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 단백질이 단리 또는 정제를 위해 시험관내에서 충분한 양으로 생산되도록 hIDUA의 생산을 위한 발현 카세트를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 숙주 세포는 hIDUA(예를 들어, 이의 기능적 단편을 포함)를 암호화하는 발현 카세트를 포함한다. 본 명세서에 제공되는 바와 같이, hIDUA 폴리펩타이드는 치료제(즉, 효소 대체 요법)로서 대상체에게 투여되는 약제학적 조성물에 포함될 수 있다.

[0105] 본 명세서에서 사용되는 용어 "표적 세포"는 기능적 hIDUA의 발현이 요구되는 임의의 세포를 지칭한다. 소정의 실시형태에서, 용어 "표적 세포"는 MPSI, 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군에 대해 치료되는 대상체의 세포를 지칭하도록 의도된다. 표적 세포의 예는 간 세포, 신장 세포, 위 근육 세포 및 뉴런을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 생체외에서 표적 세포에 전달된다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 생체내에서 표적 세포에 전달된다.

[0106] 본 명세서에 기재된 벡터의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0107] **재조합 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터**

[0108] 일 양태에서, AAV 캡시드 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)가 본 명세서에 제공된다.

[0109] 일 실시형태에서, 조절 서열은 위에 기재된 바와 같다. 일 실시형태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' 역 말단 반복(ITR), 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 일 실시형태에서, 벡터 게놈은 rAAV 벡터를 형성하는 rAAV 캡시드 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 이러한 핵산 서열은 발현 카세트의 측면에 있는 AAV 역 말단 반복 서열(ITR)을 포함한다. 일례에서, "벡터 게놈"은 최소한으로 5'에서 3'로, AAV 5' ITR, 표적 세포에서 발현을 지시하는 조절 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능적 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열 및 비번역 영역(들) 및 AAV 3' ITR의 miRNA 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, ITR은 AAV2로부터 유래하고, 캡시드는 상이한 AAV로부터 유래한다. 대안적으로, 다른 ITR이 사용될 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, miRNA 표적 서열은 이식유전자 발현이 바람직하지 않고/않거나 감소된 수준의 이식유전자 발현이 요구되는 세포에서 miRNA 서열에 의해 특이적으로 인식되도록 설계된다.

[0110] ITR은 벡터 생산 동안 게놈의 복제 및 패키징을 담당하는 유전적 요소이며, rAAV를 생성하는데 필요한 유일한 바이러스 시스(cis) 요소이다. 일 실시형태에서, ITR은 캡시드를 제공하는 것과는 다른 AAV로부터 유래한다. 바람직한 실시형태에서, AAV2로부터의 ITR 서열 또는 이의 결실된 버전(ITR)은 편의를 위해 그리고 규제 승인을 가속화하기 위해 사용될 수 있다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2이고 AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터 유래하는 경우, 생성된 벡터는 유사형이라고 할 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, NAGLU 코딩 서열 및 임의의 조절 서열 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이러한 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다. D-서열 및 말단 분해 부위(terminal resolution site: trs)가 결실된 ΔITR이라고 하는 5' ITR의 단축된 버전이 기재되어 있다. 다른 실시형태에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다.

[0111] 본 명세서에서 사용되는 용어 "AAV"는 자연 발생 아데노-관련 바이러스, 당업자가 이용 가능한 아데노-관련 바이러스 및/또는 본 명세서에 기재된 조성물(들) 및 방법(들)에 비추어볼 때 인공 AAV도 지칭한다. 아데노-관련 바이러스(AAV) 바이러스 벡터는 표적 세포로의 전달을 위한 AAV 역 말단 반복 서열(ITR)의 측면에 있는 발현 카세트에 패키징된 AAV 단백질 캡시드를 갖는 AAV DNase-저항성 입자이다. AAV 캡시드는 선택된 AAV에 따라 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비로 20면체 대칭으로 배열된 60개의 캡시드(cap) 단백질 서브유닛 VP1, VP2 및 VP3으로 구성된다. 다양한 AAV가 위에서 확인된 바와 같은 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 공급원으로서 선택될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 제2007/0036760 A1호; 미국 공개 제2009/0197338 A1호; EP 1310571 참조. 또한, WO 2003/042397(AAV7 및 다른 시미안 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), WO 2005/033321 및 미국 특허 제7,906,111호(AAV9) 및 WO 2006/110689 및 WO 2003/042397(rh.10) 참조. 이들 문서는 또한 AAV를 생성하기 위해 선택될 수 있는 다른 AAV를 기술하고 있으며, 이들은 참조에 의해 원용된다. 인간 또는 비-인간 영장류(NHP)로부터 단리되거나 또는 조작된 AAV 중에서 잘 특성화된, 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로 개발된 최초의 AAV이며; 이는 상이한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험을 위해 널리 사용되었다. 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 AAV 캡시드, ITR 및 기타 선택된 AAV 성분은 일반적으로 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAVrh10, AAVhu37, AAV7M8 및 AAVAnc80, AAVrh90(PCT/US20/30273, 2020년 4월 28일자로 출원됨), AAVrh91(PCT/US20/30266, 2020년 4월 28일자로 출원됨) 및 AAVrh92, rh93 및 rh91.93(PCT/US20/30281, 2020년 4월 28일자로 출원됨) 및 임의의 공지되거나 또는 언급된 AAV의 변이체, 또는 아직 발견되지 않은 AAV 또는 이의 변이체 또는 혼합물로 식별되는 AAV를 제한 없이 포함하는 임의의 AAV 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 WO 2005/033321 참조. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드 또는 이의 변이체이다. 소정의 실시형태에서, 캡시드 단백질은 rAAV 벡터의 이름에서 용어 "AAV" 다음에 오는 숫자 또는 숫자와 문자의 조합으로 지정된다.

[0112] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, AAV와 관련하여, 용어 "변이체"는 보존적 아미노산 치환을 갖는 것들과 아미노산 또는 핵산 서열에 대해 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 그 이상의 서열 동일성을 공유하는 것들을 포함하여 공지된 AAV 서열로부터 유래되는 임의의 AAV 서열을 의미한다. 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 임의의 기재되거나 또는 공지된 AAV 캡시드 서열로부터 최대 약 10%의 변이를 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본 명세서에 제공되고/되거나 당업계에 공지된 AAV 캡시드와 약 90%의 동일성 내지 약 99.9%의 동일성, 약 95% 내지 약 99%의 동일성 또는 약 97% 내지 약 98%의 동일성을 공유한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV 캡시드와 적어도 95%의 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 동일성 백분율을 결정할 때, 비교는 임의의 가변 단백질(예를 들어, vp1, vp2 또는 vp3)에 대해 이루어질 수 있다.

[0113] ITR 또는 다른 AAV 성분은 AAV로부터 당업자에 의해 이용 가능한 기법을 사용하여 쉽게 단리되거나 또는 조작될

수 있다. 이러한 AAV는 학문적, 상업적 또는 공공의 공급원(예를 들어, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(American Type Culture Collection), 버지니아주 머내서스 소재)으로부터 단리, 조작되거나 또는 얻어질 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌 또는, 예를 들어, GenBank, PubMed 등과 같은 데이터베이스에서 이용 가능한 것과 같은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적합한 수단을 통해 조작될 수 있다. AAV 바이러스는 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성의 최소화, 안정성 및 입자 수명의 조정, 효율적인 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 이러한 입자를 최적화할 수 있도록 하는 종래의 분자 생물학 기법에 의해 조작될 수 있다.

[0114] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 상호교환적으로 사용되는 용어 "rAAV" 및 "인공 AAV"는 제한 없이 캡시드 단백질 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하는 AAV를 의미하되, 벡터 게놈은 AAV에 이종성인 핵산을 포함한다. 일 실시형태에서, 캡시드 단백질은 비-자연 발생적 캡시드이다. 이러한 인공 캡시드는 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 상이한 선택된 AAV, 동일한 AAV의 비-연속 부분, 비-AAV 바이러스 공급원 또는 비-바이러스 공급원으로부터 얻어질 수 있는 이종 서열과 조합하여 사용하여 임의의 적합한 기법에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는 제한 없이 유사형 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드 또는 "인간화된" AAV 캡시드일 수 있다. 하나의 AAV의 캡시드가 이종 캡시드 단백질로 대체된 유사형 벡터가 본 발명에 유용하다. 일 실시형태에서, AAV2/5 및 AAV2/8은 예시적인 유사형 벡터이다. 선택된 유전적 요소는 형질감염, 전기천공, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 이러한 작제물을 제조하기 위해 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 당업자에게 공지되어 있으며, 유전자 공학, 재조합 공학 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)] 참조.

[0115] 본 명세서에서 사용되는 "AAV9 캡시드"는 (a) 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 GenBank 등록 번호: AAS99264의 아미노산 서열(AAV vp1 캡시드 단백질은 서열번호 19로 복제됨) 및/또는 (b) GenBank 등록 번호: AY530579.1: (1번...2211번 nt)(서열번호 18로 복제됨)의 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 아미노산 서열을 갖는 AAV9를 지칭한다. 이러한 암호화된 서열의 일부 변형은 본 발명에 포함되며, GenBank 등록 번호: AAS99264 및 US7906111(또한, WO 2005/033321)에 참조된 아미노산 서열과 약 99%의 동일성을 갖는 서열을 포함할 수 있다. 이러한 AAV는, 예를 들어, 천연 단리물(예를 들어, hu68, hu31 또는 hu32), 또는, 예를 들어, US 9,102,949, US 8,927,514, US 2015/349911; WO 2016/049230A11; US 9,623,120; US 9,585,971에 기술된 것과 같은, 예를 들어, AAV9 캡시드로 정렬된 임의의 다른 AAV 캡시드에서 상응하는 위치로부터 "동원된" 대체 잔기로부터 선택되는 아미노산 치환을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 아미노산 치환, 결실 또는 부가를 갖는 AAV9의 변이체를 포함할 수 있다. 그러나, 다른 실시형태에서, AAV9의 다른 변이체 또는 위에 참조된 서열에 대해 적어도 약 95%의 동일성을 갖는 AAV9 캡시드가 선택될 수 있다. 예를 들어, 미국 공개 제2015/0079038호 참조. 캡시드, 이를 위한 코딩 서열을 생성하는 방법 및 rAAV 바이러스 벡터를 생성하는 방법이 기재되어 있다. 예를 들어, 문헌[Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)] 및 US 2013/0045186A1 참조.

[0116] AAVhu68은 vp1, 서열번호 9의 67번 및 157번 위치의 2개의 암호화된 아미노산에 의해 다른 클레이드 F 바이러스 AAV9와 다르다. 대조적으로, 다른 클레이드 F AAV(AAV9, hu31, hu31)는 67번 위치에 Ala가 있고, 157번 위치에 Ala가 있다. 서열번호 9의 넘버링에 기초하여 157번 위치에 발린(Val 또는 V), 및 선택적으로 67번 위치에 글루탐산(Glu 또는 E)을 갖는 신규한 AAVhu68 캡시드 및/또는 조작된 AAV 캡시드가 제공된다. 또한, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 WO 2018/160582(서열 목록을 포함) 참조.

[0117] 본 명세서에서 사용되는 용어 "클레이드(Clade)"는 AAV의 그룹과 관련하여 AAV vp1 아미노산 서열의 정렬에 기초하여, 적어도 75%(적어도 1000개의 복제물 중)의 부트스트랩 값(bootstrap value) 및 0.05 이하의 포아송 보정 거리 측정치(Poisson correction distance measurement)에 의한 이웃-결합 알고리즘(Neighbor-Joining algorithm)을 사용하여 결정되는 바와 같이 서로 계통 발생학적으로 관련된 AAV의 그룹을 지칭한다. 이웃-결합 알고리즘은 문헌에 기술되어 있다. 예를 들어, 문헌[M. Nei and S. Kumar, Molecular Evolution and Phylogenetics (Oxford University Press), New York (2000)] 참조. 이 알고리즘을 구현하는데 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 예를 들어, MEGA v2.1 프로그램 수정된 네이-고조보리(Nei-Gojobori) 방법을 구현한다. 이들 기법 및 컴퓨터 프로그램 및 AAV vp1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당업자는 선택된 AAV가 본 명세서에서 확인된 클레이드 중 하나에 또는 또 다른 클레이드에 포함되는지 또는 이러한 클레이드에 포함되지 않는지를 쉽게 결정할 수 있다. 예를 들어, 문헌[G Gao, et al, J Virol, 2004 Jun; 78(10: 6381-6388] 참조(이는 클레이드 A, B, C, D, E 및 F를 식별하고, 신규한 AAV의 핵산 서열, GenBank 등록 번호

AY530553 내지 AY530629를 제공함). 또한, WO 2005/033321 참조.

[0118] 소정의 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 다음 중 하나 이상을 추가로 특징으로 한다. AAVhu68 캡시드 단백질은 다음을 포함한다: 서열번호 9의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 AAVhu68 vp1 단백질, 서열번호 9로부터 생성된 vp1 단백질 또는 서열번호 9의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 8과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp1 단백질; 서열번호 9의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 AAVhu68 vp2 단백질, 서열번호 8의 적어도 412번 내지 2211번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp2 단백질 또는 서열번호 9의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 8의 적어도 412번 내지 2211번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp2 단백질 및/또는 서열번호 9의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 AAVhu68 vp3 단백질, 서열번호 8의 적어도 607번 내지 2211번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp3 단백질 또는 서열번호 9의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 8의 적어도 607번 내지 2211번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성되는 vp3 단백질.

[0119] AAVhu68 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 전형적으로 서열번호 9(1번 내지 736번 아미노산)의 전장 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 동일한 핵산 서열에 의해 암호화되는 대안적 스플라이스 변이체로서 발현된다. 선택적으로 vp1-암호화 서열은 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 발현하기 위해 단독으로 사용된다. 대안적으로, 이러한 서열은 vp1-고유 영역(약 1번 aa 내지 약 137번 aa) 및/또는 vp2-고유 영역(약 1번 aa 내지 약 202번 aa)이 없는 서열번호 9(약 203번 내지 736번 aa)의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열, 또는 이에 상보적인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 8의 약 607번 nt 내지 약 2211번 nt), 또는 서열번호 9의 203번 내지 736번 aa를 암호화하는 서열번호 8과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열 중 하나 이상과 공동 발현될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, vp1-암호화 및/또는 vp2-암호화 서열은 vp1-고유 영역(약 1번 내지 약 137번 aa)이 없는 서열번호 9(약 138번 내지 736번 aa)의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열, 또는 이에 상보적인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 8의 412번 내지 22121번 nt), 또는 서열번호 9의 약 138번 내지 736번 aa를 암호화하는 서열번호 8과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열과 공동 발현될 수 있다.

[0120] 본 명세서에 기재된 바와 같이, rAAVhu68은 서열번호 9의 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 핵산으로부터의 캡시드를 발현하는 생산 시스템에서 생산된 rAAVhu68 캡시드 및 선택적으로, 예를 들어, vp1 및/또는 vp2-고유 영역이 없는 vp 3 단백질을 암호화하는 추가적인 핵산 서열을 갖는다. 단일 핵산 서열 vp1을 사용한 생산으로부터 생성된 rAAVhu68은 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질의 이종 집단을 생성한다. 보다 구체적으로, AAVhu68 캡시드는 vp1 단백질 내, vp2 단백질 내 및 vp3 단백질 내에 하위집단을 포함하며, 이는 서열번호 9에서 예측된 아미노산 잔기로부터의 변형을 갖는다. 이러한 하위집단은 최소한 탈아마이드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴 - 글리신 쌍의 아스파라긴은 고도로 탈아마이드화된다.

[0121] 일 실시형태에서, AAVhu68 vp1 핵산 서열은 서열번호 8의 서열 또는 이에 상보적인 가닥, 예를 들어, 상응하는 mRNA 또는 tRNA를 갖는다. 소정의 실시형태에서, vp2 및/또는 vp3 단백질은, 예를 들어, 선택된 발현 시스템에서 vp 단백질의 비를 변경하기 위해 vp1과 상이한 핵산 서열로부터 추가적으로 또는 대안적으로 발현될 수 있다. 소정의 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 1번 aa 내지 약 137번 aa) 및/또는 vp2-고유 영역(약 1번 aa 내지 약 202번 aa)가 없는 서열번호 9(약 203번 내지 736번 aa)의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열, 또는 이에 상보적인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 8의 약 607번 nt 내지 약 2211번 nt)가 또한 제공된다. 소정의 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 1번 내지 약 137번 aa)이 없는 서열번호 9(약 138번 내지 736번 aa)의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열, 또는 이에 상보적인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 8의 412번 내지 2211번 nt)가 또한 제공된다.

[0122] 그러나, 서열번호 9의 아미노산 서열을 암호화하는 다른 핵산 서열이 rAAVhu68 캡시드를 생성하는데 사용하기 위해 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 8의 핵산 서열, 또는 서열번호 9를 암호화하는 서열번호 8과 적어도 70% 내지 99% 동일한, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 8의 핵산 서열, 또는 서열번호 9의 vp2 캡시드 단백질(약 138번 내지 736번 aa)을 암호화하는 서열번호 8의 약 412번 nt 내지 약 2211번 nt와 적어도 70% 내지 99%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도

97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 8의 약 607번 nt 내지 약 2211번 nt의 핵산 서열, 또는 서열번호 9의 vp3 캡시드 단백질(약 203번 내지 736번 aa)을 암호화하는 서열번호 8과 적어도 70% 내지 99%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0123] 소정의 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 핵산 서열 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 변형(예를 들어, 탈아마이드화된 아미노산)을 갖는 서열번호 9의 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 것과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 사용하여 생성된다. 소정의 실시형태에서, vp1 아미노산 서열은 서열번호 9로 복제된다.

[0124] vp 캡시드 단백질을 언급하기 위해 사용되는 경우, 본 명세서에서 사용되는 용어 "이종" 또는 임의의 이의 문법적 변형은 동일하지 않은 요소로 구성된, 예를 들어, 상이한 변형된 아미노산 서열을 갖는 vp1, vp2 또는 vp3 단량체(단백질)를 갖는 집단을 지칭한다. 서열번호 9는 AAVhu68 vp1 단백질의 암호화된 아미노산 서열을 제공한다. vp1, vp2 및 vp3 단백질(대안적으로 동형이라 함)과 관련하여 사용되는 용어 "이종"은 캡시드 내 vp1, vp2 및 vp3 단백질의 아미노산 서열의 차이를 지칭한다. AAV 캡시드는 vp1 단백질 내, vp2 단백질 내 및 vp3 단백질 내에 예측된 아미노산 잔기로부터 변형이 있는 하위집단을 포함한다. 이들 하위집단은 최소한 소정의 탈아마이드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 소정의 하위집단은 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴(N) 위치를 포함하고, 선택적으로 다른 탈아마이드화된 아미노산을 추가로 포함하되, 탈아마이드화는 아미노산 변화 및 다른 선택적 변형을 초래한다.

[0125] 본 명세서에서 사용되는 vp 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한 적어도 하나의 정의된 공통된 특성을 갖고, 참조 그룹의 모든 구성원보다 적은 적어도 하나의 그룹 구성원으로 구성된 vp 단백질의 그룹을 지칭한다.

[0126] 예를 들어, vp1 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한 조립된 AAV 캡시드에서 적어도 하나(1)의 vp1 단백질이고, 모든 vp1 단백질보다 적다. vp3 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한 조립된 AAV 캡시드에서 모든 vp3 단백질보다 적은 하나(1)의 vp3 단백질일 수 있다. 예를 들어, vp1 단백질은 vp 단백질의 하위집단일 수 있고; vp2 단백질은 vp 단백질의 별도의 하위집단일 수 있으며, vp3은 조립된 AAV 캡시드에서 vp 단백질의 추가의 하위집단이다. 또 다른 예에서, vp1, vp2 및 vp3 단백질은, 예를 들어, 아스파라긴 - 글리신 쌍에서, 상이한 변형, 예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴을 갖는 하위집단을 포함할 수 있다.

[0127] 달리 명시되지 않는 한, 고도로 탈아마이드화된 것은 참조 아미노산 위치에서 예측된 아미노산 서열과 비교하여 참조 아미노산 위치에서 적어도 45% 탈아마이드화된, 적어도 50% 탈아마이드화된, 적어도 60% 탈아마이드화된, 적어도 65% 탈아마이드화된, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 최대 약 100% 탈아마이드화된 것을 지칭한다(예를 들어, 서열번호 9[AAVhu68]의 넘버링을 기준으로 57번 아미노산에서 아스파라긴의 적어도 80%는 총 vp1 단백질을 기준으로 탈아마이드화될 수 있고, 총 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 기준으로 탈아마이드화될 수 있음). 이러한 백분율은 2D-겔, 질량 분석 기법 또는 다른 적합한 기법을 사용하여 결정될 수 있다.

[0128] AAVhu68 캡시드 단백질에서, 4개의 잔기(N57, N329, N452, N512)는 일상적으로 다양한 로트에 걸쳐 70% 초과의 탈아마이드화 수준 그리고 대부분의 경우 90% 초과의 수준을 나타낸다. 추가적인 아스파라긴 잔기(N94, N253, N270, N304, N409, N477 및 Q599)는 또한 다양한 로트에 걸쳐 약 20%의 탈아마이드화 수준을 나타낸다. 탈아마이드화 수준은 처음에 트립신 소화를 사용하여 확인되었고, 케모트립신 소화로 검증되었다.

[0129] AAVhu68 캡시드는 vp1 단백질 내, vp2 단백질 내 및 vp3 단백질 내에 서열번호 9의 예측된 아미노산 잔기로부터 변형이 있는 하위집단을 포함한다. 이러한 하위집단은 최소한 소정의 탈아마이드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 소정의 하위집단은 서열번호 9의 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴(N) 위치를 포함하고, 선택적으로 다른 탈아마이드화된 아미노산을 추가로 포함하되, 탈아마이드화는 아미노산 변화 및 다른 선택적 변형을 초래한다.

[0130] 소정의 실시형태에서, AAVrh91 캡시드를 갖는 rAAV가 제공된다. AAVrh91 캡시드를 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 27에 제공되며, 암호화된 아미노산 서열은 서열번호 28에 제공된다. AAVrh91(서열번호 28)의 vp1, vp2 및 vp3 중 적어도 하나를 포함하는 rAAV가 본 명세서에 제공된다. AAVrh91(서열번호 27)의 vp1, vp2 및 vp3 중 적어도 하나에 의해 암호화되는 AAV 캡시드를 포함하는 rAAV가 또한 본 명세서에 제공된다. 또 다른 실시형태에서, AAVrh91 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 29에 제공되며, 암호화된 아미노산

서열은 서열번호 28에 제공된다. AAVrh91eng(서열번호 29)의 vp1, vp2 및 vp3 중 적어도 하나에 의해 암호화되는 AAV 캡시드를 포함하는 rAAV가 또한 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, vp1, vp2 및/또는 vp3 AAVrh91(서열번호 28)의 전장 캡시드 단백질이다. 다른 실시형태에서, vp1, vp2 및/또는 vp3은 N-말단 및/또는 C-말단 절단(예를 들어, 약 1개 내지 약 10개의 아미노산의 절단(들))을 갖는다.

[0131] 소정의 실시형태에서, 다음을 포함하는 rAAV가 제공된다: (A) (1) 서열번호 28의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 vp1 단백질; 서열번호 27로부터 생성된 vp1 단백질, 또는 서열번호 28의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 27과 서열 적어도 70% 동일한 핵산으로부터 생성된 vp1 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp1 단백질의 이종 집단; 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 vp2 단백질, 서열번호 27의 적어도 412번 내지 2208번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp2 단백질, 또는 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 27의 적어도 412번 내지 2208번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp2 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp2 단백질의 이종 집단; 서열번호 28의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 vp3 단백질, 서열번호 27의 적어도 607번 내지 2208번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp3 단백질, 또는 서열번호 28의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 27의 적어도 607번 내지 2208번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp3 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp3 단백질의 이종 집단을 포함하는 AAVrh91 캡시드 단백질; 및/또는 (2) 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp1 단백질의 이종 집단, 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp2 단백질의 이종 집단 및 서열번호 28의 적어도 203번 내지 736번 아미노산을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp3 단백질의 이종 집단 중 하나 이상을 포함하는 AAVrh91 캡시드로서, 여기에서 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 서열번호 28의 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 적어도 2개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴(N)을 포함하며 선택적으로 다른 탈아마이드화된 아미노산을 포함하는 하위집단을 추가로 포함하는 아미노산 변형이 있는 하위집단을 포함하고, 탈아마이드화는 아미노산 변화를 초래하는, 상기 AAVrh91 캡시드; 및 (B) AAVrh91 캡시드 내의 벡터 게놈으로서, 벡터 게놈은 AAV 역 말단 반복 서열을 포함하는 핵산 분자 및 숙주 세포에서 생성물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 생성물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는, 상기 AAVrh91 캡시드 내의 벡터 게놈.

[0132] 또 다른 실시형태에서, 다음을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스 rAAV가 제공된다: (A) (1)서열번호 28의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 vp1 단백질, 서열번호 29로부터 생성된 vp1 단백질 또는 서열번호 28의 1번 내지 736번의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 28과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp1 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp1 단백질의 이종 집단; 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해 생성된 vp2 단백질, 서열번호 29의 적어도 412번 내지 2208번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp2 단백질 또는 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 29의 적어도 412번 내지 2208번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp2 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp2 단백질의 이종 집단; 서열번호 28의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 발현으로부터 생성된 vp3 단백질, 서열번호 29의 적어도 607번 내지 2208번 뉴클레오타이드를 포함하는 서열로부터 생성된 vp3 단백질 또는 서열번호 28의 적어도 약 203번 내지 736번 아미노산의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 28의 적어도 607번 내지 2208번 뉴클레오타이드와 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생성된 vp3 단백질로부터 선택되는 AAVrh91 vp3 단백질의 이종 집단을 포함하는 AAVrh91 캡시드 단백질; 및/또는 (2) 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp1 단백질의 이종 집단, 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp2 단백질의 이종 집단 및 서열번호 28의 적어도 203번 내지 736번 아미노산을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp3 단백질의 이종 집단 중 하나 이상을 포함하는 AAVrh91 캡시드로서, 여기에서 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 서열번호 28의 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 적어도 2개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴(N)을 포함하며 선택적으로 다른 탈아마이드화된 아미노산을 포함하는 하위집단을 추가로 포함하는 아미노산 변형이 있는 하위집단을 포함하고, 탈아마이드화는 아미노산 변화를 초래하는, 상기 AAVrh91 캡시드; 및 (B) AAVrh91 캡시드의 벡터 게놈으로서, 벡터 게놈은 AAV 역 말단 반복 서열을 포함하는 핵산 분자 및 숙주 세포에서 생성물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 생성물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는, 상기 AAVrh91 캡시드의 벡터 게놈.

[0133] 소정의 실시형태에서, 제공된 rAAV는 서열번호 28의 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 적어도 2개의 고도로 탈아마이드화된 아스파라긴(N)을 포함하며 선택적으로 다른 탈아마이드화된 아미노산을 포함하는 하위집단을 추가로 포함하는 아미노산 변형이 있는 AAVrh91 vp1, vp2 및 vp3 하위집단을 갖되, 탈아마이드화는 아미노산 변화를 초래한다. 서열번호 28의 번호에 대해 N-G 쌍 N57, N383 및/또는 N512에서 높은 수준의 탈아마이드화가 관찰된다. 소정의 실시형태에서, AAVrh91은, 예를 들어, 전형적으로 10% 미만으로 탈아마이드화된 다른 잔기를 가질 수 있고/있거나 인산화(예를 들어, 존재하는 경우, 약 2% 내지 약 30%, 또는 약 2% 내지 약 20% 또는 약 2 내지 약 10%의 범위)(예를 들어, S149에서) 또는 산화(예를 들어, 약 W22, 약 M211, W247, M403, M435, M471, W478, W503, 약 M537, 약 M541, 약 M559, 약 M599, M635 및/또는 W695 중 하나 이상에서)를 포함한 다른 변형을 가질 수 있다. 선택적으로 W는 카이누레닌으로 산화될 수 있다.

AAVrh91 탈아마이드화

VP1 넘버링을 기준으로 한 AAVrh91 탈아마이드화	탈아마이드화 %
N57+탈아마이드화	65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 또는 90-100
N94+탈아마이드화	2-15 또는 2-5
N303+탈아마이드화	2-15 또는 5-10
N383+탈아마이드화	65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 또는 90-100
N497+탈아마이드화	2-15 또는 5-10
N512+탈아마이드화	65-90, 70-95, 80-95, 75-100, 80-100 또는 90-100
약 N691+탈아마이드화	2-15, 2-10 또는 5-10

[0134]

[0135] 소정의 실시형태에서, AAVrh91 캡시드는 트립신 효소를 이용한 질량 분석을 사용하여 결정된 바와 같이 제공된 범위에서 선행하는 표에서 확인된 위치 중 하나 이상이 변형된다. 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 위치 또는 N 다음의 글리신이 본 명세서에 기재된 바와 같이 변형된다. 잔기 번호는 본 명세서에 제공된 AAVrh91 서열을 기준으로 한다. 서열번호 28 참조.

[0136] 소정의 실시형태에서, AAVrh91 캡시드는 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp1 단백질의 이종 집단, 서열번호 28의 적어도 약 138번 내지 736번 아미노산의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp2 단백질의 이종 집단 및 서열번호 28의 적어도 203번 내지 736번 아미노산을 암호화하는 핵산 서열의 생성물인 vp3 단백질의 이종 집단을 포함한다.

[0137] 소정의 실시형태에서, AAVrh91 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 27에 제공된다. 다른 실시형태에서, 서열번호 27에 대해 70% 내지 99.9%의 동일성을 갖는 핵산 서열이 AAVrh91 캡시드 단백질을 발현하도록 선택될 수 있다. 소정의 다른 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 27과 적어도 약 75% 동일, 적어도 80% 동일, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 동일 또는 적어도 99% 내지 99.9% 동일하다. 그러나, 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 다른 핵산 서열이 rAAV 캡시드를 생성하는데 사용하기 위해 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 27의 핵산 서열, 또는 서열번호 28을 암호화하는 서열번호 27과 적어도 70% 내지 99.9% 동일한, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 27의 핵산 서열, 또는 서열번호 28의 vp2 캡시드 단백질(약 138번 내지 736 aa)을 암호화하는 서열번호 27의 약 412번 nt 내지 약 2208번 nt와 적어도 70% 내지 99.9%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 27의 약 607번 nt 내지 약 2208번 nt의 핵산 서열, 또는 서열번호 28의 vp3 캡시드 단백질(약 203번 내지 736번 aa)을 암호화하는 서열번호 27의 607번 nt 내지 약 2208번 nt와 적어도 70% 내지 99.9%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0138] 소정의 실시형태에서, AAVrh91 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 29에 제공된다. 다른 실시형태에서, 서열번호 29에 대해 70% 내지 99.9%의 동일성을 갖는 핵산 서열이 AAVrh91 캡시드 단백질을 발현하도록 선택될 수 있다. 소정의 다른 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 29와 적어도 약 75% 동일, 적어도 80% 동일, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 동일 또는 적어도 99% 내지 99.9% 동일하다. 그러나, 서열번호 28의 아미노산 서열을 암호화하는 다른 핵산 서열이 rAAV 캡시드를 생성하는데 사용하기 위해 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 29의 핵산 서열, 또는 서열번호 28을 암호화하는 서열번

호 29와 적어도 70% 내지 99.9% 동일한, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 29의 핵산 서열, 또는 서열번호 28의 vp2 캡시드 단백질(약 138번 내지 736번 aa)을 암호화하는 서열번호 29의 약 412번 nt 내지 약 2208번 nt와 적어도 70% 내지 99.9%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 소정의 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 29의 약 607번 nt 내지 약 2208번 nt의 핵산 서열, 또는 서열번호 28의 vp3 캡시드 단백질(약 203번 내지 736번 aa)을 암호화하는 서열번호 29의 607번 nt 내지 약 2208번 nt와 적어도 70% 내지 99.9%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0139] 본 발명은 또한 AAVrh91 캡시드 서열(서열번호 28) 또는 돌연변이체 AAVrh91을 암호화하는 핵산 서열을 포함하며, 여기서 하나 이상의 잔기는 탈아마이드화 또는 본 명세서에서 확인된 다른 변형을 감소시키기 위해 변경되었다. 이러한 핵산 서열은 돌연변이체 AAVrh91 캡시드의 생산에 사용될 수 있다.

[0140] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV는 자가-상보적 AAV이다. 약어 "sc"는 자가-상보적을 지칭한다. "자가-상보적 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열에 의해 운반되는 코딩 영역이 분자내 이중-가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 감염시, 두 번째 가닥의 세포 매개성 합성을 기다리는 대신, scAAV의 두 개의 상보적인 반쪽이 회합하여 즉각적인 복제 및 전사를 위해 준비된 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 단위를 형성할 것이다. 예를 들어, 문헌[D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254] 참조. 자가-상보적 AAV는, 예를 들어, 각각이 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 미국 특허 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기술되어 있다.

[0141] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 rAAV는 뉴클레이스-저항성이다. 이러한 뉴클레이스는 단일 뉴클레이스 또는 뉴클레이스의 혼합물일 수 있고, 엔도뉴클레이스 또는 엑소뉴클레이스일 수 있다. 뉴클레이스-저항성 rAAV는 AAV 캡시드가 완전히 조립되고, 생산 과정에서 존재할 수 있는 오염 핵산을 제거하도록 설계된 뉴클레이스 인큐베이션 단계 동안 분해(소화)로부터 이러한 패키징된 게놈 서열을 보호한다는 것을 나타낸다. 많은 경우에, 본 명세서에 기재된 rAAV는 DNase 저항성이다.

[0142] 본 명세서에 기재된 rAAV의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0143] **rAAV.hIDUA 바이러스 입자의 생산**

[0144] 본 발명은 본 명세서에 기재된 rAAV.hIDUA 약제학적 조성물 및 제형의 제조를 제공한다. 본 명세서에 기재된 유전자 요법 벡터의 제조 방법은 유전자 요법 벡터의 생성을 위해 사용되는 플라스미드 DNA의 생성, 벡터의 생성 및 벡터의 정제와 같은 당업계에 잘 알려진 방법을 포함한다.

[0145] 본 명세서에 기재된 재조합 아데노-관련 바이러스(AAV)는 공지된 기법을 사용하여 생성될 수 있다. 예를 들어, WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2 참조. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 암호화하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역 말단 반복부(ITR)의 측면에 있는 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트; 및 발현 카세트를 AAV 캡시드 단백질로 패키징할 수 있게 하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 또한, AAV 캡시드를 암호화하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; 기재된 바와 같은 벡터 게놈; 및 벡터 게놈을 AAV 캡시드 단백질로 패키징할 수 있게 하는데 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포가 본 명세서에 제공된다. 일 실시형태에서, 숙주 세포는 HEK 293 세포이다. 이러한 방법은 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 WO2017160360 A2에 보다 상세히 기술되어 있다.

[0146] 일부 실시형태에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고, 생성된 플라스미드는 AAV 게놈 및 관심 유전자를 암호화하는 AAV 시스-플라스미드, AAV rep 및 cap 유전자를 포함하는 AAV 트랜스-플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드이다. 벡터 생성 과정은 세포 배양의 개시, 세포의 계대, 세포의 시딩, 플라스미드 DNA를 이용한 세포의 형질감염, 형질감염 후 무혈청 배지로의 배지 교환 및 벡터-함유 세포와 배양 배지의 수확과 같은 방법 단계를 포함할 수 있다. 수확된 벡터-함유 세포 및 배양 배지는 본 명세서에서 미정제 세포 수확물로 지칭된다.

[0147] 미정제 세포 수확물은 벡터 수확물의 농축, 벡터 수확물의 정용여과, 벡터 수확물의 미세유동화, 벡터 수확물의 뉴클레이스 소화, 미세유동화된 중간체의 여과, 크로마토그래피에 의한 미정제물 정제, 초원심분리에 의한 미정제물 정제, 접선 유동 여과에 의한 완충액 교환 및/또는 벌크 벡터를 제조하기 위한 제형화 및 여과와 같은 이

후 대상 방법 단계일 수 있다.

[0148] 높은 염 농도에서 2-단계 친화성 크로마토그래피 정제 후 음이온 교환 수지 크로마토그래피를 사용하여 벡터 약품을 정제하고 빈 캡시드를 제거한다. 이러한 방법은 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 "Scalable Purification Method for AAV9"라는 명칭의 WO 2017/160360에 보다 상세히 기술되어 있다. 간략하게는, 게놈-결핍 AAV9 중간체로부터의 패키징된 게놈 서열을 갖는 rAAV9 입자를 분리하는 방법은 재조합 AAV9 바이러스 입자 및 AAV9 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액을 고속 액체 크로마토그래피에 적용하는 단계를 포함하되, AAV9 바이러스 입자 및 AAV9 중간체는 pH 10.2에서 평형화된 강력한 음이온 교환 수지에 결합되고, 약 260 및 약 280에서 자외선 흡광도에 대해 용리액을 모니터링하면서 염 구배를 적용하였다. rAAV9에 대해 덜 최적이지만, pH는 약 10.0 내지 10.4의 범위일 수 있다. 이 방법에서, AAV9 전체 캡시드는 A260/A280의 비가 변곡점에 도달할 때 용리되는 분획으로부터 수집된다. 일례에서, 친화성 크로마토그래피 단계의 경우, 정용여과된 생성물은 AAV2/9 혈청형을 효율적으로 포획하는 Capture Select™ Poros-AAV2/9 친화성 수지(라이프 테크놀로지스)에 적용될 수 있다. 이러한 이온 조건하에서, 상당한 백분율의 잔류 세포 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해 흐르고, AAV 입자가 효율적으로 포획된다.

[0149] 당업자가 이용할 수 있는 rAAV를 생산하는 다른 방법이 이용될 수 있다. 적합한 방법은 제한 없이 바큘로바이러스 발현 시스템 또는 효모를 통한 생산을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Robert M. Kotin, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15; 20(R1): R2-R6. Published online 2011 Apr 29. doi: 10.1093/hmg/ddr141; Aucoin MG et al., Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. Biotechnol Bioeng. 2006 Dec 20;95(6):1081-92; SAMI S. THAKUR, Production of Recombinant Adeno-associated viral vectors in yeast. Thesis presented to the Graduate School of the University of Florida, 2012; Kondratov O et al. Direct Head-to-Head Evaluation of Recombinant Adeno-associated Viral Vectors Manufactured in Human versus Insect Cells, Mol Ther. 2017 Aug 10. pii: S1525-0016(17)30362-3. doi: 10.1016/j.ymthe.2017.08.003. [Epub ahead of print]; Mietzsch M et al, OneBac 2.0: Sf9 Cell Lines for Production of AAV1, AAV2, and AAV8 Vectors with Minimal Encapsidation of Foreign DNA. Hum Gene Ther Methods. 2017 Feb;28(1):15-22. doi: 10.1089/hgtb.2016.164.; Li L et al. Production and characterization of novel recombinant adeno-associated virus replicative-form genomes: a eukaryotic source of DNA for gene transfer. PLoS One. 2013 Aug 1;8(8):e69879. doi: 10.1371/journal.pone.0069879. Print 2013; Galibert L et al, Latest developments in the large-scale production of adeno-associated virus vectors in insect cells toward the treatment of neuromuscular diseases. J Invertebr Pathol. 2011 Jul;107 Suppl:S80-93. doi:10.1016/j.jip.2011.05.008; 및 Kotin RM, Large-scale recombinant adeno-associated virus production. Hum Mol Genet. 2011 Apr 15;20(R1):R2-6. doi: 10.1093/hmg/ddr141. Epub 2011 Apr 29] 참조.

[0150] rAAV의 특성화 또는 정량화를 위한 종래의 방법은 당업자가 이용할 수 있다. 빈 및 전체 입자 함량을 계산하기 위해, 선택된 샘플(예를 들어, 본 명세서의 예에서, GC의 # = 입자의 #인 아이오딕사놀 구배-정제된 제제)에 대한 VP3 밴드 부피는 로딩된 GC 입자에 대해 플로팅된다. 생성된 선형 방정식(y = mx+c)은 테스트 물품 피크의 밴드 부피에 있는 입자의 수를 계산하는데 사용된다. 로딩된 20㎕당 입자(pt)의 수에 50을 곱하여 입자(pt)/㎖를 얻는다. Pt/㎖를 GC/㎖로 나누어 입자 대 게놈 카피(pt/GC)의 비를 얻는다. Pt/㎖에서 GC/㎖를 빼서 빈 pt/㎖를 얻는다. 빈 pt/㎖를 pt/㎖로 나누고 100을 곱하여 빈 입자의 백분율을 얻는다. 일반적으로, 빈 캡시드 및 패키징된 게놈을 갖는 AAV 벡터 입자에 대한 검정 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Grimm et al., Gene Therapy (1999) 6:1322-1330; Sommer et al., Molec. Ther. (2003) 7:122-128] 참조. 변성된 캡시드를 테스트하기 위해, 방법은 처리된 AAV 스톡을 3개 캡시드 단백질을 분리할 수 있는 임의의 겔, 예를 들어, 완충액 중 3% 내지 8%의 Tris-아세테이트를 포함하는 구배 겔로 구성되는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동에 적용하는 단계, 샘플 물질이 분리될 때까지 겔에 전개하는 단계 및 나일론 또는 나이트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론에 겔을 블로팅하는 단계를 포함한다. 그런 다음, 항-AAV 캡시드 항체는 변성된 캡시드 단백질, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단일클론 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단일클론 항체에 결합하는 1차 항체로서 사용된다(문헌[Wobus et al., J. Viral. (2000) 74:9281-9293]). 그런 다음, 1차 항체에 결합하고, 1차 항체와의 결합을 검출하기 위한 수단을 포함하는 2차 항체, 보다 바람직하게는 이에 공유 결합된 검출 분자를 포함하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 서양고추냉이 과산화효소에 공유적으로 연결된 양 항-마우스 IgG 항체에 결합하는 2차 항체가 사용된다. 결합을 검출하는 방법은 1차 항체와 2차 항체 사이의 결합을 반-정량적으로 결정하는데 사용되며, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출, 전자기 방사선 또는 비색 변화를 검출할 수 있는

검출 방법, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트가 사용된다. 예를 들어, SDS-PAGE의 경우, 칼럼 분획으로부터 샘플이 취해지고, 환원제(예를 들어, DTT)를 포함하는 SDS-PAGE 로딩 완충액에서 가열될 수 있으며, 캡시드 단백질은 미리 주조된 구배 폴리아크릴아마이드 겔(예를 들어, Novex)에서 분해된다. 은 염색은 제조업체의 지침에 따라 SilverXpress(인비트로젠(Invitrogen), 캘리포니아 소재)를 사용하거나 또는 다른 적합한 염색 방법, 즉, SYPRO 루비 또는 쿠마시 염색을 사용하여 수행될 수 있다. 일 실시형태에서, 칼럼 분획에서 AAV 벡터 게놈(vg)의 농도는 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해 측정될 수 있다. 샘플은 희석되고, 외인성 DNA를 제거하기 위해 DNase I(또는 또 다른 적합한 뉴클레이스)로 소화된다. 뉴클레이스의 불활성화 후, 샘플은 추가로 희석되고, 프라이머 및 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 TaqMan™ 플루오로제닉 프로브를 사용하여 증폭된다. 정의된 형광 수준(역치 주기, threshold cycle: Ct)에 도달하는데 필요한 주기의 수는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) Prism 7700 서열 검출 시스템에서 각 샘플에 대해 측정된다. AAV 벡터에 포함된 것과 동일한 서열을 포함하는 플라스미드 DNA가 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성하는데 사용된다. 샘플로부터 얻어진 역치 주기(Ct) 값은 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값으로 정규화하여 벡터 게놈 역가를 결정하는데 사용된다. 디지털 PCR에 기반한 종점 검정도 사용될 수 있다.

[0151] 일 양태에서, 광범위한 스펙트럼의 세린 프로테이스, 예를 들어, 프로테이네이스 K(예컨대, 퀴아젠(Qiagen)으로부터 상업적으로 입수 가능함)를 이용하는 최적화된 q-PCR 방법이 사용된다. 보다 구체적으로, 최적화된 qPCR 게놈 역가 검정은 DNase I 소화 후, 샘플을 프로테이네이스 K 완충액으로 희석하고, 프로테이네이스 K로 처리한 후 열 불활성화한다는 점을 제외하고는 표준 검정과 유사하다. 적합하게는, 샘플은 샘플 크기와 동일한 양의 프로테이네이스 K 완충액으로 희석된다. 프로테이네이스 K 완충액은 2배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이네이스 K 처리는 약 0.2 mg/㎖이지만, 0.1 mg/㎖에서 약 1 mg/㎖까지 다양할 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55℃에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 낮은 온도(예를 들어, 약 37℃ 내지 약 50℃)에서 더 긴 기간(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분)에 걸쳐 또는 더 높은 온도(예를 들어, 최대 약 60℃)에서 더 짧은 기간(예를 들어, 약 5분 내지 10분)에 걸쳐 수행될 수 있다. 유사하게는, 열 불활성화는 일반적으로 약 95℃에서 약 15분이지만, 온도는 더 낮아질 수 있고(예를 들어, 약 70℃ 내지 약 90℃), 시간은 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 그런 다음, 샘플은 희석되고(예를 들어, 1000배) 표준 검정에 설명된 바와 같이 TaqMan 분석이 적용된다.

[0152] 추가적으로 또는 대안적으로, 액적 디지털 PCR(droplet digital PCR: ddPCR)이 사용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의해 단일-가닥 및 자가-상보적 AAV 벡터 게놈 역가를 결정하는 방법이 기술되어 있다. 예를 들어, 문헌[M. Lock et al, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi:10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14] 참조.

[0153] 캡시드 단백질의 vp1, vp2 및 vp3 사이의 비를 결정하는 방법도 사용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Vamseedhar Rayaprolu et al, Comparative Analysis of Adeno- Associated Virus Capsid Stability and Dynamics, J Virol. 2013 Dec; 87(24): 13150- 13160; Buller RM, Rose JA. 1978. Characterization of adenovirus-associated virus- induced polypeptides in KB cells. J. Virol. 25:331-338; 및 Rose JA, Maizel JV, Inman JK, Shatkin AJ. 1971. Structural proteins of adenovirus-associated viruses. J. Virol. 8:766-770] 참조.

[0154] 본 명세서에 기재된 rAAV의 생산 방법은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0155] **약제학적 조성물 및 제형**

[0156] 소정의 실시형태에서, 제형 완충액 중 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터, 예컨대, rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 기능적 hIDUA 단백질(ERT)(예를 들어, Aldurazyme®(라로니데이스); 사노피 젠자임(Sanofi Genzyme))과 병용 투여하기에 적합하다. 일 실시형태에서, 제형 완충액 중 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 소정의 실시형태에서, rAAV는 약 1×10^{9} 게놈 카피(GC)/㎖ 내지 약 1×10^{14} GC/㎖로 제형화된다. 추가의 실시형태에서, rAAV는 약 3×10^{9} GC/㎖ 내지 약 3×10^{13} GC/㎖로 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, rAAV는 약 1×10^{9} GC/㎖ 내지 약 1×10^{13} GC/㎖로 제형화된다. 일 실시형태에서, rAAV는 적어도 약 1×10^{11} GC/㎖로 제형화된다.

[0157] 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 비-바이러스 벡터 시스템에서 hIDUA 코딩 서열을 갖는 발현 카세트를 포함한다. 이는, 예를 들어, 네이키드 DNA, 네이키드 RNA, 무기 입자, 지질 또는 지질-유사 입자, 키토산-기반 제형 및 당업계에 공지된 기타를 포함할 수 있다. 이러한 비-바이러스 벡터 시스템은, 예를 들어, 플라스미드

또는 비-바이러스 유전적 요소 또는 단백질-기반 벡터를 포함할 수 있다.

[0158] 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 비-복제 바이러스 벡터를 포함한다. 적합한 바이러스 벡터는, 예를 들어, 재조합 아데노바이러스, 재조합 렌티바이러스, 재조합 보카바이러스, 재조합 아데노-관련 바이러스(AAV) 또는 또 다른 재조합 파보바이러스와 같은 임의의 적합한 전달 벡터를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 바이러스 벡터는 hIDUA를 이를 필요로 하는 환자에게 전달하기 위한 재조합 AAV이다.

[0159] 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 hIDUA 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트 및 뇌실내(intracerebroventricular: ICV), 척수강내(intrathecal: IT), 수조내 또는 정맥내(IV) 주사를 통한 전달에 적합한 제형 완충액을 포함하는 벡터를 포함한다. 일 실시형태에서, hIDUA 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트는 재조합 AAV에 패키징되어 있다.

[0160] 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 효소 대체 요법(ERT)으로서 대상체에게 전달하기 위한 기능적 hIDUA 폴리펩타이드 또는 이의 기능적 단편을 포함한다. 이러한 약제학적 조성물은 일반적으로 정맥내로 투여되지만, 그러나 일부 상황에서 피내, 근육내 또는 경구 투여도 또한 가능하다. 조성물은 MPSI, 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군을 앓고 있거나 또는 이의 위험이 있는 개체의 예방적 치료를 위해 투여될 수 있다. 치료적 적용을 위해, 약제학적 조성물은 축적된 대사산물의 농도를 감소시키고/시키거나 대사산물의 추가 축적을 예방 또는 저지하기에 충분한 양으로 확립된 질환을 앓고 있는 환자에게 투여된다. 라이소솜 효소 결핍 질환의 위험이 있는 개체의 경우, 약제학적 조성물은 대사산물의 축적을 방지 또는 저해하는데 충분한 양으로 예방적으로 투여된다. 본 명세서에 기재된 hIDUA 단백질을 포함하는 약제학적 조성물은 치료학적 유효량으로 투여된다. 일반적으로, 치료학적 유효량은 대상체의 의학적 병태의 중증도뿐만 아니라 대상체의 연령, 일반적인 병태 및 성별에 따라 달라질 수 있다. 투여량은 의사에 의해 결정될 수 있으며, 관찰된 치료의 효과에 맞게 필요에 따라 조정될 수 있다. 일 양태에서, hIDUA 단백질 또는 이의 기능적 단편의 단위를 포함하도록 제형화된 ERT용 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다.

[0161] 소정의 실시형태에서, 제형은 수성 현탁액에 용해된 계면활성제, 방부제, 부형제 및/또는 완충액을 추가로 포함한다. 일 실시형태에서, 완충액은 PBS이다. 또 다른 실시형태에서, 완충액은 인공 뇌척수액(artificial cerebrospinal fluid: aCSF), 예를 들어, Eliott 제형 완충액; 또는 하버드 어파라터스(Harvard apparatus) 관류액(최종 이온 농도(mM 단위)를 갖는 인공 CSF: Na 150; K 3.0; Ca 1.4; Mg 0.8; P 1.0; Cl 155)이다. 완충 식염수, 계면활성제 및 생리학적으로 적합한 염 또는 약 100mM 소듐 클로라이드(NaCl) 내지 약 250mM 소듐 클로라이드와 동등한 이온 강도로 조정된 염의 혼합물 또는 동등한 이온 농도로 조정된 생리학적으로 적합한 염 중 하나 이상을 포함하는 것을 포함하는 다양한 적합한 용액이 알려져 있다.

[0162] 적합하게는, 제형은 생리학적으로 허용 가능한 pH, 예를 들어, pH 6 내지 8 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7 또는 pH 7.2 내지 7.8의 범위로 조정된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32이기 때문에, 척수강내 전달의 경우, 이러한 범위 내의 pH가 바람직할 수 있는 반면; 정맥내 전달의 경우, 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 내의 다른 pH 및 이러한 하위 범위가 다른 전달 경로를 위해 선택될 수 있다.

[0163] 적합한 계면활성제 또는 계면활성제의 조합은 무독성인 비-이온 계면활성제 중에서 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 예를 들어, 중성 pH를 갖고 평균 분자량이 8400인 폴록사머 188로도 알려져 있는 Pluronic® F68 [바스프(BASF)]와 같은 1차 하이드록실기에서 종결되는 이작용성 블록 공중합체 계면활성제가 선택된다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 두 친수성 사슬의 측면에 있는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 삼블록 공중합체, SOLUTOL HS 15(마크로골-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴릭 글리세라이드), 폴리옥시 10 올레일 에터, TWEEN(폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다.

[0164] 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 포함한다. 이러한 공중합체는 일반적으로 문자 "P"(폴록사머의 경우)에 이어서 세 자리 숫자로 명명된다: 처음 두 자리 숫자×100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자 질량을 나타내고, 마지막 자리×10은 폴리옥시에틸렌 함량의 백분율을 나타낸다. 일 실시형태에서, 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005 % 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다.

[0165] 일례에서, 제형은, 예를 들어, 물 중 소듐 클로라이드, 소듐 바이카보네이트, 덱스트로스, 마그네슘 설페이트(예를 들어, 마그네슘 설페이트·7H2O), 포타슘 클로라이드, 칼슘 클로라이드(예를 들어, 칼슘 클로라이드·2H2O), 이염기성 소듐 포스페이트 및 이들의 혼합물 중 1종 이상을 포함하는 완충 식염수 용액을 포함할 수 있

다. 적합하게는, 척수강내 전달의 경우, 삼투압 농도는 뇌척수액과 양립 가능한 범위(예를 들어, 약 275 내지 약 290)이며; 예를 들어, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview 참조. 선택적으로, 척수강내 전달의 경우, 상업적으로 이용 가능한 희석제는 현탁제로서 사용하거나 또는 또 다른 현탁제 및 다른 선택적 부형제와 조합하여 사용될 수 있다. 예를 들어, Elliotts B® 용액[루카레 메이컬(Lukare Medical)] 참조.

