(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0170022
(43) 공개일자 2023년12월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) *C12N 15/113* (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0016 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7038538
(22) 출원일자(국제) 2022년04월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2023년11월08일
(86) 국제출원번호 PCT/US2022/024415
(87) 국제공개번호 WO 2022/221276
국제공개일자 2022년10월20일
(30) 우선권주장
63/293,505 2021년12월23일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베니아
미국 펜실베니아 필라델피아 (우편번호 19104) 월넛 스트리트 3451 7플로어
(72) 발명자
윌슨 제임스 엠.
미국 펜실베니아 19103 필라델피아 델란시 스트리트 1831
힌더러 크리스티안
미국 메릴랜드 21217 볼티모어 웨스트 라파예트 애비뉴 200
워크맨 에일린
미국 펜실베니아 19123 필라델피아 노스 델라웨어 애비뉴 800 아파트먼트 611
(74) 대리인
특허법인와이에스장