[0166] 소정의 실시형태에서, 제형은 1종 이상의 침투 촉진제를 포함할 수 있다. 적합한 침투 촉진제의 예는, 예를 들어, 만니톨, 소듐 글리코콜레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 카프릴레이트, 소듐 카프레이트, 소듐 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터 또는 EDTA를 포함할 수 있다.

[0167] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같이 완충액 용액 중 rAAV를 동결 형태로 포함하는 동결 조성물이 제공된다. 선택적으로, 1종 이상의 계면활성제(예를 들어, Pluronic F68), 안정화제 또는 방부제가 이 조성물에 존재한다. 적합하게는, 사용을 위해, 조성물은 해동되고, 적합한 희석제, 예를 들어, 멸균 식염수 또는 완충 식염수로 목적하는 용량으로 적정된다.

[0168] 소정의 실시형태에서, 제형에 현탁된(선택적으로 동결된) 농축된 벡터, 선택적 희석 완충액, 및 장치 및 척수강내 투여에 필요한 기타 구성 요소를 포함하는 키트가 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 키트는 추가적으로 또는 대안적으로 정맥내 전달을 위한 성분을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 주사하기에 충분한 완충액을 제공한다. 이러한 완충액은 농축된 벡터의 약 1:1 내지 1:5 희석 또는 그 이상을 허용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 치료 임상의가 용량 적정 및 기타 조정을 할 수 있도록 더 많거나 더 적은 양의 완충액 또는 멸균수가 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 장치의 하나 이상의 성분이 키트에 포함된다.

[0169] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV와 같은 벡터 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 본 명세서에서 사용되는 "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 완충액, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 당업계에 잘 알려져 있다. 보충 활성 성분은 또한 조성물에 혼입될 수 있다. 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 마이크로스피어, 지질 입자, 소포 등과 같은 전달 비히클이 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포에 도입하는데 사용될 수 있다.

[0170] 특히, rAAV 벡터는 지질 입자, 리포솜, 소포, 나노스피어 또는 나노입자 등에 캡슐화되어 전달을 위해 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 치료학적 유효량의 상기 벡터가 약제학적 조성물에 포함된다. 담체의 선택은 본 발명을 제한하지 않는다. 다른 종래의 약제학적으로 허용 가능한 담체는, 예컨대, 방부제 또는 화학적 안정화제이다. 적합한 예시적인 방부제는 클로로뷰탄올, 포타슘 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0171] 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 숙주에게 투여될 때 알레르기 반응 또는 유사한 이상 반응을 일으키지 않는 분자 독립체 및 조성물을 지칭한다.

[0172] 본 명세서에서 사용되는 용어 "투여량" 또는 "양"은 치료 과정에서 대상체에게 전달되는 총 투여량 또는 양, 또는 단일 단위(또는 다중 단위 또는 분할 투여량) 투여로 전달되는 투여량 또는 양을 지칭할 수 있다.

[0173] 일 양태에서, 제형 완충액 중 본 명세서에 기재된 바와 같은 바이러스 벡터(예를 들어, rAVV)를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에 제공된다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 약 1.0×10^{9} GC 내지 약 1.0×10^{16} GC(70kg의 평균 체중 대상체를 치료하기 위해)의 범위 및 바람직하게는 인간 환자의 경우 1.0×10^{12} GC 내지 1.0×10^{14} GC의 범위의 복제-결함 바이러스의 양을 포함하도록 투여 단위로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{9}, 2×10^{9}, 3×10^{9}, 4×10^{9}, 5×10^{9}, 6×10^{9}, 7×10^{9}, 8×10^{9} 또는 9×10^{9} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{10}, 2×10^{10}, 3×10^{10}, 4×10^{10}, 5×10^{10}, 6×10^{10}, 7×10^{10}, 8×10^{10} 또는 9×10^{10} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{11}, 2×10^{11}, 3×10^{11}, 4×10^{11}, 5×10^{11}, 6×10^{11}, 7×10^{11}, 8×10^{11} 또는 9×10^{11} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{12}, 2×10^{12}, 3×10^{12}, 4×10^{12}, 5×10^{12}, 6×10^{12},

7×10^{12}, 8×10^{12} 또는 9×10^{12} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{13}, 2×10^{13}, 3×10^{13}, 4×10^{13}, 5×10^{13}, 6×10^{13}, 7×10^{13}, 8×10^{13} 또는 9×10^{13} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{14}, 2×10^{14}, 3×10^{14}, 4×10^{14}, 5×10^{14}, 6×10^{14}, 7×10^{14}, 8×10^{14} 또는 9×10^{14} GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 적어도 1×10^{15}, 2×10^{15}, 3×10^{15}, 4×10^{15}, 5×10^{15}, 6×10^{15}, 7×10^{15}, 8×10^{15} 또는 9×10^{15} GC를 포함하도록 제형화된다. 일 실시형태에서, 인간 적용의 경우, 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC의 범위일 수 있다.

[0174] 일 실시형태에서, 제형 완충액 중 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다. 일 실시형태에서, rAAV는 약 1×10^{9} 게놈 카피(GC)/㎖ 내지 약 1×10^{14} GC/㎖로 제형화된다. 추가의 실시형태에서, rAAV는 약 3×10^{9} GC/㎖ 내지 약 3×10^{13} GC/㎖로 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, rAAV는 약 1×10^{9} GC/㎖ 내지 약 1×10^{13} GC/㎖로 제형화된다. 일 실시형태에서, rAAV는 적어도 약 1×10^{11} GC/㎖로 제형화된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물은 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{9} GC 내지 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{14} GC의 용량으로 투여할 수 있다.

[0175] 소정의 실시형태에서, 조성물은 임의의 적합한 경로에 의한 전달을 위해 적합한 수성 현탁액 매질(예를 들어, 완충 식염수)에 제형화될 수 있다. 본 명세서에 제공된 조성물은 고용량의 바이러스 벡터의 전신 전달에 유용하다. rAAV의 경우, 고용량은 적어도 1×10^{13} GC 또는 적어도 1×10^{14} GC일 수 있다. 그러나, 개선된 안전성을 위해, 본 명세서에 제공된 miRNA 서열은 다른 더 낮은 용량으로 전달되는 발현 카세트 및/또는 벡터 게놈에 포함될 수 있다. 본 명세서에 기재된 수성 현탁액 또는 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하도록 설계된다. 일 실시형태에서, 약제학적 조성물은 뇌실내(ICV), 척수강내(IT) 또는 수조내 주사를 통한 전달을 위해 제형화된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 정맥내(IV) 주사에 의해 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하도록 설계된다. 대안적으로, 다른 투여 경로(예를 들어, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 근육내 및 기타 비경구 경로)가 선택될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 조성물은 본질적으로 동시에 두 가지 상이한 경로로 전달된다.

[0176] 본 명세서에서 사용되는 용어 "척수강내 전달" 또는 "척수강내 투여"는 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 척수관, 보다 구체적으로 지주막하 공간으로의 주사를 통한 약물의 투여 경로를 지칭한다. 척수강내 전달은 요추 천자, 심실내, 후두하/수조내 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자에 의해 지주막하 공간 전체에 걸친 확산을 위해 도입될 수 있다. 또 다른 예에서, 주사는 대조(cisterna magna)내 일 수 있다. 수조내 전달은 벡터 확산을 증가시키고/시키거나 투여로 인한 독성 및 염증을 감소시킬 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Christian Hinderer et al., Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna, Mol Ther Methods Clin Dev. 2014; 1: 14051. Published online 2014 Dec 10. doi: 10.1038/mtm.2014.51] 참조.

[0177] 본 명세서에서 사용되는 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여" 뇌실의 뇌척수액 또는 대수조 소뇌연수로 직접, 보다 구체적으로 후두하 천자를 통해 또는 대수조로 직접 주사하거나 또는 영구적으로 배치된 관을 통해 약물을 투여하는 경로를 지칭한다.

[0178] 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물 및 제형의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0179] **치료 방법**

[0180] 기재된 바와 같은 치료학적 유효량의 hIDUA를 전달하는 것을 포함하는 MPSI, 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군에 대한 방법이 본 명세서에 제공된다. 특히, 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 rAAV.hIDUA를 이를 필요로 하는 환자에게 전달하는 단계를 포함하는, MPSI, 헐러, 헐러-샤이에 및/또는 샤이에 증후군으로 진단된 환자에서 신경인지 장애를 예방, 치료 및/또는 완화시키는 방법이 본 명세서에 제공된다. 치료학적 유효량의 본 명세서에 기재된 rAAV.hIDUA 벡터는 다음 단락 중 어느 하나에서 확인된 증상 중 하나 이상을 교정할 수 있다.

[0181] 단백질, 펩타이드 또는 폴리펩타이드(예를 들어, 면역글로불린으로서)를 시퀀싱하는 방법은 당업자에게 공지되어 있다. 일단 단백질의 서열이 알려지면, 웹-기반 및 상업적으로 이용 가능한 컴퓨터 프로그램뿐만 아니라 아미노산 서열을 핵산 코딩 서열로 역번역하는 서비스 기반 회사가 있다. 예를 들어, www.ebi.ac.uk/Tools/st/에서 이용 가능한 엠보스(EMBOSS)의 backtranseq; geneinfinity.org/sms/sms_backtranslation.html에서 이용 가능한 Gene Infinity; expasy.org/tools/에서 이용 가능한 ExPasy 참조. 일 실시형태에서, RNA 및/또는 cDNA 코딩 서열은 인간 세포에서 최적의 발현을 위해 설계되었다.

[0182] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 목적하는 이식유전자 산물을 환자에게 전달하는 한편, 후근 신경절 뉴런에서 이식유전자 발현을 억제하는데 유용하다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 척수강내 또는 전신 유전자 요법 투여 후 신경 변성을 조절하고/하거나 2차 배측 척수 축삭 변성을 감소시키는 방법에 유용하다. 따라서, 본 명세서에 제공된 조성물은 특히 CNS로의 유전자 요법의 전달에 유용하지만, 예를 들어, 고용량의 유전자 요법이 DRG 형질도입 및 독성을 유발할 수 있는 전신 IV 전달을 포함한 다른 전달 경로에도 유용할 수 있다. 방법은 이식유전자 및 miRNA 표적(들)을 포함하는 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 포함하는 조성물을 환자에게 전달하는 단계를 포함한다.

[0183] 소정의 실시형태에서, 방법은 DRG에서 이식유전자 발현 수준을 억제하기 위해 miR-183 표적 서열을 포함하는 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 전달하는 단계를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 방법은 DRG에서 이식유전자 발현을 억제하는데 유용한 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 전달하는 단계를 포함하되, 발현 카세트 또는 벡터 게놈은 적어도 2개의 miR183 표적 서열, 적어도 3개의 miR183 표적 서열, 적어도 4개의 miR183 표적 서열, 적어도 5개의 miR183 표적 서열, 적어도 6개의 miR183 표적 서열, 적어도 7개의 miR183 표적 서열 또는 적어도 8개의 miR183 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 방법은 DRG에서 이식유전자 발현을 억제하는데 유용한 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 전달하는 단계를 포함하되, 발현 카세트 또는 벡터 게놈은 8개의 miR183 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 방법은 추상 뉴런, 푸르키네 뉴런, 과립 세포, 방추 뉴런, 신경간 세포, 성상세포, 희소돌기 아교세포, 미세아교세포 및/또는 뇌실막 세포 중 하나 이상으로부터 선택되는 CNS에 존재하는 하나 이상의 세포에서 발현을 향상시킨다.

[0184] 소정의 실시형태에서, 하나 이상의 miR-183 표적 서열 및/또는 그 이상의 miR-183 표적 서열에 작동 가능하게 연결된 이식유전자를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 전달하는 단계를 포함하는, 망막, 내이 및 후각 수용체의 하부 운동 뉴런에서 이식유전자의 발현을 전달 및/또는 향상시키는데 유용한 방법이 제공된다. 소정의 실시형태에서, 세포 또는 조직은 간 또는 심장 중 하나 이상일 수 있다.

[0185] 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 CNS에 존재하는 세포에 전달하는 단계를 포함하는 방법이 제공되되, 발현 카세트 또는 벡터 게놈은 하나 이상의 miR-183 표적 서열을 포함하고, 이식유전자(즉, 이종 유전자 산물을 암호화하는 서열)가 결여되어 있다. 이러한 실시형태에서, miR-183의 CNS 세포로의 전달이 달성된다. 소정의 실시형태에서, miR-183 서열을 포함하는 발현 카세트 또는 벡터 게놈의 전달은 CNS에 존재하는 소정의 다른 세포에서 DRG 발현의 억제 및 향상된 유전자 발현을 초래한다.

[0186] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 CNS 외부의 세포에서 이식유전자의 발현을 향상시키는 방법에 유용하다. 소정의 실시형태에서, CNS 외부의 세포에서 발현을 향상시키는 방법은 miR-182 표적 서열을 포함하는 발현 카세트 또는 벡터 게놈을 환자에게 전달하는 단계를 포함한다.

[0187] 일 실시형태에서, 현탁액은 약 6.8 내지 약 7.32의 pH를 갖는다.

[0188] 이러한 용량 및 농도의 전달에 적합한 부피는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 1㎕ 내지 150㎖의 부피가 선택될 수 있으며, 성인의 경우 더 높은 부피를 선택할 수 있다. 전형적으로, 신생아의 경우, 적합한 부피는 약 0.5㎖ 내지 약 10㎖이고, 영아의 경우, 약 0.5㎖ 내지 약 15㎖가 선택될 수 있다. 유아의 경우, 약 0.5㎖ 내지 약 20㎖의 부피가 선택될 수 있다. 아동의 경우, 최대 약 30㎖의 부피가 선택될 수 있다. 10대 이전 및 10대의 경우, 최대 약 50㎖의 부피가 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 선택된 약 5㎖ 내지 약 15㎖의 부피 또는 약 7.5㎖ 내지 약 10㎖의 부피로 척수강내 투여를 받을 수 있다. 다른 적합한 부피 및 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추기 위해 조정될 것이며, 이러한 투여량은 재조합 벡터가 사용되는 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다.

[0189] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 조성물은 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{9} GC 내지 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{14} GC의 용량으로 투여할 수 있다. 소정의 실시형태에서, rAAV는 체중 kg당 약 1×

10^{9} GC 내지 체중 kg당 약 1×10^{13} GC의 용량으로 전신적으로 병용 투여된다.

[0190] 소정의 실시형태에서, 대상체에는 치료학적 유효량의 hIDUA 유전자 산물을 암호화하는 핵산 서열 및 miRNA 표적 서열을 포함하는 조성물을 투여되며, 이는 표적 세포에서 hIDUA를 전달하고 발현하며 DRG 발현을 특이적으로 탈표적화한다.

[0191] 소정의 실시형태에서, AAV.알파-L-아이두로니데이스(AAV.IDUA) 유전자 요법 벡터는 IDUA 유전자에 대한 코딩 서열(예를 들어, 서열번호 14의 1943번 내지 3901번 nt 참조)에 작동 가능하게 연결된 miRNA183 클러스터의 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개 또는 적어도 4개의 miR 표적 서열(miR-183, miR-182 및 miR183 표적 서열 또는 이들의 조합을 포함)을 포함하는 벡터 게놈을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 동일할 수 있거나 또는 서로 상이할 수 있는 스페이서에 의해 각각 분리된 동일한 miR 표적 서열의 다중 카피를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 벡터 게놈은 miR183 클러스터 표적 서열의 3개 내지 6개의 카피를 포함하며, 선택적으로 표적 서열 중 하나 이상은 miR-183 클러스터 구성원에 대해 적어도 약 80% 내지 약 99% 상보적이다. 또 다른 실시형태에서, 벡터는 miR183 표적 서열의 1개, 2개, 3개 또는 4개 카피를 포함한다. 이러한 벡터 게놈은 선택적으로 miR183 클러스터의 구성원에 해당하는 추가적인 표적 서열을 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 miR183 클러스터 구성원에 대한 단일 miR 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 miR183 클러스터 구성원에 대한 2개의 miR 표적 서열 및 선택적으로 적어도 하나의 스페이서를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터는 miR183 클러스터 구성원에 대한 3개의 miR 표적 서열 및 선택적으로 적어도 2개의 스페이서를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 벡터 게놈은 서로 서열이 상이한 miR183 클러스터에 대한 2개 이상의 miR 표적 서열을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 벡터 게놈은 비-AAV 벡터에 의해 운반된다.

[0192] 일 실시형태에서, 발현 카세트는 범위 및 종점 내의 모든 정수 또는 분수량을 포함하여 뇌 질량의 그램(g)당 약 1×10^{9} GC 내지 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{13} 게놈 카피(GC)의 양으로 전달되는 벡터 게놈에 있다. 또 다른 실시형태에서, 투여량은 뇌 질량의 그램당 1×10^{10} GC 내지 뇌 질량의 그램당 약 1×10^{13} GC이다. 특정 실시형태에서, 환자에게 투여되는 벡터의 용량은 적어도 약 1.0×10^{9} GC/g, 약 1.5×10^{9} GC/g, 약 2.0×10^{9} GC/g, 약 2.5×10^{9} GC/g, 약 3.0×10^{9} GC/g, 약 3.5×10^{9} GC/g, 약 4.0×10^{9} GC/g, 약 4.5×10^{9} GC/g, 약 5.0×10^{9} GC/g, 약 5.5×10^{9} GC/g, 약 6.0×10^{9} GC/g, 약 6.5×10^{9} GC/g, 약 7.0×10^{9} GC/g, 약 7.5×10^{9} GC/g, 약 8.0×10^{9} GC/g, 약 8.5×10^{9} GC/g, 약 9.0×10^{9} GC/g, 약 9.5×10^{9} GC/g, 약 1.0×10^{10} GC/g, 약 1.5×10^{10} GC/g, 약 2.0×10^{10} GC/g, 약 2.5×10^{10} GC/g, 약 3.0×10^{10} GC/g, 약 3.5×10^{10} GC/g, 약 4.0×10^{10} GC/g, 약 4.5×10^{10} GC/g, 약 5.0×10^{10} GC/g, 약 5.5×10^{10} GC/g, 약 6.0×10^{10} GC/g, 약 6.5×10^{10} GC/g, 약 7.0×10^{10} GC/g, 약 7.5×10^{10} GC/g, 약 8.0×10^{10} GC/g, 약 8.5×10^{10} GC/g, 약 9.0×10^{10} GC/g, 약 9.5×10^{10} GC/g, 약 1.0×10^{11} GC/g, 약 1.5×10^{11} GC/g, 약 2.0×10^{11} GC/g, 약 2.5×10^{11} GC/g, 약 3.0×10^{11} GC/g, 약 3.5×10^{11} GC/g, 약 4.0×10^{11} GC/g, 약 4.5×10^{11} GC/g, 약 5.0×10^{11} GC/g, 약 5.5×10^{11} GC/g, 약 6.0×10^{11} GC/g, 약 6.5×10^{11} GC/g, 약 7.0×10^{11} GC/g, 약 7.5×10^{11} GC/g, 약 8.0×10^{11} GC/g, 약 8.5×10^{11} GC/g, 약 9.0×10^{11} GC/g, 약 9.5×10^{11} GC/g, 약 1.0×10^{12} GC/g, 약 1.5×10^{12} GC/g, 약 2.0×10^{12} GC/g, 약 2.5×10^{12} GC/g, 약 3.0×10^{12} GC/g, 약 3.5×10^{12} GC/g, 약 4.0×10^{12} GC/g, 약 4.5×10^{12} GC/g, 약 5.0×10^{12} GC/g, 약 5.5×10^{12} GC/g, 약 6.0×10^{12} GC/g, 약 6.5×10^{12} GC/g, 약 7.0×10^{12} GC/g, 약 7.5×10^{12} GC/g, 약 8.0×10^{12} GC/g, 약 8.5×10^{12} GC/g, 약 9.0×10^{12} GC/g, 약 9.5×10^{12} GC/g, 약 1.0×10^{13} GC/g, 약 1.5×10^{13} GC/g, 약 2.0×10^{13} GC/g, 약 2.5×10^{13} GC/g, 약 3.0×10^{13} GC/g, 약 3.5×10^{13} GC/g, 약 4.0×10^{13} GC/g, 약 4.5×10^{13} GC/g, 약 5.0×10^{13} GC/g, 약 5.5×10^{13} GC/g, 약 6.0×10^{13} GC/g, 약 6.5×10^{13} GC/g, 약 7.0×10^{13} GC/g, 약 7.5×10^{13} GC/g, 약 8.0×10^{13} GC/g, 약 8.5×10^{13} GC/g, 약 9.0×10^{13} GC/g, 약 9.5×10^{13} GC/g 또는 약 1.0×10^{14} GC/g 뇌 질량이다.

[0193] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 miR 표적 서열-함유 조성물은 환자가 요구하는 면역억제 병용 요법의 용량, 기간 및/또는 양을 최소화한다. 현재, 이러한 병용 요법을 위한 면역억제제는 글루코코르티코이드, 스테

로이드, 대사길항제, T-세포 저해제, 마크롤라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그), 및 알킬화제, 항-대사산물, 세포독성 항생제, 항체 또는 이뮤노필린에 활성인 작용제를 포함하는 세포정지제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 면역억제제는 질소 머스터드, 나이트로소우레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토퓨린, 플루오로우라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-지시 항체, 항-IL-2 항체, 사이클로스포린, 타콜리무스, 시롤리무스, IFN-β, IFN-γ, 오피오이드 또는 TNF-α(종양 괴사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여 0일, 1일, 2일, 7일 또는 그 이상 전에 시작될 수 있다. 이러한 요법은 같은 날 두 가지 이상의 약물(예를 들어, 프레드니손, 마이코페놀레이트 모페틸(micophenolate mofetil: MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 병용 투여를 포함할 수 있다. 이러한 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 후 동일한 용량 또는 조정된 용량으로 계속될 수 있다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 miR 표적 서열-함유 조성물은 유전자 요법(예를 들어, rAAV) 벡터의 전달 전, 도중 또는 이후에 면역억제 요법의 필요성을 제거한다.

[0194] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트를 포함하는 조성물은 이를 필요로 하는 대상체에게 1회 투여된다. 소정의 실시형태에서, 발현 카세트는 rAAV를 통해 전달된다.

[0195] 치료에 대한 후보인 환자는 헐러, 헐러-샤이에 및 샤이에와 관련된 증상이 있는 소아 및 성인 환자이다. MPSI 장애는 초기 중증(헐러)에서 후기 발병(샤이에) 형태까지의 다양한 질환이다. 헐러 증후군은 전형적으로 IDUA 효소 활성이 전혀 없고(0%) 조기에 진단되는 것을 특징으로 하며, 발달 지연, 간비장비대, 골격 침범, 각막 혼탁, 관절 침범, 난청, 심장 침범 및 생애 첫 10년 동안의 사망을 특징으로 한다. 헐러-샤이에 환자는 약간의 IDUA 효소 활성(0%를 초과하지만 전형적으로 2% 미만)을 가지며, 가변적인 지적 효과, 호흡기 질환, 폐쇄성 기도 질환, 심혈관 질환, 관절 강직/수축, 골격 이상, 감소된 시력 및 10대 또는 20대에서의 사망이 관찰되었다. 샤이에 증후군이 있는 환자는 전형적으로 "정상" IDUA 효소 활성의 적어도 2%를 가지며 나중에 진단되고; 이러한 환자는 전형적으로 정상적인 지능을 갖지만, 간비장비대, 관절 침범, 신경 포착, 난청, 심장 침범 및 정상적인 수명을 갖는다. 또한, 문헌[Newborn Screening for Mucopolysaccharidosis Type 1 (MPS I): A Systematic Review of Evidence Report of Final Findings, Final Version 1.1, Prepared for: MATERNAL AND CHILD HEALTH BUREAU] 참조.

[0196] 본 명세서에 제공된 조성물은 경증에서 완전히 진행된 과민증에 이르기까지의 범위일 수 있는 재조합 효소에 대한 면역 반응과 관련된 장기 효소 대체 요법(ERT)의 합병증뿐만 아니라 국부 및 전신 감염과 같은 평생 말초 접근의 합병증을 피한다. ERT와는 대조적으로, 본 발명의 조성물은 평생 반복되는 매주 주사를 필요로 하지 않는다. 이론에 얽매이지 않고, 본 명세서에 기재된 치료 방법은 CNS 구획 외부에서 치료적 지렛대를 제공하는 지속적이고 상승된 순환 IDUA 수준을 제공하는 높은 형질도입 효율을 갖는 벡터에 의해 제공되는 효율적이고 장기적인 유전자 전달을 제공함으로써 MPSI 장애와 관련된 적어도 중추 신경계 표현형을 교정하는데 유용한 것으로 여겨진다. 또한, CNS로의 AAV-매개성 전달 이전에 단백질 형태 또는 rAAV.hIDUA의 형태의 효소의 직접적인 전신 전달을 포함하는 다양한 경로에 의해 활성 내성을 제공하고, 효소에 대한 항체 형성을 방지하는 방법이 본 명세서에 제공된다.

[0197] 일부 실시형태에서, 헐러 증후군으로 진단된 환자가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 헐러-샤이에 증후군으로 진단된 환자가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 샤이에 증후군으로 진단된 환자가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 일부 실시형태에서, 신경인지 결함이 있는 MPS I을 갖는 소아 대상체가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다.

[0198] 소정의 실시형태에서, 신생아(3개월 이하)가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 소정의 실시형태에서, 3개월 내지 9개월의 아기가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 소정의 실시형태에서, 9개월 내지 36개월의 어린이가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 소정의 실시형태에서, 3세 내지 12세의 어린이가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 소정의 실시형태에서, 12세 내지 18세의 어린이가 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다. 소정의 실시형태에서, 18세 이상의 성인이 본 명세서에 기재된 방법에 따라 치료된다.

[0199] 일 실시형태에서, 환자는 헐러 증후군을 가질 수 있고, 적어도 약 3개월 내지 12개월 미만의 남아 또는 여아이다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 남성 또는 여성 헐러-샤이에 환자일 수 있고, 적어도 약 6세 내지 최대 18세이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 나이가 많거나 적을 수 있으며, 남성 또는 여성일 수 있다.

[0200] 적합하게는, 치료를 위해 선택된 환자는 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 환자를 포함할 수 있다: 혈장, 섬유아세포 또는 백혈구에서 측정된 바와 같은 IDUA 효소 활성의 결핍 또는 감소에 의해 확인된 MPS I의 문서화된 진

단; 임의의 다른 신경학적 또는 정신과적 요인으로 설명할 수 없는 경우 다음 중 하나로 정의되는 MPS I로 인한 초기 신경인지 결함의 문서화된 증거: - IQ 테스트 또는 신경심리학적 기능(언어, 기억, 주의력 또는 비언어적 능력)의 1개의 영역에서 평균보다 1 표준 편차 아래의 점수, 또는 - 순차 테스트에서 1 표준 편차보다 큰 감소의 문서화된 병력의 증거. 대안적으로, 소변 또는 유전자 테스트에서 증가된 GAG가 사용될 수 있다. 치료 전, 대상체, 예를 들어, 영아는 바람직하게는 MPS I 환자, 즉, hIDUA를 암호화하는 유전자에 돌연변이가 있는 환자를 확인하기 위해 유전자형 분석을 겪는다. 치료 전, MPS I 환자는 hIDUA 유전자를 전달하는데 사용되는 AAV 혈청형에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 소정의 실시형태에서, AAV에 대한 중화 항체 역가가 5 이하인 MPS I 환자는 본 명세서에 기재된 방법 중 임의의 하나 이상에 따라 치료된다.

[0201] 치료 전, MPSI 환자는 hIDUA 유전자를 전달하는데 사용되는 AAV 벡터의 캡시드에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 이러한 Nab는 형질도입 효율을 방해하며 치료적 효능을 감소시킬 수 있다. 기준선 혈청 Nab 역가가 1:5 이하인 MPS I 환자는 rAAV.hIDUA 유전자 요법 프로토콜을 사용한 치료에 적합한 후보이다. 혈청 Nab의 역가가 1:5 초과인 MPS I 환자의 치료는 rAAV.hIDUA 벡터 전달을 사용한 치료 전 및/또는 도중에 면역억제제와의 일시적인 병용 치료와 같은 병용 요법이 필요할 수 있다. 선택적으로, 면역억제 병용 요법은 AAV 벡터 캡시드 및/또는 제형의 다른 성분에 대한 중화 항체의 사전 평가 없이 예방 조치로서 사용될 수 있다. 사전 면역억제 요법은 특히 이식유전자 산물이 "외부 물질"로 보일 수 있는 IDUA 활성의 수준이 거의 없는 환자에서도 hIDUA 이식유전자 산물에 대한 잠재적인 면역 부작용을 예방하는 것이 바람직할 수 있다. 아래에 기재된 마우스, 개 및 NHP에서의 비-임상 연구 결과는 hIDUA 및 신경염증에 대한 면역 반응의 발생과 일치한다. 유사한 반응이 인간 대상체에서는 발생하지 않을 수 있지만, 예방책으로서 면역억제 요법이 rAAV.hIDUA의 모든 수용자에게 권장된다.

[0202] 이러한 병용 요법을 위한 면역억제제는 글루코코르티코이드, 스테로이드, 대사길항제, T-세포 저해제, 마크롤라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그) 및 알킬화제, 항-대사산물, 세포독성 항생제, 이뮤노필린에 활성인 항체 또는 작용제를 포함하는 세포정지제를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 면역억제제는 질소 머스터드, 나이트로소우레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토퓨린, 플루오로우라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-지시된 항체, 항-IL-2 항체, 사이클로스포린, 타콜리무스, 시롤리무스, IFN-β, IFN-γ, 오피오이드 또는 TNF-α(종양 괴사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다. 소정의 실시형태에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여 0일, 1일, 2일, 7일 또는 그 이상 전에 시작될 수 있다. 이러한 요법은 같은 날 두 가지 이상의 약물(예를 들어, 프레드니손, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 병용 투여를 포함할 수 있다. 이러한 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 후 동일한 용량 또는 조정된 용량으로 계속될 수 있다. 이러한 요법은 필요에 따라 약 1주(7일), 약 60일 또는 그 이상일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 타콜리무스가 없는 양생법이 선택된다.

[0203] 그럼에도 불구하고, 일 실시형태에서, 다음 특성 중 하나 이상을 갖는 환자는 치료 담당 의사의 재량에 따라 치료에서 제외될 수 있다:

[0204] o 기준선 MRI 테스트의 검토는 IC 주사에 대한 금기사항을 보여줌.

[0205] o IC 주사에 대한 금기사항을 초래한 이전 두경부 수술의 이력이 있음.

[0206] o CT(또는 조영제) 또는 전신 마취에 대한 임의의 금기사항이 있음.

[0207] o MRI(또는 가돌리늄)에 대한 임의의 금기사항이 있음.

[0208] o 추정 사구체 여과율(estimated glomerular filtration rate: eGFR)이 30 ㎖/분/1.73 m2 미만임.

[0209] o MPS I 또는 신경정신병적 병태의 진단으로 인한 것이 아닌 임의의 신경인지 결함이 있음.

[0210] o 시롤리무스, MMF 또는 프레드니솔론에 대한 과민 반응의 임의의 병력이 있음.

[0211] o 면역억제 요법(예를 들어, 절대 호중구 수가 1.3 $\times 10^3/\mu\ell$ 미만이고, 혈소판 수가 $100\times 10^3/\mu\ell$ 미만이며, 헤모글로빈이 12 g/dℓ 미만[남성] 또는 10 g/dℓ 미만[여성]임)이 적절하지 않을 수 있는 임의의 병태가 있음.

[0212] o 요추 천자에 대한 임의의 금기사항이 있음.

[0213] o HSCT를 받음.

[0214] o 치료 전 6개월 이내에 IT 투여를 통해 라로니데이스를 투여받았음.

[0215] o 임의의 시간에 라로니데이스를 IT로 투여받았으며, 환자를 과도한 위험에 처하게 할 수 있는 IT 투여와 관련하여 고려되는 중대한 이상 반응을 경험하였음.

[0216] o 치료 전 적어도 3개월 동안 완전 관해되지 않은, 림프종의 임의의 병력 또는 피부의 편평 세포 또는 기저 세포 암종 이외의 또 다른 암의 병력.

[0217] o 환자가 이전에 알려진 길버트 증후군의 병력이 있고, 총 빌리루빈의 35% 미만의 결합 빌리루빈을 나타내는 빌리루빈 비율을 갖지 않는 한, 3 × 정상 상한치(upper limit of normal: ULN) 초과의 알라닌 아미노트랜스퍼레이스(ALT) 또는 아스파테이트 아미노트랜스퍼레이스(AST) 또는 1.5 × ULN 초과의 총 빌리루빈.

[0218] o 인간 면역결핍 바이러스(HIV)-양성 테스트의 병력, 활동성 또는 재발성 B형 간염 또는 C형 간염, 또는 B형 간염, C형 간염 또는 HIV에 대한 양성 스크리닝 테스트의 병력.

[0219] o 임신 중, 산후 6주 미만, 모유 수유 중이거나 임신 계획 중(본인 또는 파트너)

[0220] o 치료 전 1년 이내의 알코올 또는 약물 남용의 병력.

[0221] o 환자의 안전을 위협할 수 있는 심각하거나 불안정한 의학적 또는 심리적 병태가 있음.

[0222] o 통제되지 않는 발작.

[0223] 다른 실시형태에서, 주치의는 이러한 신체적 특성(병력) 중 하나 이상이 본 명세서에 제공되는 바와 같은 치료를 배제해서는 안된다고 결정할 수 있다.

[0224] 본 명세서에 기재된 방법의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0225] **투여량 및 투여 방식**

[0226] 환자에게 투여하기에 적합한 약제학적 조성물은 생리학적으로 적합한 수성 완충액, 계면활성제 및 선택적 부형제를 포함하는 제형 완충액 중 rAAV.hIDUA 벡터의 현탁액을 포함한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 척수강내로 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 수조내로 투여된다. 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 정맥내로 투여된다. 소정의 실시형태에서, 약제학적 조성물은 20분(±5분)에 걸쳐 주입에 의해 말초 정맥을 통해 전달된다. 그러나, 이 시간은 필요 또는 목적하는 바에 따라 조정될 수 있다. 그러나, 또 다른 투여 경로가 선택될 수 있다. 대안적으로 또는 추가적으로, 투여 경로는 원하는 경우 조합될 수 있다.

[0227] rAAV의 단일 투여가 효과적일 것으로 예상되지만, 투여는 반복될 수 있다(예를 들어, 분기별로, 2년마다, 매년 또는 달리 필요할 때, 특히 신생아의 치료에서). 선택적으로, 치료학적 유효량의 초기 용량은 주입/주사를 견딜 수 있는 대상체의 연령 및 능력을 고려하여 분할 주입/주사 세션에 걸쳐 전달될 수 있다. 그러나, 전체 치료적 용량을 매주 반복적으로 주사할 필요가 없으므로, 환자에게 편안함과 치료적 결과 모두의 측면에서 이점을 제공한다.

[0228] 일부 실시형태에서, rAAV 현탁액은 적어도 1×10^{9} GC/㎖인 rAAV 게놈 카피(GC) 역가를 갖는다. 소정의 실시형태에서, rAAV 현탁액 중 rAAV 빈/전체 입자의 비는 0.01 내지 0.05(빈 캡시드가 95% 내지 99% 없음)이다. 일부 실시형태에서, 이를 필요로 하는 MPS I 환자에게 rAAV 현탁액의 적어도 약 4×10^{8} GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} GC/g 뇌 질량의 용량을 투여받았다.

[0229] 표시된 연령 그룹의 MPS I 환자에게 다음과 같은 치료적으로 효과적인 균일 용량의 rAAV.hIDUA가 투여될 수 있다:

[0230] o 신생아: 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC;

[0231] o 3개월 내지 9개월: 약 6×10^{12} 내지 약 3×10^{14} GC;

[0232] o 9개월 내지 36개월: 약 10^{13} 내지 약 5×10^{14} GC;

[0233] o 3세 내지 12세: 약 1.2×10^{13} 내지 약 6×10^{14} GC;

[0234] o 12세 이상: 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC;

[0235] o 18세 이상(성인): 약 1.4×10^{13} 내지 약 7.0×10^{14} GC.

[0236] 일부 실시형태에서, 12세 이상의 MPS I 환자(18세 이상 포함)에게 투여된 용량은 1.4×10^{13} 게놈 카피(GC)(1.1×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 일부 실시형태에서, 12세 이상의 MPS I 환자(18세 이상 포함)에게 투여된 용량은 7×10^{13} GC(5.6×10^{10} GC/g 뇌 질량)이다. 또 다른 추가의 실시형태에서, MPSI 환자에게 투여되는 용량은 적어도 약 4×10^{8} GC/g 뇌 질량 내지 약 4×10^{11} GC/g 뇌 질량이다. 소정의 실시형태에서, MPS I 신생아에게 투여되는 용량은 약 1.4×10^{11} 내지 약 1.4×10^{14} GC의 범위이고; 3개월 내지 9개월의 영아에게 투여되는 용량은 약 2.4×10^{11} 내지 약 2.4×10^{14} GC의 범위이며; 9개월 내지 36개월의 MPS I 어린이에게 투여되는 용량은 약 4×10^{11} 내지 약 4×10^{14} GC의 범위이고; 3세 내지 12세의 MPS I 어린이에게 투여되는 용량은 약 4.8×10^{11} 내지 약 4.8×10^{14} GC의 범위이며; 12세 이상의 어린이 및 성인에게 투여되는 용량은 약 5.6×10^{11} 내지 약 5.6×10^{14} GC의 범위이다.

[0237] 이러한 용량 및 농도의 전달에 적합한 부피는 당업자에 의해 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 1㎕ 내지 150㎖의 부피가 선택될 수 있고, 성인의 경우 더 높은 부피가 선택될 수 있다. 전형적으로, 신생아의 경우, 적합한 부피는 약 0.5㎖ 내지 약 10㎖이고, 더 나이든 영아의 경우, 약 0.5㎖ 내지 약 15㎖가 선택될 수 있다. 유아의 경우, 약 0.5㎖ 내지 약 20㎖의 부피가 선택될 수 있다. 어린이의 경우, 최대 약 30㎖의 부피가 선택될 수 있다. 10대 이전 및 10대의 경우, 최대 약 50㎖의 부피가 선택될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 환자는 약 5㎖ 내지 약 15㎖ 또는 약 7.5㎖ 내지 약 10㎖의 부피로 척수강내 투여를 받을 수 있다. 다른 적합한 부피 및 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이점의 균형을 맞추기 위해 조정될 것이며, 이러한 투여량은 재조합 벡터가 사용되는 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다.

[0238] 척수강내 전달을 위한 일 실시형태에서, 환자는 성인 대상체이며, 용량은 약 1×10^{8} GC 내지 5×10^{14} GC를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 용량은 약 3.8×10^{12} 내지 약 1.9×10^{14} GC를 포함한다. 추가의 실시형태에서, 환자는 적어도 약 3개월 내지 최대 12개월의 헐러 증후군이 있는 영아 대상체이며, 용량은 4×10^{8} GC rAAV.hIDUA/g 뇌 질량 내지 3×10^{12} GC rAAV.hIDUA/g 뇌 질량과 적어도 동등한 양을 포함한다. 또 다른 예에서, 환자는 적어도 약 6세 내지 최대 18세의 헐러-샤이에 증후군이 있는 어린이이며, 용량은 적어도 4×10^{8} GC rAAV.hIDUA/g 뇌 질량 내지 3×10^{12} GC rAAV.hIDUA/g 뇌 질량과 동등한 양을 포함한다.

[0239] **효능의 모니터링**

[0240] 요법의 효능은 (a) MPSI 환자에서 신경인지 장애의 예방; 및 (b) 질환의 바이오마커, 예를 들어, CSF, 혈청 및/또는 소변 및/또는 간 및 비장 부피에서의 GAG 수준 및/또는 효소 활성의 감소를 평가함으로써 측정될 수 있다. 신경인지는, 예를 들어, 헐러 대상체에 대한 Bayley의 영아 발달 척도에 의해 측정되거나 또는 헐러-샤이에 대상체에 대한 Wechsler의 약식 지능 척도(Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence: WASI)에 의해 측정되는 바와 같이 지능 지수(intelligence 지수: IQ)를 측정함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어, Bayley의 영아 발달 척도(BSID-III)를 사용한 발달 지수(developmental quotient: DQ)를 평가하거나, Hopkins 언어 학습 테스트 및/또는 주의력 변화 테스트(Tests of Variables of Attention: TOVA)를 사용하여 기억력을 평가하는 신경인지 발달 및 기능에 대한 다른 적절한 측정이 이용될 수 있다. vineland의 적응 행동 척도, 시각 처리, 소근육 운동, 의사소통, 사회화, 일상 생활 기술, 및 감정 및 행동 건강과 같은 기타 신경심리학적 기능이 모니터링된다. 체적 측정을 위한 뇌의 자기 공명 영상(Magnetic Resonance Imaging: MRI), 확산 텐서 영상(diffusion tensor imaging: DTI) 및 안정 상태 데이터, 초음파에 의한 정중 신경 단면적, 척수 압박의 개선, 안전성, 간 크기 및 비장 크기 등도 모니터링된다.

[0241] 선택적으로, 효능의 다른 측정은 바이오마커(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 폴리아민) 및 임상 결과의 평가를 포함할 수 있다. 소변은 총 GAG 함량, 크레아틴에 대한 GAG의 농도뿐만 아니라 MPS I 특이적 pGAG에

대해 평가된다. 혈청 및/또는 혈장은 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, pGAG, 및 헤파린 보조인자 II-트롬빈 복합체 및 염증 마커의 농도에 대해 평가된다. CSF는 IDUA 활성, 항-IDUA 항체, 헥소사미니데이스(hex) 활성 및 pGAG(예컨대, 헤파란 설페이트 및 더마탄 설페이트)에 대해 평가된다. 벡터에 대한 중화 항체 및 항-IDUA 항체에 대한 결합 항체의 존재는 CSF 및 혈청에서 평가될 수 있다. 벡터 캡시드 또는 hIDUA 이식유전자 산물에 대한 T-세포 반응은 ELISPOT 검정에 의해 평가될 수 있다. CSF, 혈청 및 소변에서 IDUA 발현의 약동학뿐만 아니라 벡터 농도도 또한 모니터링될 수 있다.

[0242] hIDUA의 전신 전달을 수반하는 CNS로의 rAAV.hIDUA의 유전자 요법 전달의 조합은 본 발명의 방법에 포함된다. 전신 전달은 ERT(예를 들어, Aldurazyme® 사용)를 사용하거나 또는 간에 친화성이 있는 rAAV.hIDUA(예를 들어, AAV68 캡시드를 보유하는 rAAV.hIDUA)를 사용하는 추가적인 유전자 요법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0243] 전신 전달과 관련된 임상 효능의 추가적인 측정은, 예를 들어, 이중 에너지 x-선 흡광계측법(dual energy x-ray absorptiometry: DXA)에 의해 측정된 골 무기질 밀도, 골 무기질 함량, 골 기하 구조 및 강도, 골밀도와 같은 정형외과 측정; 신장(연령에 따른 서 있는 높이/누운 길이에 대한 Z-점수); 뼈 대사의 마커: 혈청 오스테오칼신(OCN) 및 뼈-특이적 알칼리 포스파테이스(bone-specific alkaline phosphatase: BSAP), I형 콜라겐의 카복시말단 텔로펩타이드(carboxyterminal telopeptide of type I collagen: ICTP)와 I형 콜라겐의 카복시말단 텔로펩타이드 α1 사슬(carboxyterminal telopeptide α1 chain of type I collagen: CTX); 유연성 및 근육 강도: 6분 걷기 연구(바이오덱스 III 등속성 강도 테스트 시스템이 각 참가자의 무릎 및 팔꿈치의 강도를 평가하는데 사용됨)를 포함한 바이오덱스 및 신체적 요법 평가; 능동 관절 운동 범위(Range of Motion: ROM); 아동 건강 평가 설문지/건강 평가 설문지(어린이 Health Assessment Questionnaire/Health Assessment Questionnaire: CHAQ/HAQ) 장애 지수 점수; 개체의 심폐 능력을 모니터링하기 위한 근전도(Electromyographic: EMG) 및/또는 산소 이용: 운동 테스트 중 최대 산소 흡수량(VO2 피크); 무호흡/저호흡 지수(Apnea/Hypopnea Index: AHI); 강제 폐활량(Forced Vital 능력: FVC); 좌심실 질량(Ventricular Mass: LVM)을 포함할 수 있다.

[0244] 소정의 실시형태에서, 환자에서 MPSI를 진단 및/또는 치료하거나 또는 치료를 모니터링하는 방법이 제공된다. 방법은 MPSI를 갖는 것으로 의심되는 인간 환자로부터 뇌척수액 또는 혈장 샘플을 얻는 단계; 샘플에서 스페르민 농도 수준을 검출하는 단계; 1 ng/㎖ 초과의 스페르민 농도를 갖는 환자에서 MPS I으로부터 선택되는 뮤코다당류축적증이 있는 환자를 진단하는 단계; 및 유효량의 인간 알파-L-아이두로니데이스(hIDUA)를 본 명세서에 제공되는 바와 같이 진단된 환자에게, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 장치를 사용하여 전달하는 단계를 포함한다.

[0245] 또 다른 양태에서, 방법은 MPSI 요법을 모니터링하고 조정하는 단계를 포함한다. 이러한 방법은 MPSI에 대한 요법을 받은 인간 환자로부터 뇌척수액 또는 혈장 샘플을 얻는 단계; 질량 스펙트럼 분석을 수행함으로써 샘플에서 스페르민 농도 수준을 검출하는 단계; MPSI 치료제의 투여량 수준을 조정하는 단계를 포함한다. 예를 들어, "정상" 인간 스페르민 농도는 뇌척수액에서 약 1 ng/㎖ 이하이다. 그러나, MPSI가 치료되지 않은 환자는 2 ng/㎖ 초과 및 최대 약 100 ng/㎖의 스페르민 농도 수준을 가질 수 있다. 환자의 수준이 정상 수준에 근접한 경우, 임의의 동반 ERT의 용량은 더 낮출 수 있다. 반대로, 환자가 목적하는 스페르민 수준보다 더 높은 수준을 갖는 경우, 더 높은 용량 또는 추가적인 요법, 예를 들어, ERT가 환자에게 제공될 수 있다.

[0246] 스페르민 농도는 적합한 검정을 사용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 문헌[J Sanchez-Lopez, et al, "Underivatives polyamine analysis is plant samples by ion pair liquid chromatography coupled with electrospray tandem mass spectrometry," Plant Physiology and Biochemistry, 47 (2009): 592-598, avail online 28 Feb 2009; MR Hakkinen et al, "Analysis of underivatized polyamines by reversed phase liquid chromatography with electrospray tandem mass spectrometry", J Pharm Biomec Analysis, 44 (2007): 625-634]에 기술되어 있는 검정, 정량적 동위원소 희석 액체 크로마토그래피(LC)/질량 분석(MS) 검정. 다른 적합한 검정이 사용될 수 있다.

[0247] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 초기 신경인지 결함이 있는 MPS I를 갖는 소아 대상체에서 투여 후 52주에 신경인지를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 CSF 글리코사미노글리칸(GAG)과 MPS I 환자의 신경인지의 관계를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 자기 공명 영상(MRI), 예를 들어, 회백질 및 CSF 뇌실의 체적 분석에 의해 측정된 바와 같이 MPS I 환자의 CNS에 대한 신체적 변화에 대한 치료제의 효과를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 뇌척수액(CSF), 혈청 및 소변에서 바이오마커(예를 들어, GAG, HS)에 대한 치료제의 약력학적 효과를 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본

명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 삶의 질(quality of life: QOL)에 대한 치료제의 영향을 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 운동 기능에 대한 치료제의 영향을 평가함으로써 결정된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료제의 효능은 MPS I 환자의 성장 및 발달 이정표에 대한 치료제의 효과를 평가함으로써 결정된다.

[0248] 본 명세서에 기재된 rAAV 벡터로부터 발현되는 바와 같이, CSF, 혈청 또는 다른 조직에서 검출되는 바와 같은 적어도 약 2%의 발현 수준은 치료적 효과를 제공할 수 있다. 그러나, 더 높은 발현 수준이 달성될 수 있다. 이러한 발현 수준은 정상적인 기능적 인간 IDUA 수준의 2% 내지 약 100%일 수 있다. 소정의 실시형태에서, 정상보다 더 높은 발현 수준이 CSF, 혈청 또는 다른 조직에서 검출될 수 있다.

[0249] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 이의 증상을 치료, 예방 및/또는 완화하는 방법은 헐러 대상체에 대한 Bayley의 영아 발달 척도를 사용하여 평가되는 바와 같이 치료받은 환자에서 지능 지수(IQ)의 상당한 증가를 초래한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 이의 증상을 치료, 예방 및/또는 완화하는 방법은 헐러-샤이에 대상체에 대한 Wechsler 약식 지능 척도(WASI)에 의해 측정되는 바와 같이 치료받은 환자에서 신경인지 IQ의 상당한 증가를 초래한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 이의 증상을 치료, 예방 및/또는 완화하는 방법은 Bayley의 영아 발달 척도를 사용하여 평가되는 바와 같이 치료받은 환자에서 신경인지 DQ의 상당한 증가를 초래한다.

[0250] 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 이의 증상을 치료, 예방 및/또는 완화하는 방법은 기능적 인간 IDUA 수준의 상당한 증가를 초래한다. 소정의 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 MPS I 및/또는 이의 증상을 치료, 예방 및/또는 완화하는 방법은 환자의 혈청, 소변 및/또는 뇌척수액(CSF)의 샘플에서 측정되는 바와 같이 GAG 수준의 상당한 감소를 초래한다.

[0251] **병용 요법**

[0252] hIDUA의 전신 전달을 수반하는 CNS로의 rAAV.hIDUA의 유전자 요법 전달의 조합은 본 발명의 방법에 포함된다. 전신 전달은 ERT(예를 들어, Aldurazyme® 사용) 또는 rAAV.hIDUA를 사용하는 추가적인 유전자 요법을 사용하여 달성될 수 있다.

[0253] 소정의 실시형태에서, rAAV.hIDUA의 척수강내 투여는, 예를 들어, 간으로 지시된 제2 AAV.hIDUA 주사와 함께 병용 투여된다. 이러한 예에서, 벡터는 동일할 수 있다. 예를 들어, 벡터는 동일한 캡시드 및/또는 동일한 벡터 게놈 서열을 가질 수 있다. 대안적으로, 벡터는 상이할 수 있다. 예를 들어, 벡터 스톡 각각은 상이한 조절 서열(예를 들어, 각각 상이한 조직-특이성 프로모터를 가짐), 예를 들어, 간-특이적 프로모터 및 CNS-특이적 프로모터로 설계될 수 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 벡터 스톡 각각은 상이한 캡시드를 가질 수 있다. 예를 들어, 간으로 지시된 벡터 스톡은 AAV8, AAVhu68, AAV9, AAVrh91, AAVrh64R1, AAVrh64R2, AAVrh8, AAVrh10, AAV3B 또는 AAVdj 등으로부터 선택되는 캡시드를 가질 수 있다. 이러한 양생법에서, 각 벡터 스톡의 용량은 척수강내로 전달된 총 벡터가 약 1×10^{8} GC 내지 1×10^{14} GC의 범위 내에 있도록 조정될 수 있고; 다른 실시형태에서, 두 경로 모두에 의해 전달된 조합된 벡터는 1×10^{11} 내지 1×10^{16}의 범위이다. 대안적으로, 각 벡터는 약 10^{8} GC 내지 약 10^{12} GC/벡터의 양으로 전달될 수 있다. 이러한 용량은 실질적으로 동시에 또는 상이한 시간에, 예를 들어, 약 1일 내지 약 12주 간격, 또는 약 3일 내지 약 30일 또는 다른 적합한 시간에 전달될 수 있다.

[0254] 일부 실시형태에서, 환자에게 간-지시된 척수강내 주사를 통해 rAAV.hIDUA가 병용 투여된다. 일부 실시형태에서, 치료 방법은 (a) MPS I 및/또는 헐러, 헐러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 환자에게 충분한 양의 hIDUA 효소 또는 간 지시된 rAAV-hIDUA를 투여하여 이식유전자-특이적 내성을 유도하는 단계; 및 (b) rAAV.hIDUA를 환자의 CNS에 투여하여 환자에서 hIDUA의 치료적 수준의 발현을 지시하는 단계를 포함한다.

[0255] 추가의 실시형태에서, MPSI 및/또는 헐러, 헐러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 환자에게 충분한 양의 hIDUA 효소 또는 간-지시된 rAAV-hIDUA로 내성을 유도(내성을 유도)하여 이식유전자-특이적 내성을 유도한 후, 환자에게 hIDUA의 CNS-지시된 rAAV-매개성 전달을 수행하는 단계를 포함하는 MPSI 및/또는 헐러, 헐러-샤이에 및 샤이에 증후군과 관련된 증상을 갖는 인간 환자의 치료 방법이 제공된다. 소정의 실시형태에서, 예를 들어, 환자가 4주 미만(신생아 단계)이거나 또는 영아인 경우 환자에게 hIDUA에 대해 내성을 유도하기 위해 환자에게 간-지시된 주사를 통해 rAAV.hIDUA가 투여되며, 그리고 환자가 영아, 어린이 및/또는 성인인 경우 CNS에서 hIDUA의 치료적 농도를 발현하기 위해 환자는 이후에 척수강내 주사를 통해 rAAV.hIDUA를 투여받는다.

[0256] 일례에서, MPSI 환자는 출생 후 약 2주 이내, 예를 들어, 약 0일 내지 약 14일, 또는 약 1일 내지 12일, 또는 약 3일 내지 약 10일 또는 약 5일 내지 약 8일 이내에 hIDUA를 환자에게 전달함으로써 내성이 유도되며, 즉, 환자는 신생아이다. 다른 실시형태에서, 나이가 많은 영아가 선택될 수 있다. hIDUA의 내성 유도 용량은 rAAV를 통해 전달될 수 있다. 그러나, 또 다른 실시형태에서, 용량은 효소(효소 대체 요법)의 직접 전달에 의해 전달된다. 차이니즈 햄스터 난소(Chinese hamster ovary: CHO) 세포에서 재조합 hIDUA를 생산하고, 담배 세포(문헌[LH Fu, et al, Plant Science (Impact Factor: 3.61). 12/2009; 177(6):668-675]) 또는 식물 종자(문헌[X He et al, Plant Biotechnol J. 2013 Dec; 11(9): 1034- 1043])에서 가용성 rhIDUA를 생산하는 방법은 문헌에 기술되어 있다.

[0257] 추가적으로, 재조합 hIDUA는 Aldurazyme®(라로니데이스)로 상업적으로 생산되며; 항-인간 인슐린 수용체 단일클론 항체와 알파-L-아이두로니데이스의 융합 단백질[AGT-181; 암젠(ArmaGen, Inc)]이 유용할 수 있다. 현재 덜 선호되지만, 효소는 "네이키드" DNA, RNA 또는 또 다른 적합한 벡터를 통해 전달될 수 있다. 일 실시형태에서, 효소는 정맥내로 및/또는 척수강내로 환자에게 전달된다. 또 다른 실시형태에서, 또 다른 투여 경로가 사용된다(예를 들어, 근육내, 피하 등). 일 실시형태에서, 내성을 유도하기 위해 선택된 MPSI 환자는 내성을 유도하는 투여를 시작하기 전에 임의의 검출 가능한 양의 hIDUA를 발현할 수 없다. 재조합 인간 IDUA 효소가 전달될 때, 척수강내 rhIDUA 주사는 주사당(예를 들어, 정맥내 또는 척수강내) 약 0.58 mg/kg 체중 또는 약 0.25mg 내지 약 2mg의 총 rhIDUA로 구성될 수 있다. 예를 들어, 총 9cc를 주사하기 위해 3cc의 효소(예를 들어, 대략 1.74mg의 Aldurazyme®(라로니데이스))가 6cc의 Elliotts B® 용액으로 희석된다. 대안적으로, 더 높은 또는 더 낮은 용량이 선택된다. 유사하게는, 벡터로부터 발현될 때, 더 낮은 발현된 단백질 수준이 전달될 수 있다. 일 실시형태에서, 내성을 유도하기 위해 전달된 hIDUA의 양은 치료학적 유효량보다 더 낮다. 그러나, 다른 용량이 선택될 수 있다.

[0258] 전형적으로, 내성을 유도하는 용량의 투여 후, 치료적 용량은, 예를 들어, 내성을 유도하는 투여 후 약 3일 내지 약 6개월, 보다 바람직하게는, 내성을 유도하는 투여 후 약 7일 내지 약 1개월 이내에 대상체에게 전달된다. 그러나, 대기하는 기간이 더 길거나 또는 더 짧을 수 있으므로, 이들 범위 내의 다른 시점이 선택될 수 있다.

[0259] 대안으로, 면역억제 요법은 벡터 투여 전, 도중 및/또는 이후에 벡터에 추가로 제공될 수 있다. 면역억제 요법은 위에 기재된 바와 같은 프레드니솔론, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 타콜리무스 또는 시롤리무스를 포함할 수 있다. 아래에 기재된 타콜리무스가 없는 양생법이 바람직할 수 있다.

[0260] **키트**

[0261] 소정의 실시형태에서, 제형(선택적으로 동결된)에 현탁된 농축된 발현 카세트(예를 들어, 바이러스 또는 비-바이러스 벡터에서), 선택적 희석 완충액 및 척수강내, 뇌실내 또는 수조내 투여에 필요한 장치 및 성분을 포함하는 키트가 제공된다. 또 다른 실시형태에서, 키트는 추가적으로 또는 대안적으로 정맥내 전달을 위한 성분을 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 키트는 주사를 가능하게 하기에 충분한 완충액을 제공한다. 이러한 완충액은 농축된 벡터의 약 1:1 내지 1:5 희석 또는 그 이상을 허용할 수 있다. 다른 실시형태에서, 치료 임상의가 용량 적정 및 다른 조정을 할 수 있도록 더 많거나 또는 더 적은 양의 완충액 또는 멸균수가 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 장치의 하나 이상의 구성 요소가 키트에 포함된다. 식염수, 포스페이트 완충 식염수(PBS) 또는 글리세롤/PBS와 같은 적합한 희석 완충액이 이용 가능하다.

[0262] 본 명세서에 기재된 키트의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0263] **장치**

[0264] 일 양태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은, 예를 들어, 그 전문이 참조에 의해 본 명세서에 원용되어 있는 WO 2017/136500에 기술되어 있는 방법 및/또는 장치를 통해 척수강내로 투여될 수 있다. 요약하면, 방법은 척추 바늘을 환자의 대조에 전진시키는 단계, 척추 바늘의 근위 허브에 가요성 튜브 한 가닥을 연결하고 가요성 튜브의 근위 단부에 밸브의 출구 포트를 연결하는 단계, 및 상기 전진 및 연결 단계 후에 그리고 튜브가 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후, 일정량의 등장성 용액을 포함하는 제1 용기를 밸브의 플러시 주입 포트에 연결한 후 일정량의 약제학적 조성물을 포함하는 제2 용기를 밸브의 벡터 주입 포트에 연결하는 단계를 포함한다. 밸브에 제1 및 제2 용기를 연결한 후, 밸브의 벡터 주입 포트와 출구 포트 사이에 유체 흐름의 경로가 열리고, 약제학적 조성물이 척추 바늘을 통해 환자에게 주입되고, 약제학적 조성물을 주입한 후, 유체 흐름을 위한 경로는 밸브의 플러시 주입 포트 및 출구 포트를 통해 열리고, 등장성 용액이 척추 바늘에 주입되어 약제학적

조성물을 환자에게 플러싱한다. 이러한 방법 및 이러한 장치는 각각 선택적으로 본 명세서에 제공된 조성물의 척수강내 전달에 사용될 수 있다. 대안적으로, 다른 방법 및 장치가 이러한 척수강내 전달에 사용될 수 있다.

[0265] 본 명세서에 기재된 장치의 조성물은 명세서 전반에 걸쳐 기재된 다른 조성물, 양생법, 양태, 실시형태 및 방법에 적용되는 것으로 이해되어야 한다.

[0266] **실시예**

[0267] 본 발명은 이제 하기 실시예를 참조하여 설명된다. 이들 실시예는 단지 예시의 목적으로 제공되며, 본 발명은 이러한 실시예에 제한되는 것으로 결코 해석되어서는 안되며, 오히려 본 명세서에 제공된 교시의 결과로서 명백해지는 임의의 및 모든 변형을 포괄하는 것으로 해석되어야 한다.

[0268] **실시예 1: 물질 및 방법**

[0269] *동물*

[0270] 모든 동물 절차는 펜실베니아 대학의 동물 실험 윤리 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다. 레서스 마카크(마카카 뮬라타(*Macaca mulatta*))는 코베인 리서치 프로덕츠사(Covance Research Products, Inc.) 및 프라임젠/프리랩스 프라이메이츠(Primgen/Prelabs Primates)로부터 조달하였다. 동물은 펜실베니아 대학의 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of laboratory Animal Care: AAALAC) 국제 위원회에서 인증한 비인간 영장류 리서치 프로그램 시설의 스테인리스 스틸 압착식 케이지에서 사육하였다. 동물에게 간식, 시각 및 청각 자극, 조작 및 사회적 상호작용과 같은 다양한 환경을 조성해 주었다. C56BL/6J 마우스(스톡 #000664)는 잭슨 래보래토리(Jackson 실험실)로부터 구입하였다. 동물은 펜실베니아 대학 유전자 요법 프로그램의 AAALAC 국제 위원회에서 인증한 마우스 장벽 동물 사육장에 가두어 케이지당 2마리 내지 5마리의 동물을 환경이 강화된 표준 우리에서 사육하였다(네스트렛 네스팅 매터리얼(Nestlets nesting material)). 케이지, 물병 및 베딩 물질은 무균 시설에서 고압멸균 처리하였고, 케이지는 매주 1회 교체하였다. 자동으로 제어되는 12시간 명암 주기를 유지하였다. 각 암기(dark period)는 1900시간(±30분)에 시작하였다. 조사된 실험실 설치류용 먹이는 임의로 제공하였다.

[0271] 동물 관리에 의해 그리고/또는 수의사가 가능한 개입이 필요한 임의의 상태에 대해 매일 시각적으로 동물을 모니터링하였다. 여기에는 독성, 고통 및/또는 행동 변화의 징후에 대한 동물의 일반적인 모습을 모니터링하는 것을 포함하였다. 특정 연구 시점에서, 동물은 또한 활력 징후를 포함하지만 이로 제한되지 않는 추가적인 매개변수에 대해 모니터링하였고, 임상 병리학을 위해 혈액을 수집하였다. 기재된 연구에 등록된 모든 동물은 1개월에 최대 1회 신경학적 평가를 받았다. 신경학적 검사에는 정신활동, 자세, 고유수용감각 및 보행에 대한 케이지 내 평가(cage-side evaluation)뿐만 아니라 뇌신경, 운동 강도 및 반사에 대한 통제된 평가(restrained evaluation)를 포함하였다. 동물은 행동 변화 또는 식욕의 현저한 변화와 같은 통증 또는 불편함의 임의의 징후에 대해 관리 직원이 매일 관찰하였다. 임의의 임상 이상은 연구 수의사 및 연구 책임자에게 보고하였으며, 이들 중 어느 것도 테스트 물품 투여와 관련된 것으로 의심되지 않았다.

[0272] **벡터**

[0273] 제조업체의 지침에 따라 주형으로 pAAV2/9를 사용하여 QuikChange Lightning 부위-지정 돌연변이유발 키트(애질런트 테크놀로지스(Agilent Technologies), Cat #210515)로 AAV9.PHP.B 트랜스-플라스미드(pAAV2/PHP.B)를 생성하였다. AAV 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 생성하고 적정하였다(*37*). 간략하게는, HEK293 세포를 삼중-형질감염시키고, 배양 상청액을 수확하고, 농축하고, 아이오딕사놀 구배로 정제하였다. 정제된 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 토끼 베타-글로빈 폴리A 서열을 표적화하는 프라이머를 사용하여 액적 디지털 PCR로 적정하였다(*38*). 인간 알파-L-아이두로니데이스 hIDUA)를 암호화하는 조작된 서열을 CB7 프로모터하에 클로닝하였다. 마이크로RNA 서열은 공개 데이터베이스 mirbase.org에서 얻었다(Hsa-mir-183 MI0000273; Hsa-mir-182 MI0000272; Hsa-mir-96 MI0000098; Hsa-mir-145 MI0000461). DRG-풍부한 miR에 대한 표적의 4개의 탠덤 반복부를 녹색 형광 단백질(GFP) 또는 hIDUA 시스-플라스미드의 3' 비번역 영역(UTR)에 클로닝하였다.

[0274] *생체내 연구 및 조직학*

[0275] 마우스에 측면 꼬리 정맥을 통해 1×10^{12} 게놈 카피(GC; 5×10^{13} GC/kg)의 AAV-PHP.B 또는 4×10^{12} GC(2×10^{14} GC/kg)의 0.1㎖의 PBS(비히클) 중 DRG-miR 표적이 있거나 없는 향상된 GFP를 암호화하는 AAV9 벡터를 투여하고, 주사 후 제21일에 CO_2의 흡입에 의해 안락사시켰다. 뇌에서 시작하여 조직을 즉시 수집하고, 10% 중성 완충 포르말린에서 약 24시간 동안 침지-고정시키고, 인산-완충 식염수(PBS)로 간단히 세척하고, 4℃에서 PBS 중 15%

및 30% 수크로스에서 순차적으로 평형화시켰다. 그런 다음, 조직을 최적 절단 온도의 포매 매질에서 동결시키고, GFP 시각화를 위해 동결 절단하였다(뇌는 30㎛로 절단하였고, 다른 조직은 8㎛ 두께로 절단함). 이미지는 Nikon Eclipse Ti-E 형광 현미경으로 얻었다. DRG에서 GFP 발현은 면역조직화학(IHC)에 의해 분석하였다. DRG가 포함된 척주를 24시간 동안 포르말린에 고정시키고, 부드러워질 때까지 10% 에틸렌다이아민테트라아세트산(pH 7.5)에서 탈석회화하고, 표준 프로토콜에 따라 파라핀-포매시켰다. 절편을 에탄올 및 자일렌 시리즈를 통해 탈파라핀화하고, 10mM 시트레이트 완충액(pH 6.0)에서 6분 동안 끓여 항원 복원을 수행하고, 2% H_2O_2(15분), 아비딘/바이오틴 차단 시약(각 15분; 벡터 래보래토리즈(벡터 Laboratories)) 및 차단 완충액(10분 동안 PBS 중 1% 당나귀 혈청 + 0.2% Triton)으로 순차적으로 차단시킨 후, 차단 완충액에 희석된 1차(37℃에서 1시간) 및 바이오티닐화된 2차 항체(1:500으로 희석, 45분; 잭슨 이뮤노리서치(Jackson ImmunoResearch))와 함께 인큐베이션하였다. GFP에 대한 토끼를 항체를 1차 항체(NB600-308, 노부스 바이올로지컬즈(Novus Biologicals); 1:500로 희석)로 사용하였다. DAB를 기질로 사용하는 Vectastain Elite ABC 키트(벡터 래보래토리즈)를 사용하면 결합된 항체를 갈색 침전물로 시각화할 수 있다.

[0276] *비-인간 영장류(NHP)*

[0277] NHP에게 3.5×10^{13} GC의 AAVhu68.GFP 벡터 또는 1×10^{13} GC의 AAVhu68.hIDUA 벡터를 이전에 기재된 바와 같이 형광 투시경의 안내하에 대조에 주사된 1㎖의 멸균 인공 CSF(비히클)의 총 부피를 투여하였다(*40*). 안전 판독을 위해 기간 동안 혈액 수집 및 뇌척수액(CSF) 탭(tap)을 수행하였다. 혈청 화학, 혈액학, 응고 및 CSF 분석은 계약 시설인 안테크 다이그노스틱스(Antech Diagnostics)에서 수행하였다. 동물을 정맥내 펜토바르비탈의 과다투여로 안락사시키고 부검하였다; 그런 다음, 종합적인 병리조직학적 검사를 위해 조직을 채취하였다. 수집된 조직을 즉시 포르말린에 고정시키고 파라핀에 포매시켰다. 조직병리학을 위해, 조직 절편을 표준 프로토콜에 따라 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. GFP 발현에 대한 IHC는 GFP에 대한 상이한 항체(염소 항체 NB100-1770, 노부스 바이올로지컬즈; 1:500으로 희석, 4℃에서 밤새 인큐베이션됨)를 사용하지만 마우스 연구에 대해 기재된 바와 같이 수행하였다. hIDUA에 대한 면역염색은 IHC에 대한 위의 프로토콜에 따라 hIDUA에 대한 양 항체(AF4119, 알앤디 시스템즈(R&D Systems); 1:200으로 희석됨)를 사용하여 수행하였다. 또한, 절편을 동일한 1차 항체를 사용하여 면역형광(IF)에 의해 hIDUA에 대해 염색하였다. IF의 경우, 절편을 탈파라핀화하고, 위에 기재된 바와 같이 항원 복원을 위해 처리한 다음, PBS 중 1% 당나귀 혈청 + 0.2% Triton에서 25분 동안 차단시킨 다음 차단 완충액에 희석된 1차(실온에서 2시간, 1:50으로 희석) 및 FITC-표지된 2차(45분; 잭슨 이뮤노리서치; 1:100으로 희석) 항체와 함께 순차적으로 인큐베이션하였다. 절편을 핵 대조염색으로 DAPI를 사용하여 Fluoromount G로 마운팅하였다.

[0278] 내인성 원숭이 IDUA RNA에 결합하지 않는 벡터 게놈으로부터 전사된 RNA에 특이적인 프로브를 사용하여 인시투 혼성화(In situ hybridization: ISH)를 수행하였다. Z-형 프로브 쌍은 라이프 테크놀로지스에서 합성하였으며, ISH는 제조업체의 프로토콜에 따라 라이프 테크놀로지스의 ViewRNA ISH 조직 검정 키트를 사용하여 파라핀 절편에서 수행하였다. 양성 신호를 나타내는 Fast Red 침전물의 침착은 로다민 필터 세트를 사용하는 형광 현미경으로 이미지화하였다. IDUA IHC가 있는 조직 절편은 슬라이드 스캐너(레이카 바이오시스템즈(Leica Biosystems))를 사용하여 정량화 목적으로 스캔하였다.

[0279] *조직병리학 및 형태측정 병리 점수 매기기*

[0280] 벡터 그룹에 대해 맹검인 위원회에서 인증한 전문의 자격이 있는 수의 병리학자가 0 병변의 부재, 1 초경도(10% 미만), 2 경도(10% 내지 25%), 3 중등도(25% 내지 50%), 4 위중(50% 내지 95%) 및 5 중증(95% 초과)으로 정의한 중증도 등급을 확립하였다. 배측 축삭병증 점수는 각 동물에서 적어도 3개의 경추, 3개의 흉추 및 3개의 요추 절편으로부터 확립하였고; DRG 중증도 등급은 적어도 3개의 경추, 3개의 흉추 및 3개의 요추 분절로부터 확립하였으며; 정중 신경 점수는 가능한 최대 점수 10으로 축삭병증과 섬유증 중증도 등급의 합이었으며, 좌우 신경의 원위 및 근위 부분에서 확립하였다. 이식유전자 발현의 정량화를 위해, 위원회에서 인증한 수의 병리학자가 처리되지 않은 동물로부터 얻은 대조군 슬라이스로부터의 신호와 비교하여 항-GFP 또는 항-hIDUA 항체로 면역 염색된 세포를 계수하였다. ×20 배율 필드당 양성 세포의 총 수는 구조 및 동물당 최소 5개의 필드에서 ImageJ 또는 Aperio Image Scope 세포 계수기 도구를 사용하여 수동으로 계수하였다.

[0281] *ISH 정량화*

[0282] 주어진 절편 내에서 핵 신호(포함된 벡터 게놈)를 나타내는 DRG 뉴런의 세포질 ISH 신호를 정량화하였다. 염색된 슬라이드를 스캔하고, 분석할 DRG의 전체 영역을 포함시키기 위해 스크린 샷을 찍었다. ImageJ의 Fiji 버전

을 사용하여, ISH 채널만을 표시하는 이미지는 동일한 설정에서 역치화하고(thresholded), ISH 및 DAPI 채널을 표시하는 해당 이미지와 동기화(창 동기화 도구를 사용)시켰다. 그런 다음, 역치화된 이미지에 표시된 세포질 영역에서 ISH 신호가 차지하는 영역의 백분율을 '측정' 도구로 결정하였다.

[0283] *벡터의 체내 분포*

[0284] NHP 조직 DNA를 QIAamp DNA Mini 키트(퀴아젠 Cat #51306)로 추출하고, 벡터 게놈은 Taqman 시약(어플라이드 바이오시스템즈, 라이프 테크놀로지스) 및 벡터의 rBG 폴리아데닐화 서열을 표적화하는 프라이머/프로브를 사용하여 qRT-PCR에 의해 정량화하였다.

[0285] *면역학*

[0286] hIDUA에 대한 말초 혈액 T-세포 반응은 이전에 공개된 방법에 따라 인터페론 감마 효소-연결 면역흡착 반점 검정에 의해 측정하였으며, hIDUA 이식유전자에 특이적인 펩타이드 라이브러리를 사용하였다. 양성 반응 기준은 10^6개의 림프구당 55개 초과의 반점 형성 단위였으며, 자극이 없을 때 중간 음성 대조군의 3배였다. 또한, 연구 제90일에 부검 후 비장, 간 및 심부 경추 림프절로부터 추출된 림프구에서 T-세포 반응을 검정하였다. hIDUA에 대한 항체는 혈청(1:1,000 샘플 희석)에서 측정하였다.

[0287] 사이토카인/케모카인 분석: CSF 샘플을 수집하고, 분석할 때까지 -80℃에서 보관하였다. 다음 분석물을 포함하는 Milliplex MAP 키트를 사용하여 CSF 샘플을 분석하였다: sCD137, 에오탁신, sFasL, FGF-2, 프랙탈카인, 그랜자임 A, 그랜자임 B, IL-1α, IL-2, IL-4, IL-6, IL-16, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-21, IL-22, IL-23, IL-28A, IL-31, IL-33, IP-10, MIP-3α, 퍼포린, TNFβ. CSF 샘플을 Luminex xPONENT 4.2; Bio-Plex Manager 소프트웨어 6.1을 사용하여 FLEXMAP 3D 기기에서 2회 반복으로 평가하고 분석하였고. CV%가 20% 미만인 샘플만을 분석에 포함시켰다.

[0288] *시험관내 연구*

[0289] *miR183 발현*

[0290] MIR183 인간 마이크로RNA 발현 플라스미드는 GFP 및 부분 내부 리보솜 진입 부위를 암호화하는 KpnI-PstI 단편을 결실시킴으로써 오리젠(Origene) MI0000273 벡터로부터 변형되었다. 본 발명자들은 일시적 형질감염 및 항-GFP 면역블로팅에 의해 변형된 벡터로부터 GFP 발현의 부족을 확인하였다. HEK293 세포에서 GFP 발현 카세트의 3'-UTR에 위치한 마이크로RNA 결합 부위를 보유하는 GFP 시스-플라스미드로 폴리에틸렌이민-매개성 일시적 형질감염을 수행하였다. 형질감염 후 72시간에, 프로테이스 저해제와 함께 50mM Tris-HCl(pH 8.0), 150mM NaCl 및 0.5% Triton X-100에서 세포를 용해시켰다. 총 13㎍의 세포 용해물을 항-GFP 면역블로팅에 이어 전기화학발광-기반 신호 검출 및 정량화에 사용하였다. 통계적 분석을 위해 실험을 3회 반복 수행하였다.

[0291] *miR183 정량화(RT-PCR)*

[0292] 인간 DRG 및 척수 조직은 아나바이오스사(Anabios, Inc)에서 제공받았다. 요추 DRG 및 척수는 원래 25세의 남성 백인(신경병성 통증의 병력이 없는 동의된 장기 공여자)로부터 얻었으며, RNALater(앰비온(Ambion))에 즉시 보관하였다. 3마리 동물의 NHP 레서스 원숭이 조직을 이전 연구로부터 얻었으며, -80℃ 냉동고에 보관하였다. miRNeasy Mini 키트를 총 RNA 단리(퀴아젠)에 사용하고, 추출된 RNA를 프로토콜 지침에 따라 TaqMan 마이크로RNA 역 전사 키트(어플라이드 바이오시스템즈)로 역전사시켰다. qRT-PCR을 수행하여 제조업체의 지침에 따라 hsa-miR-183-5p(검정 ID 002269) 및 RNU6B(검정 ID 00193)(어플라이드 바이오시스템즈)에 특이적인 프라이머가 포함된 TaqMan 마이크로RNA 검정 키트를 사용하여 상이한 조직에서 miR183의 존재비를 결정하였다. 100ng의 총 RNA로부터 유래된 cDNA를 사용하여 각 qRT-PCR 검정을 3회 반복하여 수행하고, 비교 역치 주기(Ct) 방법에 의해 분석하였다. 평균 발현 miR183을 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 내인성 대조군 유전자로서 RNU6B로 정규화하였다.

[0293] *통계적 분석*

[0294] 대조군 그룹(miR 표적 벡터 없음)과 테스트 그룹(miR 표적 벡터) 간의 통계적 차이는 각 사이토카인에 대해 비-모수적 Kruskal-Wallis 테스트를 사용하여 수행된 사이토카인 분석 및 그룹 간의 차이에 대한 테스트 시점을 제외하고 비-모수적 양측 Wilcoxon 순위-합 테스트, 0.05의 알파 수준(R 버전 4.0.0)를 사용하여 평가하였다(알파 = 0.05; R 버전 4.0.0). 마우스에서 GFP 발현의 경우, 모수적 일원 ANOVA에 이어 Tukey의 다중 비교 테스트(0.05의 알파 수준)를 사용하여 그룹 간의 통계적 차이를 평가하였다. 데이터 세트는 Shapiro-Wilk 정규성 테스트(GraphPad Prism 버전 7.05)를 통과하였다.

[0295] **실시예 2: 이식유전자 발현의 마이크로RNA-매개성 저해는 AAV 벡터에 의한 후근 신경절 독성을 감소시킨다**

[0296] 혈액 또는 뇌 척수액을 통해 비-인간 영장류(NHP)의 중추 신경계(CNS)에 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 전달하는 것은 후근 신경절(DRG) 독성과 관련이 있다. 종래의 면역-억제 양생법은 이러한 독성을 예방하지 못하며, 이는 아마도 독성이 높은 형질도입률로 인해 발생할 수 있으며 결국 표적 세포에서 이식유전자의 과잉으로 인해 세포 스트레스를 유발할 수 있기 때문일 수 있다. 본 발명자들은 miR183에 대한 서열 표적을 해당 이식유전자 mRNA의 3' 비번역 영역 내 벡터 게놈에 도입함으로써 DRG 독성을 제거하는 접근법을 개발하였다.

[0297] *AAV 벡터는 NHP에서 DRG 변성을 유발한다*

[0298] NHP에서의 DRG 독성의 경험을 바탕으로, 본 발명자들은 독성의 중증도를 정량화하는 시스템을 개발하였다. 본 발명자들은 DRG의 척수를 따라 위치한 세포체, 말초 신경 내 축삭 및 배측 백질 신경로를 상행하는 축삭을 평가하였다(도 1a). 본 발명자들은 1차 병변이 DRG에 위치한 감각 뉴런 세포체의 변성이라고 믿는다. 현미경 평가는 다양한 DRG 병변을 강조한다. 초기 신경 변성은 그렇지 않으면 증식하는 위성 및 미세아교 및 침윤된 단핵 세포로 둘러싸인 정상적인 신경 세포체로 구성된다(도 2a). 신경 변성 및 신경세포 포식증의 후기 단계는 미만성 세포질 과호산구증가증 및 핵 소실이 있는 작고 불규칙하거나 또는 각진 신경 세포체를 포함한다(도 1b; 도 2c 및 도 2e). 이식유전자 단백질을 고도로 발현하는 세포는 녹색 형광 단백질(GFP; 도 1b)을 발현하는 AAV 벡터의 ICM 투여를 받은 동물에서 이식유전자 산물 면역염색에 의해 입증된 바와 같이 변성을 겪을 가능성이 더 높다. 세포체 사멸은 축삭병증(원위 및 근위 축삭의 변성)을 수반한다. 척수의 배측 백질 신경로는 축삭 변성과 일치하는 팽창된 축삭과 함께 골수대식세포 및 축삭 찌꺼기가 있거나 없는 확장된 수초를 나타낸다(도 1b; 도 2b, 도 2d 및 도 2f). 도 1c는 다양한 DRG 독성 및 척수 축삭병증 중증도의 예를 예시한다. 등급은 고배율 필드 병리조직학적 검사에서 영향을 받은 조직의 비율을 기준으로 한다: 1 초경도(10% 미만), 2 경도(10% 내지 25%), 3 중등도(25% 내지 50%), 4 위중(50% 내지 95%) 및 5 중증(95% 초과).

[0299] ICM 또는 요추 천자(LP) 경로를 통해 AAV 벡터를 CSF로 투여한 청소년기/성체 NHP에 대한 본 발명자들의 총 경험은 이전 공개된 독성 연구 및 아래에 기재된 2개의 NHP 실험뿐만 아니라 다수의 비공개된 연구를 포함하여 총 27개의 연구에 걸쳐 총 219마리의 원숭이였다. 이러한 경험은 5개의 캡시드, 20개의 이식유전자, 5개의 프로모터(CAG, CB7, UBC, hSyn 및 MeP426), 1×10^{12} GC 내지 3×10^{14} GC의 용량, 구배 또는 칼럼에 의해 정제된 벡터, 3개 제형(인산-완충 식염수 및 2개 상이한 인공 CSF), 및 다양한 발달 단계의 레서스 및 사이노몰구스 마카쿠스를 포함한다. 모든 그룹에서, 본 발명자들은 DRG 독성 및 축삭병증을 관찰하였다. 병리는 주사 후 약 1개월에 최고조에 달하고, 성숙 마카쿠스에서 평가된 가장 긴 기간인 최대 6개월 동안 진행되지 않는다. 대부분의 경우, 병리는 경도에서 중등도이며, NHP는 신경병성 통증을 시사하는 임상 징후를 나타내지 않았다. 그러나, ICM 주사된 GFP를 발현하는 고용량의 벡터는 운동실조와 관련된 중증 병리를 유발할 수 있다.

[0300] *DRG 뉴런에서 특이적으로 발현되는 miRNA는 AAV 이식유전자 발현을 제거할 수 있다*

[0301] 본 발명자들은 DRG 독성을 완화시키는 방법을 고려할 때 여러 메커니즘을 평가하였다. 이전 연구에서, 본 발명자들은 인간 알파-L-아이두로니데이스(hIDUA) 또는 인간 아이두로네이트 2-설파테이스를 발현하는 ICM-투여된 AAV9 벡터인 면역-억제 NHP에 의해 형질도입된 DRG에 대한 파괴적 적응 면역 반응의 역할을 분석하였다. 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및 라파마이신으로 치료하면 벡터 및 이식유전자 산물에 대한 적응 면역 반응이 둔해졌지만, DRG 독성 또는 축삭병증에는 영향을 미치지 않았다.

[0302] 본 발명자들의 작동 모델은 고도로 형질도입된 DRG에서 이식유전자의 산물의 과발현이 신경 손상 및 세포체와 관련 축삭의 변성으로 이어지며 반응성 염증 반응이 뒤따른다고 주장한다(도 3a). 이러한 가설을 테스트하기 위해, 본 발명자들은 특히 이식유전자 발현을 제거하기 위한 전략을 설계하였다. 본 발명자들은 이전에 조혈-유래 세포에서 렌티바이러스 벡터 발현을 제한하거나 또는 AAV-매개성 유전자 전달 후 간, 심장 또는 근육의 비표적화하기 위해 배포된 접근법을 사용하였다. 접근법은 DRG 뉴런에서 단독으로 발현되는 miRNA 표적을 이식유전자의 3' 비번역 영역으로 클로닝하는 것과 관련이 있다(도 3b). 벡터로부터 발현된 임의의 mRNA는 내인성으로 발현된 miRNA에 의해 파괴된다.

[0303] 기존의 miRNA 데이터베이스 및 문헌을 스크리닝한 결과 miRNA183 클러스터가 이러한 전략에 우수한 후보인 것으로 나타났다(miR183용 miRBase Tracker: MI0000273). 이 클러스터는 모두 폴리시스트론성 pri-miRNA로부터 발현된 3개의 miRNA(96, 182 및 183)를 포함한다. 정상적인 조건하에서, 이러한 복합체의 발현은 제브라피쉬, 마우스, 래트 및 인간 조직에서 입증된 바와 같이 후각 상피, 귀, 망막 및 DRG의 뉴런으로 크게 제한된다. 본 발명자들은 정량적 실시간 PCR(qRT-PCR)에 의해 3마리의 NHP 및 1명의 인간 공여자로부터 이러한 감각 뉴런-특이

적 발현 패턴을 확인하였다. 본 발명자들은 miR183이 NHP 및 인간 DRG에서 척수에 비해 적어도 10배 이상 풍부하고, NHP에서 가장 낮은 존재비는 대뇌 피질에 있으며(DRG에서보다 1,000배 더 낮음) 심장, 비장, 골격근, 소뇌, 간 및 수질이 뒤따름을 보여주었다(도 4a 및 도 4b). 감각 뉴런 외부에서, 클러스터는 암 및 자가면역 질환을 포함한 여러 병리학적 병태에서 상향조절될 수 있다. 본 발명자들의 초기 스크리닝에는 래트 DRG에서 발현되는 덜 특성화된 miRNA145를 포함하였다. 이러한 모든 복합체 내의 miRNA의 표적 서열은 마우스, 원숭이 및 인간 간에 보존된다(miR183용 miRBase tracker 참조: MI0000273, MI0003084, MI0000225; miR182: MI0000272, MI0000224, MI0002815; miR96: MI0000098, MI0000583, MI0003085; 및 miR145: MI0000461, MI0000169, MI0002558).

[0304] 본 발명자들은 시험관내 검정을 사용하여 miRNA 전략의 활성 및 특이성을 평가하였다. 본 발명자들은 발현 카세트의 3' 비번역 영역에 표적 miRNA 서열의 4개 반복 연쇄체를 포함하도록 AAV 시스-플라스미드를 구성하였다. AAV 시스-플라스미드를 miR183을 발현하는 플라스미드로 공동 형질감염시켰다. 이식유전자의 발현 GFP는 동족 인식 서열을 포함하는 경우에만 miR183의 존재가 감소되었다(도 5a; p=0.0027).

[0305] AAV 벡터 내의 잠재적인 miRNA 표적의 생체내 활성 및 특이성을 C57Bl/6J 마우스에서 스크리닝하였다. 본 발명자들은 miRNA183 복합체(miR182 및 miR183)의 2개 구성원뿐만 아니라 miR145로부터 miRNA 표적이 있거나 없는 GFP-발현 벡터를 평가하였다. 본 발명자들은 처음에 183 복합체의 또 다른 구성원인 miR96을 테스트하였지만, miR183(p=0.03) 및 miR145(p=0.03)와 비교하여 마우스 피질에서의 감소된 GFP-miR96 이식유전자 발현으로 인해 제거하였다(도 6a 및 도 6c). 동물에게 DRG를 표적으로 하는 AAV9의 고용량 정맥내(IV) 주사 또는 CNS를 표적으로 하는 고용량 AAV-PHP.B 주사를 하였다. 동물을 제21일에 부검하고, 뇌와 간(AAV-PHP.B) 또는 간, 심장 및 근육(AAV9)에서 면역조직화학(IHC)에 의해 그리고 직접-형광 현미경에 의해 DRG에서의 GFP 발현을 분석하였다. DRG 뉴런에서 GFP의 발현은 miR183 표적(p=0.00007) 및 miR182 표적(p=0.00003)을 포함하지만 miR145 표적은 포함하지 않는 벡터로 실질적으로 감소되었다(도 5b 및 도 5c). miR183 표적을 포함하는 벡터를 사용하여 간, 심장, 근육 또는 뇌 피질에서 발현의 감소는 없었고, 뇌 피질(p = 0.03) 및 심장(p = 0.04)에서 대조군 GFP 벡터와 비교할 때 발현은 향상되었다(도 5d, 도 6a 내지 도 6c). 이러한 마우스 실험에서, 벡터-유도성 DRG 독성이 NHP에서만 관찰되었기 때문에, 본 발명자들은 miR183 표적-매개성 이식유전자 억제가 병리에 미치는 영향을 평가할 수 없었다. 이러한 종 차이에 대한 이유는 알려져 있지 않다.

[0306] ITR.CB7.CI.eGFP.miR145(4개 카피).rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 10에 제공되고, ITR.CB7.CI.GFP.miR182(4개 카피).rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 11에 제공되며, ITR.CB7.CI.GFP.miRNA96(4개 카피).rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 12에 제공되고, ITR.CB7.CI.GFP.miR183(4개 카피).rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 13에 제공된다.

[0307] *miR183에 의한 제한된 이식유전자 발현은 NHP에서 DRG 독성을 감소시킨다*

[0308] 마우스에서의 고무적인 데이터를 기반으로, 본 발명자들은 NHP에서 GFP-miR183 표적 발현 카세트를 평가하였다. 본 발명자들은 CB7 프로모터로부터 GFP(n=2, 1마리의 수컷, 1마리의 암컷; 각각 5년령 및 8년령) 또는 GFP miR183(n=4 암컷, 5년령 내지 6년령 범위)를 발현하는 AAVhu68 벡터를 레서스 마카크(3.5×10^{13} GC)에 ICM-주사하였다. 동물의 절반을 GFP 발현을 위해 제14일에 부검하였다. 나머지 동물을 제60일에 부검하여 발현 및 DRG 독성을 평가하였다. 동물은 임상적 후유증 없이 ICM-투여된 벡터에 내약성이 있었고, 벡터 투여 후 이 연구 등록된 임의의 동물에 대해 신경병성 통증의 증거는 없었다. 본 발명자들은 대조군 벡터(p=0.0054)와 비교하여 miR183-표적 함유 벡터를 사용한 DRG에서 GFP 발현의 통계적으로 유의한 감소를 관찰한 반면, 발현은 요추 운동뉴런(p=0.0273) 및 소뇌(p=0.0044)에서는 향상되고 피질, 심장 및 간에서는 변화없이 유지됨을 관찰하였다(도 7a 및 도 7b). 이는 9개 영역(경추, 흉추 및 요추에서의 DRG 및 배측 척추 축삭병증, 및 정중, 비골 및 요골 신경에서의 축삭병증)에 걸친 병리의 감소와 관련이 있다. 벡터가 miR183 표적을 포함하지 않는 경우, 병리는 모든 영역에 존재하였으며, 4등급, 2등급 및 1등급 사이에 고르게 분포하였다. miR183 벡터의 가장 큰 병리 정도는 2등급이었으며, 이는 11%의 영역에서만 나타났고; 나머지 영역은 1등급 병리(72%) 또는 병리 없음(17%; 도 7c)을 포함하였다.

[0309] 본 발명자들은 뮤코다당류축적증 I 환자에게 결핍된 효소인 hIDUA를 발현하는 벡터를 사용하여 NHP에서 miR183 표적 서열을 추가로 평가하였다. 이러한 인간 이식유전자에 대한 연구는 NHP에서의 DRG 독성을 강조한 최초의 공개된 보고서였다. 실험은 다음 3개의 그룹을 포함하였다: 그룹 1 - miR183 표적이 없는 대조군 벡터 단독(AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG)(n=3, 2마리의 암컷, 1마리의 수컷, 2.5년령); 그룹 2 - 스테로이드로 처리된 동물에서 miR183 표적이 없는 대조군 벡터(-7일부터 30일까지 프레드니솔론 1 mg/kg/일을 투여한 후 점진적으로

감량시킴; n=3, 3마리의 수컷, 2.5년령 내지 3.5년령); 및 그룹 3 - miR183 표적이 포함된 벡터(AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.4xmiR183.rBG)(n=3, 2마리의 수컷, 1마리의 암컷, 2.25년령 내지 2.5년령). 모든 벡터 게놈에는 닭 β-액틴 프로모터의 제어하에 있는 hIDUA 코딩 서열 및 CMV 인핸서 요소(CB7 프로모터로도 지칭됨), 닭 β-액틴 스플라이스 공여체(973bp, GenBank: X00182.1) 및 토끼 β-글로빈 스플라이스 수용체 요소 및 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 신호(rBG, 127bp, GenBank: V00882.1)로 구성된 키메라 인트론(CI)을 포함하였다. ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 14에 제공된다. ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.4xmiRNA183.rBG.ITR에 대한 벡터 게놈은 서열번호 16에 제공된다. 모든 동물은 AAVhu68 벡터(1×10^{13} GC)의 ICM 주사를 받았고, 제90일에 부검을 수행하여 이식유전자 발현 및 DRG-관련 독성을 평가하였다.

[0310] 모든 그룹의 동물은 벡터-관련 임상 소견 또는 임상 병리학적 이상(표 1 및 표 2) 없이 ICM 벡터에 내성이 있었다. CSF의 세포증가증은 매우 낮았으며, 그룹 2에서의 한 마리의 동물과 그룹 3에서의 한 마리의 동물로 한정되었다(표 3). 본 발명자들은 3개 그룹 모두에서 T-세포 반응(ELISPOT에 의해 측정됨) 및 hIDUA에 대한 항체를 모두 검출하였다(도 8a 내지 도 8d). 프랙탈카인 및 MIP-3a CSF의 양은 벡터 투여 후 24시간에 급증하여, 그룹 1의 2마리의 동물 및 그룹 3의 3마리의 동물에서 비검출에서 100 pg/㎖ 초과까지 증가한 반면, 이러한 분석물은 24시간에서는 검출 가능하지 않았지만 그룹 2(예방적 스테로이드)의 CSF에서는 제21일 및 제35일에 증가하였다. 주사 후 제21일 및 제35일에 그룹 3(hIDUA.miR183) 동물의 CSF에서 검출 불가능하거나 또는 미량(15 pg/㎖ 미만)의 사이토카인 및 케모카인이 측정된 반면(과발현-유도성 스트레스가 예상되는 경우), 하나 또는 여러 개의 분석물(프랙탈카인, MIP-3a, IL16, 퍼포린 및 IL17)이 그룹 1의 모든 동물에서 100 pg/㎖ 초과였다(도 9).

[0311] 면역형광 및 인시투 혼성화(ISH)를 사용하여, 본 발명자들은 대조군 벡터(miR183 표적 없음; 도 10 및 도 11a)를 사용한 그룹 1 및 그룹 2에서 DRG에서 hIDUA의 높은 발현을 관찰하였다. 본 발명자들은 척수 및 소뇌의 하부 운동 뉴런 및 피질 뉴런을 비롯한 다른 CNS 구획에서 낮거나 중간 정도의 hIDUA 발현을 검출하였다(도 10 및 도 11a). miR183 표적을 벡터(AAVhu68.hIDUA-miR183/그룹 3)에 혼입시키면 면역형광(도 10 상단 행, 도 11a) 및 면역조직화학(도 10, 도 11a)에 의해 강조된 바와 같이 CNS(척수, 소뇌 및 피질)에서의 발현의 감소 없이 DRG 뉴런에서 hIDUA 단백질 발현이 제거되었다(p=0.000003). mRNA 수준(도 10, 아래 행)에서, 형질도입된 DRG 뉴런의 세포질은 ISH 신호는 AAVu68.hIDUA를 투여받은 동물의 면적의 42%에서 AAVhu68.hIDUA-miR183을 투여받은 동물에서 7%로 감소되었으며(도 11a), 이는 83%의 감소를 나타낸다. DRG에서 hIDUA 발현의 감소는 감소된 유전자 전달 때문이 아니라 CNS 및 DRG 전반에 걸친 벡터의 체내 분포가 본질적으로 모든 그룹에 걸쳐 동일하였기 때문이다(도 12). 스테로이드는 대조군 벡터와 비교하여 DRG(p=0.0001)에서 발현을 적당히 감소시켰고, 하부 운동 뉴런(p=0.0024)에서 발현을 증가시켰다(도 10 및 도 11a). 예상대로, 대조군 벡터를 사용한 투여(그룹 1)는 GFP-발현 벡터보다 비교적 경도의 DRG, 후주 및 말초 신경 병리를 초래하였다. 그러나, miR183 표적-함유 벡터로 형질도입된 동물의 DRG(p=0.0583), 후주(p<0.0001) 및 말초(정중) 신경(p=0.0137)에서 병리는 전혀 없었다(그룹 3, 도 11b). 스테로이드를 사용한 병용 치료(그룹 2)는 모 벡터(miR183 표적을 포함하지 않음)의 독성을 감소시키지 않았지만(도 11b), 대신 말초 신경(p=0.0256) 및 후주(p=0.066)에서 독성을 악화시키는 경향과 관련이 있었다.

표 1

AAV.hIDUA 벡터를 ICM 주사한 NHP의 혈액 화학

동물 # 및 그룹	시점	총 단백질 g/dℓ	알부민 g/dℓ	글로불린 g/dℓ	A/G 비 -	AST IU/ℓ	ALT IU/ℓ	Alk 포스파테이스 IU/ℓ	GGT IU/ℓ	총 빌리루빈 mg/dℓ	BUN mg/dℓ	크레아티닌 mg/dℓ
17C024 AAVhu68.hIDUA	기준선	5.6	3.8	1.8	2.1	33	40	703	64	0.1	27	0.6
	D0	6.0	3.7	2.3	1.6	28	36	682	61	0.1	23	0.4
	D7	6.1	3.9	2.2	1.8	30	33	680	64	0.1	30	0.5
	D21	5.9	3.7	2.2	1.7	25	22	825	66	0.1	21	0.5
	D35	5.9	3.4	2.5	1.4	32	24	777	74	0.1	22	0.5
	D60	5.9	3.7	2.2	1.7	28	30	815	74	0.1	28	0.4
	D90	5.5	3.6	1.9	1.9	29	25	689	76	0.1	24	0.6

[0312]

[0313]

동물 # 및 그룹	시점	총 단백질 g/dℓ	알부민 g/dℓ	글로불린 g/dℓ	A/G 비 -	AST IU/ℓ	ALT IU/ℓ	Alk 포스파테이스 IU/ℓ	GGT IU/ℓ	총 빌리루빈 mg/dℓ	BUN mg/dℓ	크레아티닌 mg/dℓ
17C031 AAVhu68.hIDUA	기준선	5.7	3.8	1.9	2.0	35	39	539	36	0.1	27	0.5
	D0	6.5	4.0	2.5	1.6	37	43	570	47	0.2	23	0.4
	D7	6.3	3.9	2.4	1.6	27	39	547	45	0.1	26	0.5
	D21	6.6	3.9	2.7	1.4	33	34	476	39	0.1	25	0.6
	D35	6.3	3.4	2.9	1.2	32	31	591	42	0.1	24	0.5
	D60	6.2	4.0	2.2	1.8	32	33	545	45	0.1	25	0.4
	D90	6.0	3.6	2.4	1.5	34	27	478	43	0.1	24	0.5
17C029 AAVhu68.hIDUA	기준선	6.8	3.6	3.2	1.1	41	43	574	74	0.1	27	0.7
	D0	6.9	4.0	2.9	1.4	27	40	607	79	0.1	18	0.7
	D7	7.1	3.8	3.3	1.2	29	40	503	71	0.1	24	0.6
	D21	6.9	3.9	3.0	1.3	49	38	557	77	0.1	15	0.6
	D35	6.6	3.6	3.0	1.2	30	33	555	76	0.1	19	0.6
	D60	6.3	4.0	2.3	1.7	38	43	545	86	0.1	22	0.6
	D90	6.2	3.7	2.5	1.5	31	23	506	81	0.1	20	0.6
17C016 AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	기준선	6.0	3.9	2.1	1.9	42	35	623	59	0.2	16	0.5
	D0	6.8	4.1	2.7	1.5	33	58	588	59	0.2	16	0.4
	D7	6.3	3.9	2.4	1.6	26	28	444	51	0.1	20	0.5
	D21	6.4	3.7	2.7	1.4	29	23	393	44	0.2	16	0.6
	D35	6.9	3.9	3.0	1.3	32	29	364	41	0.1	21	0.5
	D60	6.5	3.8	2.7	1.4	41	29	525	63	0.2	23	0.5
	D90	5.7	3.6	2.1	1.7	32	29	752	79	0.1	12	0.5
17C019	기준선	5.5	3.4	2.1	1.6	35	42	338	49	0.1	31	0.6

동물 # 및 그룹	시점	총 단백질 g/dℓ	알부민 g/dℓ	글로불린 g/dℓ	A/G 비 -	AST IU/ℓ	ALT IU/ℓ	Alk 포스파테이스 IU/ℓ	GGT IU/ℓ	총 빌리루빈 mg/dℓ	BUN mg/dℓ	크레아티닌 mg/dℓ
AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	D0	6.3	3.7	2.6	1.4	32	39	383	49	0.1	19	0.6
	D7	6.1	3.6	2.5	1.4	26	34	322	47	0.1	30	0.7
	D21	6.0	3.3	2.7	1.2	28	32	332	53	0.1	19	0.7
	D35	5.9	3.5	2.4	1.5	42	38	378	49	0.1	27	0.6
	D60	5.6	3.6	2.0	1.8	35	36	437	61	0.2	23	0.5
	D90	5.6	3.6	2.0	1.8	41	34	650	73	0.2	21	0.6
17C020 AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	기준선	6.1	4.1	2.0	2.1	26	33	641	87	0.1	21	0.7
	D0	6.5	4.1	2.4	1.7	21	25	538	61	0.1	12	0.6
	D7	6.9	4.0	2.9	1.4	21	28	463	58	0.1	21	0.7
	D21	6.6	4.0	2.6	1.5	23	29	456	55	0.1	13	0.5
	D35	6.2	3.7	2.5	1.5	22	26	309	54	0.1	20	0.6
	D60	6.2	4.1	2.1	2.0	26	27	516	90	0.1	19	0.5
	D90	6.1	3.8	2.3	1.7	23	22	605	82	0.1	16	0.6
17-167 AAVhu68.hIDUA-miR183	기준선	6.6	3.9	2.7	1.4	24	21	764	112	0.1	18	0.5
	D0	6.7	4.1	2.6	1.6	27	21	606	88	0.1	20	0.4
	D7	6.6	3.9	2.7	1.4	31	27	606	87	0.1	24	0.6
	D21	6.8	4.2	2.6	1.6	29	27	584	102	0.1	22	0.5
	D35	6.6	4.0	2.6	1.5	35	34	642	93	0.1	16	0.5
	D60	6.0	3.7	2.3	1.6	37	25	689	79	0.1	15	0.6
	D90	6.6	3.9	2.7	1.4	24	21	764	112	0.1	18	0.5
17-215 AAVhu68.hIDUA-miR183	기준선	6.1	3.4	2.7	1.3	24	34	536	51	0.1	22	0.5
	D0	6.5	3.6	2.9	1.2	29	50	568	54	0.2	21	0.5
	D7	6.3	3.7	2.6	1.4	24	35	499	46	0.1	27	0.6

[0314]

동물 # 및 그룹	시점	총 단백질 g/dℓ	알부민 g/dℓ	글로불린 g/dℓ	A/G 비 -	AST IU/ℓ	ALT IU/ℓ	Alk 포스파테이스 IU/ℓ	GGT IU/ℓ	총 빌리루빈 mg/dℓ	BUN mg/dℓ	크레아티닌 mg/dℓ
	D21	6.2	3.5	2.7	1.3	31	37	526	58	0.1	21	0.5
	D35	6.0	3.4	2.6	1.3	33	47	619	57	0.1	18	0.4
	D60	6.1	3.7	2.4	1.5	40	50	628	45	0.2	18	0.5
	D90	6.3	3.9	2.4	1.6	27	42	856	55	0.1	17	0.6
17-102 AAVhu68. hIDUA-miR183	기준선	6.7	3.8	2.9	1.3	24	31	613	57	0.1	20	6.7
	D0	7.0	3.6	3.4	1.1	32	35	632	57	0.1	13	7.0
	D7	6.9	3.9	3.0	1.3	31	25	601	57	0.1	16	6.9
	D21	7.0	3.8	3.2	1.2	31	30	611	65	0.1	20	7.0
	D35	6.8	3.8	3.0	1.3	28	29	684	59	0.1	20	6.8
	D60	6.4	3.8	2.6	1.5	34	36	588	44	0.1	20	6.4
	D90	7.0	4.0	3.0	1.3	27	28	576	41	0.1	18	7.0

[0315]

표 2

AAV.hIDUA 벡터를 ICM 주사한 NHP의 전체 혈구 수

동물 # 및 그룹	시점	WBC $\times 10^3/\mu\ell$	RBC $\times 10^6/\mu\ell$	HGB g/dℓ	HCT %	혈소판 $\times 10^3/\mu\ell$	호중구 /μℓ	림프구 /μℓ	단핵구 /μℓ	호산구 /μℓ	호염기구 /μℓ
17C024 AAVhu68. hIDUA	기준선	8.6	6.1	13.1	43	305	2838	5246	344	172	0
	D0	6.1	5.5	12.7	40	304	3294	2562	183	61	0
	D7	5.3	5.1	11.2	38	343	1060	3869	265	106	0
	D21	6.7	5.7	12.8	42	289	1742	4422	335	201	0
	D35	5.6	5.6	12.7	42	377	1792	3584	168	56	0

[0316]

동물 # 및 그룹	시점	WBC $\times 10^3/\mu\ell$	RBC $\times 10^6/\mu\ell$	HGB g/dℓ	HCT %	혈소판 $\times 10^3/\mu\ell$	호중구 /㎕	림프구 /㎕	단핵구 /㎕	호산구 /㎕	호염기구 /㎕
	D60	6.6	5.8	13.0	42	356	1716	4488	198	198	0
	D90	5.4	5.7	13.1	41	399	1674	3456	162	108	0
17C031 AAVhu68.hIDUA	기준선	11.9	5.3	12.6	41	386	4879	6188	476	357	0
	D0	5.5	5.2	12.5	41	366	2255	2970	165	110	0
	D7	14.4	4.8	11.2	39	357	8064	5040	864	432	0
	D21	10.7	5.4	12.8	43	410	5136	4815	428	321	0
	D35	9.7	5.3	12.8	43	267	4559	4559	388	194	0
	D60	8.3	5.3	12.7	42	390	2988	4731	332	249	0
	D90	8.4	4.9	12.1	39	414	4284	2940	672	420	84
17C029 AAVhu68.hIDUA	기준선	15.5	5.9	12.7	43	561	4495	9610	775	620	0
	D0	15.1	5.7	12.6	41	493	9362	4681	755	302	0
	D7	11.2	5.8	12.7	43	576	2800	7280	784	336	0
	D21	10.6	5.8	12.6	42	496	4982	4770	530	318	0
	D35	12.0	5.8	13.1	44	511	2520	8280	600	600	0
	D60	11.6	5.8	13.6	43	497	3480	7192	696	232	0
	D90	19.6	5.7	12.9	42	283	14896	3528	980	196	0
17C016 AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	기준선	10.2	5.9	13.5	44	235	1734	7752	306	408	0
	D0	8.9	5.6	12.9	44	353	3382	5073	356	89	0
	D7	9.6	5.5	12.3	41	346	2976	5952	576	96	0
	D21	11.9	5.4	12.4	41	424	2856	8330	595	119	0
	D35	7.9	5.4	12.7	43	352	4977	2528	316	79	0
	D60	8.7	5.6	12.8	43	380	2610	5655	348	87	0
	D90	8.4	5.4	12.7	41	357	2940	4956	420	84	0
17C019	기준선	10.7	5.5	13.4	40	257	6099	4066	214	321	0
	D0	10.6	6.4	13.9	49	358	7208	2650	318	424	0

[0317]

[0318]

동물 # 및 그룹	시점	WBC ×10³/μℓ	RBC ×10⁶/μℓ	HGB g/dℓ	HCT %	혈소판 ×10³/μℓ	호중구 /μℓ	림프구 /μℓ	단핵구 /μℓ	호산구 /μℓ	호염기구 /μℓ
AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	D7	10.8	5.9	13.1	44	286	3564	6048	1080	108	0
	D21	12.3	5.7	12.9	41	462	5658	5904	492	246	0
	D35	12.4	5.9	13.4	45	297	7812	3720	620	248	0
	D60	8.6	5.8	13.4	43	373	3612	4386	430	172	0
	D90	11.1	5.5	13.0	41	349	8214	2442	333	111	0
17C020 AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	기준선	14.6	6.5	14.1	47	357	4818	8760	584	438	0
	D0	15.4	6.1	13.7	44	339	8778	5390	616	616	0
	D7	14.0	6.0	13.4	43	378	4060	8680	840	420	0
	D21	14.4	5.7	12.9	42	327	6336	7056	720	144	144
	D35	11.1	6.2	13.9	45	369	2664	7770	444	222	0
	D60	10.8	6.2	14.0	45	380	4104	5940	324	432	0
	D90	7.2	5.9	13.5	44	296	2376	4536	216	72	0
17-167 AAVhu68.hIDUA-miR183	기준선	10.6	5.4	13.7	44	245	1802	8162	530	106	0
	D0	7.2	5.1	12.2	40	373	936	5904	288	72	0
	D7	7.6	4.9	12.2	39	258	1140	6080	304	76	0
	D21	10.2	5.5	13.4	45	270	3468	5712	714	102	204
	D35	10.6	5.3	13.2	42	275	5406	4664	424	106	0
	D60	9.5	5.2	13.4	42	115	3515	5510	380	95	0
	D90	10.6	5.4	13.7	44	245	1802	8162	530	106	0
17-215 AAVhu68.hIDUA-miR183	기준선	12.9	5.8	12.7	44	380	2709	9546	387	258	0
	D0	10.0	5.5	11.9	40	374	3600	5900	300	200	0
	D7	11.2	5.4	12.0	40	423	2800	7616	560	224	0
	D21	11.8	5.2	11.3	39	375	2242	9086	236	118	118
	D35	12.5	5.6	12.4	42	337	5125	6625	500	250	0

[0319]

동물 # 및 그룹	시점	WBC ×10³/μl	RBC ×10⁶/μl	HGB g/dl	HCT %	혈소판 ×10³/μl	호중구 /μl	림프구 /μl	단핵구 /μl	호산구 /μl	호염기구 /μl
	D60	10.3	5.4	12.1	39	315	3811	5974	309	206	0
	D90	13.7	5.3	12.1	38	415	8494	4795	274	137	0
17-102 AAVhu68.hIDUA-miR183	기준선	5.3	6.0	14.0	46	518	530	3816	371	530	53
	D0	12.4	5.9	13.5	44	478	6944	4588	496	372	0
	D7	9.2	5.8	13.1	44	501	3312	4968	368	552	0
	D21	9.0	5.9	14.0	45	510	2250	5940	540	270	0
	D35	9.4	6.4	14.5	49	409	3760	4888	564	188	0
	D60	9.1	6.2	14.6	46	410	3276	5005	455	364	0
	D90	7.8	5.9	14.4	44	528	3042	4212	312	234	0

표 3

AAV.hIDUA 벡터를 ICM 주사한 NHP의 CSF 백혈구 수(μl당 세포)

[0320]

그룹	동물 #	0일	21일	35일	60일	90일
AAVhu68.hIDUA	17C024	0	1	2	1	2
	17C031	0	1	2	1	1
	17C029	0	0	0	0	0
AAVhu68.hIDUA + 스테로이드	17C016	0	0	0	0	3
	17C019	0	1	2	1	0
	17C020	0	0	5	1	혈액 오염
AAVhu68.hIDUA-miR183	17-167	0	2	3	1	1
	17-215	0	1	2	1	1
	17-102	0	3	7	2	0

[0321] *NHP에서 AAV-유도성 DRG 독성은 신경 세포자멸사를 통해 발생한다*

[0322] DRG에서 신경 변성의 메커니즘을 연구하기 위해, 본 발명자들은 miR183이 있거나 없는 벡터가 주사된 동물로부터의 일부 조직학적 절편을 선택하고, 세포 세포자멸사 및 폴딩되지 않은 단백질 반응(unfolded protein response: UPR)의 마커에 대해 IHC를 수행하였다. 초기 연구는 세포자멸사의 하류 마커인 카스페이스-3의 활성화에 초점을 맞추었다. 헤마톡실린 및 에오신 평가에 기초하여 신경 변성을 나타낸 동물의 DRG는 세포 침윤과 함께 활성화된 카스페이스-3에 대해 양성인 IHC 염색을 나타내었다(도 13a 내지 도 13c). AAV-주사되지 않은 동물로부터의 DRG 및 비장은 각각 음성 및 양성 대조군으로 작용하였다(도 13e 및 도 13f). DRG에서 카스페이스-3-양성 뉴런은 AAV.hIDUA가 주사된 3마리의 동물(11개, 0개 및 1개의 양성 DRG 뉴런)과 비교하여 AAVhu68.GFP가 주사된 동물로부터의 절편(20개의 카스페이스-3 양성 DRG 뉴런)에서 더 풍부하였다. 각 경우에, miRNA183 표적 서열의 포함은 활성화된 카스페이스-3을 갖는 세포의 수를 감소시켰다(GFP.miR183이 있는 3개 및 0개의 양성 뉴런, n=2 동물 및 hIDUA.miR183이 있는 0개의 양성 뉴런, n=3 동물; 도 13c 내지 도 13d). 본 발명자들은 IHC에 의한 카스페이스-8의 상향조절을 평가함으로써 외인성 경로로 지칭되는 적응성 또는 선천성 면역에 의해 유도되는 세포자멸사를 조사하였다. 카스페이스-3 양성 뉴런이 있는 절편만을 처리하였다. 모든 벡터 그룹에 걸쳐 퇴화하는 신경 세포체는 활성화된 카스페이스-8에 대해 음성인 반면, 침윤 세포는 내부 양성 대조군으로 작용하는 카스페이스-8에 대해 강력하게 양성이었다(도 15a 내지 도 15E). 동일한 절편을 또한 세포자멸사의 내인성 경로의 공통 마커인 활성화된 카스페이스-9에 대해 평가하였다. 이러한 세포자멸사의 메커니즘은 미토콘드리아의 증가된 막 투과성 및 카스페이스 9의 활성화로 인한 사이토크롬 C의 방출을 통해 매개된다. IHC는

AAVhu68.eGFP를 투여받은 동물에서 DRG의 하나의 퇴화하는 신경 세포체에서 카스페이스-9를 보여주었지만(도 16a); AAVhu68.eGFP.miRNA가 투여되고 신경 변성을 나타낸 동물에서는 카스페이스-9가 관찰되지 않았다(도 16c). miR183이 있거나 없는 AAVhu68.hIDUA 벡터를 투여받은 동물로부터 양성 카스페이스-9 뉴런은 없었지만, 이는 AAVhu68.eGFP와 비교하여 이러한 벡터로 관찰된 병변의 발생률 감소의 기능일 수 있으며, 조직학적 절편에서 올바른 변성 단계에서 뉴런을 발견할 가능성을 감소시킨다(도 16b 및 도 16d).

[0323] 이식유전자의 단백질 과발현으로 인한 독성의 제안된 메커니즘을 지원하기 위해, 본 발명자들은 그룹당 1마리의 동물에서 전사 인자 6(ATF6)을 활성화하기 위한 IHC를 수행하였다. UPR은 골지체에서 ATF6 활성화를 촉발하여 세포질 단편을 생성하고, 이는 핵으로 이동하여 ER-관련 결합 요소의 전사를 활성화하고; UPR을 통한 세포자멸사는 내인성 경로를 통해 발생한다. ATF6에 대한 IHC는 AAVhu68.eGFP(40개 초과의 양성 세포), AAVhu.68.hIDUA(40개 초과의 양성 세포) 및 AAVhu68.eGFP.miR183(18 양성 세포)를 투여받은 동물의 DRG에서 신경 및 신경주위 위성 세포의 세포질에서 다초점 양성이었으며, 이는 병변 중증도에 상응하였다(도 14a 내지 도 14c). 대조적으로, AAVhu68.hIDUA.miR183을 투여받은 동물뿐만 아니라 미경험 AVV를 주사하지 않은 대조군 NHP는 ATF6에 대해 광범위하게 음성이었다(도 14d 및 도 14e). 전체 연구 소견과 일치하게, miR183이 포함된 벡터를 투여받은 동물은 감소된 양성 ATF6 신호를 보이고 감소된 세포 스트레스를 나타내었다.

[0324] DRG의 독성은 벡터의 높은 전신 투여량 또는 벡터의 CSF로의 직접 전달에 의존하는 임의의 유전자 요법에서 발생할 가능성이 있다. 이러한 안전성 문제는 영장류에게만 국한되며, 일반적으로 무증상으로 나타난다. 그러나, DRG 독성은 고유수용성(proprioceptive) 결함으로 인한 운동실조와 같은 상당한 이환율을 유발할 가능성이 있다. 미국 식품의약국은 최근 NHP DRG 독성으로 인해 후발성 SMA에 대한 척수강내 AAV9에 대한 시험을 부분 임상 보류로 두어 이러한 위험이 AAV 요법의 개발을 제한할 수 있는 방법을 강조하였다.

[0325] 원래 이 독성은 외래 캡시드 또는 이식유전자 에피토프를 향한 DRG의 형질도입된 뉴런에 대한 파괴적 T-세포 면역에 의해 유발되는 것으로 가정되었다. 그러나, MMF 및 라파마이신과 같은 강력한 면역 억제 양생법은 독성 연구에서 독성을 예방하지 못하였고, 이 연구에서는 스테로이드도 예방하지 못하였다. 지연되지만 진행되지 않는 DRG 변성의 시간 경과는 적응 면역이 역할을 한다는 개념을 뒷받침하지 않았다. 세포독성 T 세포가 관련되어 있다면, 본 발명자들은 DRG 및 이식유전자를 발현하는 다른 세포 유형의 변성뿐만 아니라 조기에 시작하여 및 시간이 경과함에 따라 진행되는 단핵 세포 침윤을 관찰하였을 것이다.

[0326] 높은 수준의 DRG 형질도입은 고도로 형질도입된 DRG 뉴런의 변성으로 이어지는 세포 스트레스를 생성할 수 있다. 조직학적 분석은 변성이 가장 많은 이식유전자 단백질을 발현한 DRG 뉴런으로 제한되었음을 보여주었다. 뉴런 변성은 또한 카스페이스-3 및 카스페이스-9 활성화와 연관되어 세포자멸사가 T 세포에 의해 매개되는 것과는 대조적으로 세포내 스트레스 공급원에 의해 유발되었음을 시사한다. miRNA183을 통한 이식유전자 발현의 세포-특이적 절제에 의한 DRG 변성의 감소는 캡시드 또는 벡터 DNA보다 이식유전자-유래 mRNA 또는 단백질의 과발현이 이러한 과정을 구동함을 시사한다. miR 표적 또는 미경험 동물이 포함된 대조군과 비교하여 miR 표적이 없는 벡터를 투여받은 동물의 뉴런 및 위성 세포에서 증가된 ATF6 염색은 UPR이 연루되었음을 보여주지만, 분비되지 않은(GFP) 대 분비된(IDUA) 이식유전자 사이에 자극(inciting) 메커니즘이 다를 수 있다.

[0327] 지연되지만 자체-제한적인 DRG 신경 변성의 시간 경과는 비-면역 독성이 고도로 형질도입된 세포의 서브세트로 제한된다는 개념과 일치한다. DRG 독성 및 축삭병증이 가역적인지 여부는 불분명하다. 6개월 동안 성체 동물을 관찰한 후에도, 본 발명자들은 병리의 해소를 관찰하지 못하였다. 본 발명자들이 ICM 주사 후 NHP에서 DRG 독성이 확인되지 않은 유일한 실험은 벡터가 4년 후에 부검된 1개월령 마카쿠스에 투여되었을 때였다. 영아 영장류는 DRG 독성에 저항성이 있거나, 이들의 DRG 뉴런이 재생 능력을 갖고 있거나 또는 이 연장된 기간에 걸쳐 병변이 퇴행할 수 있다. 본 발명자들의 소견은 DRG 독성이 테이-삭스병에서 결핍된 라이소솜 효소인 헥소사미니데이스를 발현하는 AAV의 직접 뇌내 투여 후 NHP의 CNS에서 이전에 보고된 신경독성의 유형인 이식유전자 과발현에 의해 유발된다는 것을 뒷받침한다. 따라서, DRG 독성의 중증도는 용량, 프로모터 강도 및 이식유전자의 특성에 의해 영향을 받아야 한다. 그러나, 본 발명자들은 아직 DRG 독성 없이 성숙한 영장류에서 벡터의 효과적인 용량을 달성할 수 있는 CNS-지시된 AAV를 찾지 못하였다.

[0328] 감각 뉴런이 영장류에서 가장 효율적으로 형질도입된 세포 중 하나인 이유는 알려지지 않았다. DRG는 CNS의 외부에 존재하며 다공성의 유창 모세관이 있기 때문에 전신적으로 투여된 벡터에 의해 쉽게 접근된다. 전신 벡터는 또한 말초 축삭에 의한 흡수 후 역행 수송을 통해 DRG 뉴런에 접근할 수 있다. 척수강내 공간 내에 존재하는 감각 신경 구획의 해부학은 CSF로 전달되는 벡터의 높은 형질도입을 촉진할 수 있다. 후근에 있는 DRG 뉴런의 축삭은 CSF에 노출되므로, ICM/LP 투여 후 벡터에 쉽게 접근할 수 있다. DRG의 세포외 체액에 대한 지주막하 공

간의 개방된 접근은 ICM/LP 벡터가 DRG의 뉴런 및 다른 세포에 직접 접촉할 수 있게 하여야 한다. miR183 표적 서열의 포함을 통한 DRG 뉴런 내 이식유전자 발현의 선택적 억제는 이 miRNA에 의해 영향을 받지 않아야 하는 다른 DRG-관련 세포에서 이식유전자 발현의 분석을 용이하게 하였다. ISH는 직접 형질도입을 시사할 수 있는 주변 아교 위성 세포에서 이식유전자 mRNA를 밝혀내었다. 아교 세포에서 이식유전자 mRNA의 존재의 기능적 결과는 알려져 있지 않다.

[0329] 벡터 이식유전자 발현을 선택적으로 저해하는 것은 DRG 독성을 감소시키고 잠재적으로 제거해야만 한다. 이를 달성하기 위한 핵심은 다른 곳에서 발현에 영향을 미치지 않고 DRG 뉴런에서 발현을 구체적으로 소멸시키는 전략을 설계하는 것을 포함한다. 현재, 캡시드 변형 또는 조직-특이성 프로모터를 통해 이러한 특이성을 달성하는 것은 불가능하다. miR183에 대한 표적을 벡터에 포함시키면 벡터 제조, 효능 또는 체내 분포에 영향을 미치지 않으면서 DRG 독성을 감소/제거하는 목적하는 결과가 달성된다. 그러나, miR183 및 RISC가 높은 GC 수로 포화될 가능성이 있으므로, 용량 창(window)은 좁을 수 있다. 본 연구에서 ISH의 정량화는 형질도입된 DRG 뉴런에서 mRNA 수준의 80%의 감소가 독성을 억제하기에 충분함을 시사한다. 동물 모델에서 최소-효능 용량 연구와 결합된 신중한 용량-범위 연구는 임의의 주어진 이식유전자에 대한 본 접근법의 실행 가능성을 확립하는데 필수적이다. hIDUA NHP 연구에는 AAV 시험에서 면역-매개성 독성을 완화시키기 위한 표준 접근법인 스테로이드와 함께 비-miR183-표적화 벡터를 투여받은 그룹이 포함되었다. DRG 독성은 스테로이드-처리 그룹에서 감소되지 않았다. 이 실험은 AAV 유전자 요법에서 예방적 스테로이드의 한계를 보여준다.

[0330] DRG 독성을 감소시키기 위한 이러한 접근법의 모듈성은 CNS-지시된 유전자 요법을 위해 고려되는 임의의 AAV 벡터에 사용될 수 있음을 시사한다. 벡터 내 miR183 표적이 miR183 분자를 정상 표적에서 멀어지게 하여 세포의 생리를 교란시킬 수 있다. 이에 대한 증거는 miR183(DRG)을 발현하는 심하게 형질도입된 세포로 제한되는 것일 수 있다.

[0331] 본 발명자들은 AAV miR183 표적-함유 벡터로 처리된 NHP에서 독성을 관찰하지 못하였다. miR183, 182 및 96에 대한 공통 표적이 있는 miR183 클러스터의 중복성은 단일 miRNA 넉아웃 모델에 비해 완전한 클러스터에서 제안된 바와 같이 이러한 이론적인 위험을 감소시킬 수 있다. 또한, miR183을 발현하는 것으로 알려진 다른 세포 유형(후각 상피, 망막, 내이, 활성화된 면역 세포)은 ICM 또는 전신 AAV 전달시 효율적으로 형질도입되지 않는다. DRG 독성에 대해 규제 기관에 의해 제기된 우려를 고려할 때, 본 발명자들은 miRNA183 탈표적화 전략을 CNS 유전자 요법 프로그램에 포함시키는 것이 현명하다고 생각한다. 이 전략의 주요 한계는 DRG 형질도입이 치료적 효과를 달성하는데 필요한 신경 형태의 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth)과 같은 질환에서 DRG 독성을 완화시키는 것이다.

[0332] 요약하면, 본 발명자들은 NHP에서 AAV-유도성 DRG 독성을 완화시키기 위한 접근법을 개발하였다. 이 접근법은 다양한 치료적 적용에서 광범위한 AAV 벡터에 걸쳐 테스트될 수 있다.

[0333] **실시예 3: hIDUA를 암호화하는 조작된 서열의 비교 및 IDUA 활성 및 발현에 대한 miR183 표적 서열의 효과.**

[0334] 최적화되지 않은 천연 cDNA와 비교하여 인간 IDUA를 암호화하는 조작된 서열(서열번호 22 내지 26)의 전달을 위해, 야생형 수컷 마우스에 1×10^{11} GC의 AAVhu68을 IV 주사하였다. hIDUAcoV1(서열번호 22)은 혈청에서 가장 빠르고 가장 높은 효소 수준을 나타내었고, 수준은 제21일에 안정하였으며(도 17a), 이는 유의한 수준의 항-약물 항체가 없음을 시사한다. hIDUAcoV1은 부분적으로 뇌에서의 빠른 발현(혈청일) 및 높은 수준의 활성으로 인해 추가 연구에서 평가하였다(도 17b).

[0335] MPS I(IDUA-결핍) 마우스에 miR183 표적이 있거나 없는 hIDUACov1을 암호화하는 AAVhu68의 1×10^{11} GC를 ICV 주사하였다(4회 반복). 마우스를 주사 후 제30일 또는 제90일에 희생시켰다(도 18a 및 도 18b). IDUA 활성은 hIDUAcov1 또는 hIDUAcov1-miR183을 암호화하는 AAVhu68로 ICV 처리 후 야생형보다 높았다(도 18c 내지 도 18c). 평균 수준은 4xmiR183 표적 벡터로 증가하였으며, 이는 miR183 표적이 작제물에 포함될 때 효능이 같거나 더 클 것임을 나타낸다. 조직을 처리하여 치료적 효능의 마커로서 LAMP1 면역형광을 사용하여 보관 감소를 평가하였다. LAMP1 형광은 비히클 대조군으로 처리된 KO 마우스에서 증가하였고, miR183 표적이 있거나 없는 hIDUA의 두 버전을 암호화하는 벡터로 AAV 처리한 후 피질에서 감소하였다(도 18e 및 도 18f). 치료 효능은 나이든 마우스에 비해 어린 마우스에서 더 높았다.

[0336] **실시예 4: miR183 클러스터 표적 서열을 갖는 발현 작제물의 시험관내 평가**

[0337] miRNA 표적 서열을 보유하는 작제물의 활성 및 특이성을 평가하기 위해 시험관내 검정을 사용하였다. 위의 실시

예 2에 기재된 바와 같이, HEK293 세포(또는 또 다른 적합한 세포주)를 GFP 이식유전자를 갖는 시스 플라스미드 및 miR-182 및 miR-183과 같은 하나 이상의 miRNA를 발현하는 플라스미드로 공동 형질감염시켰다. 시스 플라스미드는 발현 카세트의 3'UTR에서 다양한 수의 상응하는 표적 miRNA 서열로 설계되며, 대안적 스페이서 서열이 도입된다. 형질감염 후 72시간에, GFP의 발현을 정량화하여 발현의 상대 수준을 결정하였다.

[0338] 예를 들어, 표적 miR183 서열의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 최대 8개의 카피를 보유하는 작제물을 테스트하였다. 개별 표적 서열은 서열번호 5 내지 7에 제공된 것과 같은 스페이서 서열에 의해 직접 연결되거나 또는 분리된다. 시험관내 연구 결과에 기초하여, GFP의 발현을 감소시키거나 또는 제거하는 서열(반복부 수를 포함) 및 스페이서의 적합한 조합을 확인하였다. 그런 다음, 이 연구의 후보를 표적 miRNA 서열 및 스페이서 서열과 동일하거나 또는 유사한 배열을 갖는 발현 작제물을 갖는 AAV 벡터(예를 들어, AAV9 또는 AAV-PHP.B)를 전달함으로써 생체내에서 스크리닝하였다. 예를 들어, DRG의 탈표적화(즉, GFP 발현의 감소)를 포함하여 CNS 발현 수준을 평가하기 위한 예시적인 생체내 마우스 연구가 실시예 2에 제공된다.

[0339] 다양한 스페이서 서열이 있거나 없는 miR182에 대한 표적 서열의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 최대 8개의 카피의 조합을 갖는 작제물을 사용하여 유사한 연구를 또한 수행하였다. 추가적으로, miR182 및 miR183 인식 서열의 조합 및 상이한 배열을 갖는 작제물을 생성하였다. 그런 다음, miR182 표적 서열 단독 및 시험관내에서 바람직한 감소된 수준의 발현을 나타내는 miR182와 miR183 표적 서열의 조합을 갖는 작제물을, 예를 들어, CNS 및 DRG의 세포에서 이식유전자 발현(탈표적화의 정도)의 독성 및 수준을 결정하기 위해 AAV 벡터의 투여 후 생체내에서 평가하였다.

[0340] 대안적으로, miR182 표적 서열 및/또는 다른 mir183 클러스터 표적 서열(즉, miR-183, miR-96 또는 miR-182에 상응하는 표적 서열)의 조합의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 최대 8개의 카피를 갖는 작제물을 생성하였다. 조합 miR182-mir183 클러스터 표적 서열-보유 작제물을 위의 실시예 2에 기재된 바와 같이 GFP 발현 검정을 사용하여 시험관내에서 테스트하였다. 위와 같이, 테스트된 발현 카세트는 스페이서 서열에 의해 분리되거나 또는 분리되지 않은 다양한 수의 miRNA 표적 서열을 갖는다. 그 후, miR182 표적 서열 및 다른 mir183 클러스터 표적 서열의 조합을 갖는 소정의 작제물의 활성을 고용량 IV로 투여되는 AVV 벡터를 생성함으로써 생체내에서 평가하였다. 위와 같이, AAV 벡터 이식유전자의 발현은 DRG를 비롯한 다양한 세포 및 조직, 특히, 간 조직에서 평가하였다.

[0341] 또한, 이식유전자 발현의 miR182 표적 서열의 1개, 2개, 3개, 4개 또는 최대 8개의 카피의 효과를 평가하였다. 위와 같이, miR182 표적 서열을 발현 카세트의 3'UTR에 도입하여 시험관내 테스트를 위한 실험 작제물을 생성하였다. 다중 miR182 서열이 도입되는 경우, 서열은 연속적일 수 있거나, 또는 대안적으로 별도의d by 임의의 다양한 개재 스페이서 서열에 의해 분리될 수 있다. miR182 표적 서열 및 해당되는 경우 스페이서 서열의 임의의 조합을 갖는 발현 카세트를 갖는 AAV 벡터를 생성하고, 생체내에서 테스트하였다. 특히, miR182 표적 서열을 갖는 발현 카세트의 경우, AAV 벡터의 고용량 IV 투여 후 근육 조직에서 이식유전자 발현을 평가하였다.

[0342] **실시예 5: 이식유전자에 작동 가능하게 연결된 miR 표적 서열을 갖는 rAAV의 전달은 miR183 클러스터-조절된 유전자의 발현을 증가시키지 않는다**

[0343] 인간 CACNA2D1 및 CACNA2D2 유전자(구성원은 전압-개폐 칼슘 채널을 암호화함)는 miR183 클러스터(miR183/96/182)의 예측된 표적이며, 인간 공여자로부터의 DRG에서 3개의 miRNA와 CACNA2D1 및 CACNA2D2 발현 사이에 상당한 역 상관관계가 관찰되었다. 예를 들어, 문헌[Peng at al, "mirR-183 cluster scales mechanical pain sensitivity by regulating basal and neuropathic pain genes". Science. 2017 Jun 16;356(6343):1168-1171. doi: 10.1126/science.aam7671. Epub 2017 Jun 1] 참조. miR183이 CACNA2D 발현을 하향조절하는 것으로 보고되어 있다. 그러나, "스펀지 효과"가 있는 경우 CACNA2D의 증가된 발현이 예상되며, 이는 통증 및 압력에 대한 동물의 민감도의 증가에 기여한다.

[0344] 4xmiR183 표적 서열이 있거나 없는 eGFP를 포함하는 벡터 게놈을 포함하거나 또는 4xmiR183이 있거나 없는 hIDUA를 포함하는 벡터 게놈을 포함하는 스톡 rAAV를 래트-DRG 배지로 2.5×10^{12}/㎖로 희석하고, 오래된 배지를 제거한 후 24-웰-플레이트의 DRG-함유 웰 각각에 0.25㎖를 첨가하였다. 24시간 후, 배지를 제거하고, 새로운 배지로 교체하였다. 형질도입을 3회 반복으로, 즉, AAV-GFP에 대한 3개의 웰과 AAV-GFP-miR183에 대한 3개의 웰(모의 대조군에 대한 2개의 웰)에서 수행하였다. 형질도입을 향상시키기 위해, 아데노바이러스 AD5(시그나젠 래보래토리즈(SignaGen Laboratories); 메릴랜드주 록빌 소재)를 또한 AAV 벡터와 함께 10의 MOI로 첨가하였다. RNA를 각 웰에 별도로 단리하고, q-RT-PCR에 사용하였다(1개의 반응물/웰; 2회 반복). 형질도입 후 72시간에

DRG 배양물로부터 총 RNA를 추출하였다.

[0345] miR183의 발현 수준 및 표적 유전자 CACNA2D1과 CACNA2D2에 대한 잠재적인 스펀지 효과를 래트 CACNA2D1(검정 ID Rn01442580) 및 CACNA2D2(검정 ID: Rn00457825)에 특이적인 프라이머를 사용하여 결정하였다. 도 20은 낮거나(5×10^5) 또는 높은(2.5×10^8) 농도에서 miR183 탈표적화 서열의 4개의 카피가 있거나 없는 eGFP 이식유전자를 운반하는 다양한 벡터의 AAV 형질도입(AAV9)의 결과를 보여준다. miR183이 없는 저용량 및 고용량을 100(저용량 AAV9-eGFP의 경우) 또는 10(고용량 AAV9-eGFP의 경우)의 감염 다중도(MOI)로 아데노바이러스 유형 5(Ad5) 헬퍼의 공동 형질감염 유무에 관계없이 테스트하였다. 모든 DRG 뉴런은 형질도입되었고, 독성의 가시적인 징후는 관찰되지 않았다. DRG 뉴런에서는 GFP 발현이 나타나지 않는 반면, 섬유아세포 유사 세포에서는 일부 발현이 관찰되었다. 이는 (x4)miR183 표적 발현 카세트를 사용한 GFP 전사의 억제를 확인하였다.

[0346] *NHP에서 miR183 스펀지-효과 연구*

[0347] AAV-IDUA 또는 AAV.hIDUA.4Xmir183 벡터로 처리된 동물(n=3/그룹)인 비-인간 영장류(NHP) 레서스 원숭이 연구(19-04)로부터 DRG(요추) 및 뇌(전두엽 피질) 조직을 얻었다. miRNeasy Mini 키트(퀴아젠, 메릴랜드주 저먼타운 소재)를 사용하여 총 RNA를 단리하고, 추출된 RNA를 프로토콜의 지침에 따라 TaqMan® 마이크로RNA 역전사 키트(어플라이드 바이오시스템즈)로 역전사시켰다. 정량적 실시간 중합효소 연쇄반응(qPCR)을 수행하여 제조업체의 지침에 따라 hsa-miR-183-5p(검정 ID 002269) 및 RNU6B(검정 ID 00193)(어플라이드 바이오시스템즈, 미국 캘리포니아주 포스터 시티 소재)에 특이적인 프라이머와 함께 TaqMan 마이크로RNA 검정 키트를 사용하여 상이한 조직에서 miR183의 존재비를 결정하였다. 유사하게는, miR183의 2개의 직접적인 표적, 즉 CACNA2D1 및 CACNA2D2의 존재비를 각각 CACNA2D1(검정 ID Hs00984840) 및 CACNA2D2(검정 ID: Hs01021049)에 특이적인 프라이머와 함께 TaqMan 유전자 발현 검정 키트를 사용하여 측정하였다. 각 qPCR 검정을 생물학적 복제물로부터의 100ng의 총 RNA로부터 유래된 cDNA를 사용하여 3회 반복으로 수행하였고, 비교 역치 주기(Ct) 방법에 의해 분석하였다. miR183의 평균 발현 수준을 내인성 대조군 유전자로서 RNU6B로 정규화하고, CACNA2D1 및 CACNA2D2의 평균 수준은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 방법을 사용하여 GAPDH로 정규화하였다(문헌[Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat Protoc. 2008;3(6):1101-8.]). 도 19a(drg) 및 도 19b(피질) 참조. DRG(높은 miR183 존재비) 또는 전두엽 피질(낮은 miR183 존재비)에서 AAV-IDUA 또는 AAV-IDUA-miR183 동물을 비교할 때, miR183 클러스터-조절된 유전자(CACNA2D1 또는 CACNA2D2)의 발현 증가는 없었다.

[0348] *래트 신생아 후근 신경절(DRG) 뉴런 세포 배양*

[0349] 래트 DRG 뉴런(론자 워커스빌(Lonza Walkersville, Inc.))을 해동시키고, 7㎖의 권장 배지(PNGM BulletKit: 1차 뉴런 Basal Medium containing 2mM L-글루타민, 50 ㎍/㎖ 겐타마이신/37 ng/㎖ 암포테리신 및 2% NSF-1을 포함하는 1차 신경 기초 배지)에 첨가하였다. 그런 다음, 약 5.0×10^5 DRG 뉴런을 포함하는 8㎖의 배지를 세포를 첨가하기 직전에 폴리-D-라이신(30 ㎍/㎖; 시그마(Sigma))으로 코팅된 24-웰 조직 배양 플레이트의 8개의 웰 사이에 나누었다. 세포를 37℃, 5% CO_2 인큐베이터에서 4시간 동안 인큐베이션한 다음, 배지를 제거하고, 새로운 미리 가온된 배지로 교체하였다. 슈완 세포 증식을 저해하기 위해, 유사분열 세포 저해제(5㎕의 17.5 ㎍/㎖ 우리딘 및 5㎕의 7.5 ㎍/㎖ 5-플루오로-2-데옥시우리딘/㎖의 배지)를 처음 4시간 인큐베이션 후에 첨가하였다. 세포를 37℃, 5% CO_2에서 인큐베이션하고, 제5일에 배지를 완전히 교체하고, 그 후 3일마다 50% 배지를 교체하였다. 초기 배양 6일 후, 래트 DRG 뉴런을 위에 기재된 바와 같은 AAV 벡터로 형질도입시켰다.

[0350] 도 21은 래트 DRG 세포에서 miR183 스펀지 효과 연구의 효과를 보여준다. 래트 DRG 세포에서 miR183 수준은 세포가 AAV9-eGFP-mir183으로 형질도입되었을 때 감소하였다. AAV9-eGFPmiR183은 GFP-miR183 mRNA에 대한 표적 결합을 보여준다.

[0351] 도 22a 내지 도 22c는 공지된 miR183 조절된 전사체에 대한 래트 DRG 세포에서의 효과를 보여준다. 도 22a는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV-GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서 CACANA2D1 상대 발현을 보여준다. 도 22b는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV-GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서CACANA2D2 상대 발현을 보여준다. 도 22c는 모의 벡터, AAV-GFP 또는 AAV- GFP-miR183 벡터의 전달 후 래트 DRG 세포에서 ATF3 발현을 보여준다. 이러한 세 가지 공지된 miR183-조절된 전사체의 mRNA 수준의 상대 발현에는 변화가 없었다. 형질도입되지 않은 모의 웰 및 GFP-miR183 형질도입된 웰과 비교하여 차이는 관찰되지 않았다. 이 데이터는 이들 세포에서 스펀지 효과가 없음을 보여준다. miR183의 나머지 수준이 충분하거나 또는 클러스터(miR96 및/또는 miR182)의 다른 구성원이 miR183의 감소된 이용 가능성을 보상할 수 있다.

[0352] 실시예 6: DRG 병리의 메타-분석

[0353] 혈액 또는 뇌 척수액(CSF)을 통한 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터의 비인간 영장류(NHP)로의 투여는 후근 신경절(DRG) 병리를 유발할 수 있다. 병리는 대부분의 경우 초경도에서 중등도이고, 영향을 받은 동물에서 임상적으로 증상이 없으며, 단핵 세포 침윤, 신경 변성, 및 중심 및 말초 축삭의 2차 축삭병증에 의한 병리조직학적 분석을 특징으로 한다. 본 발명자들은 256마리의 NHP에서의 33개의 비임상 연구로부터 데이터를 집계하고, 상이한 투여 경로, 용량, 시간 경과, 연구 수행, 동물의 연령, 성별, 캡시드, 프로모터, 캡시드 정제 방법 및 이식유전자 사이의 DRG 병리의 중증도에 대한 메타-분석을 수행하였다. DRG 병리는 AAV를 CSF에 투여한 NHP의 83% 및 정맥내(IV) 경로를 통한 NHP의 32%에서 관찰되었다. 본 발명자들은 주사시 용량과 연령이 중증도에 유의한 영향을 미치는 반면 성별은 영향을 미치지 않음을 보여주었다. DRG 병리는 주사 후 1개월 내지 5개월과 유사하고 6개월 후에 덜 심각했던 급성 시점(즉, 14일 이하)에는 없었다. 벡터 정제 방법은 영향을 미치지 않았으며, 본 발명자들이 테스트한 모든 캡시드 및 프로모터는 일부 DRG 병리를 유발하였다. 5개의 상이한 캡시드, 5개의 상이한 프로모터 및 20개의 상이한 이식유전자로부터의 본 명세서에 제시된 데이터는 DRG 병리가 NHP를 사용한 비임상 연구에서 AAV 유전자 요법 후 거의 보편적임을 시사한다. 치료적 이식유전자를 투여받은 어떠한 동물도 임의의 임상 징후를 나타내지 않았다. 신경 전도 속도와 같은 민감한 기법의 통합은 말초 신경 축삭병증의 중증도와 상관관계가 있는 소수의 동물에서 변형을 나타낼 수 있다. 인간 CNS 시험 및 고용량 IV 연구에서 감각 신경병증의 모니터링은 임상적으로 의미가 있는 DRG 병리가 발생하는지를 결정하는데 현명한 것으로 보인다.

[0354] *물질 및 방법*

[0355] *데이터 이용 가능성 진술*

[0356] 집계된 데이터는 작업에 자금을 지원한 후원자에게 독점적인 특정 이식유전자를 제외하고 제공된 실험 세부 정보와 함께 제공됩니다.

[0357] *동물*

[0358] 33건의 연구에서 237마리의 레서스 마카크 및 19마리의 사이노몰구스 마카쿠스를 이 메타-분석에 포함하였다. 모든 동물 절차는 펜실베니아 대학의 동물 실험 윤리 위원회의 승인을 받았다. 레서스 마카크(마카카 뮬라타) 또는 사이노몰구스 마카쿠스(마카카 파스시쿨라리스(Macaca fascicularis))는 코베인 리서치 프로덕츠사(텍사스주 앨리스 소재), 프라임젠/프리랩스 프라이메이츠(일리노이주 하인스 소재), 엠디 안데르센(MD Anderson)(텍사스주 배스트롭 소재)로부터 구입하거나 또는 기증받았다. 동물은 펜실베니아 대학의 실험실 동물 관리 평가 및 인증 협회(AAALAC) 국제 위원회에서 인증한 비인간 영장류 리서치 프로그램 시설 또는 필라델피아 어린이 병원의 스테인리스 스틸 압착식 케이지에서 사육하였다. 동물에게 간식, 시각 및 청력 자극, 조작 및 사회적 상호작용과 같은 다양한 환경을 조성해주었다.

[0359] *테스트 또는 대조군 제품 투여*

[0360] CSF 투여를 위해, NHP에게 이전에 기재된 바와 같은 형광 투시경 안내하에 멸균 인공 CSF(비히클)에 희석된 벡터를 대조에 주사하였다(문헌[N. Katz, et la. Hum Gene Ther Methods 29, 212-219, 2018]). 마취된 동물에서 형광 투시경 안내하에 요추 천자를 수행하였다. L4-5 또는 L5-6 공간에 척추 바늘을 삽입한 후, 본 발명자들은 CSF 회수(return) 및/또는 최대 1㎖의 조영제 물질(아이오헥솔 180)의 주사에 의해 위치를 확인하였다. 정맥내 투여를 위해, 카테터를 복재 정맥에 배치하고, 멸균 1× 둘베코 인산-완충 식염수로 벡터를 희석하였다.

[0361] *신경 전도 속도 테스트*

[0362] 동물을 케타민/덱스메데토미딘의 조합으로 진정시키고, 체온을 유지시키기 위해 열팩과 함께 수술 테이블에 측면 또는 배측으로 누운 상태로 두었다. 자극기 프로브를 기록 부위에 가장 가까운 음극과 함께 정중 신경 위에 배치하고, 2개 바늘 전극을 원위 지골(기준 전극) 및 근위 지골(기록 전극)의 수준에서 디지트 II(digit II)로 피하로 삽입하고, 접지 전극은 자극 프로브(음극)에 근접하게 배치하였다. 본 발명자들은 소아 자극기로 최고 진폭 응답에 도달할 때까지 단계적 방식으로 증가된 자극을 전달하였다. 최대 10개의 최대 자극에 대해 평균을 내어 정중 신경에 대해 보고하였다. 기록 부위에서 자극 음극까지의 거리(㎝)를 측정하고, 이를 사용하여 전도 속도를 계산하였다. 전도 속도 및 감각 신경 활동 전위(sensory nerve action potential: SNAP) 진폭의 평균을 모두 보고하였다.

[0363] *벡터*

[0364] 리서치 연구를 위해, AAV 벡터를 생성하고, 이전에 기술되어 있는 바와 같이 적정하였다(문헌[M. Lock et al.

Hum Gene Ther 21, 1259-1271, 2010; M. Lock, et al. Hum Gene Ther Methods 25, 115-125, 2014]). 간략하게는, HEK293 세포를 삼중 형질감염시키고, 배양 상청액을 수확하고, 농축하고, 아이오딕사놀 구배로 정제하였다. 우수 실험실 관리 기준(Good Laboratory Practice: GLP)을 준수한 독성 연구를 위해, HEK293 세포의 삼중-형질감염에 의해 벡터를 또한 생성하고, 이전에 기술되어 있는 바와 같이 POROS™ CaptureSelect™ AAV9 수지(써모피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 매사추세츠주 월섬 소재)를 사용하여 친화성 크로마토그래피에 의해 정제하였다(문헌[J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79-88, 2018]).

[0365] *조직병리학*

[0366] 대부분의 연구에서, 위원회에서 인증한 수의 병리학자는 처음에 테스트 물품/치료 그룹에 대해 맹검이었으며, 병변이 없는 경우 0, 초경도(10% 미만)인 경우 1, 경도(10% 내지 25%)인 경우 2, 중등도(25% 내지 50%)인 경우 3, 위중(50% 내지 95%)인 경우 4 및 중증(95% 초과)인 경우 5로 정의되는 중증도 점수를 확립하였다. 이러한 점수는 헤마톡실린 및 에오신(H&E)-염색된 조직의 현미경 평가를 기반으로 하였으며, 여기서 %는 평균 고배율 필드에서 병변에 의해 영향을 받은 조직의 비율을 나타낸다. 모든 GLP 및 일부 비-GLP 연구의 경우, 외부 위원회에서 인증한 수의 병리학자가 상호 검토(peer-review)를 완료하였다. DRG 변성 및 척수의 배측 축삭병증의 중증도 점수는 경추, 흉추 및 요추 분절로부터 확립하였다; 그러나, 평가된 절편의 수는 연구에 따라 다양하였다. 일부 연구에서는, 여러 조직 절편이 주어진 분절에 대한 슬라이드에 존재할 때, 점수는 DRG 및 척수의 개별 절편에 대해 할당하였고; 이들을 단일 대표 점수에 대해 평균을 내었다. 본 발명자들은 척수 축삭병증이 모든 DRG에서 오는 축삭의 배열(collation)을 나타내므로 DRG 병리의 더 나은 지표로 간주한다. 본 발명자들은 DRG 병리를 본 명세서 전반에 걸쳐 DRG 세포체 및 척수 또는 척수 단독 내의 병리조직학적 소견으로 정의한다. 말초 신경 축삭병증 등급은 정중(근위 및/또는 원위), 요골, 척골, 좌골(근위 및/또는 원위), 비골, 경골 및/또는 비복 신경의 평가를 기반으로 확립하였다. 근위 및 원위 정중 신경에 대한 평가를 수행하였을 때, 근위 분절은 상완신경총에서 팔꿈치까지의 신경 부분에 해당하고, 원위 분절은 팔꿈치에서 손바닥까지의 신경 부분에 해당하였다. 존재하는 경우, 말초 신경의 축삭주위(즉, 신경내) 섬유증에 대해 중증도 점수가 주어졌다. 말초 신경을 양측으로 평가한 연구의 경우, 각 신경에 대해 축삭병증 및 축삭 주위 점수를 평균 내었다.

[0367] *데이터 추출*

[0368] 병리학 점수 및 모든 관련 연구 정보를 포함한 미가공 데이터를 연구 파일로부터 추출하고, 단일 엑셀 스프레드시트에 집계하였다. 두 사람이 독립적으로 미리 결정된 검색 기준에 기초하여 점수를 추출하고 정렬하여 그래프를 생성하고 통계를 수행하였다. 추출된 결과 사이에 불일치가 있는 경우, 공동 품질 관리에 대한 합의를 하였다.

[0369] *통계*

[0370] 각 매개변수(즉, 주사 연령, 캡시드, 투여 경로, 시간 경과, 프로모터, 성별, 벡터 정제 방법 및 용량)에 대해, 본 발명자들은 R 프로그램(버전 3.5.0; https://cran.r-project.org) 내에서 함수 "wilcox.test"가 있는 Wilcoxon 순위-합 테스트를 사용하여 각 DRG 또는 SC 분절(즉, 경추, 흉추 및 요추)에 대한 각 그룹 쌍 사이의 병리학 점수 비교를 수행하였다. 그런 다음, 본 발명자들은 R에 있는 "metap" 패키지에서 함수 "sumlog"가 있는 Fisher의 방법을 사용하여 전체 DRG 또는 SC 그룹간 비교를 위한 3개의 비교로부터 조합된 p-값을 계산하였다. 통계적 유의성은 0.05 수준에서 조합된 p-값에 대해 평가하였다.

[0371] *결과*

[0372] *DRG 병리 평가*

[0373] 본 발명자들은 뉴런 및 이의 상응하는 축삭의 신경 해부학 및 체계적인 평가를 기반으로 DRG 뉴런에 대한 병변을 정확하게 평가하고 점수를 매기는 방법을 개발하였다. 1차 감각 뉴런의 신경 세포체는 DRG 내에 위치한 지주막하 공간의 각 척추 후근의 기저부에 있는 난형 팽창이다. DRG 뉴런은 하나의 말초 가지가 말초 신경으로 연장되며 하나의 중심 가지가 척수 백질 신경로에서 배측으로 상행하는 유사-단극성이다(도 23). 본 발명자들의 경험에 따르면, 신경 변성은 DRG에 균일하게 영향을 미치지 않으며, 이는 대표적인 샘플을 제공하기 위해 경추, 흉추 및 요추 부위로부터 여러 DRG를 수집해야 함을 의미한다. DRG의 병리는 단핵 염증성 세포 및 증식하는 상주 위성 세포를 수반하는 단핵 세포 침윤으로 나타나며, 신경 변성은 후기 단계에서 가시화된다(도 23, A1 원). 신경 세포체 손상에 대한 이차적인 것은 신경근(도 23, B1), 척수의 상행성 배측로(도 23, C1) 및 말초 신경(도 23, D1)에서의 DRG 축삭 돌기를 따른 축삭 변성(즉, 축삭병증)이다. 정상적인 대응물에 대한 전형적인 병리조직학적 소견은 도 23, A1 내지 D2에 도시되어 있으며; DRG 병리의 다양한 단계에 대한 고배율 이미지 또한 나타나

있다. 퇴행 과정의 초기에, 신경 세포체는 미세아교 세포 및 침윤 단핵 세포 외에 증식하는 위성 세포만이 있는 비교적 정상적인 것으로 보인다(신경세포 포식증, 도 23, 패널 E). 병변이 진행됨에 따라, 신경 세포체는 쇠퇴되거나 또는 핵이 없고 세포질 과호산구증가증이 있는 작고, 불규칙하거나 또는 각진 모양의 세포를 특징으로 하는 변성의 증거(도 23, 패널 F, 수직 화살표)를 나타낸다. 말기 신경 세포체 변성(도 23, 패널 G, 원)은 위성 세포, 미세아교 세포 및 단핵 세포에 의한 완전 소멸(도 23, 패널 G, 별)을 수반한다. DRG 및 상응하는 축삭에 대한 조직학적 소견의 중증도는 평균 고배율 필드에서 영향을 받은 뉴런 또는 축삭의 백분율에 기초하여 등급을 매겼다: 0 병변의 부재, 1 초경도(10% 미만), 2 경도(10% 내지 25%), 3 중등도(25% 내지 50%), 4 위중(50% 내지 95%) 및 5 중증(95% 초과). DRG는 정상적인 뉴런의 존재비를 가지며 주어진 절편에서 변성을 나타내는 소수의 뉴런만이 있는 모자이크형을 나타낸다. 본 발명자들은 척수 축삭병증이 모든 DRG에서 오는 축삭의 배열을 나타내므로 DRG 병리의 더 나은 지표로 간주한다. 본 발명자들은 DRG 병리를 본 명세서 전반에 걸쳐 DRG 세포체 및 척수 또는 척수 단독 내의 병리조직학적 소견으로 정의한다.

[0374] *연구 및 집단 특성*

[0375] 본 발명자들은 2013년부터 2020년까지 Penn의 유전자 요법 프로그램에서 AAV 벡터 또는 비히클 대조군을 주사한 256마리의 동물을 포함한 33건의 연구로부터 데이터를 집계하였다. 이들 연구의 요약은 아래 표에 제공된다.

NHP 집단 및 연구 특성

매개변수	동물의 수					
종	레서스 (전체)	레서스 (수컷)	레서스 (암컷)	사이노몰구스 (전체)	사이노몰구스 (수컷)	사이노몰구스 (암컷)
	237	134	103	19	13	6
성별	수컷			암컷		
	147			109		
연령	영아 (1개월)		청소년기 (1년 내지 3년)		성체 (3년 초과)	
	4		58		194	
투여 경로**	IV	ICM	LP	IV+ICM	IM	
	27	213	6	4	4	
용량 범위	IV			ICM 및 LP		
	1e13 GC/kg – 2e14 GC/kg			1e12 GC – 3e14 GC		
캡시드	5					
프로모터	5					
이식유전자	20					
ICM/LP 연구를 위한 캡시드 제조	GLP 연구 (칼럼-정제 벡터)			비-GLP (아이오딕사놀-정제 벡터)		
	101			103		

**주사되지 않은 n=2 (병리 없음)

[0376]

[0377] *DRG 병리의 중증도에 대한 연구 특성의 영향*

[0378] AAV ICM 또는 LP를 투여받은 NHP의 83%(170마리/205마리 동물), IV 경로의 경우 NHP의 32%(8마리/25마리 동물), ICM + IV 조합의 경우 100%(4마리/4마리 동물) 및 근육내의 경우 0%(IM, 0마리/4마리 동물)에서 DRG 병리가 관찰되었다. 병리학자가 DRG의 중증도 점수 및 척수 및 말초 신경에서의 상응하는 축삭을 기준으로 DRG 병변의 등급을 매겼다. 각 DRG 및 척추 영역(경추, 흉추 및 요추)에 대한 점수를 얻었다. DRG의 중증도는 각 척수 영역을 DRG로부터의 전체 축삭을 그룹화하여 여러 DRG로부터의 병리학 점수를 조사하기 때문에 척수에서보다 더 낮았다(도 23). 병리의 중증도에 유의하게 영향을 미친 연구 설계 매개변수는 투여 경로(ROA), 용량 및 부검 시점이었다(도 24a 내지 도 24c). 비임상 실험실 연구에 대한 GLP 관행 준수(미국 연방 규정집의 제21편, 58부에 의거)는 병리의 중증도에 영향을 미치지 않았다(도 24d). IM을 제외한 모든 ROA는 비히클 대조군과 비교할 때 DRG 및 척수 모두에서 유의한 병리를 초래하였다($p=0.04$ DRG 및 척수, IV 대 비히클; $p<0.001$ DRG 및 $p<0.0001$ 척수, 기타 모든 경로 대 비히클). ICM, LP 및 ICM/IV는 모두 유사하였고, IV보다 유의하게 더 나빴다(IV 대

ICM p<0.0001; IV 대 LP p=0.02; IV 대 ICM/IV p=0.0006 - 도 24a). IM(미제시)은 병리로 이어지지 않았고(모두 0점), 비히클 대조군과 유사하였다. 다음 모든 분석에 대해, 본 발명자들은 CSF내 투여(즉, ICM 또는 LP)한 동물만을 고려하였다. 2개의 더 낮은 용량 범위(3E+12 GC 미만 및 3E+12 - 1E+13 GC)는 유사하였지만, 최대 용량 범위(1E+13 GC 초과)는 최저 용량 범위(p=0.009, 척수) 및 중간 용량 범위(p= 0.001 DRG, p=0.05 척수; 도 24b)보다 유의하게 더 나쁜 병리학 점수를 초래하였다. 주사 후 시점(즉, 부검이 수행되고 조직이 분석되었을 때)은 21일 내지 60일, 90일 및 120일 내지 169일 사이에 유사한 병리 중증도를 나타내었다. 초기(즉, 14일) 시점에서는 병리가 관찰되지 않았지만, 180일 이상의 더 긴 추적 관찰에서는 다른 모든 시점과 비교하여 중증도의 유의미한 감소를 보여주었다(p<0.0001 척수; p<0.0001 DRG D90; p<0.001 DRG 기타 시점).

[0379] *DRG 병리의 중증도에 대한 동물 특성의 영향*

[0380] 벡터 투여시 연령은 병리 중증도에 상당한 영향을 미쳤다. 청소년기 동물은 성체와 비교할 때 DRG 변성이 덜 중증이었지만(p=0.003), 유사한 척수 축삭병증을 가졌다(도 25a). 영아로서 처리된 4마리의 동물은 이전에 보고된 바와 같이 DRG 또는 척수 병리의 징후가 없었다(문헌[J. Hordeaux et al. Hum Gene Ther 30, 957-966, 2019]). 이러한 결과는 적은 n수와 연구 종점(주사 후 4년)의 가능한 영향으로 인해 주의해서 해석하여야 한다. 도 24a 내지 도 24d에 나타낸 바와 같이, 연구 기간은 병리의 중증도에 영향을 미치며, 주사시 연령 및/또는 연구 기간이 병리의 부재를 뒷받침하는지 여부는 불분명하다. 추가적으로 그리고 중요하지 않게는, 성별은 SC 또는 DRG 병리에 영향을 미치지 않았다(도 24b).

[0381] *DRG 병리의 중증도에 대한 벡터 특성의 영향*

[0382] DRG 신경변성은 모든 캡시드에 존재하였지만, 혈청형 간에 중증도에 약간의 차이가 있었다(도 26a). DRG로 제한되고 척수 점수에서 볼 수 없는 이러한 변형은 척수 단면보다 샘플링 인공물에 더 민감한 모자이크형을 나타내기 때문에 의미가 없을 수 있다. 축삭병증 및 DRG 점수는 둘 다 AAVhu68보다 AAV1(p=0.01 척수; p=0.0004 DRG) 및 AAV9보다 AAV1(p=0.007 척수 및 DRG - 도 26a)에서 유의하게 더 나빴다. 유비퀴터스 프로모터 CAG, CB7 및 UbC는 모두 서로 유사하였지만, CAG는 hSyn(p=0.028)보다 더 나쁜 축삭병증을 초래하였고, MeP426는 CB7(p=0.001), UbC(p=0.002) 및 hSyn(p=0.0003; 도 26b)보다 더 나빴다. 본 발명자들은 20개의 상이한 이식유전자를 테스트하였으며, 하나를 제외한 모두가 DRG 병리를 야기하였다(도 26c). 병리 중증도는 이식유전자 사이에 다양하였고(0.5에서 2.7까지의 평균 척수 축삭병증 점수); 병리 중증도는 분비된 이식유전자와 비교하여 분비되지 않은 이식유전자의 경우 20% 내지 25% 낮았으며(도 26d; DRG의 경우, 분비된 평균=0.61, 분비되지 않은 평균=0.47, p=0.05; SC의 경우, 분비된 평균=1.17, 분비되지 않은 평균=0.94, p=0.02). 더욱이, 정제 방법(즉, 비-GLP 연구에서 아이오딕사놀 및 GLP 연구에서 칼럼 크로마토그래피)은 DRG 병리의 존재 또는 중증도에 영향을 미치지 않았다(도 26d).

[0383] *DRG 병리의 국소 중증도 및 임상 징후*

[0384] 본 발명자들은 경추, 흉추 및 요추와 관련하여 병리의 국소적(regional) 차이를 평가하였다. 삼차 신경절(TRG)도 또한 지주막하 공간 내부의 두개골 기저에 위치한 DRG와 유사한 특성을 갖는 감각 신경절을 나타내므로 분석하였다. 도 27은 각 영역뿐만 아니라 평균의 실제 병리학 점수의 분포를 보여준다. TRG 병리는 경추 및 요추 DRG(유의하지 않음)와 유사한 반면, 흉추 DRG는 덜 중증의 점수를 가졌다(p=0.007). SC 영역 점수는 상응하는 DRG 점수보다 모두 유의하게 나빴으며(p<0.0001), 이는 여러 DRG로부터의 일관된 SC 배열 축삭이며, 이는 더 많은 병변을 포함함을 의미한다. 대부분의 절편은 중증도 점수가 정상이거나 또는 낮으며(1등급), 4등급 및 5등급 점수는 거의 보고되지 않았다(5등급은 평균 고배율 필드에서 병변의 영향을 받는 조직 표면의 95% 이상에 해당함)(도 27). 본 발명자들은 정신활동, 자세 및 보행에 대한 케이지 내 평가뿐만 아니라 뇌신경, 고유수용감각, 운동 강도, 감각 기능 및 반사의 억제 평가를 포함하는 신경학적 검사를 수행하였다. AAV ICM 또는 LP를 투여한 204마리의 동물 중, 단 3마리에서만 운동실조 및/또는 떨림의 임상 징후가 있는 명백한 병리가 발생하였다. 3마리 모두에 GFP를 암호화하는 벡터를 1E+13 GC 초과의 용량으로 투여하였고, 병리는 주사 후 제21일에 나타났다. 정중 신경의 신경 전도 속도는 56마리의 동물에서 기록하였다. 2마리는 주사 후 제28일에 위중한 양측성 감각 진폭 감소가 발생하여 부검때까지 지속되었다. 이는 정중 신경의 위중한(4등급 중증도) 축삭병증 및 신경내 섬유증과 상관관계가 있었지만, 명백한 임상적 후유증은 없었다. 대부분의 동물은 말초 신경에서 낮은 중증도 등급의 축삭병증 및 섬유증을 가졌다(도 28a 및 도 28b).

[0385] *논의*

[0386] DRG 병리 및 2차 축삭병증은 대다수의 본 발명자들의 NHP 연구에서 초경도이며, 이는 비전문가가 알아차리기 어

려울 수 있다. 본 발명자들의 ICM AAV 투여를 평가한 첫 번째 GLP 독성 연구에서(문헌[J. Hordeaux, et al. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 79-88, 2018]), 초기 병리 평가를 수행한 CRO는 신경병리학 경험이 있는 동료-검토 병리학자만이 발견한 병변을 놓쳤었다. 신경 변성은 드물며 DRG는 주어진 절편에서 퇴행성 이벤트가 거의 없는 대부분의 정상적인 뉴런의 모자이크형이기 때문에, 본 발명자들은 강력한 조직학적 분석을 위해 여러 DRG를 수집해야 할 필요가 있음을 발견하였다(본 발명자들은 척추 영역당 적어도 3개를 권장함). DRG 신경 손상을 검출하고 정량화하는 더 쉬운 방법은 척수에서 축삭 변성을 평가함으로써 세포체에서 병리의 2차 결과를 평가하는 단계를 포함하며; 이는 검출하기 쉬우며, 여러 DRG에서 오는 상행성 섬유의 배열을 나타낸다.

[0387] 올바른 조직을 수집하고 주의 깊게 분석할 때, 본 발명자들은 AAV ICM을 투여받은 NHP의 83% 및 AAV IV를 투여받은 NHP의 32%에서 DRG 병리의 일부 증거를 발견하였다. 병리를 나타내는 IV 용량은 1E+13 GC/kg만큼 낮았으며, 이는 현재 용량 현재 여러 혈우병 시험에 대한 임상에서 평가된 용량이다(문헌[B. S. Doshi and V. R. Ther Adv Hematol 9, 273-293, 2018]). 제조 정제 방법은 병리에 영향을 미치지 않았다. 본 발명자들이 테스트한 모든 캡시드 및 모든 프로모터는 일정 수준의 DRG 병리를 보여주었으며, 이는 캡시드 또는 프로모터를 변경하는 것이 실행 가능한 해결책이 아님을 시사한다. 비임상 연구 설계 및 임상적 중개(clinical translation)와 관련하여, 본 발명자들은 주사시 용량 및 연령이 중증도에 유의하게 영향을 미치는 반면 성별은 영향을 미치지 않음을 발견하였다. 병리의 중증도에 가장 큰 영향을 미치는 본 연구의 양태는 이식유전자였으며, 이는 이식유전자 과발현이 변성으로 이어지는 초기 이벤트를 유발한다는 본 발명자들의 가설과 일치한다. 대부분의 이식유전자의 경우, 최소 효능 용량(MED)을 초과하는 최대 무독성량(No Observable Adverse Effect Level: NOAEL)을 확인할 수 없었다.

[0388] 급성 시점(즉, 14일 또는 그 이하)은 조직병리를 나타내지 않는 반면 더 긴 연구(즉, 180일 초과)는 덜 중증인 병리를 나타내는 경향이 있고, 이는 시간이 경과함에 따른 진행의 부족과 가능한 부분적 관해를 시사하므로, 연구 설계를 위해 시간 경과를 고려하는 것이 중요하다. 보건 당국과 본 발명자들의 경험은 두 가지 부검 시점을 통합하는 것과 관련이 있다 - 하나는 병리의 발생 후(즉, 약 1개월)이고, 다른 하나는 병리가 악화되지 않는다는 것을 보여주기 위한 시점(즉, 4개월 내지 6개월)이다. 메타 분석에 포함된 생후 1개월에 투여된 4마리의 NHP 영아는 주사 후 4년에 동물을 부검하였을 때 우수한 이식유전자 발현 수준에도 불구하고 DRG 및 SC 축삭 병리가 없다는 것이 주목할 만하였다(문헌[J. Hordeaux et al. Hum Gene Ther 30, 957-966, 2019]). 이러한 관찰은 영아에게 투여할 때 보다 유리한 안전성 프로파일을 제안하거나 또는 급성 병리가 진행되지 않고 실제로 해결됨을 시사할 수 있으며; 본 발명자들은 이 연구에서 임의의 초기 시점 부검을 하지 않았다.

[0389] 치료적 이식유전자(즉, GFP와 같은 리포터 유전자가 아님)를 투여받은 동물 중 어떤 동물도 임의의 임상 소견을 나타내지 않았다. 이후 연구에서, 본 발명자들은 신경 전도 속도 측정을 사용하여 감각 뉴런 병리의 일상적인 모니터링을 통합하였다. 본 발명자들은 임상적 후유증의 증거 없이 보다 중증의 말초 신경 축삭병증 및 섬유증(즉, 4등급 중증도)과 관련된 2마리의 동물에서 NCV 이상을 발견하였다.

[0390] 요약하면, 본 발명자들은 DRG의 병리가 AAV 벡터가 지주막하 공간으로 전달될 때 거의 모든 NHP 연구에서 그리고 더 높은 용량이 전신적으로 투여될 때 많은 연구에서 일관된 소견을 나타냄을 보여주었다. 본 발명자들의 메타 분석은 임의의 임상적 후유증이 현저하게 없다는 점에서 주목할 만하다. 다른 종에서의 다른 비임상 연구에 대한 주의 깊은 분석은 신생아 돼지를 제외하고 DRG 병리의 임의의 증거를 보여주지 못하였으며, 이는 NHP가 이러한 잠재적 병리를 평가하기 위한 최상의 모델임을 시사한다. 인간 CNS 시험 및 고용량 IV 연구에서 감각 신경병증의 모니터링은 임상적으로 의미 있는 DRG 병리가 발생하는지 결정하는데 현명한 것으로 보인다.

[0391] **실시예 7: AAVrh91-매개성 MPSI 유전자 요법의 개발**

[0392] MPSI 이식유전자 전달에 대한 DRG 탈표적화 miRNA 표적 부위의 안전성 및 효능에 대한 영향을 평가하기 위해 비임상 연구를 수행하였다. 실시예 2에 기재된 바와 같이, 발현 카세트의 3' UTR 영역에서 DRG가 풍부한 miR인 miR183에 대한 표적의 4개의 탠덤 반복부를 클로닝함으로써 DRG에서 이식유전자 발현을 억제하는 전략은 DRG에서 GFP 발현을 제거하는 동시에 다른 곳(뇌, 간, 심장)에서 이식유전자 발현의 일부 향상을 부여하는데 효과적이었다. NHP에서 테스트하였을 때, 4개의 탠덤 반복부는 DRG에서 발현을 감소시켰고, AAVhu68.hIDUA를 동일한 용량으로 주사한 동물과 비교할 때 AAVhu68.hIDUA-4xmiR183을 1×10^{13} GC ICM으로 주사한 NHPd에서의 형질도입된 DRG에서 관찰된 mRNA ISH 신호의 80%의 감소가 관찰되었다. 이러한 감소는 DRG 병리 및 2차 축삭병증을 완전히 예방하기에 충분하였다. 아래에 기재된 연구는 CNS, AAVrh91(AAV1 변이체) 및/또는 임상 약물 투여 및 샘플링에 일반적으로 사용되는 CNS-표적화 투여를 위한 Ommaya 저장소를 사용한 전달에서 개선된 방향성 및 체내 분포를 갖는 캡시드를 이용한다.

[0393] *비임상 리서치 연구*

[0394] *NHP 파일럿 연구 - NextGen DRG 및 캡시드 비교*

[0395] 이 연구는 레서스 마카크에 대조내(ICM) 투여 후 안전성, 약리학 및 벡터 체내 분포에 대한 예비 데이터를 얻기 위해 설계하였다.

[0396] 연구 설계:

[0397] • 벡터

[0398] 1. AAVhu68.hIDUAcoV1

[0399] 2. AAVrh91.hIDUA coV1

[0400] 3. AVrh91.hIDUA coV1.4xmiR183

[0401] 4. AAVrh91.hIDUA coV1.4xmiR182

[0402] • 동물의 수: 15마리(n=3/그룹)

[0403] • 투여 경로: ICM

[0404] • 용량: 3×10^{13} GC

[0405] • 생존 기간: 90일

[0406] 생존 분석은 일일 케이지 내 관찰, 표준화된 신경학적 평가, 혈청 화학 패널에 대한 주기적 채혈, 전체 혈구 수, 응고 패널, 보체 활성화, 간 기능 테스트, CSF 화학을 위한 주기적 CSF 탭 및 세포 계수를 포함한다. 혈청 및 PBMC를 수집하여 캡시드 및 이식유전자에 대한 체액 및 세포 면역 반응을 조사하였다.

[0407] 벡터 투여 후 제90일에 이 연구의 생존 단계를 완료한 후, 종합적인 병리조직학적 검사(동료 검토와 함께 위원회가 인증한 수의 병리학자) 및 정량적 PCR과 hIDUA 발현의 정량화에 의한 벡터 체내 분포의 분석을 위해 수확된 조직으로부터 전체 부검을 수행하였다. 혈액, 비장, 간 및 심부 경추 림프절에서 림프구를 채취하여 부검시 이들 기관에서의 CTL의 존재를 조사하였다. miR 표적 서열이 있는 벡터는 DRG 변성 및 관련 축삭병증을 가장 잘 감소시키고/시키거나 제거하는 동시에 주요 조직에서 최적의 체내 분포를 입증할 것으로 예상된다.

[0408] *NHP 파일럿 연구 - ICV 저장소가 있는 AAVrh91 벡터*

[0409] 레서스 마카크에 이식된 심실내 저장소/카테터 시스템을 통해 AAV.GFP를 투여한 후 안전성, 약리학 및 벡터 체내 분포를 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 연구 후, 벡터는 이 투여 경로를 통해 평가되도록 선택된다.

[0410] 연구 설계:

[0411] • 동물의 수: 3마리

[0412] • 투여 경로: ICV

[0413] • 용량: 3×10^{13} GC

[0414] • 생존 기간: 90일

[0415] 생존 분석은 일일 케이지 내 관찰, 표준화된 신경학적 평가, 혈청 화학 패널에 대한 주기적 채혈, 전체 혈구 수, 응고 패널, 보체 활성화, 간 기능 테스트, CSF 화학을 위한 주기적 CSF 탭 및 세포 계수를 포함한다. 혈청 및 PBMC를 수집하여 캡시드 및 이식유전자에 대한 체액 및 세포 면역 반응을 조사하였다.

[0416] 벡터 투여 후 제90일에 이 연구의 생존 단계를 완료한 후, 종합적인 병리조직학적 검사(동료 검토와 함께 위원회가 인증한 수의 병리학자) 및 정량적 PCR과 hIDUA 발현의 정량화에 의한 벡터 체내 분포의 분석을 위해 수확된 조직으로부터 전체 부검을 수행하였다. 혈액, 비장, 간 및 심부 경추 림프절에서 림프구를 채취하여 부검시 이들 기관에서의 CTL의 존재를 조사하였다.

[0417] *MPSI 마우스에서 효능 및 용량 범위 연구*

[0418] 파일럿 용량 범위 연구에서 MPSI 마우스에 ICV로 투여될 때 이전 MPSI와 비교하여 hIDUA 발현 및 효능을 결정하기 위해 AAVrh91벡터를 평가하였다. 판독값에는 혈청 및 간 IDUA 활성 및 CNS의 보관 감소 판독값을 포함시켰다.

[0419] 연구 설계:

[0420] • 동물의 수: 약 50마리(n=10/그룹, WT/KO 대조군 포함)

[0421] • 투여 경로: ICV

[0422] • 용량:

[0423] • 1.3×10^{11} GC

[0424] • 4.5×10^{10} GC

[0425] • 1.3×10^{10} GC

[0426] • 생존 기간: 90일

[0427] (서열 자유목록)

[0428] 다음 정보는 숫자 식별자 <223> 하에 자유 텍스트를 포함하는 서열에 대해 제공된다.

[0429]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
1	<223> miR-183 target
2	<223> mirR-96 target
3	<223> miR-182 target
4	<223> miR-145 target
5	<223> spacer (i)
6	<223> spacer (ii)
7	<223> spacer (iii)
10	<223> ITR.CB7.CI.eGFP.miR145.rBG.ITR <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> 5' - AAV2 - ITR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' - AAV2 - ITR <220> <221> promoter <222> (198)..(579)

[0430]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<223> CMV IE promoter <220> <221> promoter <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> eGFP gene <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2727) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2728)..(2731) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2732)..(2754) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2755)..(2760) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2761)..(2783) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2784)..(2789) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2790)..(2812) <223> miR145 <220> <221> misc_feature <222> (2981)..(3198) <223> 3' ITR
11	<223> ITR.CB7.CI.eGFP.miR182.rGB.ITR <220> <221> misc_feature

[0431]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<222> (1)..(130) <223> 5' ITR (AAV2) <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> chicken beta-actin intron <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> eGFP coding sequence <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2728) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2729)..(2732) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2733)..(2756) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2757)..(2760) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2763)..(2786) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2787)..(2792) <223> spacer <220> <221> misc_feature

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<222> (1)..(130) <223> 5' ITR (AAV2) <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> chicken beta-actin intron <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> eGFP coding sequence <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2728) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2729)..(2732) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2733)..(2756) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2757)..(2760) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2763)..(2786) <223> miR182 <220> <221> misc_feature <222> (2787)..(2792) <223> spacer <220> <221> misc_feature

[0432]

[0433]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<222> (2793)..(2816) <223> miR182 <220> <221> polyA_signal <222> (2858)..(2984) <220> <221> misc_feature <222> (3073)..(3202) <223> 3' ITR
12	<223> ITR.CB7.eGFP.miRNA96.rBG.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2699) <223> eGFP coding sequence <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2727) <223> miR96 <220> <221> misc_feature <222> (2728)..(2731) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2732)..(2754) <223> miR96 <220> <221> misc_feature <222> (2755)..(2760) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2761)..(2783) <223> miR96 <220> <221> misc_feature <222> (2784)..(2789) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2790)..(2812) <223> miR96

[0434]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
13	<223> ITR.CB7.CI.eGFP.miRNA183.rBG.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1979)..(2698) <223> eGFP coding sequence <220> <221> misc_feature <222> (2705)..(2726) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (2727)..(2730) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2731)..(2752) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (2753)..(2758) <223> space <220> <221> misc_feature <222> (2781)..(2786) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (2787)..(2808) <223> miRNA183
14	<223> ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220>

[0435]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<221> misc_feature <222> (836)..(839) <223> TATA <220> <221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> chicken beta-actin intron <220> <221> CDS <222> (1943)..(3901) <223> hIDUAcoV1 <220> <221> misc_feature <222> (3908)..(3922) <223> 3UTR insertion site <220> <221> misc_feature <222> (3956)..(4082) <223> Rabbit globin poly A <220> <221> misc_feature <222> (4171)..(4300) <223> 3' ITR
15	<223> Synthetic Construct
16	<223> ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.ITR <220> <221> misc_feature <222> (1)..(130) <223> 5' ITR <220> <221> misc_feature <222> (198)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> misc_feature <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220> <221> misc_feature <222> (836)..(839) <223> TATA <220>

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
	<221> misc_feature <222> (958)..(1930) <223> chicken beta-actin intron <220> <221> CDS <222> (1943)..(3901) <220> <221> misc_feature <222> (3914)..(3935) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (3936)..(3939) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (3940)..(3961) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (3962)..(3967) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (3968)..(3989) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (3990)..(3995) <223> spacer <220> <221> misc_feature <222> (3996)..(4017) <223> miRNA183 <220> <221> misc_feature <222> (4059)..(4185) <223> Rabbit globin poly A <220> <221> misc_feature <222> (4274)..(4403) <223> 3' ITR
17	<223> Synthetic Construct

[0436]

SEQ ID NO: (containing free text)	Free text under <223>
22	<223> engineered sequence
23	<223> engineered sequence
24	<223> engineered sequence
25	<223> engineered sequence
26	<223> engineered sequence
29	<223> Synthetic Construct

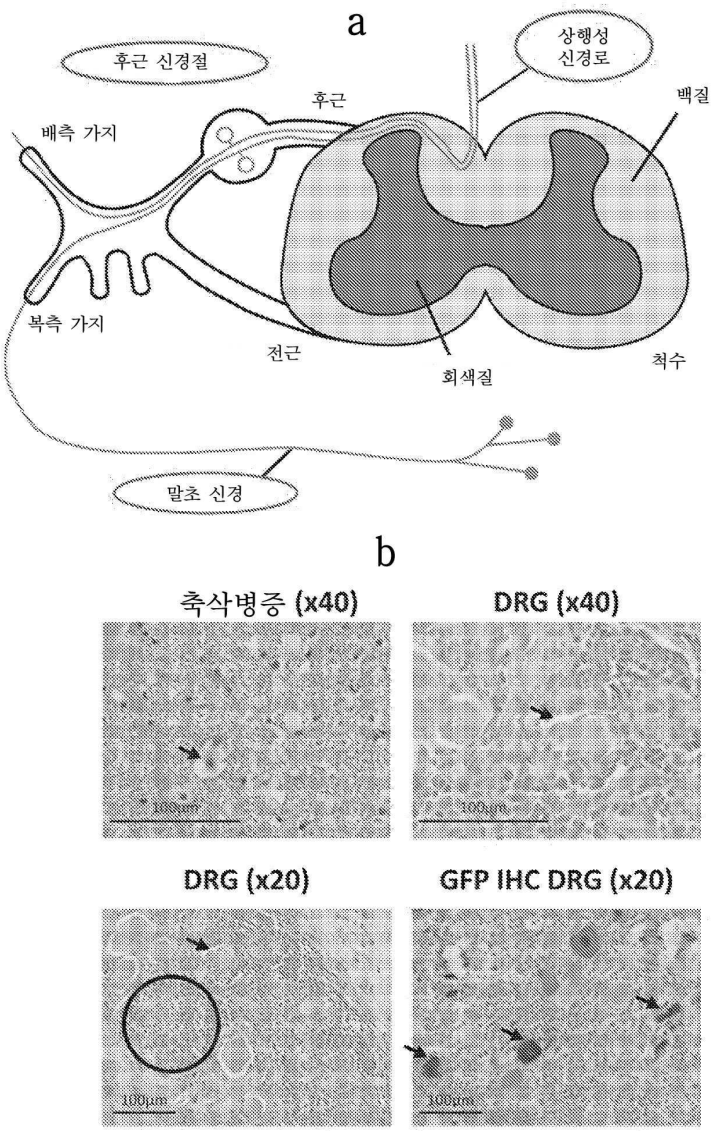
[0437]

[0438] 본 명세서에 인용된 모든 간행물은 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 2020년 6월 24일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/043,600호, 2020년 6월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/038,514호, 2020년 5월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/023,602호, 2020년 4월 6일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/005,894호, 2020년 2월 10일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/972,404호, 2019년 12월 20일자로 출원된 국제 특허 PCT/US19/67872, 2019년 11월 13일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/934,915호, 2019년 10월 23일자로 출원된 미국 특허 가출원 제62/924,970호, 2020년 5월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/023,593호, 2020년

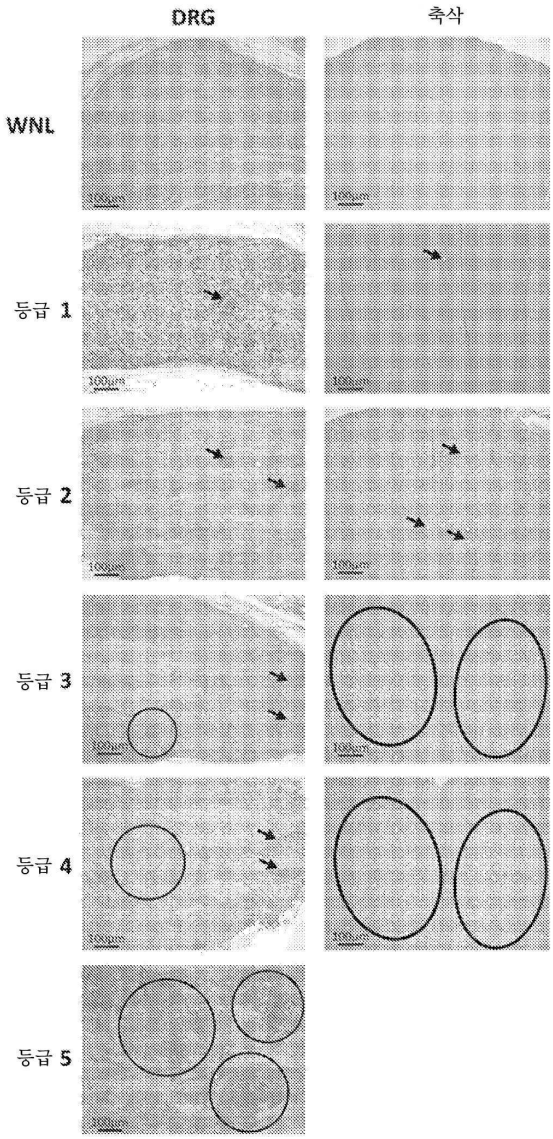
6월 12일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/038,488호, 2020년 6월 24일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/043,562호 및 2020년 9월 16일자로 출원된 미국 특허 가출원 제63/079,299호는 그 전체가 참조에 의해 본 명세서에 원용된다. 유사하게는, 본 명세서에 참조되고 "20- 9316PCT.txt"로 표시된 첨부된 서열 목록에 나타나는 서열번호가 참조에 의해 원용된다. 본 발명이 특정 실시형태를 참조하여 설명되었지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않고 수정이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다. 이러한 수정은 첨부된 청구범위의 범주에 속하는 것으로 의도된다.

도면

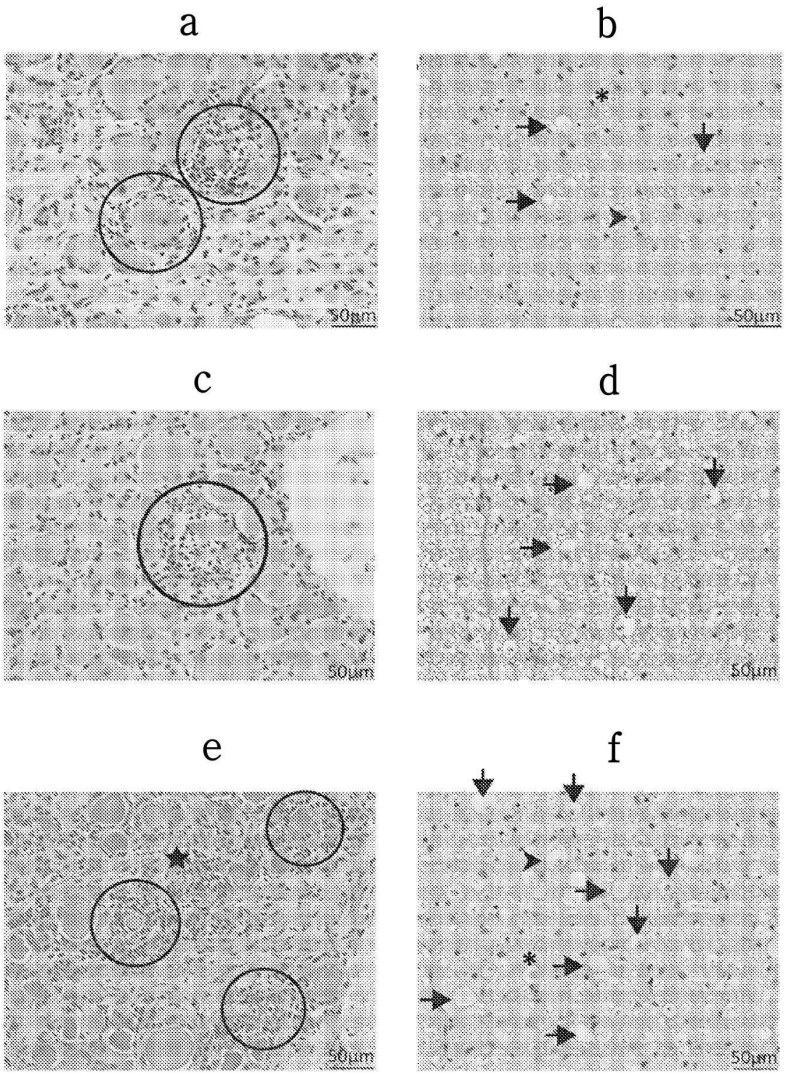
도면1ab



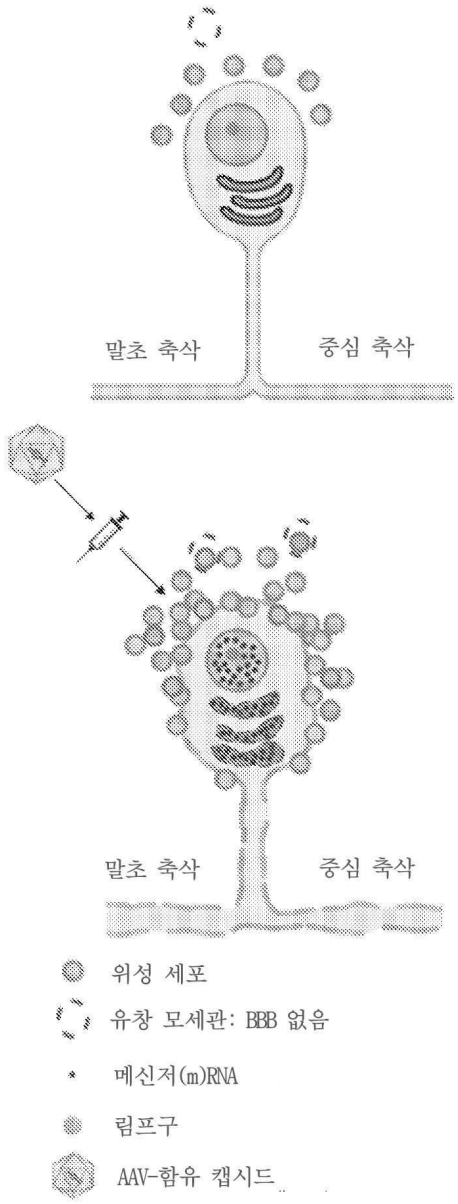
도면1c



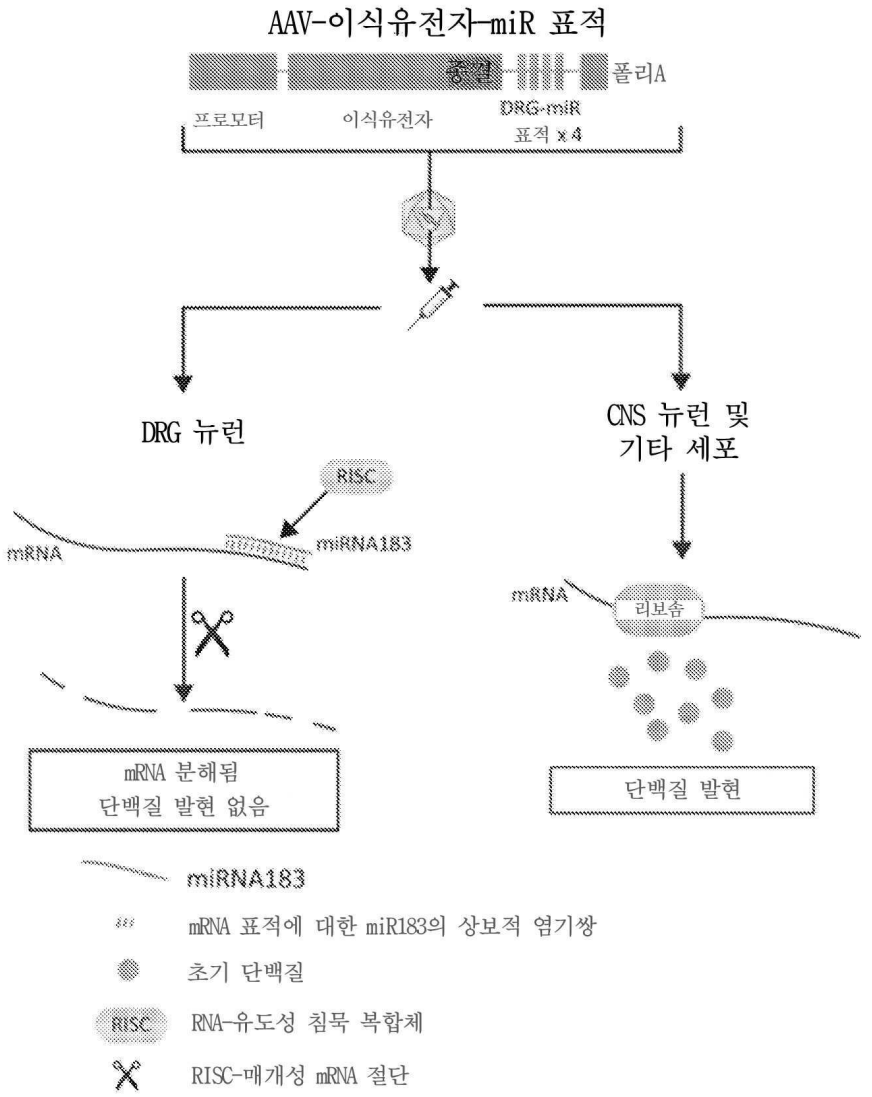
도면2



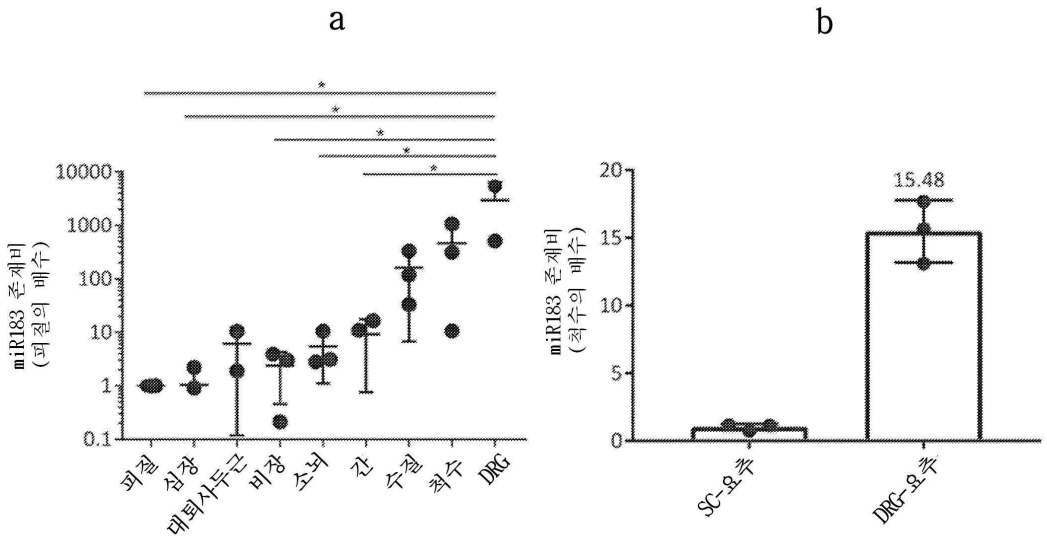
도면3a



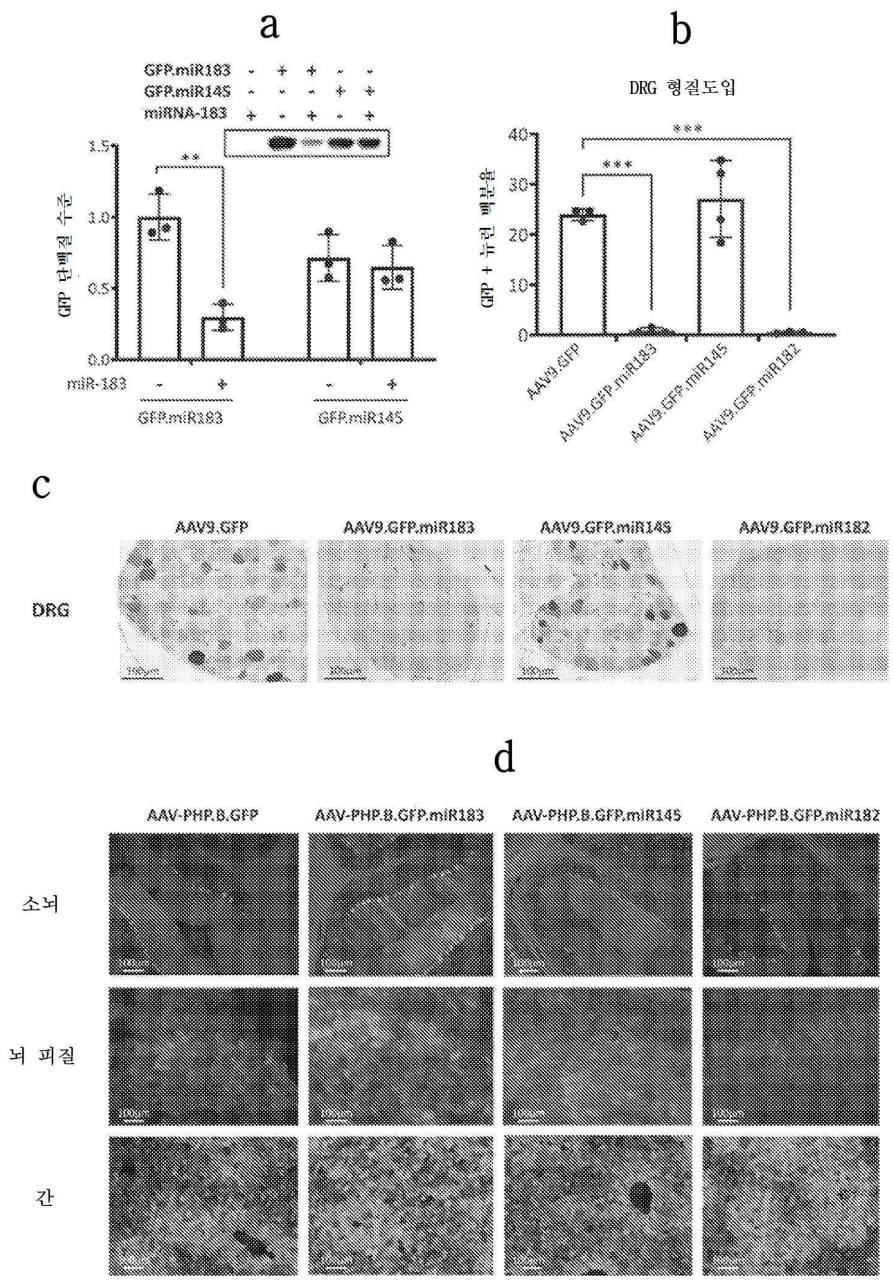
도면3b


AAV-이식유전자-miR 표적
폴리A
프로모터
이식유전자
DRG-miR
표적 x 4
DRG 뉴런
CNS 뉴런 및
기타 세포
RISC
mRNA
miRNA183
리보솜
mRNA 분해됨
단백질 발현 없음
단백질 발현
miRNA183
mRNA 표적에 대한 miR183의 상보적 염기쌍
초기 단백질
RISC
RNA-유도성 침묵 복합체
RISC-매개성 mRNA 절단

도면4

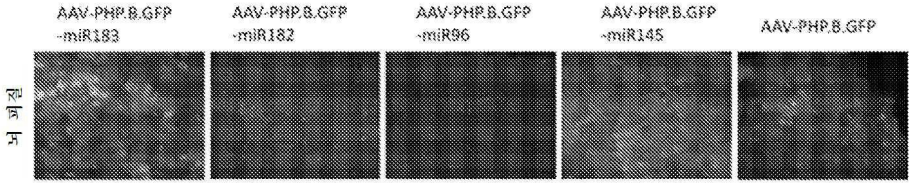

a
b
miR183 존재비
(피질의 배수)
10000
1000
100
10
1
0.1
피질
심장
대퇴사두근
비장
소뇌
간
수질
척수
DRG
miR183 존재비
(척수의 배수)
20
15
10
5
0
15.48
SC-요추
DRG-요추

도면5

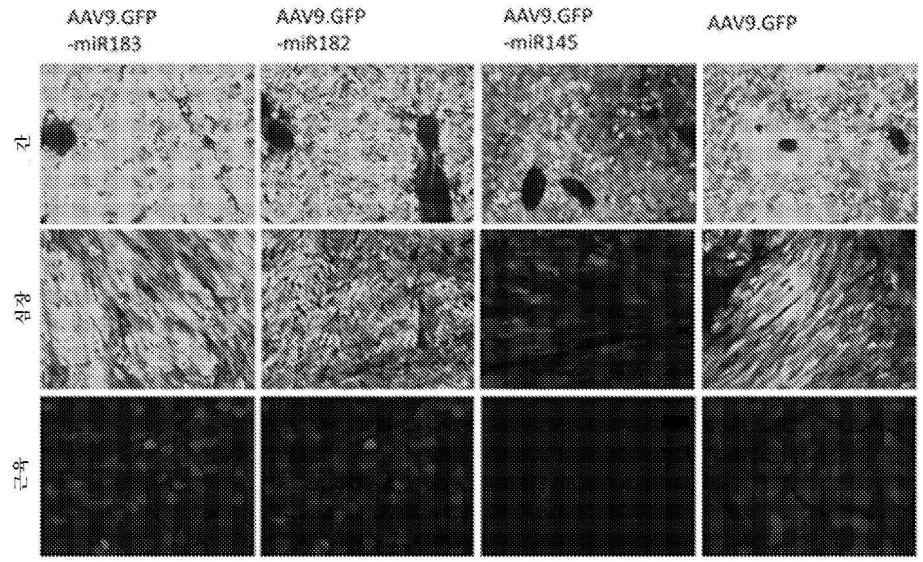

a
GFP.miR183
GFP.miR145
miRNA-183
GFP 단백질 수준
miR-183
GFP.miR183
GFP.miR145
b
DRG 형질도입
GFP + 뉴런 배분율
AAV9.GFP
AAV9.GFP.miR183
AAV9.GFP.miR145
AAV9.GFP.miR182
c
AAV9.GFP
AAV9.GFP.miR183
AAV9.GFP.miR145
AAV9.GFP.miR182
DRG
d
AAV-PHP.B.GFP
AAV-PHP.B.GFP.miR183
AAV-PHP.B.GFP.miR145
AAV-PHP.B.GFP.miR182
소뇌
뇌 피질
간

도면6ab

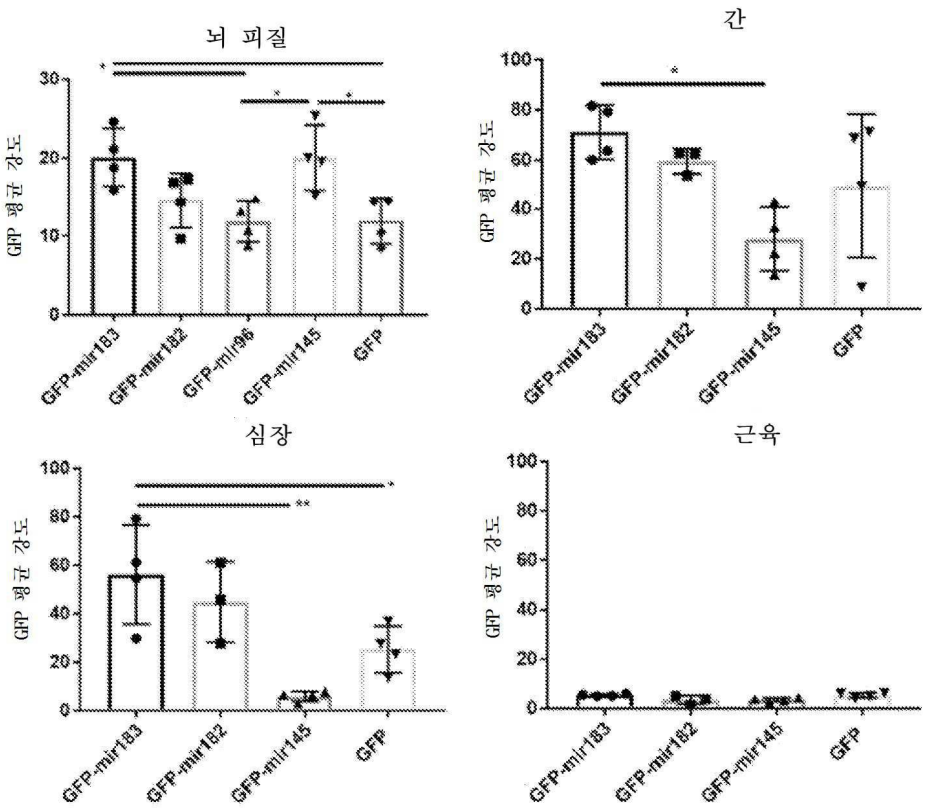
a


AAV-PHP.B.GFP
-miR183
AAV-PHP.B.GFP
-miR182
AAV-PHP.B.GFP
-miR96
AAV-PHP.B.GFP
-miR145
AAV-PHP.B.GFP
뇌 피질

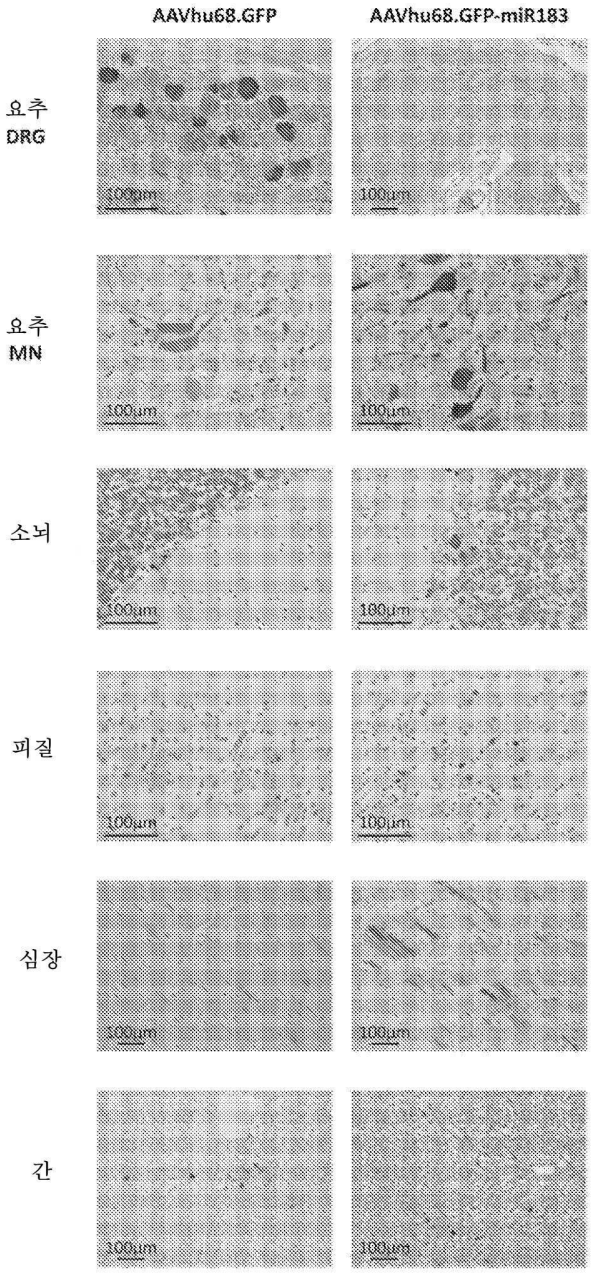
b


AAV9.GFP
-miR183
AAV9.GFP
-miR182
AAV9.GFP
-miR145
AAV9.GFP
간
심장
근육

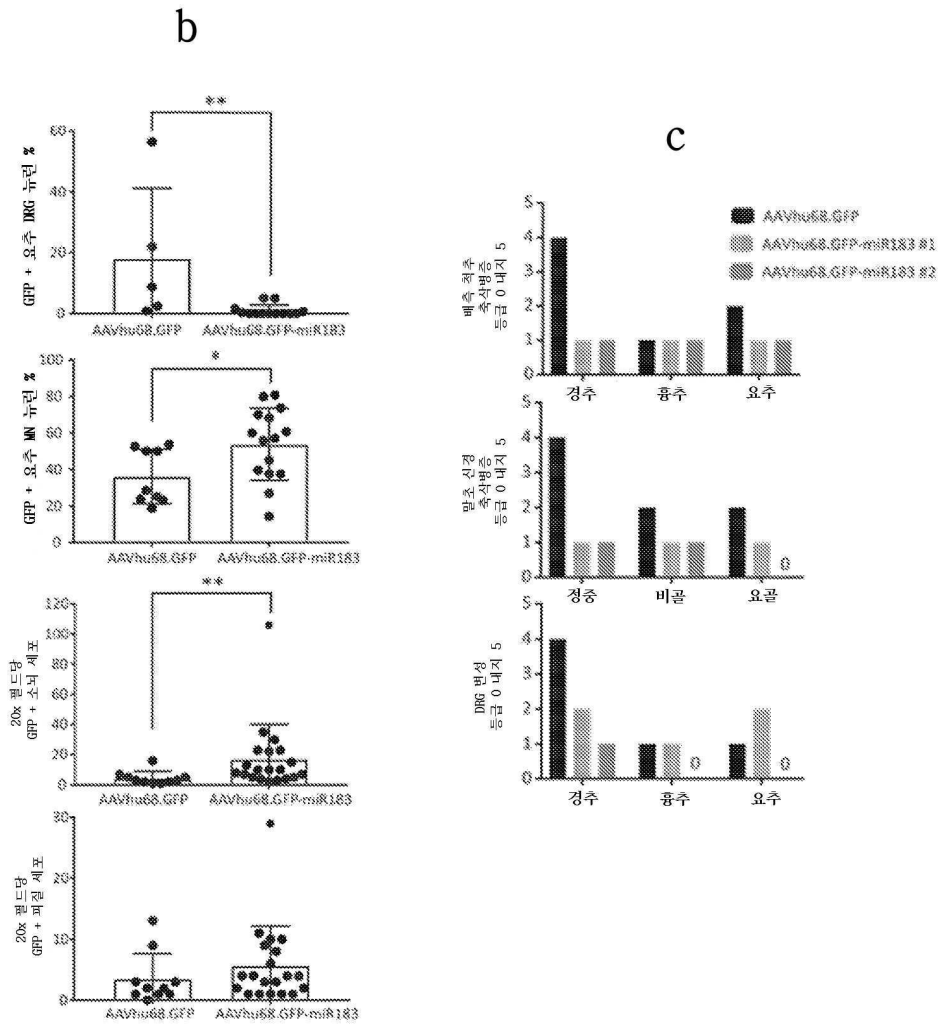
도면6c


뇌 피질
간
심장
근육
GFP 평균 강도
GFP-mir183
GFP-mir182
GFP-mir96
GFP-mir145
GFP

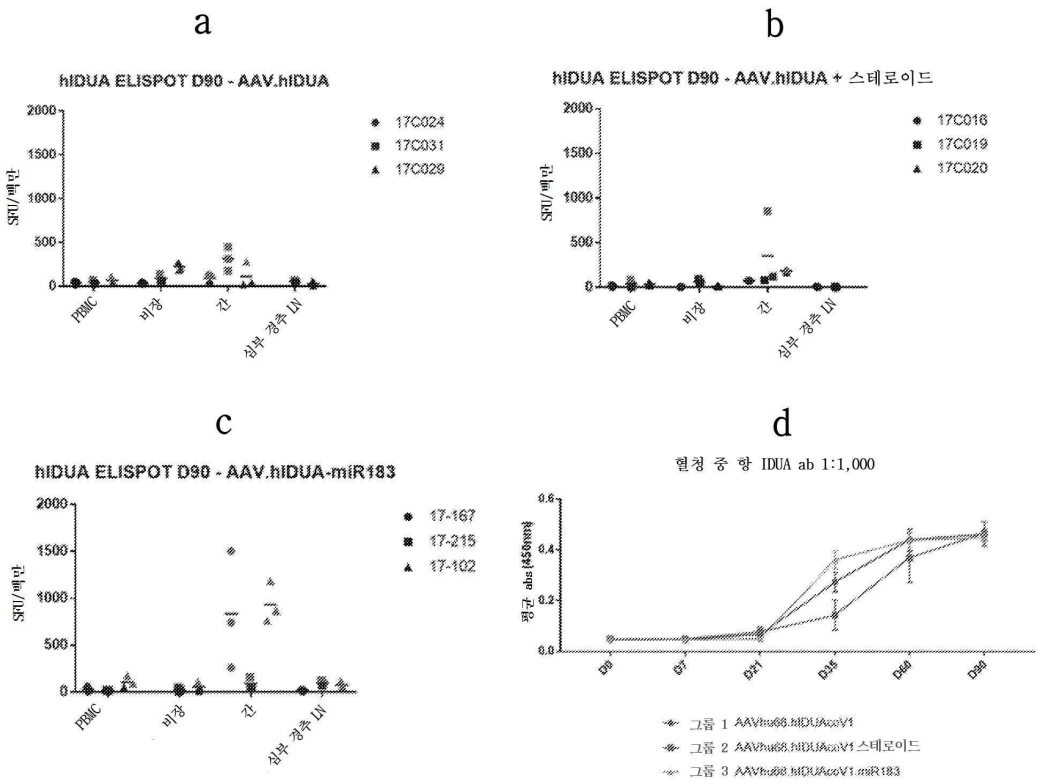
도면7a



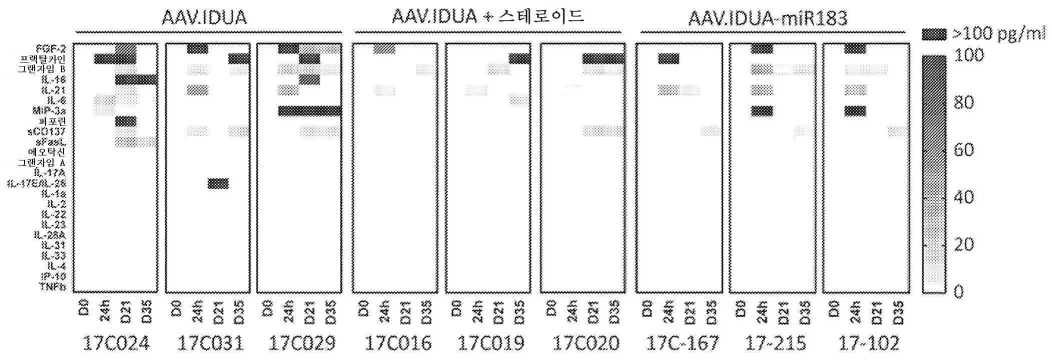
도면7bc


b
c
GFP + 요추 DRG 뉴런 %
GFP + 요추 MN 뉴런 %
20x 필드당 GFP + 소뇌 세포
20x 필드당 GFP + 피질 세포
AAVhu68.GFP
AAVhu68.GFP-miR183
AAVhu68.GFP-miR183 #1
AAVhu68.GFP-miR183 #2
배측 척추 축삭병증 등급 0 내지 5
말초 신경 축삭병증 등급 0 내지 5
DRG 변성 등급 0 내지 5
경추
흉추
요추
정중
비골
요골

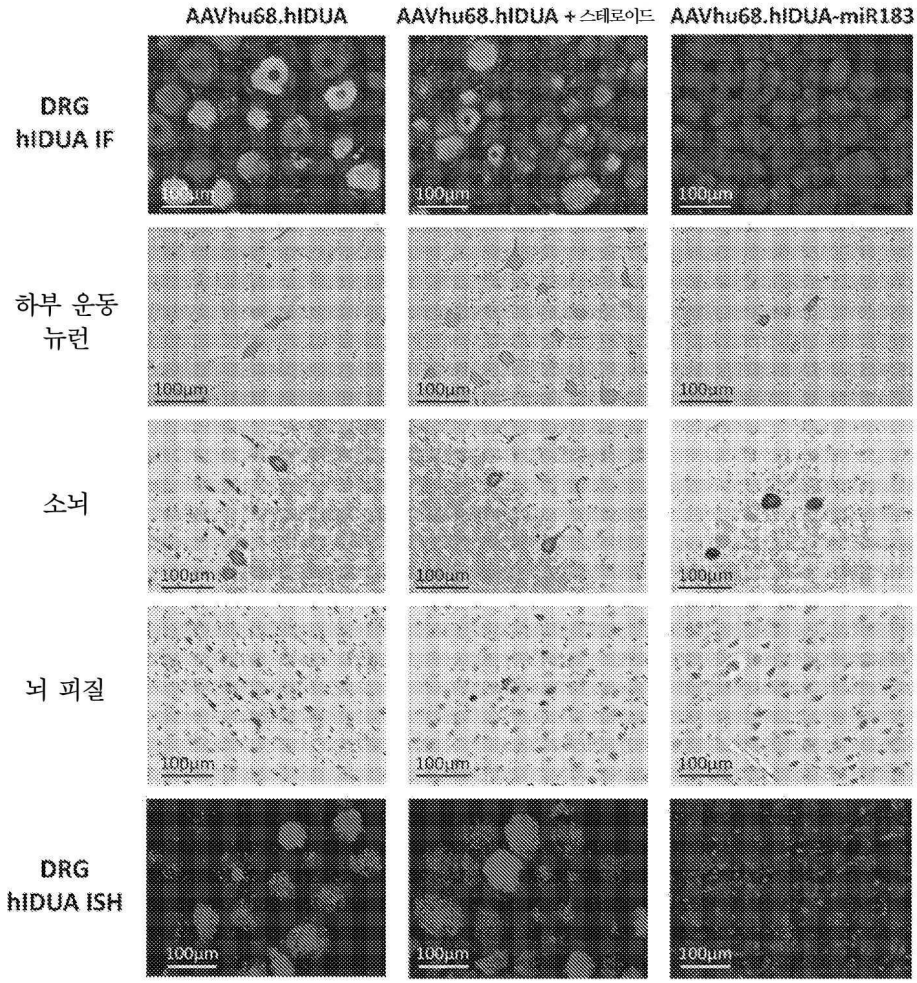
도면8


a
hIDUA ELISPOT D90 - AAV.hIDUA
SFU/백만
2000
1500
1000
500
0
17C024
17C031
17C029
PBMC
비장
간
심부 경추 LN
b
hIDUA ELISPOT D90 - AAV.hIDUA + 스테로이드
SFU/백만
17C016
17C019
17C020
c
hIDUA ELISPOT D90 - AAV.hIDUA-miR183
SFU/백만
17-167
17-215
17-102
d
혈청 중 항 IDUA ab 1:1,000
평균 abs (450nm)
0.6
0.4
0.2
0.0
D0
D7
D21
D35
D49
D60
그룹 1 AAVhu68.hIDUAcoV1
그룹 2 AAVhu68.hIDUAcoV1 스테로이드
그룹 3 AAVhu68.hIDUAcoV1.miR183

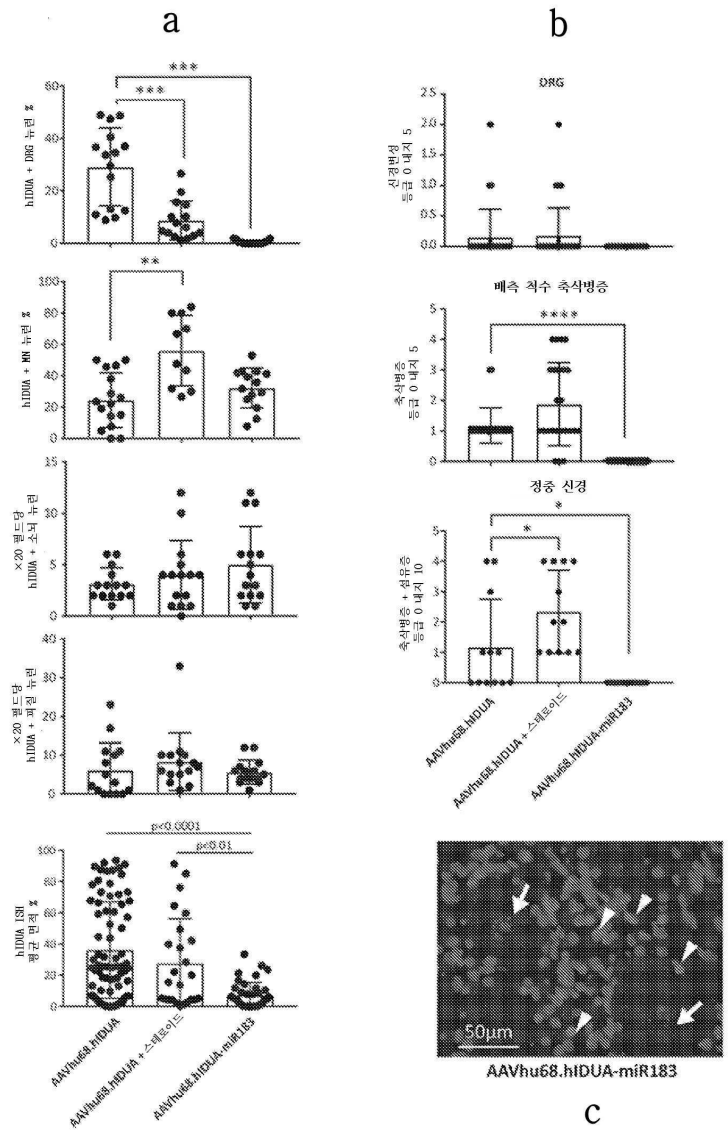
도면9


AAV.IDUA
AAV.IDUA + 스테로이드
AAV.iDUA-miR183
>100 pg/ml
100
80
60
40
20
0
FGF-2
프랙탈카인
그랜자임 B
IL-16
IL-21
IL-6
MIP-3a
피포린
sCD137
sFasL
에오탁신
그랜자임 A
IL-17A
IL-17E/IL-25
IL-18
IL-2
IL-22
IL-23
IL-28A
IL-31
IL-33
IL-4
IP-10
TNFb
D0
24h
D21
D35
17C024
17C031
17C029
17C016
17C019
17C020
17C-167
17-215
17-102

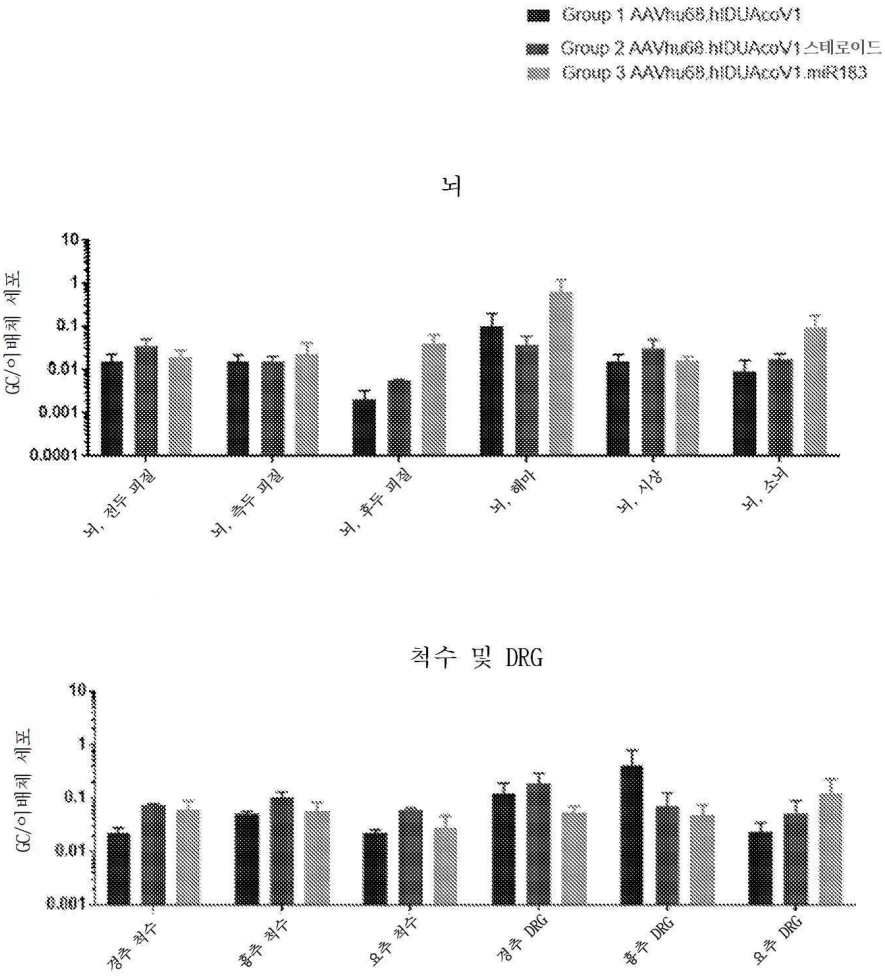
도면10


AAVhu68.hIDUA
AAVhu68.hIDUA + 스테로이드
AAVhu68.hIDUA-miR183
DRG hIDUA IF
하부 운동 뉴런
소뇌
뇌 피질
DRG hIDUA ISH
100μm

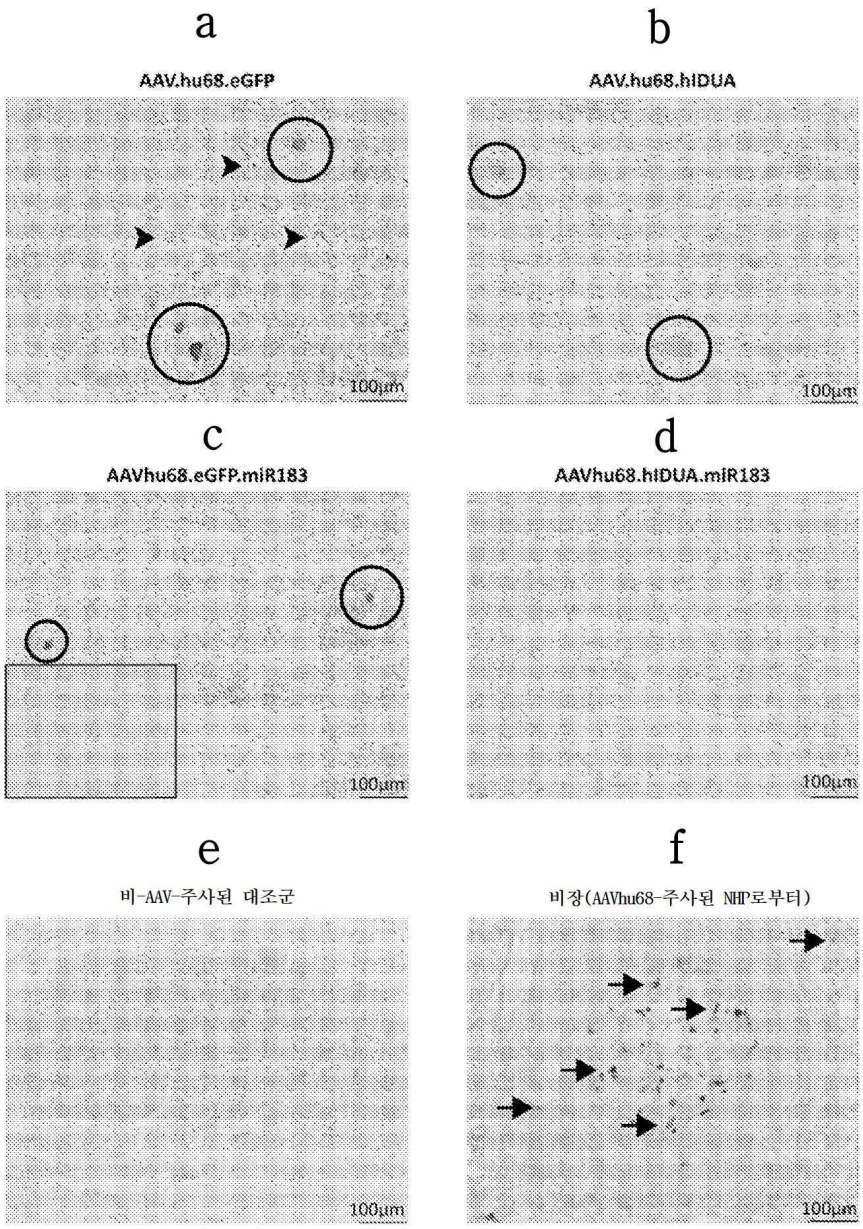
도면11


a
b
c
hIDUA + DRG 뉴런 %
hIDUA + NN 뉴런 %
×20 필드당 hIDUA + 소뇌 뉴런
×20 필드당 hIDUA + 피질 뉴런
hIDUA ISH 평균 면적 %
p<0.0001
p<0.01
AAVhu68.hIDUA
AAVhu68.hIDUA + 스테로이드
AAVhu68.hIDUA-miR183
DRG
신경병성 등급 0 내지 5
베측 척수 축삭병증
축삭병증 등급 0 내지 5
정중 신경
축삭병증 + 섬유증 등급 0 내지 10
50μm
AAVhu68.hIDUA-miR183

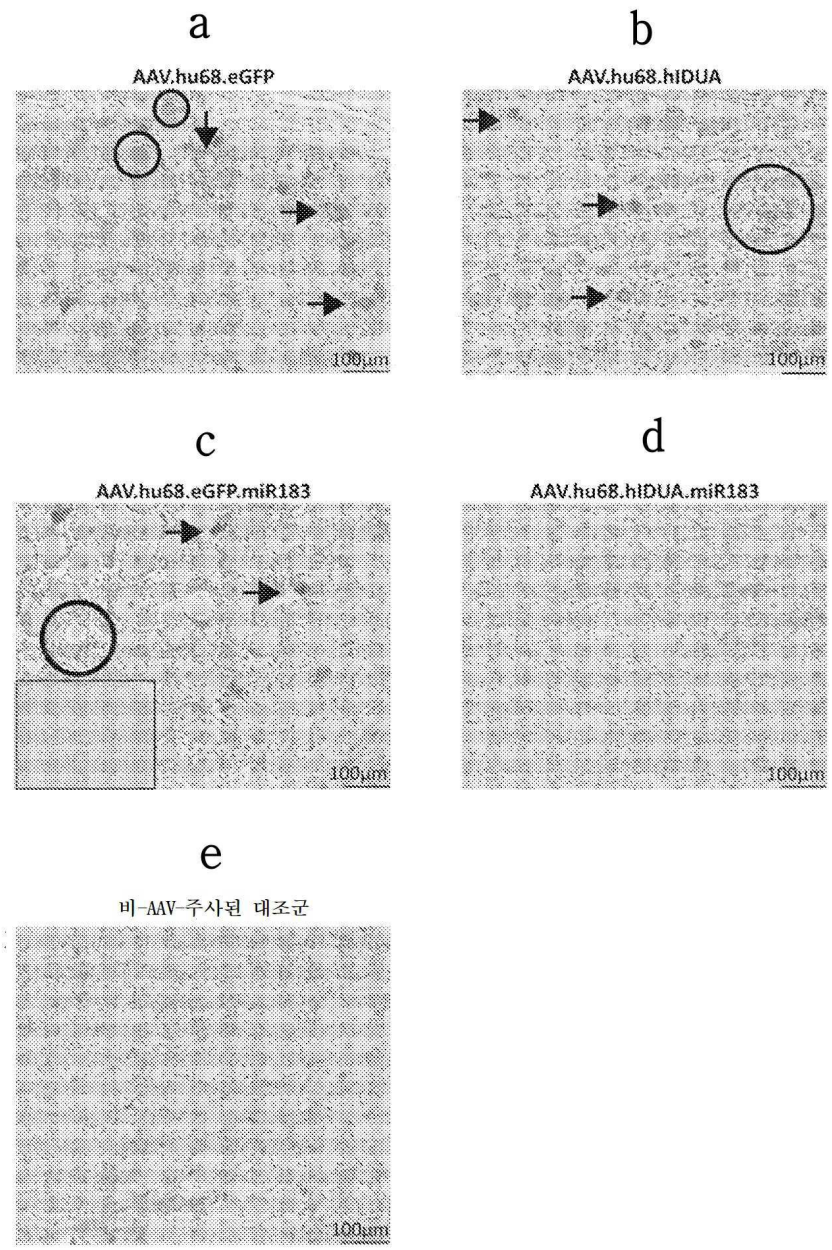
도면12


Group 1 AAVhu68.hIDUAcoV1
Group 2 AAVhu68.hIDUAcoV1 스테로이드
Group 3 AAVhu68.hIDUAcoV1.miR183
뇌
GC/이배체 세포
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
뇌, 전두 피질
뇌, 측두 피질
뇌, 후두 피질
뇌, 해마
뇌, 시상
뇌, 소뇌
척수 및 DRG
GC/이배체 세포
10
1
0.1
0.01
0.001
경추 척수
흉추 척수
요추 척수
경추 DRG
흉추 DRG
요추 DRG

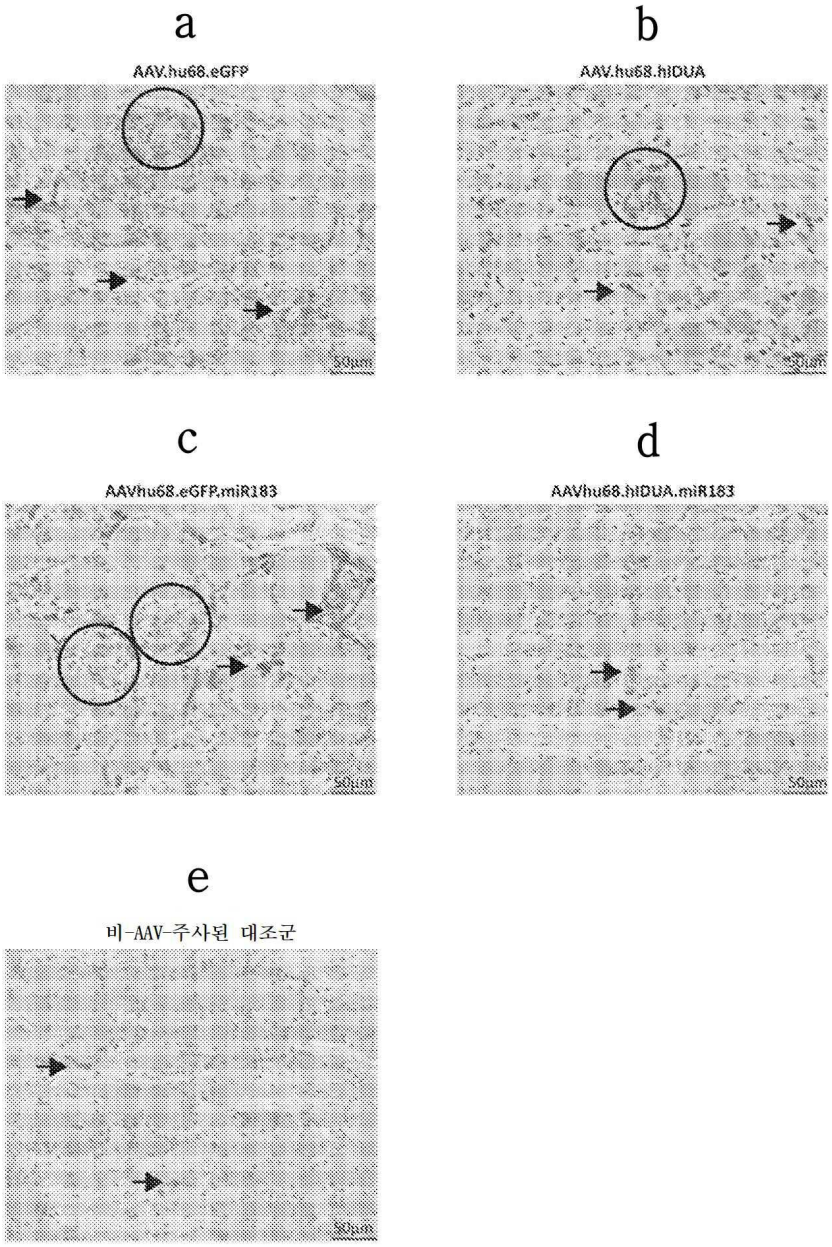
도면13


a
AAV.hu68.eGFP
100μm
b
AAV.hu68.hIDUA
100μm
c
AAVhu68.eGFP.miR183
100μm
d
AAVhu68.hIDUA.miR183
100μm
e
비-AAV-주사된 대조군
100μm
f
비장(AAVhu68-주사된 NHP로부터)
100μm

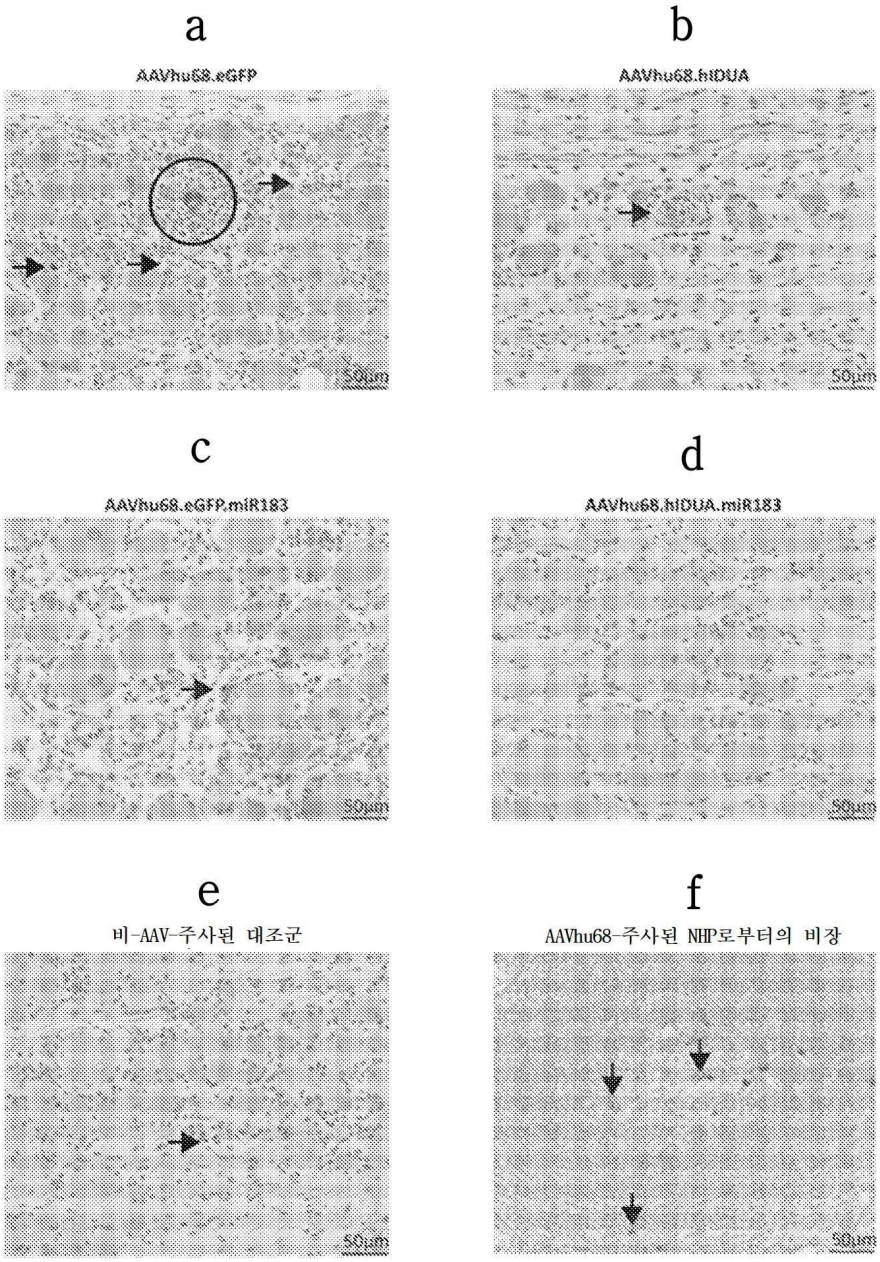
도면14


a
AAV.hu68.eGFP
100μm
b
AAV.hu68.hIDUA
100μm
c
AAV.hu68.eGFP.miR183
100μm
d
AAV.hu68.hIDUA.miR183
100μm
e
비-AAV-주사된 대조군
100μm

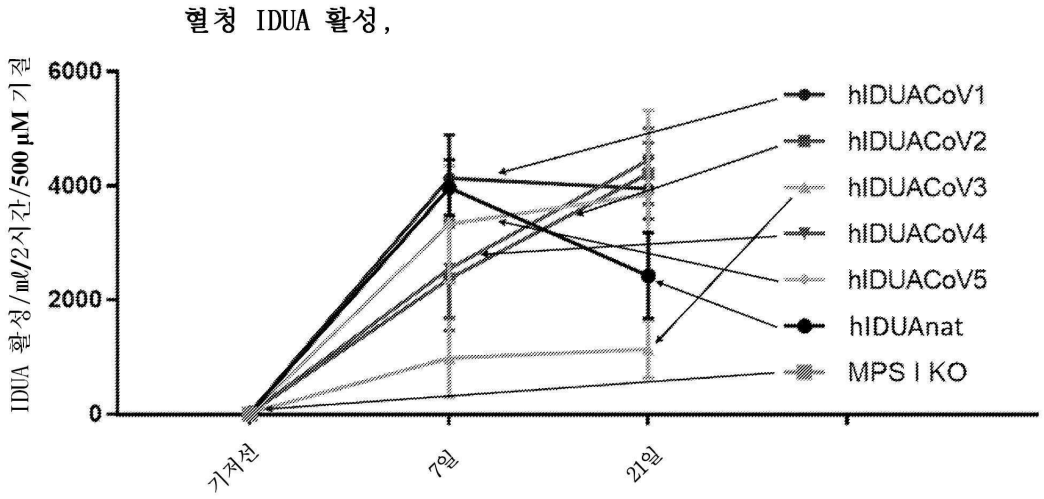
도면15


a
AAV.hu68.eGFP
50μm
b
AAV.hu68.hIDUA
50μm
c
AAVhu68.eGFP.miR183
50μm
d
AAVhu68.hIDUA.miR183
50μm
e
비-AAV-주사된 대조군
50μm

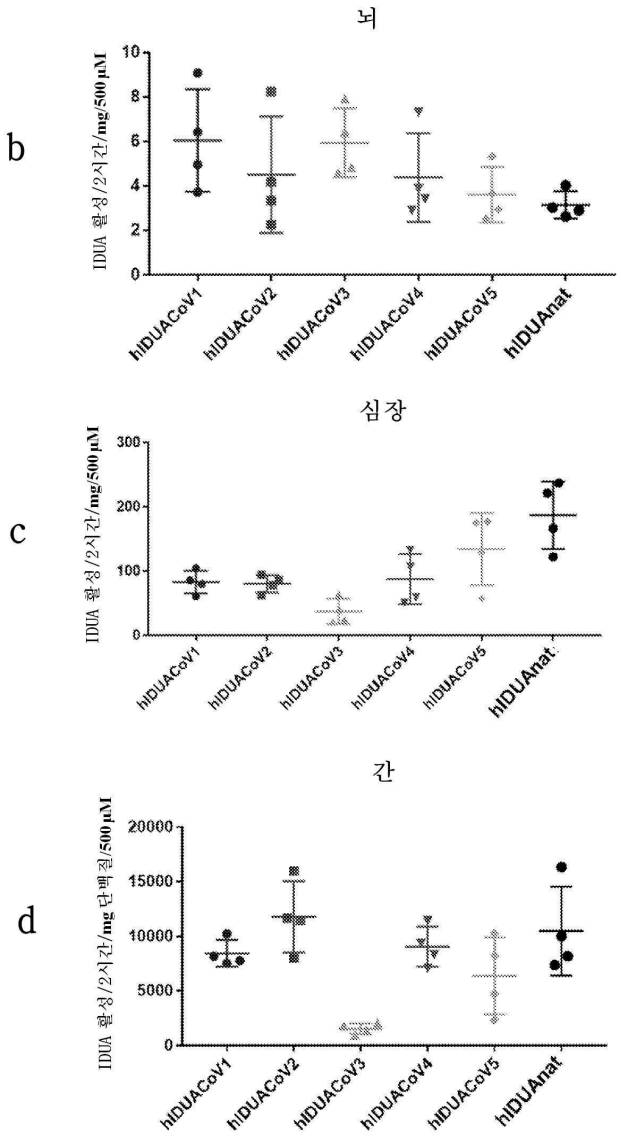
도면16


a
AAVhu68.eGFP
50μm
b
AAVhu68.hIDUA
50μm
c
AAVhu68.eGFP.miR183
50μm
d
AAVhu68.hIDUA.miR183
50μm
e
비-AAV-주사된 대조군
50μm
f
AAVhu68-주사된 NHP로부터의 비장
50μm

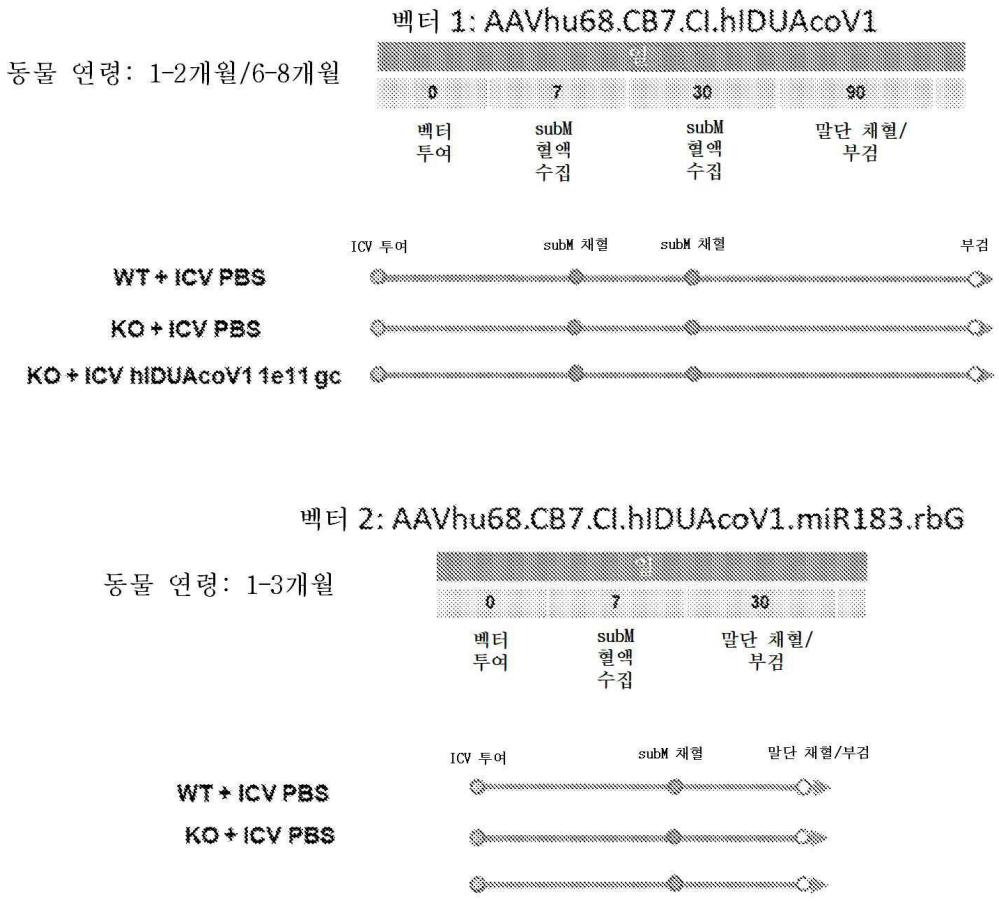
도면17a



도면17bcd

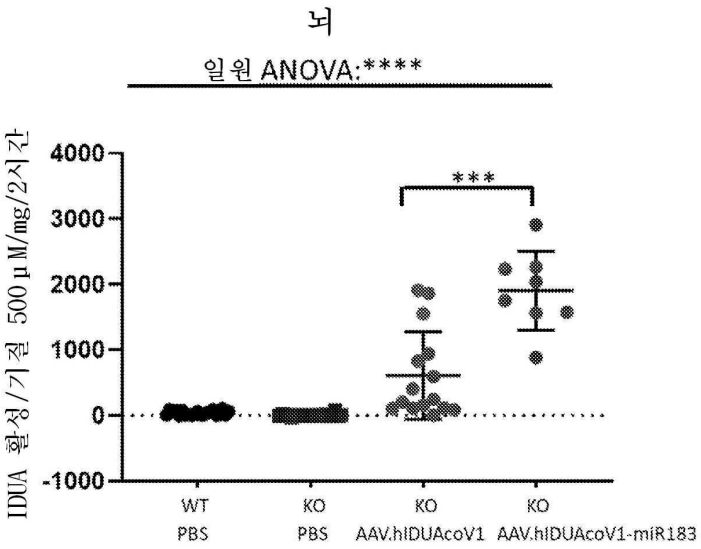


도면18a

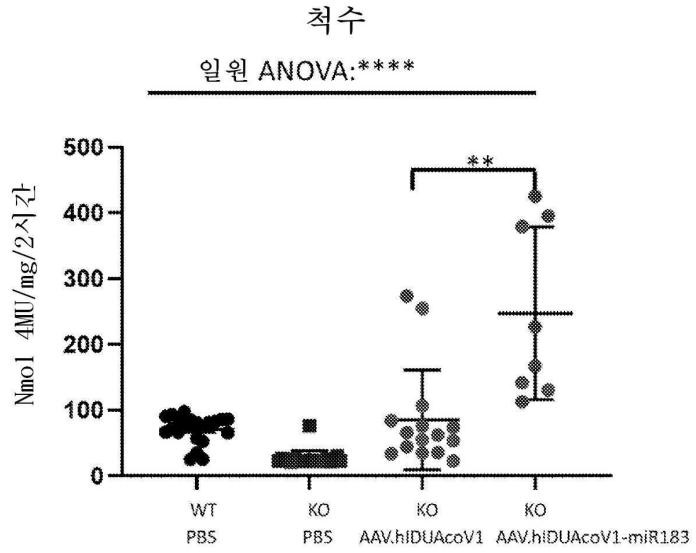

벡터 1: AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1
동물 연령: 1-2개월/6-8개월
0
7
30
90
벡터 투여
subM 혈액 수집
subM 혈액 수집
말단 채혈/ 부검
ICV 투여
subM 채혈
subM 채혈
부검
WT + ICV PBS
KO + ICV PBS
KO + ICV hIDUAcoV1 1e11 gc
벡터 2: AAVhu68.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.rbG
동물 연령: 1-3개월
0
7
30
벡터 투여
subM 혈액 수집
말단 채혈/ 부검
ICV 투여
subM 채혈
말단 채혈/부검
WT + ICV PBS
KO + ICV PBS

도면18bc

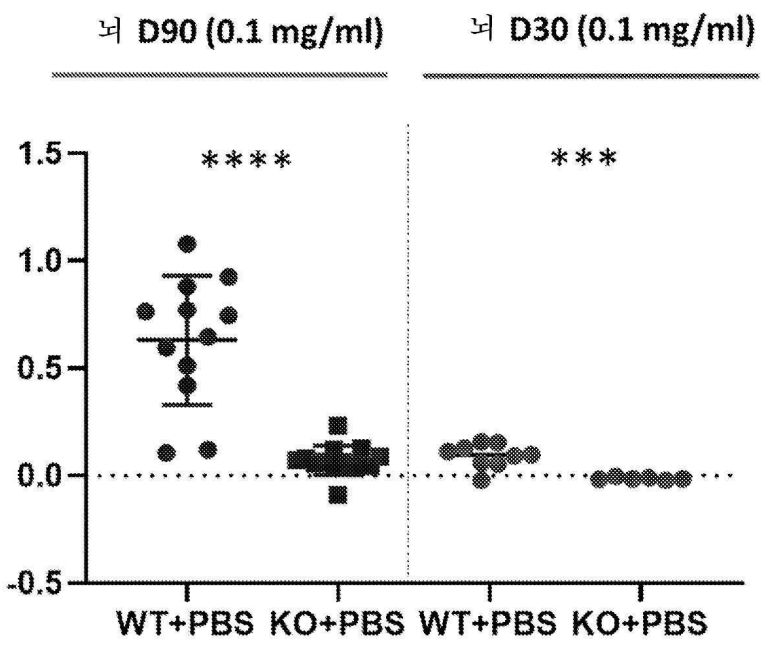
b


뇌
일원 ANOVA:****
IDUA 활성/기질 500 μ M/mg/2시간
4000
3000
2000
1000
0
-1000
***
WT
PBS
KO
PBS
KO
AAV.hIDUAcoV1
KO
AAV.hIDUAcoV1-miR183

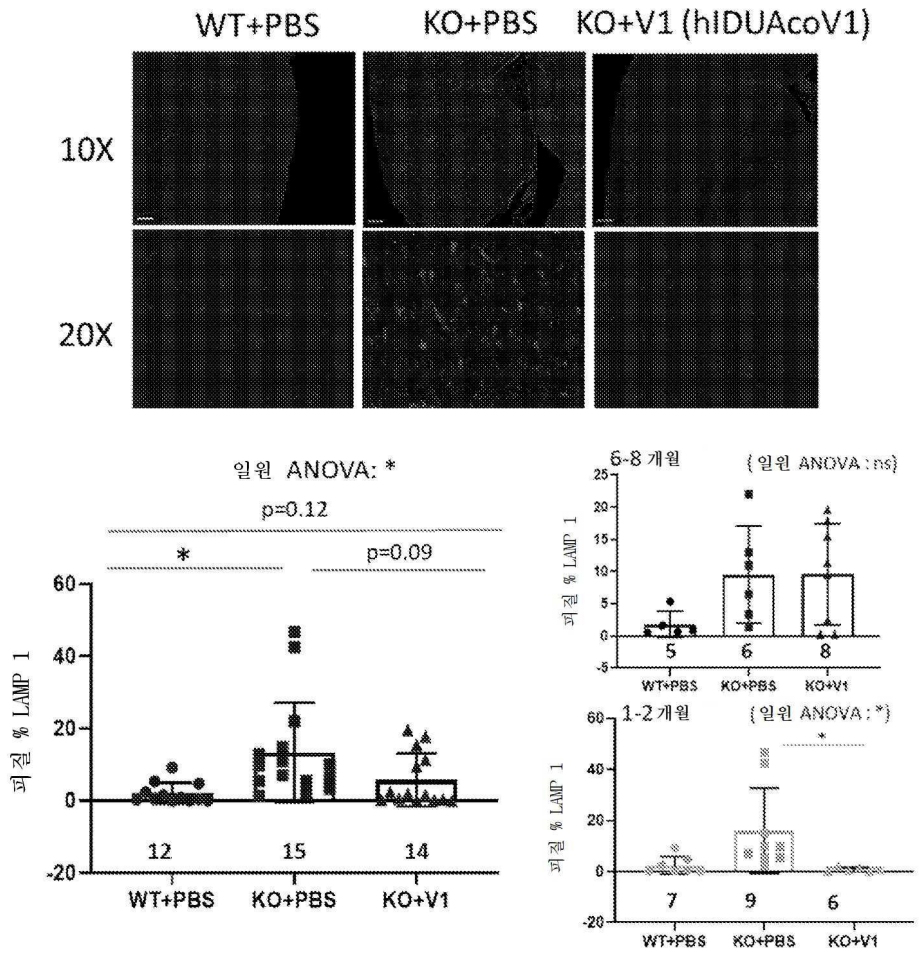
c


척수
일원 ANOVA:****
Nmol 4MU/mg/2시간
500
400
300
200
100
0
**
WT
PBS
KO
PBS
KO
AAV.hIDUAcoV1
KO
AAV.hIDUAcoV1-miR183

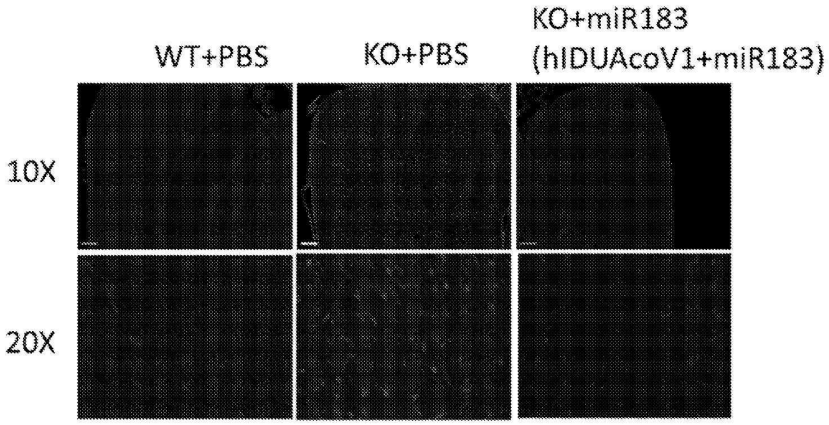
도면18d

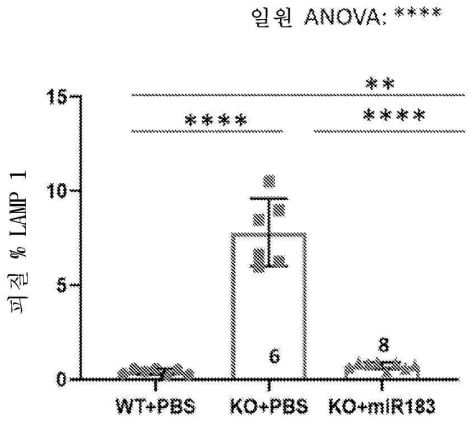

뇌 D90 (0.1 mg/ml)
뇌 D30 (0.1 mg/ml)
****
***
1.5
1.0
0.5
0.0
-0.5
WT+PBS
KO+PBS
WT+PBS
KO+PBS

도면18e


WT+PBS
KO+PBS
KO+V1 (hIDUAcoV1)
10X
20X
일원 ANOVA: *
p=0.12
*
p=0.09
피질 % LAMP 1
60
40
20
0
-20
12
15
14
WT+PBS
KO+PBS
KO+V1
6-8 개월
(일원 ANOVA : ns)
25
20
15
10
5
0
-5
5
6
8
WT+PBS
KO+PBS
KO+V1
1-2 개월
(일원 ANOVA : *)
*
60
40
20
0
-20
7
9
6
WT+PBS
KO+PBS
KO+V1

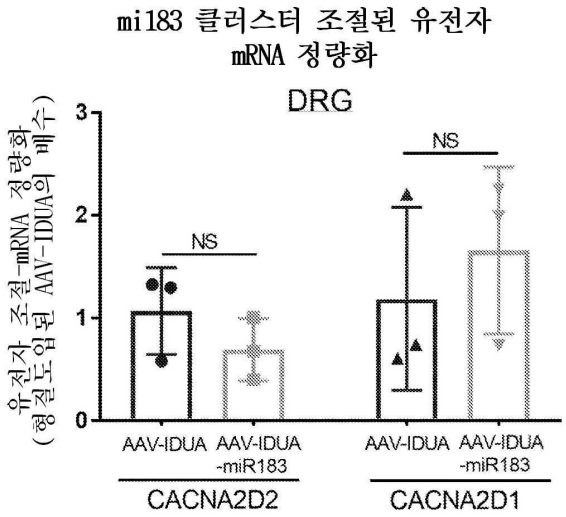
도면18f


WT+PBS
KO+PBS
KO+miR183
(hIDUAcoV1+miR183)
10X
20X

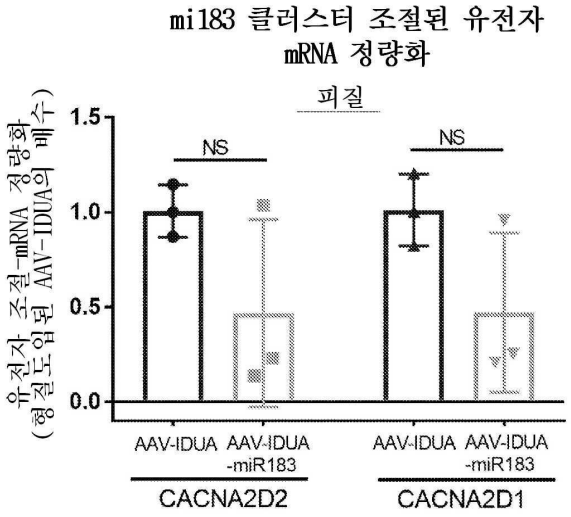

일원 ANOVA: ****
**
****
****
15
10
5
0
피질 % LAMP 1
6
8
WT+PBS
KO+PBS
KO+miR183

도면19

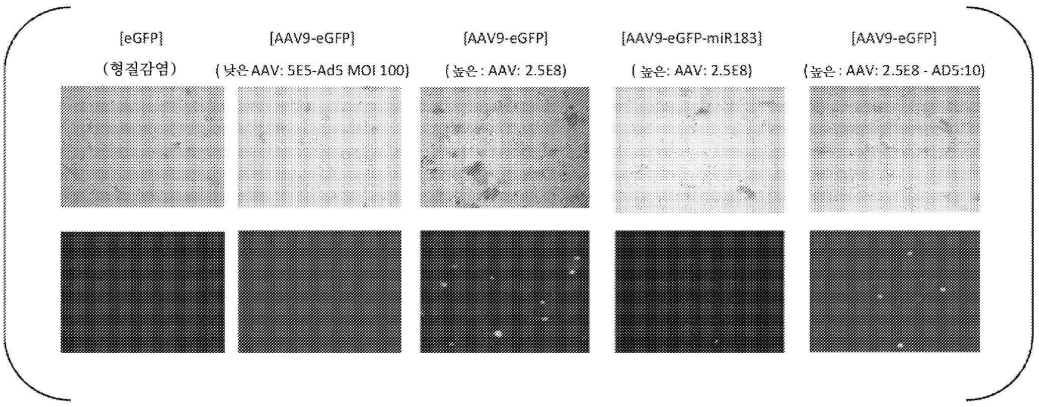
a


mi183 클러스터 조절된 유전자
mRNA 정량화
DRG
유전자 조절-mRNA 정량화
(형질도입된 AAV-IDUA의 배수)
3
2
1
0
NS
NS
AAV-IDUA
AAV-IDUA -miR183
AAV-IDUA
AAV-IDUA -miR183
CACNA2D2
CACNA2D1

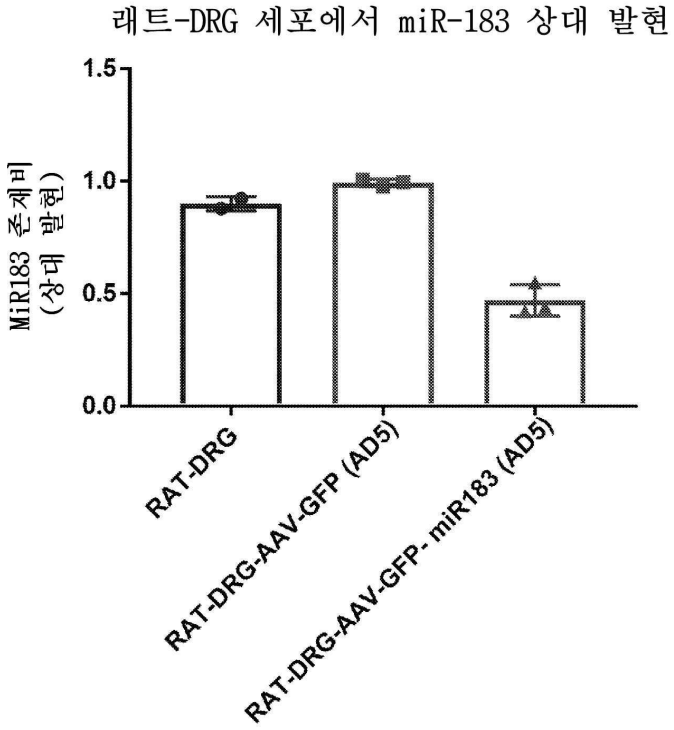
b


mi183 클러스터 조절된 유전자
mRNA 정량화
피질
유전자 조절-mRNA 정량화
(형질도입된 AAV-IDUA의 배수)
1.5
1.0
0.5
0.0
NS
NS
AAV-IDUA
AAV-IDUA -miR183
AAV-IDUA
AAV-IDUA -miR183
CACNA2D2
CACNA2D1

도면20

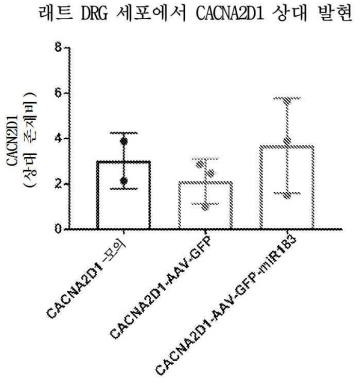

[eGFP]
(형질감염)
[AAV9-eGFP]
(낮은 AAV: 5E5-Ad5 MOI 100)
[AAV9-eGFP]
(높은 : AAV: 2.5E8)
[AAV9-eGFP-miR183]
(높은: AAV: 2.5E8)
[AAV9-eGFP]
(높은 : AAV: 2.5E8 - AD5:10)

도면21

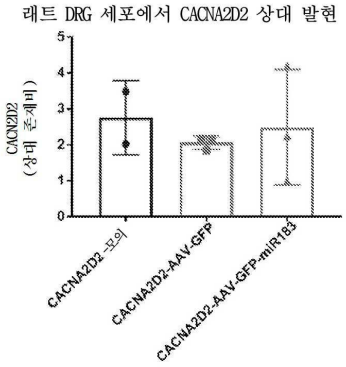

래트-DRG 세포에서 miR-183 상대 발현
MiR183 존재비 (상대 발현)
1.5
1.0
0.5
0.0
RAT-DRG
RAT-DRG-AAV-GFP (AD5)
RAT-DRG-AAV-GFP- miR183 (AD5)

도면22

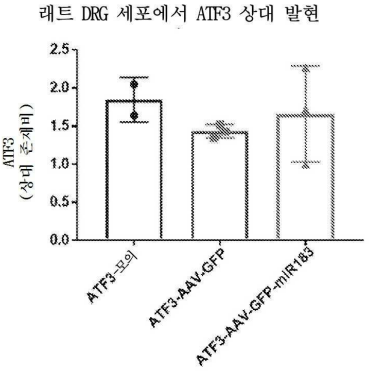
a


래트 DRG 세포에서 CACNA2D1 상대 발현
CACNA2D1 (상대 존재비)
8
6
4
2
0
CACNA2D1-모의
CACNA2D1-AAV-GFP
CACNA2D1-AAV-GFP-miR183

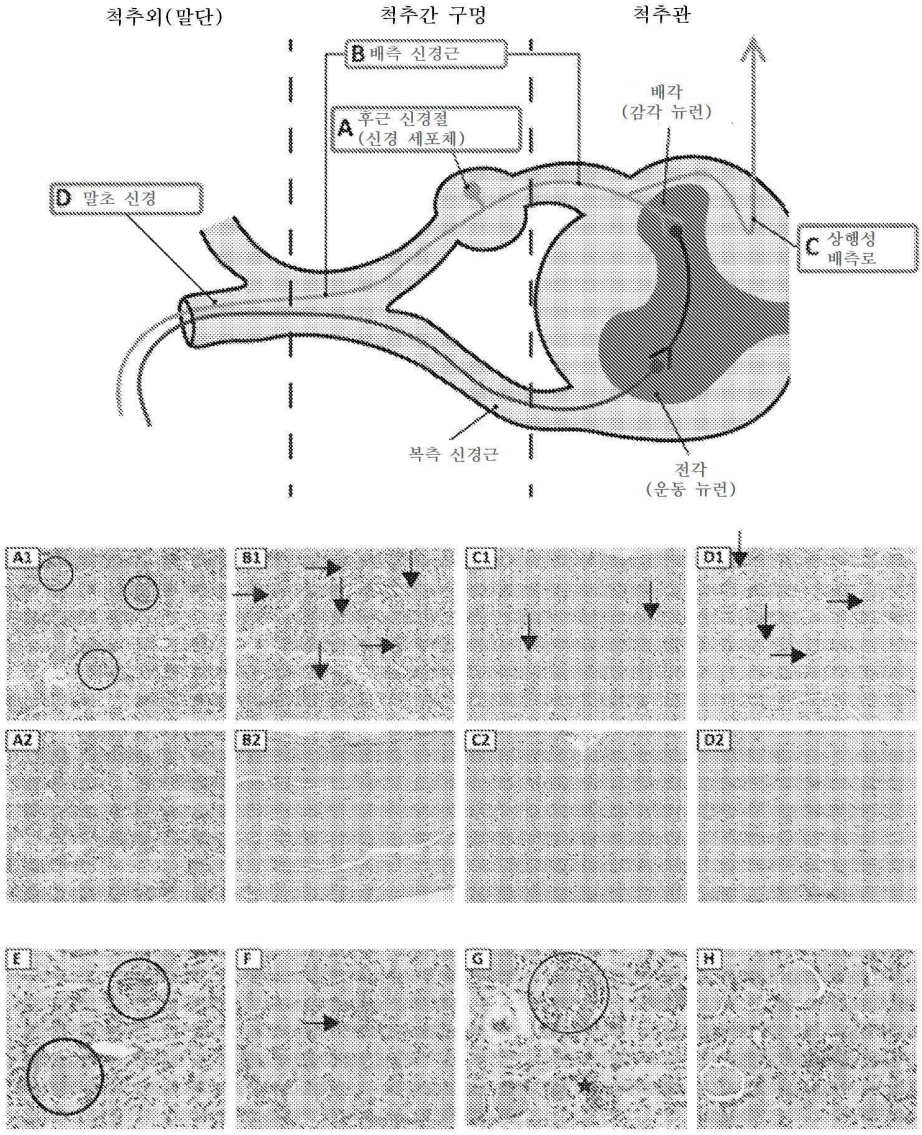
b


래트 DRG 세포에서 CACNA2D2 상대 발현
CACNA2D2 (상대 존재비)
5
4
3
2
1
0
CACNA2D2-모의
CACNA2D2-AAV-GFP
CACNA2D2-AAV-GFP-miR183

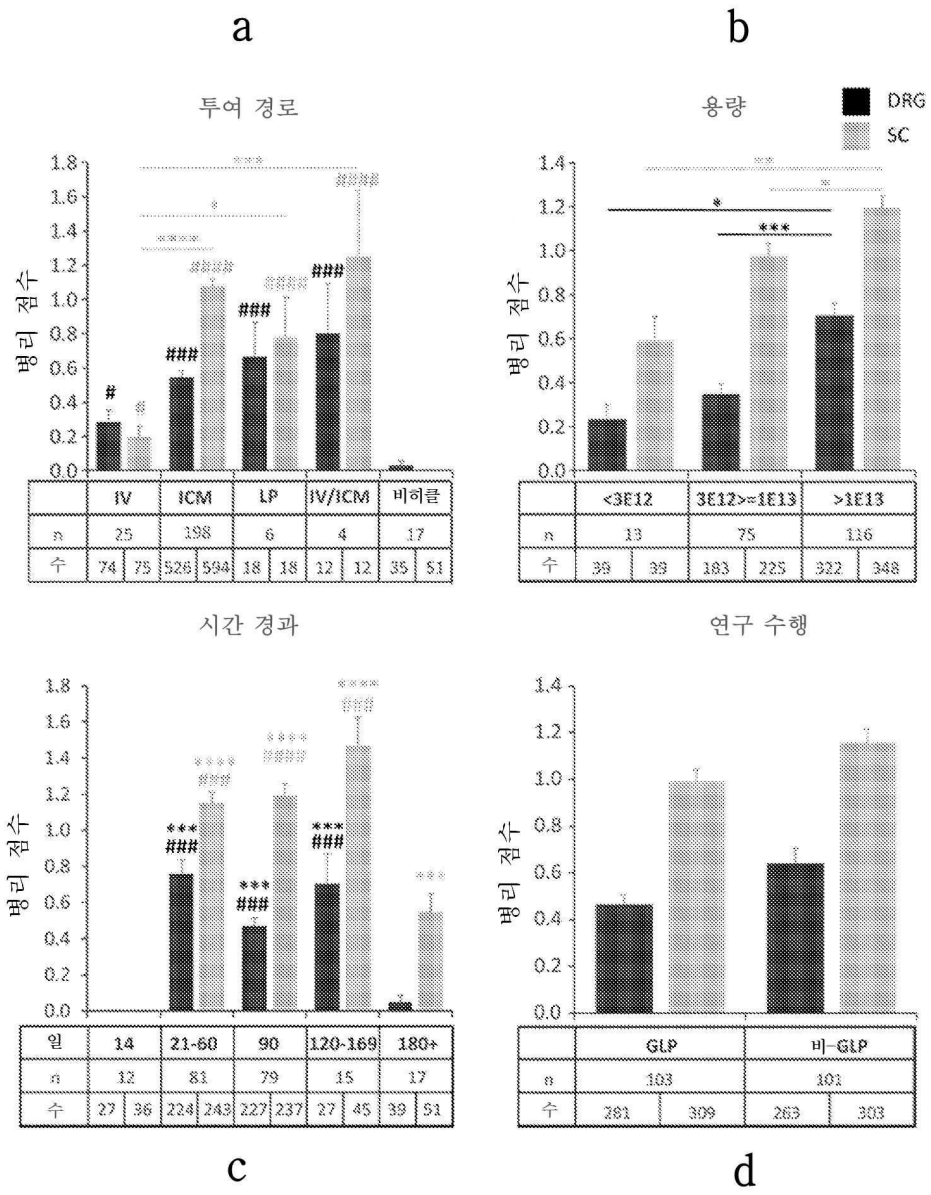
c


래트 DRG 세포에서 ATF3 상대 발현
ATF3 (상대 존재비)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
ATF3-모의
ATF3-AAV-GFP
ATF3-AAV-GFP-miR183

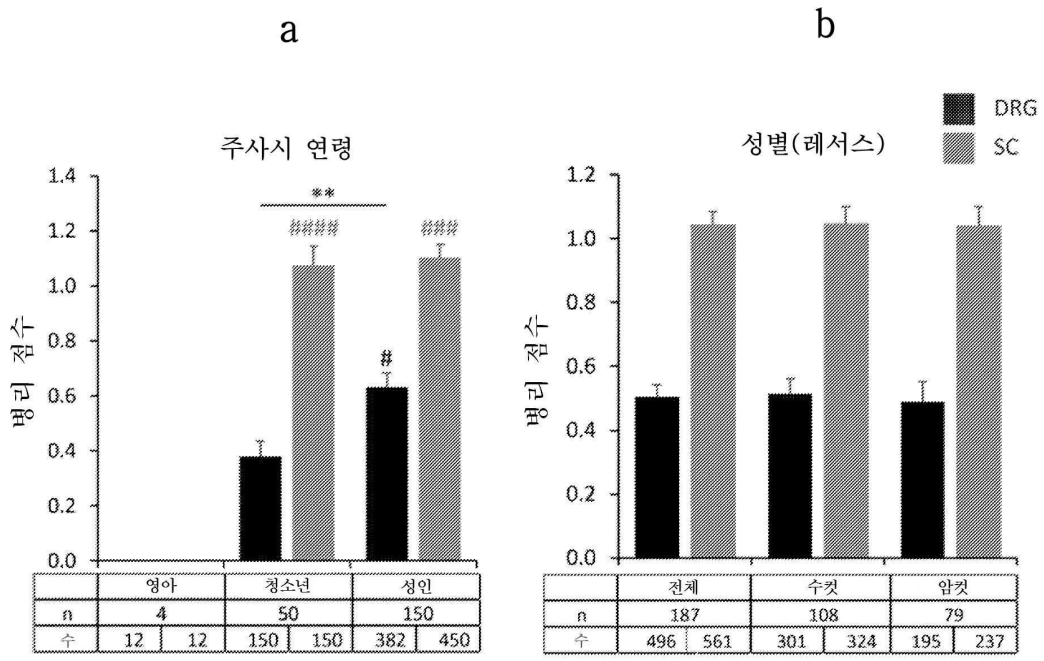
도면23


척추외(말단)
척추간 구멍
척추관
B 배측 신경근
A 후근 신경절
(신경 세포체)
배각
(감각 뉴런)
D 말초 신경
C 상행성
배측로
복측 신경근
전각
(운동 뉴런)
A1
B1
C1
D1
A2
B2
C2
D2
E
F
G
H

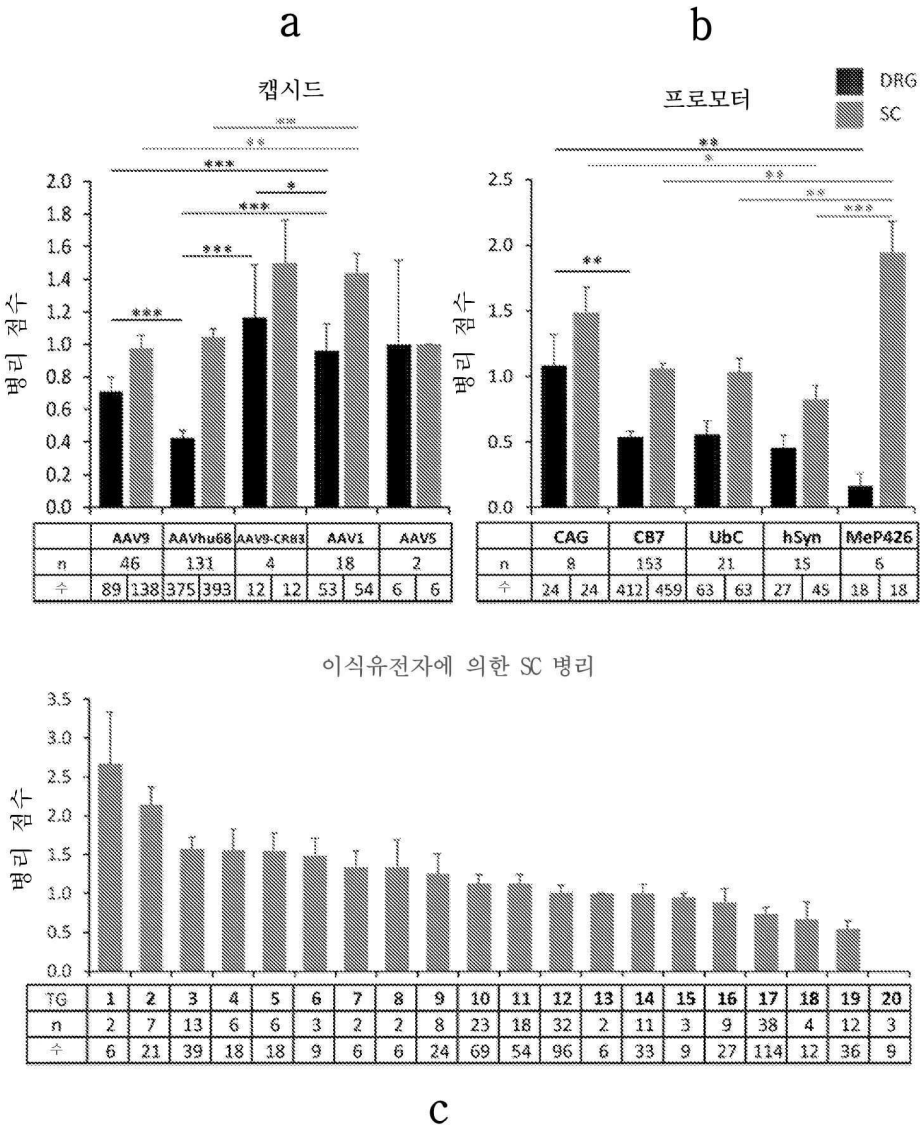
도면24


a
투여 경로
병리 점수
IV
ICM
LP
IV/ICM
비히클
n
25
198
6
4
17
수
74
75
526
594
18
18
12
12
35
51
b
용량
DRG
SC
병리 점수
<3E12
3E12>=1E13
>1E13
n
13
75
116
수
39
39
183
225
322
348
c
시간 경과
병리 점수
일
14
21-60
90
120-169
180+
n
12
81
79
15
17
수
27
36
224
243
227
237
27
45
39
51
d
연구 수행
병리 점수
GLP
비-GLP
n
103
101
수
281
309
263
303

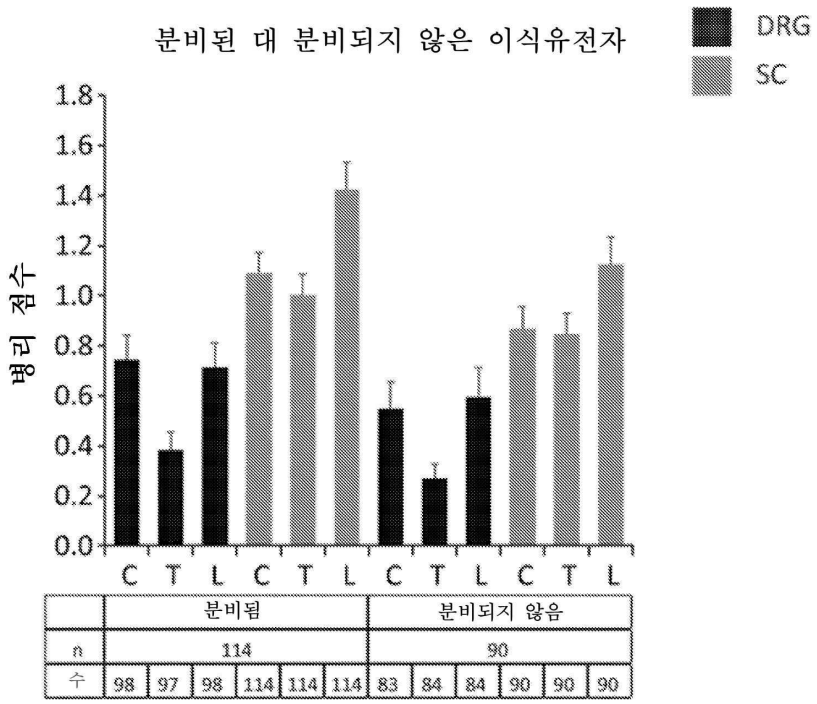
도면25


a
주사시 연령
병리 점수
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
**
####
###
#
영아
청소년
성인
n
4
50
150
수
12
12
150
150
382
450
b
성별(레서스)
DRG
SC
병리 점수
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
전체
수컷
암컷
n
187
108
79
수
496
561
301
324
195
237

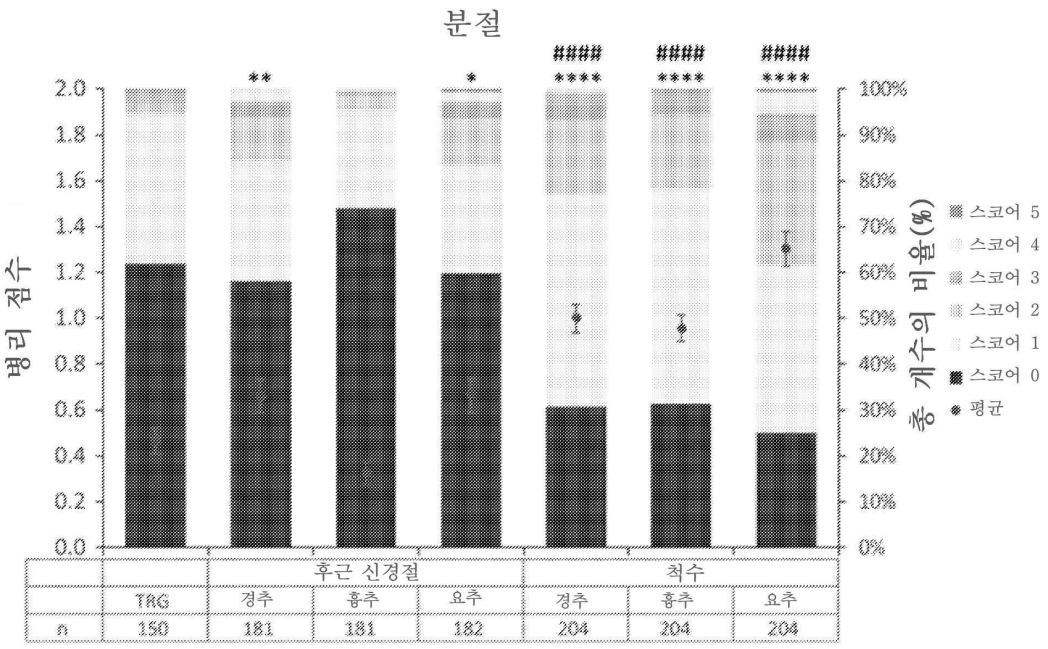
도면26abc


a
캡시드
병리 점수
AAV9 AAVhu68 AAV9-CR83 AAV1 AAV5
n 46 131 4 18 2
수 89 138 375 393 12 12 53 54 6 6
b
프로모터
DRG
SC
병리 점수
CAG C87 UbC hSyn MeP426
n 8 153 21 15 6
수 24 24 412 459 63 63 27 45 18 18
이식유전자에 의한 SC 병리
병리 점수
TG 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
n 2 7 13 6 6 3 2 2 8 23 18 32 2 11 3 9 38 4 12 3
수 6 21 39 18 18 9 6 6 24 69 54 96 6 33 9 27 114 12 36 9
c

도면26d

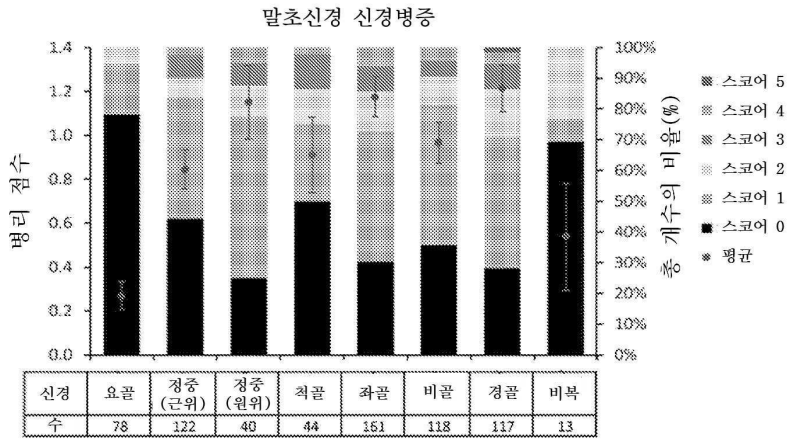

분비된 대 분비되지 않은 이식유전자
DRG
SC
병리 점수
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C T L C T L C T L C T L
분비됨
분비되지 않음
n
114
90
수
98 97 98 114 114 114 83 84 84 90 90 90

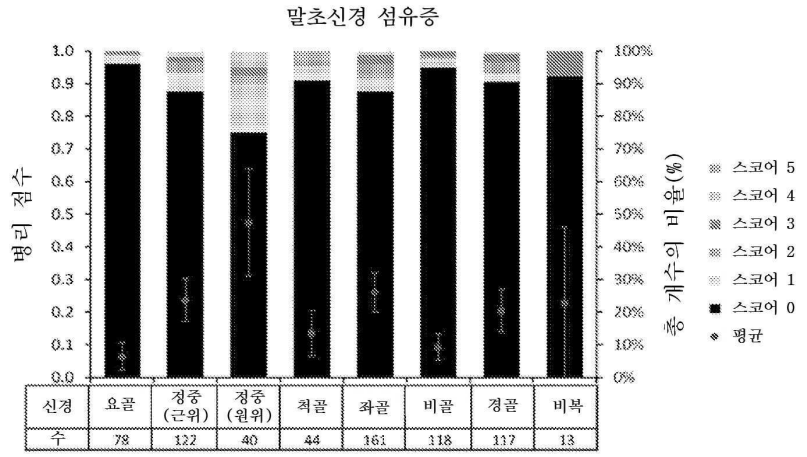
도면27


분절
병리 점수
총 개수의 비율(%)
스코어 5
스코어 4
스코어 3
스코어 2
스코어 1
스코어 0
평균
후근 신경절
척수
TRG
경추
흉추
요추
경추
흉추
요추
n
150
181
181
182
204
204
204

도면28

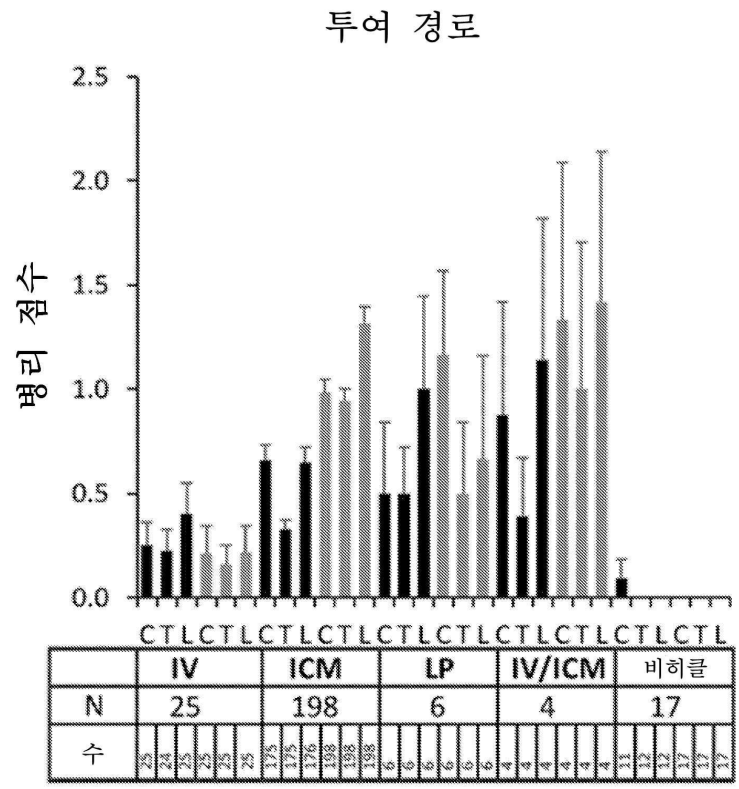
a


말초신경 신경병증
병리 점수
총 개수의 비율(%)
스코어 5
스코어 4
스코어 3
스코어 2
스코어 1
스코어 0
평균
신경 | 요골 | 정중 (근위) | 정중 (원위) | 척골 | 좌골 | 비골 | 경골 | 비복
수 | 78 | 122 | 40 | 44 | 161 | 118 | 117 | 13

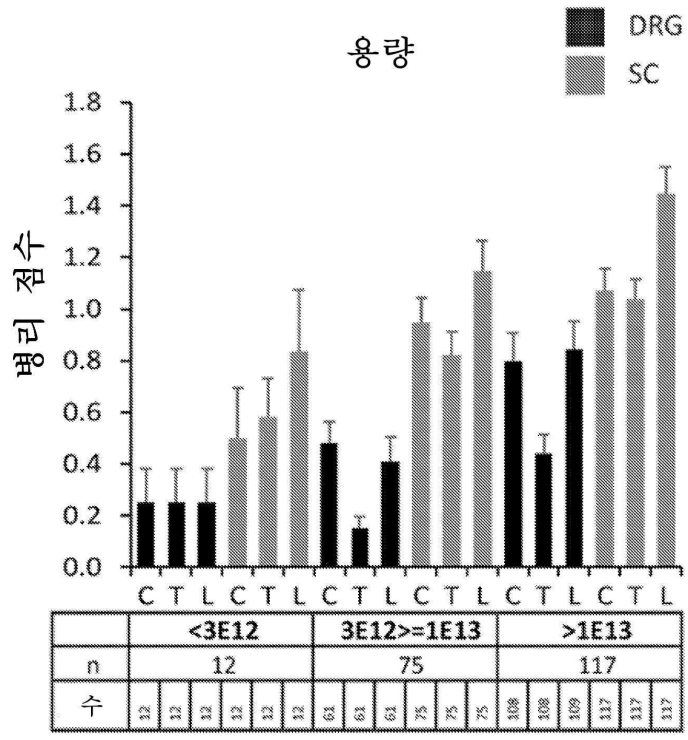

말초신경 섬유증
병리 점수
총 개수의 비율(%)
스코어 5
스코어 4
스코어 3
스코어 2
스코어 1
스코어 0
평균
신경 | 요골 | 정중 (근위) | 정중 (원위) | 척골 | 좌골 | 비골 | 경골 | 비복
수 | 78 | 122 | 40 | 44 | 161 | 118 | 117 | 13

b

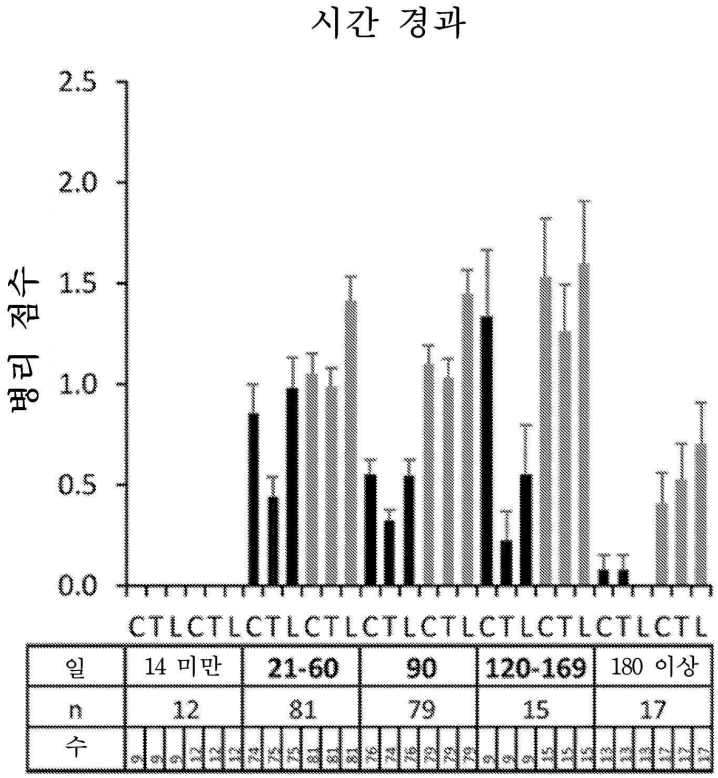
도면29a


투여 경로
병리 점수
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
C T L C T L C T L C T L C T L C T L C T L C T L C T L C T L
IV
ICM
LP
IV/ICM
비히클
N
25
198
6
4
17
수

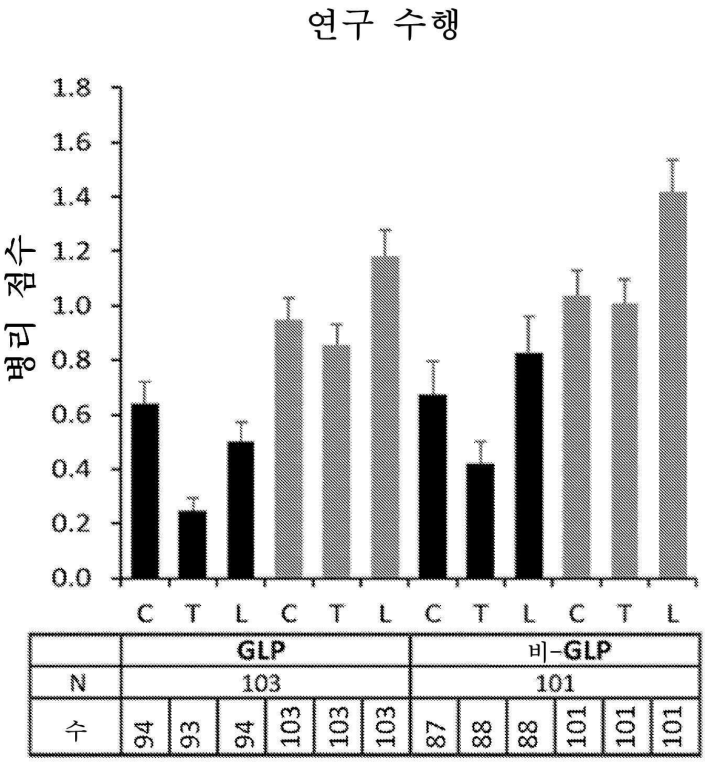
도면29b


용량
DRG
SC
병리 점수
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C T L C T L C T L C T L C T L C T L
<3E12
3E12>=1E13
>1E13
n
12
75
117
수

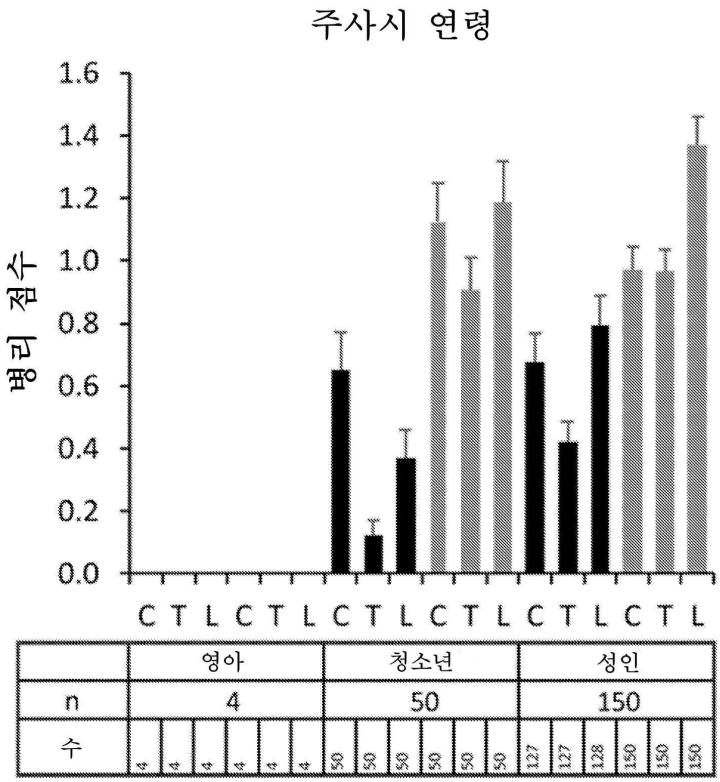
도면29c


시간 경과
병리 점수
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTL
일
14 미만
21-60
90
120-169
180 이상
n
12
81
79
15
17
수

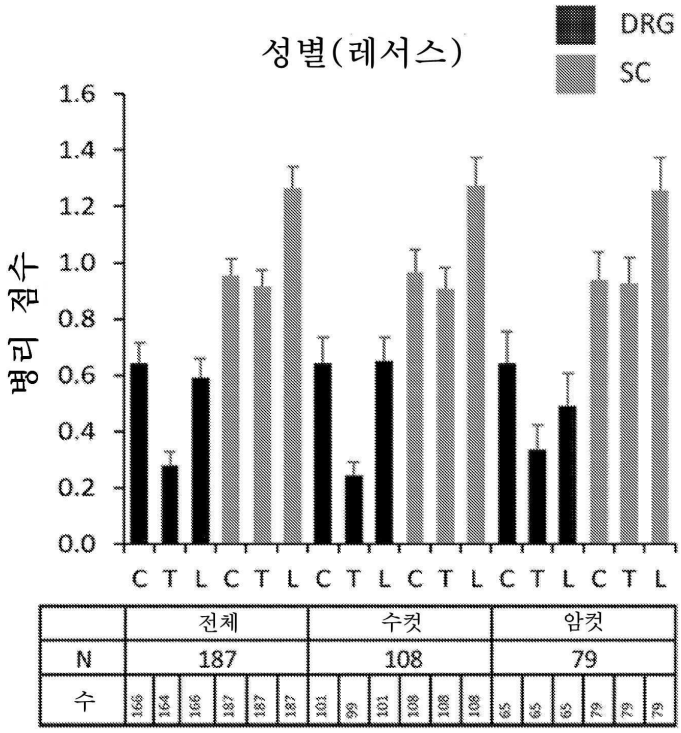
도면29d


연구 수행
병리 점수
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C T L C T L C T L C T L
GLP
비-GLP
N
103
101
수
94 93 94 103 103 103
87 88 88 101 101 101

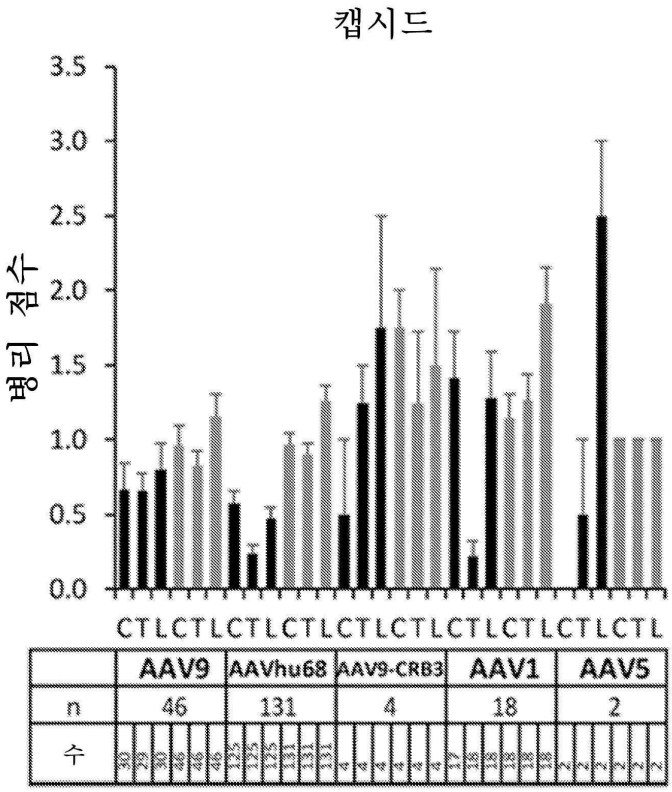
도면30a


주사시 연령
병리 점수
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C T L C T L C T L C T L C T L C T L
영아
청소년
성인
n
4
50
150
수
4 4 4 4 4 4
50 50 50 50 50 50
127 127 128 150 150 150

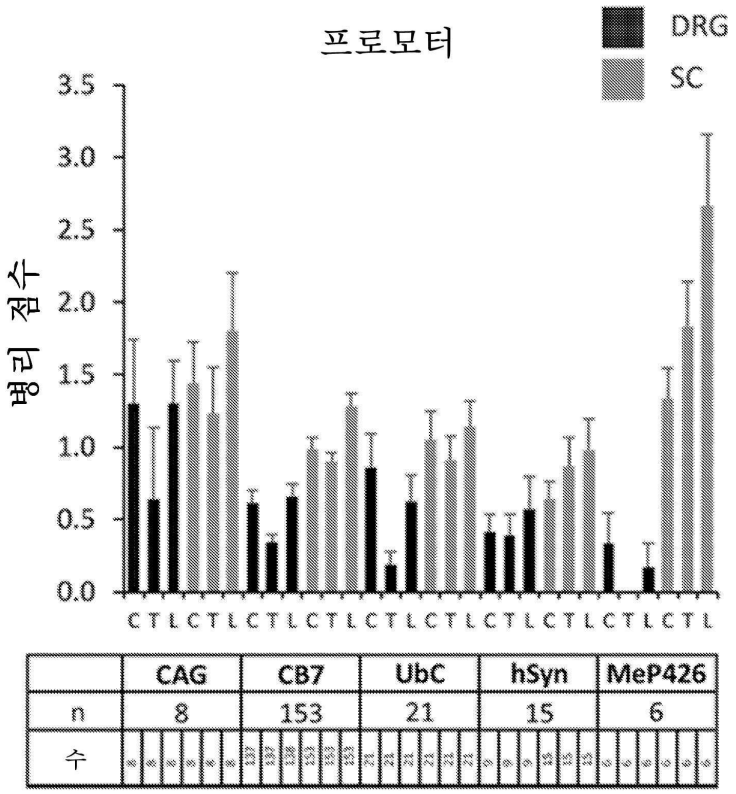
도면30b


성별(레서스)
DRG
SC
병리 점수
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
C T L C T L C T L C T L C T L C T L
전체
수컷
암컷
N
187
108
79
수
166 164 166 187 187 187
101 99 101 108 108 108
65 65 65 79 79 79

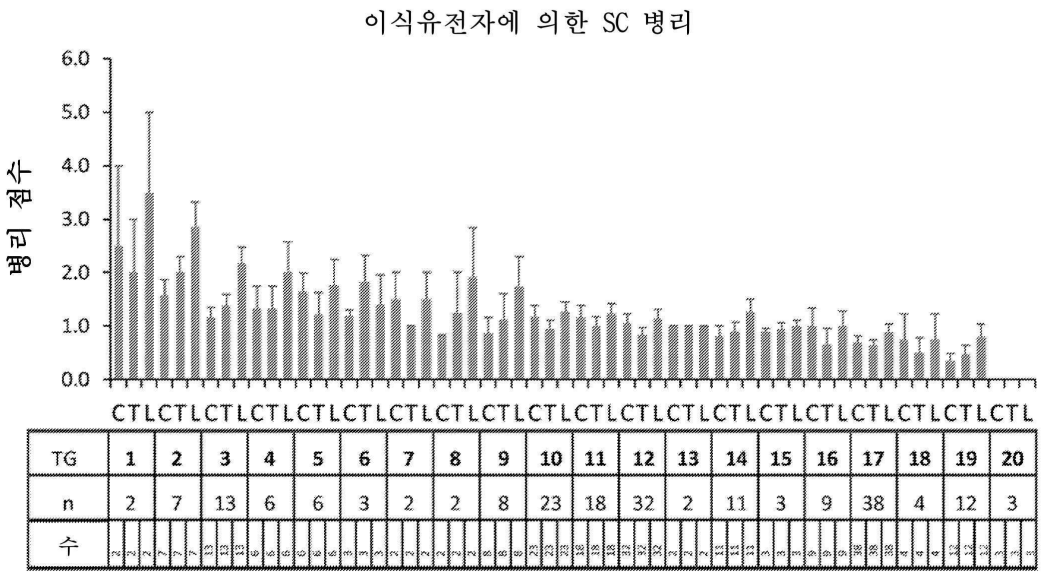
도면31a


캡시드
병리 점수
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTL
AAV9
AAVhu68
AAV9-CRB3
AAV1
AAV5
n
46
131
4
18
2
수

도면31b


프로모터
DRG
SC
병리 점수
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTLCTL
CAG
CB7
UbC
hSyn
MeP426
n
8
153
21
15
6
수

도면31c



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of The University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS FOR DRG-SPECIFIC REDUCTION OF TRANSGENE EXPRESSION

<130> WO2021081217

<140> PCT/US2020/056881

<141> 2020-10-22

<150> US 63/043,600

<151> 2020-06-24

<150> US 63/038,514

<151> 2020-06-12

<150> US 63/023,602

<151> 2020-05-12

<150> US 63/005,894

<151> 2020-04-06

<150> US 62/972,404

<151> 2020-02-10

<150> PCT/US19/67872

<151> 2019-12-20

<150> US 62/934,915

<151> 2019-11-13

<150> US 62/924,970

<151> 2019-10-23

<160> 29

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> miR-183 target

<400> 1

agtgaattct accagtgcca ta 22

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> mirR-96 target

<400> 2

agcaaaaatg tgctagtgcc aaa 23

<210> 3

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> miR-182 target

<400> 3

agtgtgagtt ctaccattgc caaa 24

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> miR-145 target

<400> 4

agggattcct gggaaaactg gac 23

<210> 5

<211> 4

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> Spacer (i)

<400> 5

ggat 4

<210> 6

<211> 6

<212> DNA

<213

> Artificial sequence

<220><223> Spacer (ii)

<400> 6

cacgtg 6

<210> 7

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> spacer iii

<400> 7

gcatgc 6

<210> 8

<211> 2211

<212> DNA

<213> adeno-associated virus hu68

<220><221> CDS

<222> (1)..(2211)

<400> 8

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt 48

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

1 5 10 15

gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc 96

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

```
            20                  25                  30

aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg        144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

        35                  40                  45

ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg        192
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
    50                  55                  60

gtc aac gaa gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac        240
Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65                  70                  75                  80

cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc        288
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
                85                  90                  95

gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc        336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct        384

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

ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg        432
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140

cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gtg ggt att ggc        480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly

145                 150                 155                 160

aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act        528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
                165                 170                 175

ggc gac aca gag tca gtc ccc gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc        576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
```

180 185 190

gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc 624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc 672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc 720

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc 768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac 816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

260 265 270
gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga 864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac 912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300

aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att 960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320
cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat 1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc 1056

```
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350
ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca       1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat cta acg ctt aat gat       1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp

    370                 375                 380
gga agc caa gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc       1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385                 390                 395                 400
ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag       1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415

ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tat gct cac agc caa agc ctg       1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
            420                 425                 430
gac cga ctc atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca       1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
        435                 440                 445
aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt       1392

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
    450                 455                 460
gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct       1440
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465                 470                 475                 480
gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac       1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

                485                 490                 495
aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat       1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
```

```
            500                 505                 510
gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa       1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
        515                 520                 525

gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc       1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
    530                 535                 540
aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata       1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545                 550                 555                 560
acc aac gaa gaa gaa att aaa act acc aac cca gta gca acg gag tcc       1728

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
                565                 570                 575
tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag       1776
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
            580                 585                 590
acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag       1824
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

        595                 600                 605
gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac       1872
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
    610                 615                 620
acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg       1920
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625                 630                 635                 640

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg       1968
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
                645                 650                 655
gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc       2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
            660                 665                 670
```

cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag 2064

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

aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac 2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt 2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val

705 710 715 720

tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg 2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735

taa 2211

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus hu68

<400> 9

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

1 5 10 15

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

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

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

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

65 70 75 80

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

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu 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 Val Gly Ile Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

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

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

515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

580 585 590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 10

<211> 3198

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ITR.CB7.CI.eGFP.miR145.rBG.ITR

<220><221> repeat_region

<222> (1)..(130)

<223> 5' - AAV2 - ITR

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(130)

<223> 5' - AAV2 - ITR

<220><221> promoter

<222> (198)..(579)

<223> CMV IE promoter

<220><221> promoter

<222> (582)..(863)

<223> CB promoter

<220><221> misc_feature

<222> (1979)..(2698)

<223> eGFP gene

<220><221> misc_feature

<222> (2705)..(2727)

<223> miR145

<220><221> misc_feature

<222> (2728)..(2731)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2732)..(2754)

<223> miR145

<220><221> misc_feature

<222> (2755)..(2760)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2761)..(2783)

<223> miR145

<220><221> misc_feature

<222> (2784)..(2789)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2790)..(2812)

<223> miR145

<220><221> misc_feature

<222> (2981)..(3198)

<223> 3' ITR

<400> 10

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aaccccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattacttaa tacgactcac tataggctag taatacgact cactatagat 1980

ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg 2040

cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg 2100

caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct 2160

cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca 2220

gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt 2280

caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt 2340

gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa 2400

gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg 2460

catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga 2520

ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta 2580

cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct 2640

gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaagg 2700

taccagggat tcctgggaaa actggacgga tagggattcc tgggaaaact ggaccacgtg 2760

agggattcct gggaaaactg gacgcatgca gggattcctg ggaaaactgg acgcggccgc 2820

ctcgaggacg gggtgaacta cgcctgagga tccgatcttt ttccctctgc caaaaattat 2880

ggggacatca tgaagcccct tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttattttc 2940

attgcaatag tgtgttggaa ttttttgtgt ctctcactcg gaagcaattc gttgatctga 3000

atttcgacca cccataatac ccattaccct ggtagataag tagcatggcg ggttaatcat 3060

taactacaag gaacccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct 3120

cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 3180

gagcgagcga gcgcgcag 3198

<210> 11

<211> 3202

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ITR.CB7.CI.eGFP.miR182.rGB.ITR

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(130)

<223> 5' ITR (AAV2)

<220><221> misc_feature

<222> (198)..(579)

<223> CMV IE promoter

<220><221> misc_feature

<222> (582)..(863)

<223> CB promoter

<220><221> misc_feature

<222> (958)..(1930)

<223> chicken beta-actin intron

<220><221> misc_feature

<222> (1979)..(2698)

<223> eGFP coding sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2705)..(2728)

<223> miR182

<220><221> misc_feature

<222> (2729)..(2732)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2733)..(2756)

<223> miR182

<220><221> misc_feature

<222> (2757)..(2760)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2763)..(2786)

<223> miR182

<220><221> misc_feature

<222> (2787)..(2792)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2793)..(2816)

<223> miR182

<220><221> polyA_signal

<222> (2858)..(2984)

<220><221> misc_feature

<222> (3073)..(3202)

<223> 3' ITR

<400> 11

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc ggggggggggg gggggcgcgg cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aacccccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattacttaa tacgactcac tataggctag taatacgact cactatagat 1980

ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg 2040

cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg 2100

caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct 2160

cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca 2220

gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt 2280

caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt 2340

gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa 2400

gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg 2460

catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga 2520

ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta 2580

cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct 2640

gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaagg 2700

taccagtgtg agttctacca ttgccaaagg atagtgtgag ttctaccatt gccaaacacg 2760

tgagtgtgag ttctaccatt gccaaagcat gcagtgtgag ttctaccatt gccaaagcgg 2820

ccgcctcgag gacggggtga actacgcctg aggatccgat ctttttccct ctgccaaaaa 2880

ttatggggac atcatgaagc cccttgagca tctgacttct ggctaataaa ggaaatttat 2940

tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt gtgtctctca ctcggaagca attcgttgat 3000

ctgaatttcg accacccata atacccatta ccctggtaga taagtagcat ggcgggttaa 3060

tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac tccctctctg cgcgctcgct 3120

cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc gggctttgcc cgggcggcct 3180

cagtgagcga gcgagcgcgc ag 3202

<210> 12

<211> 3198

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ITR.CB7.eGFP.miRNA96.rBG.ITR

<220><221> misc_feature

<222> (1979)..(2699)

<223> eGFP coding sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2705)..(2727)

<223> miR96

<220><221> misc_feature

<222> (2728)..(2731)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2732)..(2754)

<223> miR96

<220><221> misc_feature

<222> (2755)..(2760)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2761)..(2783)

<223> miR96

<220><221> misc_feature

<222> (2784)..(2789)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2790)..(2812)

<223> miR96

<400> 12

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aacccccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattacttaa tacgactcac tataggctag taatacgact cactatagat 1980

ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg 2040

cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg 2100

caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct 2160

cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca 2220

gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt 2280

caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt 2340

gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa 2400

gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg 2460

catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga 2520

ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta 2580

cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct 2640

gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaagg 2700

taccagcaaa aatgtgctag tgccaaagga tagcaaaaat gtgctagtgc caaacacgtg 2760

agcaaaaatg tgctagtgcc aaagcatgca gcaaaaatgt gctagtgcca aagcggccgc 2820

ctcgaggacg gggtgaacta cgcctgagga tccgatcttt ttccctctgc caaaaattat 2880

ggggacatca tgaagcccct tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttatttc 2940

attgcaatag tgtgttggaa ttttttgtgt ctctcactcg gaagcaattc gttgatctga 3000

atttcgacca cccataatac ccattaccct ggtagataag tagcatggcg ggttaatcat 3060

taactacaag gaacccctag tgatggagtt ggccactccc tctctgcgcg ctcgctcgct 3120

cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 3180

gagcgagcga gcgcgcag 3198

<210> 13

<211> 3194

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ITR.CB7.CI.eGFP.miRNA183.rBG.ITR

<220><221> misc_feature

<222> (1979)..(2698)

<223> eGFP coding sequence

<220><221> misc_feature

<222> (2705)..(2726)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (2727)..(2730)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2731)..(2752)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (2753)..(2758)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2781)..(2786)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (2787)..(2808)

<223> miRNA183

<400> 13

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcactaggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatggggatcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaattacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaatggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgttcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgtcaatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcctacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccacgttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttattttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgg cgccaggcggggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatcagagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgctccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtgagcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggcttgtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggggggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctccgcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagtgtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag caggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aaccccccct gcaccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattacttaa tacgactcac tataggctag taatacgact cactatagat 1980

ggtgagcaag ggcgaggagc tgttcaccgg ggtggtgccc atcctggtcg agctggacgg 2040

cgacgtaaac ggccacaagt tcagcgtgtc cggcgagggc gagggcgatg ccacctacgg 2100

caagctgacc ctgaagttca tctgcaccac cggcaagctg cccgtgccct ggcccaccct 2160

cgtgaccacc ctgacctacg gcgtgcagtg cttcagccgc taccccgacc acatgaagca 2220

gcacgacttc ttcaagtccg ccatgcccga aggctacgtc caggagcgca ccatcttctt 2280

caaggacgac ggcaactaca agacccgcgc cgaggtgaag ttcgagggcg acaccctggt 2340

gaaccgcatc gagctgaagg gcatcgactt caaggaggac ggcaacatcc tggggcacaa 2400

gctggagtac aactacaaca gccacaacgt ctatatcatg gccgacaagc agaagaacgg 2460

catcaaggtg aacttcaaga tccgccacaa catcgaggac ggcagcgtgc agctcgccga 2520

ccactaccag cagaacaccc ccatcggcga cggccccgtg ctgctgcccg acaaccacta 2580

cctgagcacc cagtccgccc tgagcaaaga ccccaacgag aagcgcgatc acatggtcct 2640

gctggagttc gtgaccgccg ccgggatcac tctcggcatg gacgagctgt acaagtaagg 2700

taccagtgaa ttctaccagt gccataggat agtgaattct accagtgcca tacacgtgag 2760

tgaattctac cagtgccata gcatgcagtg aattctacca gtgccatagc ggccgcctcg 2820

aggacggggt gaactacgcc tgaggatccg atctttttcc ctctgccaaa aattatgggg 2880

acatcatgaa gcccccttgag catctgactt ctggctaata aaggaaattt attttcattg 2940

caatagtgtg ttggaatttt ttgtgtctct cactcggaag caattcgttg atctgaattt 3000

cgaccaccca taatacccat taccctggta gataagtagc atggcgggtt aatcattaac 3060

tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact 3120

gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc 3180

gagcgagcgc gcag 3194

<210> 14

<211> 4300

<212> DNA

<213> Artificial sequence

<220><223> ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.rBG.ITR

<220><221> misc_feature

<222> (1)..(130)

<223> 5' ITR

<220><221> misc_feature

<222> (198)..(579)

<223> CMV IE promoter

<220><221> misc_feature

<222> (582)..(863)

<223> CB promoter

<220><221> misc_feature

<222> (836)..(839)

<223> TATA

<220><221> misc_feature

<222> (958)..(1930)

<223> chicken beta-actin intron

<220><221> CDS

<222> (1943)..(3901)

<223> hIDUAcoV1

<220><221> misc_feature

<222> (3908)..(3922)

<223> 3UTR insertion site

<220><221> misc_feature

<222> (3956)..(4082)

<223> Rabbit globin poly A

<220><221> misc_feature

<222> (4171)..(4300)

<223> 3' ITR

<400> 14

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc ggggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cgggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg gggggggtgag caggggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aaccccccct gcaccccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcgggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattcagcca cc atg agg cct ctc aga cct aga gct gct ctg 1972

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu

1 5 10

ctg gca ctg ctg gct tct ctg ctt gct gct cct cct gtg gct cct gcc 2020

Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala

15 20 25

gaa gct cct cat ctg gtg cac gtg gat gcc gcc aga gca ctg tgg ccc 2068

Glu Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro

30 35 40

ctg aga aga ttt tgg cgg agc acc ggc ttt tgc cct cca ctg cct cat 2116

Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His

45 50 55

tct cag gcc gac cag tac gtg ctg agc tgg gac cag caa ctg aac ctg 2164

Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu

60 65 70

gcc tac gtg gga gcc gtg cct cac aga ggc att aag caa gtg cgg acc 2212

Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr

75 80 85 90

cac tgg ctg ctg gaa ctg gtc aca aca aga ggc agc aca ggc aga ggc 2260

His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly

95 100 105

ctg agc tac aac ttc acc cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga 2308

Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg

110 115 120

gag aat cag ctg ctg cct ggc ttc gag ctg atg ggc tct gcc tct ggc 2356

Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly

125 130 135

cac ttc acc gac ttc gag gac aag cag cag gtt ttc gag tgg aag gac 2404

```
His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp
    140                 145                 150

ctg gtg tcc agc ctg gcc aga cgg tac atc ggc aga tac gga ctg gcc       2452
Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala
155                 160                 165                 170
cac gtg tcc aag tgg aac ttc gag acc tgg aac gag ccc gac cac cac       2500
His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His
                175                 180                 185
gac ttc gac aac gtg tca atg acc atg cag ggc ttt ctg aac tac tac       2548

Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr
            190                 195                 200
gac gcc tgc agc gag ggc ctg aga gct gct tct cct gct ctg aga ctt       2596
Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu
        205                 210                 215
ggc ggc cct ggc gac tct ttt cac acc cct cca aga agc cct ctg tcc       2644
Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser

    220                 225                 230
tgg gga ctg ctg aga cac tgt cac gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc       2692
Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly
235                 240                 245                 250
gag gct ggc gtg cgg ctg gat tat atc agc ctg cac aga aag ggc gcc       2740
Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala
                255                 260                 265

aga agc agc atc agc atc ctg gaa caa gag aag gtg gtg gcc cag cag       2788
Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln
            270                 275                 280
atc aga cag ctg ttc ccc aag ttc gcc gac aca ccc atc tac aac gac       2836
Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp
        285                 290                 295
```

gag gcc gat cct ctc gtt ggc tgg tca ctt cct cag cct tgg aga gcc 2884

Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala
300 305 310

gat gtg acc tat gcc gcc atg gtg gtc aaa gtg atc gcc cag cac cag 2932

Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln
315 320 325 330

aat ctg ctg ctc gcc aat acc acc agc gcc ttt cca tac gct ctg ctg 2980

Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu
335 340 345

agc aac gac aac gcc ttc ctg agc tat cac cct cat cct ttc gct cag 3028

Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln
350 355 360

cgg acc ctg acc gcc aga ttc caa gtg aac aac acc cgg cct cca cac 3076

Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His
365 370 375

gtg cag ctg ctg aga aaa cca gtg ctg aca gcc atg ggc ctg ctc gcc 3124

Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala
380 385 390

ctg ctg gac gaa gaa caa ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc gga aca 3172

Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr
395 400 405 410

gtg ctg gat agc aat cac aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gct cat aga 3220

Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg
415 420 425

cct caa gga cca gcc gat gct tgg agg gct gcc gtg ctg atc tac gcc 3268

Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala
430 435 440

agc gac gat aca agg gct cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg aca ctg 3316

Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu

```
        445                 450                 455
aga ctg aga ggc gtt cca cca gga cct ggc ctg gtg tac gtg acc aga       3364
Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg
    460                 465                 470
tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc cct gat ggc gaa tgg cgt aga cta       3412
Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu
475                 480                 485                 490

ggc aga cct gtg ttt cct acc gcc gag cag ttc aga cgg atg aga gcc       3460
Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala
                495                 500                 505
gct gaa gat ccc gtg gct gct gct cca aga cct ctt cca gct ggt ggc       3508
Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly
            510                 515                 520
aga ctg act ctg agg cct gca ctc aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg       3556

Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val
        525                 530                 535
cac gtc tgt gcc aga cct gag aag cct cct ggc caa gtg aca aga ctg       3604
His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu
    540                 545                 550
agg gcc ctg cca ctg aca cag gga cag ctg gtt ctt gtt tgg agc gac       3652
Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp

555                 560                 565                 570
gag cac gtg ggc agc aag tgt ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc       3700
Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser
                575                 580                 585
cag gac ggc aag gcc tac aca ccc gtg tct aga aag cct agc acc ttc       3748
Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe
            590                 595                 600

aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat aca ggc gcc gtg tct ggc agc tat       3796
Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr
        605                 610                 615
```

aga gtc aga gcc ctg gac tac tgg gcc aga cca gga cca ttt tct gac 3844

Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp

620 625 630

ccc gtg cct tac ctg gaa gtg ccc gtt cct aga ggc cct cct tct cct 3892

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

635 640 645 650

gga aat ccc tgataaggta ccatacctag gctcgaggac ggggtgaact 3941

Gly Asn Pro

acgcctgagg atccgatctt tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc 4001

ttgagcatct gacttctggc taataaagga aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga 4061

atttttttgtg tctctcactc ggaagcaatt cgttgatctg aatttcgacc acccataata 4121

cccattaccc tggtagataa gtagcatggc gggttaatca ttaactacaa ggaaccccta 4181

gtgatggagt tggccactcc ctctctgcgc gctcgctcgc tcactgaggc cgggcgacca 4241

aaggtcgccc gacgcccggg ctttgcccgg gcggcctcag tgagcgagcg agcgcgcag 4300

<210> 15

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 15

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

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

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

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

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

325 330 335

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

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
405 410 415
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
420 425 430
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala
435 440 445
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
450 455 460

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

Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590

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

<210> 16

<211> 4403
<212> DNA
<213> Artificial sequence
<220><223> ITR.CB7.CI.hIDUAcoV1.miR183.ITR
<220><221> misc_feature
<222> (1)..(130)
<223> 5' ITR
<220><221> misc_feature
<222> (198)..(579)
<223> CMV IE promoter
<220><221> misc_feature
<222> (582)..(863)
<223> CB promoter
<220><221> misc_feature
<222> (836)..(839)
<223> TATA
<220><221> misc_feature
<222> (958)..(1930)
<223> chicken beta-actin intron
<220><221> CDS
<222> (1943)..(3901)

<220><221> misc_feature

<222> (3914)..(3935)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (3936)..(3939)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (3940)..(3961)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (3962)..(3967)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (3968)..(3989)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (3990)..(3995)

<223> spacer

<220><221> misc_feature

<222> (3996)..(4017)

<223> miRNA183

<220><221> misc_feature

<222> (4059)..(4185)

<223> Rabbit globin poly A

<220><221> misc_feature

<222> (4274)..(4403)

<223> 3' ITR

<400> 16

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgacctttt 60

ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120

aggggttcct tgtagttaat gattaacccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180

atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240

tacggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300

tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgta tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480

caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc 540

tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagccccac 600

gttctgcttc actctcccca tctccccccc ctccccaccc ccaattttgt atttatttat 660

tttttaatta ttttgtgcag cgatgggggc gggggggggg gggggcgcgc cgccaggcgg 720

ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggccctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900

tccgccgccg cctcgcgccg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg 960

agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 1020

gtttcttttc tgtggctgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggagggccc tttgtgcggg 1080

gggagcggct cggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgccgc gtgcggctcc 1140

gcgctgcccg gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200

gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260

aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg 1320

gtcgggctgc aacccccccc gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggcttcg 1380

ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcgccg tgccgggcgg ggggtggcgg 1440

caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 1500

cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560

ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620

aaatctggga ggcgccgccg cacccccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgcc 1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tcccccttctc 1740

cctctccagc ctcggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcgggggggg acggggcagg 1800

gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggcaaag aattcagcca cc atg agg cct ctc aga cct aga gct gct ctg 1972

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu

```
                          1               5                   10
ctg gca ctg ctg gct tct ctg ctt gct gct cct cct gtg gct cct gcc      2020
Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala
                15                  20                  25
gaa gct cct cat ctg gtg cac gtg gat gcc gcc aga gca ctg tgg ccc      2068
Glu Ala Pro His Leu Val His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro
            30                  35                  40

ctg aga aga ttt tgg cgg agc acc ggc ttt tgc cct cca ctg cct cat      2116
Leu Arg Arg Phe Trp Arg Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His
        45                  50                  55
tct cag gcc gac cag tac gtg ctg agc tgg gac cag caa ctg aac ctg      2164
Ser Gln Ala Asp Gln Tyr Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu
    60                  65                  70
gcc tac gtg gga gcc gtg cct cac aga ggc att aag caa gtg cgg acc      2212

Ala Tyr Val Gly Ala Val Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr
75                  80                  85                  90
cac tgg ctg ctg gaa ctg gtc aca aca aga ggc agc aca ggc aga ggc      2260
His Trp Leu Leu Glu Leu Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly
                95                  100                 105
ctg agc tac aac ttc acc cac ctg gac ggc tac ctg gac ctg ctg aga      2308
Leu Ser Tyr Asn Phe Thr His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg

            110                 115                 120
gag aat cag ctg ctg cct ggc ttc gag ctg atg ggc tct gcc tct ggc      2356
Glu Asn Gln Leu Leu Pro Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly
        125                 130                 135
cac ttc acc gac ttc gag gac aag cag cag gtt ttc gag tgg aag gac      2404
His Phe Thr Asp Phe Glu Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp
    140                 145                 150

ctg gtg tcc agc ctg gcc aga cgg tac atc ggc aga tac gga ctg gcc      2452
Leu Val Ser Ser Leu Ala Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala
155                 160                 165                 170
```

cac gtg tcc aag tgg aac ttc gag acc tgg aac gag ccc gac cac cac 2500
His Val Ser Lys Trp Asn Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His
175 180 185
gac ttc gac aac gtg tca atg acc atg cag ggc ttt ctg aac tac tac 2548

Asp Phe Asp Asn Val Ser Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr
190 195 200
gac gcc tgc agc gag ggc ctg aga gct gct tct cct gct ctg aga ctt 2596
Asp Ala Cys Ser Glu Gly Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu
205 210 215
ggc ggc cct ggc gac tct ttt cac acc cct cca aga agc cct ctg tcc 2644
Gly Gly Pro Gly Asp Ser Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser

220 225 230
tgg gga ctg ctg aga cac tgt cac gac ggc acc aat ttc ttc acc ggc 2692
Trp Gly Leu Leu Arg His Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly
235 240 245 250
gag gct ggc gtg cgg ctg gat tat atc agc ctg cac aga aag ggc gcc 2740
Glu Ala Gly Val Arg Leu Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala
255 260 265

aga agc agc atc agc atc ctg gaa caa gag aag gtg gtg gcc cag cag 2788
Arg Ser Ser Ile Ser Ile Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln
270 275 280
atc aga cag ctg ttc ccc aag ttc gcc gac aca ccc atc tac aac gac 2836
Ile Arg Gln Leu Phe Pro Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp
285 290 295
gag gcc gat cct ctc gtt ggc tgg tca ctt cct cag cct tgg aga gcc 2884

Glu Ala Asp Pro Leu Val Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala
300 305 310
gat gtg acc tat gcc gcc atg gtg gtc aaa gtg atc gcc cag cac cag 2932
Asp Val Thr Tyr Ala Ala Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln
315 320 325 330
aat ctg ctg ctc gcc aat acc acc agc gcc ttt cca tac gct ctg ctg 2980

```
Asn Leu Leu Leu Ala Asn Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu

                335                 340                 345

agc aac gac aac gcc ttc ctg agc tat cac cct cat cct ttc gct cag       3028
Ser Asn Asp Asn Ala Phe Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln
            350                 355                 360
cgg acc ctg acc gcc aga ttc caa gtg aac aac acc cgg cct cca cac       3076
Arg Thr Leu Thr Ala Arg Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His
        365                 370                 375

gtg cag ctg ctg aga aaa cca gtg ctg aca gcc atg ggc ctg ctc gcc       3124
Val Gln Leu Leu Arg Lys Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala
    380                 385                 390
ctg ctg gac gaa gaa caa ctg tgg gcc gaa gtg tcc cag gcc gga aca       3172
Leu Leu Asp Glu Glu Gln Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr
395                 400                 405                 410
gtg ctg gat agc aat cac aca gtg ggc gtg ctg gcc tcc gct cat aga       3220

Val Leu Asp Ser Asn His Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg
                415                 420                 425
cct caa gga cca gcc gat gct tgg agg gct gcc gtg ctg atc tac gcc       3268
Pro Gln Gly Pro Ala Asp Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala
            430                 435                 440
agc gac gat aca agg gct cac ccc aac aga tcc gtg gcc gtg aca ctg       3316
Ser Asp Asp Thr Arg Ala His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu

        445                 450                 455
aga ctg aga ggc gtt cca cca gga cct ggc ctg gtg tac gtg acc aga       3364
Arg Leu Arg Gly Val Pro Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg
    460                 465                 470
tac ctg gac aac ggc ctg tgc agc cct gat ggc gaa tgg cgt aga cta       3412
Tyr Leu Asp Asn Gly Leu Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu
475                 480                 485                 490
```

```
ggc aga cct gtg ttt cct acc gcc gag cag ttc aga cgg atg aga gcc       3460
Gly Arg Pro Val Phe Pro Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala
                495                 500                 505
gct gaa gat ccc gtg gct gct gct cca aga cct ctt cca gct ggt ggc       3508
Ala Glu Asp Pro Val Ala Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly
            510                 515                 520
aga ctg act ctg agg cct gca ctc aga ctg cct agt ctg ctg ctg gtg       3556

Arg Leu Thr Leu Arg Pro Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val
        525                 530                 535
cac gtc tgt gcc aga cct gag aag cct cct ggc caa gtg aca aga ctg       3604
His Val Cys Ala Arg Pro Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu
    540                 545                 550
agg gcc ctg cca ctg aca cag gga cag ctg gtt ctt gtt tgg agc gac       3652
Arg Ala Leu Pro Leu Thr Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp

555                 560                 565                 570
gag cac gtg ggc agc aag tgt ctg tgg acc tac gag atc cag ttc agc       3700
Glu His Val Gly Ser Lys Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser
                575                 580                 585
cag gac ggc aag gcc tac aca ccc gtg tct aga aag cct agc acc ttc       3748
Gln Asp Gly Lys Ala Tyr Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe
            590                 595                 600

aac ctg ttc gtg ttc agc ccc gat aca ggc gcc gtg tct ggc agc tat       3796
Asn Leu Phe Val Phe Ser Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr
        605                 610                 615
aga gtc aga gcc ctg gac tac tgg gcc aga cca gga cca ttt tct gac       3844
Arg Val Arg Ala Leu Asp Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp
    620                 625                 630
ccc gtg cct tac ctg gaa gtg ccc gtt cct aga ggc cct cct tct cct       3892

Pro Val Pro Tyr Leu Glu Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro
635                 640                 645                 650
gga aat ccc tgataaggta ccagtgaatt ctaccagtgc cataggatag               3941
```

Gly Asn Pro

tgaattctac cagtgccata cacgtgagtg aattctacca gtgccatagc atgcagtgaa 4001

ttctaccagt gccatagcgg ccgcctcgag gacggggtga actacgcctg aggatccgat 4061

ctttttccct ctgccaaaaa ttatggggac atcatgaagc cccttgagca tctgacttct 4121

ggctaataaa ggaaatttat tttcattgca atagtgtgtt ggaatttttt gtgtctctca 4181

ctcggaagca attcgttgat ctgaatttcg accacccata atacccatta ccctggtaga 4241

taagtagcat ggcgggttaa tcattaacta caaggaaccc ctagtgatgg agttggccac 4301

tccctctctg cgcgctcgct cgctcactga ggccgggcga ccaaaggtcg cccgacgccc 4361

gggctttgcc cgggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc ag 4403

<210> 17

<211> 653

<212> PRT

<213> Artificial sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr
100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
130 135 140
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145 150 155 160
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
165 170 175
Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
180 185 190

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

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

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

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380

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

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

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
515 520 525
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575

Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
580 585 590
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 18

<211> 2211

<212> DNA

<213> adeno-associated virus 9

<220><221> CDS

<222> (1)..(2211)

<400> 18

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctt agt 48

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

1 5 10 15

gaa gga att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc 96

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

20 25 30

aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cga ggt ctt gtg ctt ccg 144

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

35 40 45

ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg gag ccg 192

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

50 55 60

gtc aac gca gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240

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

65 70 75 80

cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac cac gcc 288

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

85 90 95

gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc 336

```
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
            100                 105                 110
aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct        384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
        115                 120                 125
ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg        432

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
    130                 135                 140
cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gcg ggt att ggc        480
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145                 150                 155                 160
aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act        528
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

                165                 170                 175
ggc gac aca gag tca gtc cca gac cct caa cca atc gga gaa cct ccc        576
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
            180                 185                 190
gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt ggt ggc        624
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
        195                 200                 205

gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc        672
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
    210                 215                 220
tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc        720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225                 230                 235                 240
acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc        768

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
                245                 250                 255
tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac        816
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
```

```
            260                 265                 270
gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga       864
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

        275                 280                 285
ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc aac aac       912
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
    290                 295                 300
aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att       960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305                 310                 315                 320

cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gcc aat      1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
                325                 330                 335
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc      1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
            340                 345                 350
ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca      1104

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
        355                 360                 365
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat ctg acg ctt aat gat      1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
    370                 375                 380
gga agc cag gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc      1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe

385                 390                 395                 400
ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag      1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
                405                 410                 415
ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tac gct cac agc caa agc ctg      1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
```

420 425 430

gac cga cta atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca 1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt 1392
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct 1440

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

gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac 1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat 1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa 1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc 1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata 1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

acc aac gaa gaa gaa att aaa act act aac ccg gta gca acg gag tcc 1728
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag 1776

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

580 585 590

acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag 1824

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

595 600 605

gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac 1872

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

610 615 620

acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg 1920

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

625 630 635 640

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg 1968

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

645 650 655

gat cct cca acg gcc ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc 2016

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

660 665 670

cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag atc gag tgg gag ctg cag 2064

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

675 680 685

aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac 2112

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

690 695 700

tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gta 2160

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

705 710 715 720

tat agt gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg 2208

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

725 730 735

taa 2211

<210> 19

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus 9

<400> 19

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

100 105 110

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

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

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

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

165 170 175

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

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

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

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

<210> 20

<211> 1962

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220><221> CDS

<222> (1)..(1962)

<400> 20

atg cgt ccc ctg cgc ccc cgc gcc gcg ctg ctg gcg ctc ctg gcc tcg 48
Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser
1 5 10 15

ctc ctg gcc gcg ccc ccg gtg gcc ccg gcc gag gcc ccg cac ctg gtg 96
Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val
20 25 30

cat gtg gac gcg gcc cgc gcg ctg tgg ccc ctg cgg cgc ttc tgg agg 144
His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg
35 40 45

agc aca ggc ttc tgc ccc ccg ctg cca cac agc cag gct gac cag tac 192
Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr
50 55 60

gtc ctc agc tgg gac cag cag ctc aac ctc gcc tat gtg ggc gcc gtc 240

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val
65 70 75 80

cct cac cgc ggc atc aag cag gtc cgg acc cac tgg ctg ctg gag ctt 288
Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu
85 90 95

gtc acc acc agg ggg tcc act gga cgg ggc ctg agc tac aac ttc acc 336
Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

cac ctg gac ggg tac ctg gac ctt ctc agg gag aac cag ctc ctc cca 384

```
His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro
        115                 120                 125
ggg ttt gag ctg atg ggc agc gcc tcg ggc cac ttc act gac ttt gag        432
Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu
    130                 135                 140

gac aag cag cag gtg ttt gag tgg aag gac ttg gtc tcc agc ctg gcc        480
Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala
145                 150                 155                 160
agg aga tac atc ggt agg tac gga ctg gcg cat gtt tcc aag tgg aac        528
Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn
                165                 170                 175
ttc gag acg tgg aat gag cca gac cac cac gac ttt gac aac gtc tcc        576

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser
            180                 185                 190
atg acc atg caa ggc ttc ctg aac tac tac gat gcc tgc tcg gag ggt        624
Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly
        195                 200                 205
ctg cgc gcc gcc agc ccc gcc ctg cgg ctg gga ggc ccc ggc gac tcc        672
Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

    210                 215                 220
ttc cac acc cca ccg cga tcc ccg ctg agc tgg ggc ctc ctg cgc cac        720
Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His
225                 230                 235                 240
tgc cac gac ggt acc aac ttc ttc act ggg gag gcg ggc gtg cgg ctg        768
Cys His Asp Gly Thr Asn Phe Phe Thr Gly Glu Ala Gly Val Arg Leu
                245                 250                 255

gac tac atc tcc ctc cac agg aag ggt gcg cgc agc tcc atc tcc atc        816
Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile
            260                 265                 270
ctg gag cag gag aag gtc gtc gcg cag cag atc cgg cag ctc ttc ccc        864
Leu Glu Gln Glu Lys Val Val Ala Gln Gln Ile Arg Gln Leu Phe Pro
```

```
        275                 280                 285
aag ttc gcg gac acc ccc att tac aac gac gag gcg gac ccg ctg gtg        912

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val
    290                 295                 300
ggc tgg tcc ctg cca cag ccg tgg agg gcg gac gtg acc tac gcg gcc        960
Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala
305                 310                 315                 320
atg gtg gtg aag gtc atc gcg cag cat cag aac ctg cta ctg gcc aac       1008
Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

                325                 330                 335
acc acc tcc gcc ttc ccc tac gcg ctc ctg agc aac gac aat gcc ttc       1056
Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe
            340                 345                 350
ctg agc tac cac ccg cac ccc ttc gcg cag cgc acg ctc acc gcg cgc       1104
Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg
        355                 360                 365

ttc cag gtc aac aac acc cgc ccg ccg cac gtg cag ctg ttg cgc aag       1152
Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
    370                 375                 380
ccg gtg ctc acg gcc atg ggg ctg ctg gcg ctg ctg gat gag gag cag       1200
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln
385                 390                 395                 400
ctc tgg gcc gaa gtg tcg cag gcc ggg acc gtc ctg gac agc aac cac       1248

Leu Trp Ala Glu Val Ser Gln Ala Gly Thr Val Leu Asp Ser Asn His
                405                 410                 415
acg gtg ggc gtc ctg gcc agc gcc cac cgc ccc cag ggc ccg gcc gac       1296
Thr Val Gly Val Leu Ala Ser Ala His Arg Pro Gln Gly Pro Ala Asp
            420                 425                 430
gcc tgg cgc gcc gcg gtg ctg atc tac gcg agc gac gac acc cgc gcc       1344
```

```
Ala Trp Arg Ala Ala Val Leu Ile Tyr Ala Ser Asp Asp Thr Arg Ala

        435                 440                 445

cac ccc aac cgc agc gtc gcg gtg acc ctg cgg ctg cgc ggg gtg ccc       1392
His Pro Asn Arg Ser Val Ala Val Thr Leu Arg Leu Arg Gly Val Pro
    450                 455                 460
ccc ggc ccg ggc ctg gtc tac gtc acg cgc tac ctg gac aac ggg ctc       1440
Pro Gly Pro Gly Leu Val Tyr Val Thr Arg Tyr Leu Asp Asn Gly Leu
465                 470                 475                 480

tgc agc ccc gac ggc gag tgg cgg cgc ctg ggc cgg ccc gtc ttc ccc       1488
Cys Ser Pro Asp Gly Glu Trp Arg Arg Leu Gly Arg Pro Val Phe Pro
                485                 490                 495
acg gca gag cag ttc cgg cgc atg cgc gcg gct gag gac ccg gtg gcc       1536
Thr Ala Glu Gln Phe Arg Arg Met Arg Ala Ala Glu Asp Pro Val Ala
            500                 505                 510
gcg gcg ccc cgc ccc tta ccc gcc ggc ggc cgc ctg acc ctg cgc ccc       1584

Ala Ala Pro Arg Pro Leu Pro Ala Gly Gly Arg Leu Thr Leu Arg Pro
        515                 520                 525
gcg ctg cgg ctg ccg tcg ctt ttg ctg gtg cac gtg tgt gcg cgc ccc       1632
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
    530                 535                 540
gag aag ccg ccc ggg cag gtc acg cgg ctc cgc gcc ctg ccc ctg acc       1680
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr

545                 550                 555                 560
caa ggg cag ctg gtt ctg gtc tgg tcg gat gaa cac gtg ggc tcc aag       1728
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
                565                 570                 575
tgc ctg tgg aca tac gag atc cag ttc tct cag gac ggt aag gcg tac       1776
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr
            580                 585                 590
```

acc ccg gtc agc agg aag cca tcg acc ttc aac ctc ttt gtg ttc agc 1824

Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser

595 600 605

cca gac aca ggt gct gtc tct ggc tcc tac cga gtt cga gcc ctg gac 1872

Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

tac tgg gcc cga cca ggc ccc ttc tcg gac cct gtg ccg tac ctg gag 1920

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

gtc cct gtg cca aga ggg ccc cca tcc ccg ggc aat cca tga 1962

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 21

<211> 653

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Arg Pro Leu Arg Pro Arg Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Ala Ser

1 5 10 15

Leu Leu Ala Ala Pro Pro Val Ala Pro Ala Glu Ala Pro His Leu Val

20 25 30

His Val Asp Ala Ala Arg Ala Leu Trp Pro Leu Arg Arg Phe Trp Arg

35 40 45

Ser Thr Gly Phe Cys Pro Pro Leu Pro His Ser Gln Ala Asp Gln Tyr

50 55 60

Val Leu Ser Trp Asp Gln Gln Leu Asn Leu Ala Tyr Val Gly Ala Val

65 70 75 80

Pro His Arg Gly Ile Lys Gln Val Arg Thr His Trp Leu Leu Glu Leu

85 90 95

Val Thr Thr Arg Gly Ser Thr Gly Arg Gly Leu Ser Tyr Asn Phe Thr

100 105 110

His Leu Asp Gly Tyr Leu Asp Leu Leu Arg Glu Asn Gln Leu Leu Pro

115 120 125

Gly Phe Glu Leu Met Gly Ser Ala Ser Gly His Phe Thr Asp Phe Glu

130 135 140

Asp Lys Gln Gln Val Phe Glu Trp Lys Asp Leu Val Ser Ser Leu Ala

145 150 155 160

Arg Arg Tyr Ile Gly Arg Tyr Gly Leu Ala His Val Ser Lys Trp Asn

165 170 175

Phe Glu Thr Trp Asn Glu Pro Asp His His Asp Phe Asp Asn Val Ser

180 185 190

Met Thr Met Gln Gly Phe Leu Asn Tyr Tyr Asp Ala Cys Ser Glu Gly

195 200 205

Leu Arg Ala Ala Ser Pro Ala Leu Arg Leu Gly Gly Pro Gly Asp Ser

210 215 220

Phe His Thr Pro Pro Arg Ser Pro Leu Ser Trp Gly Leu Leu Arg His

225 230 235 240

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

245 250 255

Asp Tyr Ile Ser Leu His Arg Lys Gly Ala Arg Ser Ser Ile Ser Ile

260 265 270

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

275 280 285

Lys Phe Ala Asp Thr Pro Ile Tyr Asn Asp Glu Ala Asp Pro Leu Val

290 295 300

Gly Trp Ser Leu Pro Gln Pro Trp Arg Ala Asp Val Thr Tyr Ala Ala

305 310 315 320

Met Val Val Lys Val Ile Ala Gln His Gln Asn Leu Leu Leu Ala Asn

325 330 335

Thr Thr Ser Ala Phe Pro Tyr Ala Leu Leu Ser Asn Asp Asn Ala Phe

340 345 350

Leu Ser Tyr His Pro His Pro Phe Ala Gln Arg Thr Leu Thr Ala Arg

355 360 365

Phe Gln Val Asn Asn Thr Arg Pro Pro His Val Gln Leu Leu Arg Lys
370 375 380
Pro Val Leu Thr Ala Met Gly Leu Leu Ala Leu Leu Asp Glu Glu Gln

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

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

515 520 525
Ala Leu Arg Leu Pro Ser Leu Leu Leu Val His Val Cys Ala Arg Pro
530 535 540
Glu Lys Pro Pro Gly Gln Val Thr Arg Leu Arg Ala Leu Pro Leu Thr
545 550 555 560
Gln Gly Gln Leu Val Leu Val Trp Ser Asp Glu His Val Gly Ser Lys
565 570 575
Cys Leu Trp Thr Tyr Glu Ile Gln Phe Ser Gln Asp Gly Lys Ala Tyr

580 585 590
Thr Pro Val Ser Arg Lys Pro Ser Thr Phe Asn Leu Phe Val Phe Ser
595 600 605
Pro Asp Thr Gly Ala Val Ser Gly Ser Tyr Arg Val Arg Ala Leu Asp

610 615 620

Tyr Trp Ala Arg Pro Gly Pro Phe Ser Asp Pro Val Pro Tyr Leu Glu

625 630 635 640

Val Pro Val Pro Arg Gly Pro Pro Ser Pro Gly Asn Pro

645 650

<210> 22

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence

<400> 22

atgaggcctc tcagacctag agctgctctg ctggcactgc tggcttctct gcttgctgct 60

cctcctgtgg ctcctgccga agctcctcat ctggtgcacg tggatgccgc cagagcactg 120

tggcccctga gaagattttg gcggagcacc ggcttttgcc ctccactgcc tcattctcag 180

gccgaccagt acgtgctgag ctgggaccag caactgaacc tggcctacgt gggagccgtg 240

cctcacagag gcattaagca agtgcggacc cactggctgc tggaactggt cacaacaaga 300

ggcagcacag gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg 360

ctgagagaga atcagctgct gcctggcttc gagctgatgg gctctgcctc tggccacttc 420

accgacttcg aggacaagca gcaggttttc gagtggaagg acctggtgtc cagcctggcc 480

agacggtaca tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaactt cgagacctgg 540

aacgagcccg accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac 600

tactacgacg cctgcagcga gggcctgaga gctgcttctc ctgctctgag acttggcggc 660

cctggcgact cttttcacac ccctccaaga agccctctgt cctggggact gctgagacac 720

tgtcacgacg gcaccaattt cttcaccggc gaggctggcg tgcggctgga ttatatcagc 780

ctgcacagaa agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaagagaa ggtggtggcc 840

cagcagatca gacagctgtt ccccaagttc gccgacacac ccatctacaa cgacgaggcc 900

gatcctctcg ttggctggtc acttcctcag ccttggagag ccgatgtgac ctatgccgcc 960

atggtggtca aagtgatcgc ccagcaccag aatctgctgc tcgccaatac caccagcgcc 1020

tttccatacg ctctgctgag caacgacaac gccttcctga gctatcaccc tcatcctttc 1080

gctcagcgga ccctgaccgc cagattccaa gtgaacaaca cccggcctcc acacgtgcag 1140

ctgctgagaa aaccagtgct gacagccatg ggcctgctcg ccctgctgga cgaagaacaa 1200

ctgtgggccg aagtgtccca ggccggaaca gtgctggata gcaatcacac agtgggcgtg 1260

ctggcctccg ctcatagacc tcaaggacca gccgatgctt ggagggctgc cgtgctgatc 1320

tacgccagcg acgatacaag ggctcacccc aacagatccg tggccgtgac actgagactg 1380

agaggcgttc caccaggacc tggcctggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg 1440

tgcagccctg atggcgaatg gcgtagacta ggcagacctg tgtttcctac cgccgagcag 1500

ttcagacgga tgagagccgc tgaagatccc gtggctgctg ctccaagacc tcttccagct 1560

ggtggcagac tgactctgag gcctgcactc agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtc 1620

tgtgccagac ctgagaagcc tcctggccaa gtgacaagac tgagggccct gccactgaca 1680

cagggacagc tggttcttgt ttggagcgac gagcacgtgg gcagcaagtg tctgtggacc 1740

tacgagatcc agttcagcca ggacggcaag gcctacacac ccgtgtctag aaagcctagc 1800

accttcaacc tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtctggcag ctatagagtc 1860

agagccctgg actactgggc cagaccagga ccattttctg accccgtgcc ttacctggaa 1920

gtgcccgttc ctagaggccc tccttctcct ggaaatccc 1959

<210> 23

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence

<400> 23

atgaggcctc tcagacctag agctgctctg ctggcactgc tggcttctct gcttgctgct 60

cctcctgtgg ctcctgccga agctcctcat ctggtgcacg tggatgccgc cagagcactg 120

tggcccctga gaagattttg gcggagcacc ggcttttgcc ctccactgcc tcattctcaa 180

gccgaccaat acgtgctgag ctgggaccag caactgaacc tggcctacgt gggagccgtg 240

cctcacagag gcattaagca agtgcggacc cactggctgc tggaactggt cacaacaaga 300

ggcagcacag gcagaggcct gagctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg 360

ctgagagaga atcagctgct gcctggcttc gagctgatgg gctctgcctc tggccacttc 420

accgacttcg aggacaagca gcaggttttc gagtggaagg acctggtgtc cagcctggcc 480

agacgctaca tcggcagata cggactggcc cacgtgtcca agtggaactt cgagacctgg 540

aacgagcccg accaccacga cttcgacaac gtgtcaatga ccatgcaggg ctttctgaac 600

tactacgacg cctgcagcga gggcctgaga gctgcttctc ctgctctgag acttggcggc 660

cctggcgact cttttcacac ccctccaaga agccctctgt cctggggact gctgagacac 720

tgtcacgacg gcaccaattt cttcaccggc gaggctggcg tgcggctgga ttatatcagc 780

ctgcacagaa agggcgccag aagcagcatc agcatcctgg aacaagagaa ggtggtggcc 840

cagcagatca gacagctgtt ccccaagttc gccgacacac ccatctacaa cgacgaggcc 900

gatcctctcg ttggctggtc acttcctcag ccttggagag ccgatgtgac ctatgccgcc 960

atggtggtca aagtgatcgc ccagcaccag aatctgctgc tcgccaatac caccagcgcc 1020

tttccatacg ctctgctgag caacgacaac gccttcctga gctatcaccc tcatcctttc 1080

gctcagcgga ccctgaccgc cagattccaa gtgaacaaca cccggcctcc acacgtgcag 1140

ctgctgagaa aaccagtgct gacagccatg ggcctgctcg ccctgctgga cgaagaacaa 1200

ctgtgggccg aagtgtccca ggccggaaca gtgctggata gcaatcacac agtgggcgtg 1260

ctggcctccg ctcatcgacc tcaaggacca gccgatgctt ggagggctgc cgtgctgatc 1320

tacgccagcg acgatacaag ggctcacccc aacagatccg tggccgtgac actgagactg 1380

agaggcgttc caccaggacc tggcctggtg tacgtgacca gatacctgga caacggcctg 1440

tgcagccctg atggcgaatg gcgtagacta ggcagacctg tgtttcctac cgccgagcag 1500

ttcagacgga tgagagccgc tgaagatccc gtggctgctg ctccaagacc tcttccagct 1560

ggtggcagac tgactctgag gcctgcactc agactgccta gtctgctgct ggtgcacgtc 1620

tgtgccagac ctgagaagcc tcctggccaa gtgacaagac tgagggccct gccactgaca 1680

cagggacagc tggttcttgt ttggagcgac gagcacgtgg gcagcaagtg tctgtggacc 1740

tacgagatcc agttcagcca ggacggcaag gcctacacac ccgtgtctag aaagcctagc 1800

accttcaacc tgttcgtgtt cagccccgat acaggcgccg tgtctggcag ctatagagtc 1860

agagccctgg actactgggc cagaccagga ccattttctg accccgtgcc ttacctggaa 1920

gtgcccgttc ctagaggccc tccttctcct ggaaatccc 1959

<210> 24

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence

<400> 24

atgcgaccct tgcgaccaag agccgccctg cttgcgttgt tggcttccct tttggctgca 60

ccacccgtcg ccccggcaga ggcgcctcac ctcgtgcatg tagacgcagc ccgcgccctc 120

tggccattgc ggcgattctg gaggtctacc ggtttctgcc cacccctgcc tcattcacaa 180

gccgaccaat acgttttgtc ctgggatcaa cagctcaacc ttgcgtatgt aggcgctgtt 240

ccacaccggg gaattaagca ggtccggact cactggcttc ttgagttggt tacgacgagg 300

ggttcaacag ggagagggtt gtcctacaac tttacacatc tggatggtta tttagacctg 360

ctccgagaaa accaacttct ccctggattc gagctcatgg gctctgcctc tggtcacttt 420

acggatttcg aggataaaca gcaagtcttc gagtggaagg atcttgtgag cagccttgcc 480

agaagatata taggaagata cgggttggca cacgtatcta aatggaactt tgagacttgg 540

aacgaacccg accatcacga ctttgacaac gtatctatga cgatgcaagg cttcctcaac 600

tattatgacg cgtgcagtga aggtctgagg gctgcgtctc cggcgctcag attgggaggt 660

cctggagaca gctttcatac gcctccgcga tcccctctta gctgggggtt gctcagacat 720

tgccacgacg gtacaaactt cttcaccggc gaggcaggtg ttaggctcga ctacatctcc 780

ctgcaccgaa agggcgcgcg atcttctatc agtatattgg aacaagagaa agttgtggct 840

caacaaattc gccaactttt tcccaaattc gctgataccc cgatttacaa cgacgaagcc 900

gacccattgg taggttggag tcttccccag ccttggcgag cggatgtcac ctacgcagct 960

atggtagtta aagtgattgc gcaacaccaa aatctccttc ttgccaacac gacttctgcg 1020

tttccatacg cgttgttgtc taacgacaac gccttttttgt cctatcaccc gcacccgttt 1080

gcgcagcgaa ctctgaccgc aagatttcag gttaacaata ctcggccacc acacgtacag 1140

cttttgcgca aacctgtatt gactgccatg ggattgttgg cactgttgga tgaagaacaa 1200

ctgtgggctg aagtgagcca ggcgggtaca gttctggaca gtaatcacac tgtaggcgtg 1260

ctcgccagtg ctcaccgacc acaggggccg gcagacgcct ggagagctgc tgtactcatc 1320

tacgcatcag acgataccag ggcgcatccc aatagatccg tcgccgtaac tcttcggctt 1380

cggggcgtcc cgccagggcc gggccttgtt tatgttactc gatacttaga caacggactt 1440

tgtagtcctg atggtgaatg gcgtagatta gggcggcctg tctttcctac tgcggagcag 1500

ttcagacgaa tgagggctgc tgaggaccca gttgcagctg caccccgccc gcttccggcc 1560

ggtggcagac ttacgctcag gcccgcgctt aggttgccgt ccttgttgct tgtccacgtt 1620

tgcgctcgcc cagaaaagcc gccgggacag gttacacgac ttcgggctct gcccctgacg 1680

cagggacaac tggtgcttgt ttggagtgat gaacacgtag gaagcaagtg cttgtggact 1740

tacgagatac aattcagcca agacggcaag gcttataccc ctgtttcacg caaaccttct 1800

acttttaatt tgtttgtctt ttctccggat acgggggcgg tctctgggtc atatcgcgtg 1860

agagcactcg attactgggc tagaccaggg ccatttagcg atcccgttcc ttatctggag 1920

gtgcccgtcc cgaggggtcc accaagcccc ggaaatccg 1959

<210> 25

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence

<400> 25

atgaggcccc tgaggcccag ggccgccctg ctggccctgc tggcctccct gctggccgct 60

cctcccgtgg ccccagccga ggctcctcac ctggtgcacg tggacgccgc cagggccctg 120

tggcccctga ggaggttctg gaggtccacc ggcttctgtc ctcctctgcc ccactcccaa 180

gccgaccaat acgtgctgtc ctgggaccag cagctgaacc tggcctatgt gggagctgtg 240

ccccacaggg gcatcaagca agtgaggacc cactggctgc tggagctggt gaccaccagg 300

ggctccaccg gcaggggcct gtcctacaac ttcacccacc tggacggcta cctggacctg 360

ctgagggaga accagctgct gcccggcttc gagctgatgg gctccgcctc cggccacttc 420

accgacttcg aggacaagca gcaggtgttc gagtggaagg acctggtgtc ctccctggcc 480

aggagataca tcggcagata cggcctggcc cacgtgtcca agtggaactt cgagacctgg 540

aacgagcccg accaccacga cttcgacaac gtgtccatga ccatgcaggg cttcctgaac 600

tactacgacg cctgctccga gggcctgagg gccgcctctc ctgccctgag gctgggagga 660

cctggcgact ccttccacac acctccaagg tctcccctgt cctggggcct gctgaggcac 720

tgccacgacg gcaccaactt cttcaccgga gaggctggag tgaggctgga ctacatctcc 780

ctgcaccgga agggcgccag gtcctccatc tccatcctgg agcaggagaa ggtggtggcc 840

cagcagatca ggcagctgtt ccccaagttc gccgacacac ctatctacaa cgacgaggcc 900

gatcctctgg tgggctggtc cctgccccag ccctggaggg ctgatgtgac ctatgctgcc 960

atggtggtga aggtgatcgc ccagcaccag aacctgctgc tggccaacac cacctccgcc 1020

ttcccctacg ccctgctgtc caacgacaac gccttcctgt cctaccatcc tcaccccttc 1080

gcccaaagga ccctgaccgc caggttccaa gtgaacaaca ccaggcctcc tcacgtgcag 1140

ctgctgagga agcccgtgct gaccgccatg ggcctgctgg ccctgctgga cgaggagcag 1200

ctgtgggccg aggtgtccca ggccggcacc gtgctggact ccaaccacac cgtgggcgtg 1260

ctggcctccg cccaccggcc ccagggcccc gccgacgcct ggagggccgc cgtgctgatc 1320

tacgcctccg acgacaccag ggcccacccc aacaggtccg tggccgtgac cctgaggctg 1380

aggggcgtgc ctcccggccc cggcctggtg tacgtgacca ggtatctgga caacggcctg 1440

tgctctcctg acggcgagtg gaggaggctg ggcaggcccg tgttccccac cgccgagcag 1500

ttcaggagga tgagggccgc cgaggacccc gtggccgccg ctcctcgacc cctgcctgct 1560

ggaggcaggc tgaccctgag gcccgccctg aggctgccct ccctgctgct ggtgcacgtg 1620

tgcgccaggc ccgagaagcc tcctggccag gtgaccaggc tgagggccct gcccctgacc 1680

cagggccagc tggtgctggt gtggtccgac gagcacgtgg gctccaagtg cctgtggacc 1740

tacgagatcc agttctccca ggacggcaag gcctacacac ctgtgtccag gaagccctcc 1800

accttcaacc tgttcgtgtt ctctcctgac accggcgccg tgtccggctc ctaccgagtg 1860

agggccctgg actactgggc caggcccggc cccttctccg accccgtgcc ctacctggag 1920

gtgcccgtgc ccaggggacc tccttctcct ggcaacccc 1959

<210> 26

<211> 1959

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence

<400> 26

atgagacctt taagaccacg tgctgctctg ctggctttac tcgcttcttt actggccgct 60

cctcccgtgg cccccgctga agctcctcac ttagtgcacg tggatgccgc cagagctctg 120

tggcctctga ggagattttg gaggtccact ggtttctgcc ctcctttacc ccatagccaa 180

gctgatcagt acgtgctgag ctgggatcag caactgaatt tagcctacgt cggcgctgtg 240

cctcacagag gcattaagca agtgaggacc cactggctgc tggaactggt caccactcgt 300

ggcagcactg gtagaggact cagctacaat ttcacacatt tagacggcta tctggattta 360

ctgagagaga atcagttatt acccggtttc gagctcatgg gaagcgcctc cggccatttc 420

accgacttcg aggacaagca gcaagttttc gaatggaaag atttagtgtc ctccctcgct 480

cgtaggtaca tcggaagata cggtttagcc cacgtcagca agtggaactt cgagacttgg 540

aatgagcccg atcaccacga ttttgacaat gtcagcatga ccatgcaagg ttttttaaac 600

tactacgatg cttgtagcga aggcctcaga gctgccagcc ccgctctgag actcggcgga 660

cccggtgact ccttccacac acctcctaga agccctttaa gctggggttt actgagacac 720

tgtcacgacg gcaccaactt ctttaccggc gaggccggcg ttcgtctcga ctatatctct 780

ttacatcgta agggcgctcg ttcctccatt tccatcctcg aacaagaaaa ggtggtggct 840

cagcagatta ggcaactctt ccccaagttc gccgacaccc ctatctataa tgacgaggct 900

gatcctctgg tcggctggtc tttaccccaa ccttggagag ctgatgtcac ctacgctgcc 960

atggtggtga aggtgatcgc ccagcaccag aatttattat tagctaacac cacatccgcc 1020

ttcccttacg ctctgctgtc caacgataac gccttcctca gctatcaccc tcaccccttt 1080

gcccagagaa ctttaaccgc tagattccaa gttaataaca ccagaccccc ccacgtccag 1140

ttattacgta agcccgttct gacagccatg ggtttactcg ctttactgga cgaagagcag 1200

ctgtgggctg aagtgagcca agctggcacc gtgctggata gcaaccacac agtgggcgtg 1260

ctcgccagcg ctcataggcc tcaaggaccc gctgatgctt ggagggctgc cgtgctgatc 1320

tacgccagcg acgacacaag ggctcacccc aataggtccg tggctgttac actgagactc 1380

agaggcgtcc cccccggtcc cggtttagtg tatgtgacca gatatttaga caacggactg 1440

tgctcccccg acggagagtg gagaagactg ggtcgtcccg tgtttcctac cgccgagcag 1500

tttaggagga tgagagctgc cgaggatccc gttgccgccg ccccacgtcc tttacccgcc 1560

ggcggaaggc tgacattaag acccgcttta agactgccct ctttactgct cgtgcatgtg 1620

tgtgccagac ccgaaaagcc tcccggacaa gttaccagac tgagagccct ccctctgacc 1680

caaggtcagc tggtgctggt gtggtccgac gaacacgtgg gcagcaagtg tttatggacc 1740

tatgagatcc agttctccca agatggcaaa gcttacaccc ccgtgtctcg taaacctagc 1800

accttcaatt tattcgtgtt tagccccgac accggagccg tgtccggcag ctatcgtgtg 1860

agagctttag actactgggc taggcccggc ccttttagcg atcccgtgcc ttatttagaa 1920

gtgcccgttc ccagaggacc ccccagcccc ggaaatcct 1959

<210> 27

<211> 2211

<212> DNA

<213> adeno-associated virus rh.91

<220><221> CDS

<222> (1)..(2211)

<400> 27

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc tct 48

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

1 5 10 15

gag ggc att cgc gag tgg tgg gcg ctg aaa cct gga gcc ccg aaa ccc 96

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

20 25 30

aaa gcc aac cag caa aag cag gac gac ggc cgg ggt ctg gtg ctt cct 144

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

35 40 45

ggc tac aag tac ctc gga ccc ttc aac gga ctc gac aag ggg gag ccc 192

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

50 55 60

gtc aac gcg gcg gac gca gcg gcc ctc gag cac gac aag gcc tac gac 240

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

65 70 75 80

cag cag ctc aaa gcg ggt gac aat ccg tac ctg cgg tat aac cac gcc 288

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

85 90 95

gac gcc gag ttt cag gag cgt ctg caa gaa gat acg tct ttt ggg ggc 336

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

100 105 110

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aag aag cgg gtt ctc gaa cct 384

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

115 120 125

ttt ggt ctg gtt gag gaa gca gct aag acg gct cct gga aag aaa cgt 432

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

130 135 140

ccg gta gag cag tcg ccc caa gaa cca gac tcc tcc tcg ggc att ggc 480

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

145 150 155 160

aaa tca ggc cag cag ccc gcc aaa aag aga ctc aat ttc ggt cag act 528

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

165 170 175

ggc gac tca gag tca gtc ccc gac cct caa cct ctc gga gaa cct cca 576

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

180 185 190

gaa acc ccc gct gct gtg gga cct act aca atg gct tca ggc ggt ggc 624

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

195 200 205

gca cca atg gca gac aat aac gaa ggc gcc gac gga gtg ggt aat gcc 672

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

210 215 220

tca gga aat tgg cat tgc gat tcc aca tgg ctg ggc gac aga gtc atc 720
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile

225 230 235 240

acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctt cct acc tac aac aac cac ctc 768
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu

245 250 255

tac aag caa atc tcc agc gct tca acg ggg gcc agt aac gac aac cac 816
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Ala Ser Thr Gly Ala Ser Asn Asp Asn His

260 265 270

tac ttt ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gat ttc aac aga ttc 864
Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe

275 280 285

cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg cag cga ctc att aac aac aac 912
His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn

290 295 300

tgg gga ttc cgg ccc aag aga ctc aac ttc aag ctc ttc aac atc cag 960
Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln

305 310 315 320

gtc aag gag gtc acg acg aat gat ggc gtc aca acc atc gct aat aac 1008
Val Lys Glu Val Thr Thr Asn Asp Gly Val Thr Thr Ile Ala Asn Asn

325 330 335

ctt acc agc acg gtt caa gtg ttc tcg gac tcg gag tac cag ctg ccg 1056
Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Ser Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro

340 345 350

tac gtc ctc ggt tct gcg cac cag ggc tgc ctc cct ccg ttc ccg gcg 1104
Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala

355 360 365

gac gta ttc atg att cct cag tac ggc tac cta acg ctc aac aat ggc 1152
Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly

370 375 380

agc cag gcc gta gga cgt tca tcc ttt tat tgc ctg gaa tat ttc cca 1200
Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro
385 390 395 400
tct caa atg ctg aga acg ggc aac aac ttt acc ttc agc tac acc ttt 1248
Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415
gaa gat gtg cct ttc cac agc agt tac gcg cac agc cag agc ctg gac 1296

Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430
agg cta atg aat cct cta atc gac cag tac ctg tat tac cta aac aga 1344
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445
act cag aat caa tcc gga agt gca caa aac aag gac ttg ctg ttt agc 1392
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser

450 455 460
cgg ggg tct cca gct ggc atg tct gtt cag ccc aaa aac tgg cta ccc 1440
Arg Gly Ser Pro Ala Gly Met Ser Val Gln Pro Lys Asn Trp Leu Pro
465 470 475 480
ggg ccc tgt tac cga cag cag cgt gtt tct aaa aca aaa aca gac aac 1488
Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Lys Thr Asp Asn
485 490 495

aac aac agc aac ttt acc tgg act ggt gcc tcc aaa tac aat ctg aac 1536
Asn Asn Ser Asn Phe Thr Trp Thr Gly Ala Ser Lys Tyr Asn Leu Asn
500 505 510
gga cgt gaa tcc atc att aac cct ggc acc gct atg gca tcc cac aag 1584
Gly Arg Glu Ser Ile Ile Asn Pro Gly Thr Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
gac gac gaa gac aaa ttt ttt ccc atg agc ggt gtt atg att ttt ggc 1632

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

530 535 540

aaa gaa aat gca gga gca tca aac act gca tta gac aat gtt atg att 1680

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

545 550 555 560

aca gat gaa gag gaa att aaa gct acc aac ccc gtg gcc acc gag aga 1728

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

565 570 575

ttt gga act gtg gca gtc aat ctc caa agc agc aat aca gac cct gca 1776

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

580 585 590

aca gga gac gtg cat gtc atg ggg gct tta cct ggc atg gtg tgg caa 1824

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

595 600 605

gac aga gac gtg tac ctg cag ggt ccc att tgg gcc aag att cct cac 1872

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

610 615 620

acg gat gga cac ttt cac ccg tct cct ctt atg ggc ggc ttt gga ctt 1920

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

625 630 635 640

aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac acg cct gtt cct gcg 1968

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

645 650 655

aat cct ccg gca gag ttt tcg gct aca aag ttt gct tca ttc atc acc 2016

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

660 665 670

cag tac tcc aca gga caa gtg agc gtg gaa att gaa tgg gag ctg cag 2064

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

675 680 685

aaa gaa aac agt aag cgc tgg aat cct gaa gtg cag tac acc tcc aac 2112

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

690 695 700

tac gcg aaa tct gcc aac gtt gat ttc act gtg gac aac aat gga ctt 2160
Tyr Ala Lys Ser Ala Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Asn Asn Gly Leu
705 710 715 720

tat act gag cct cgc ccc att ggc acc cgt tac ctt acc cgt ccc ctt 2208
Tyr Thr Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Pro Leu
725 730 735

taa 2211

<210> 28

<211> 736

<212> PRT

<213> adeno-associated virus rh.91

<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 Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

385 390 395 400

Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe
405 410 415
Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp
420 425 430
Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg
435 440 445
Thr Gln Asn Gln Ser Gly Ser Ala Gln Asn Lys Asp Leu Leu Phe Ser
450 455 460

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

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

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

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

Asn Pro Pro Ala Glu Phe Ser Ala Thr Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
660 665 670

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

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

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

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

<210> 29

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> synthetic construct

<400> 29

atggctgctg acggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctttctga aggcattcgt 60

gagtggtggg ctctgaaacc tggagcccct aaacccaaag cgaaccaaca aaagcaggac 120

gacggccggg gtcttgtgct tccgggttac aaatacctcg gacccttcaa cggactcgac 180

aaaggagagc cggtcaacgc ggcggacgcg gcagccctcg aacacgacaa agcttacgac 240

cagcagctca aggccggtga caacccgtac ctccggtaca accacgccga cgccgagttt 300

caggagcgtc ttcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc ttggcagagc agtcttccag 360

gccaaaaaga gggttcttga gccttttggt ctggttgagg aagcagctaa aacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcatcatc tggtattggc 480

aaatcgggcc agcagcctgc caaaaaaaga ctaaatttcg gtcagactgg cgactcagag 540

tcagtccccg accctcaacc tctcggagaa cctccagaaa cccccgctgc tgtgggacct 600

actacaatgg cttcaggcgg tggcgcacca atggcagaca ataacgaagg cgccgacgga 660

gtgggtaatg cctcaggaaa ttggcattgc gattccacat ggctgggcga cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggcccttcct acctacaaca accacctcta caagcaaatc 780

tccagcgctt caacgggggc cagtaacgac aaccactact ttggctacag cacccccctgg 840

gggtattttg atttcaacag attccactgc cacttctcac cacgtgactg gcagcgactc 900

attaacaaca actggggatt ccggcccaag agactcaact tcaagctctt caacatccag 960

gtcaaggagg tcacgacgaa tgatggcgtc acaaccatcg ctaataacct taccagcacg 1020

gttcaagtgt tctcggactc ggagtaccag ctgccgtacg tcctcggttc tgcgcaccag 1080

ggctgcctcc ctccgttccc ggcggacgta ttcatgattc ctcagtatgg atacctcacc 1140

ctgaacaacg gaagtcaagc ggtgggacgc tcatcctttt actgcctgga gtacttccct 1200

tcgcagatgc taaggactgg aaataacttc accttcagct ataccttcga ggatgtacct 1260

tttcacagca gctacgctca cagccagagt ttggatcgct tgatgaatcc tcttattgat 1320

cagtatctgt actacctgaa cagaacgcaa aatcaatctg gaagtgcaca aaacaaggac 1380

ctgcttttta gccgggggtc tcctgctggc atgtctgttc agcccaaaaa ttggctacct 1440

gggccctgct accggcaaca gagagtttca aagactaaaa cagacaacaa caacagtaac 1500

tttacctgga caggtgccag caaatataat ctcaatggcc gcgaatcgat cattaatcca 1560

ggaaccgcta tggccagtca caaggacgat gaagacaaat ttttccctat gagcggcgtt 1620

atgatatttg gcaaagaaaa tgcaggagca agtaacactg cattagataa tgtaatgatt 1680

acggatgaag aagagattaa agctaccaat cctgtggcaa cagagagatt tggaactgtg 1740

gcagtcaact tgcagagctc aaatacagac cccgcaactg gagacgtcca tgtcatgggg 1800

gccttacctg gcatggtgtg gcaagatcgt gacgtgtacc ttcaaggacc tatctgggca 1860

aagattcctc acacggatgg acactttcat ccttctcctc tgatgggagg ctttggactg 1920

aaacatccgc ctcctcaaat cctcatcaaa aatactccgg taccggcaaa tcctccggca 1980

gagttcagcg ctacaaagtt tgcttcattt atcactcagt actccactgg acaggtcagc 2040

gtggaaattg agtgggagct acagaaagaa aacagcaaac gttggaatcc agaggtgcag 2100

tacacttcca actacgcgaa gtctgccaat gtggacttta ctgtagacaa caatggtctt 2160

tatactgaac ctcgccctat tggaacccgg tatctcacac gacccttgta a 2211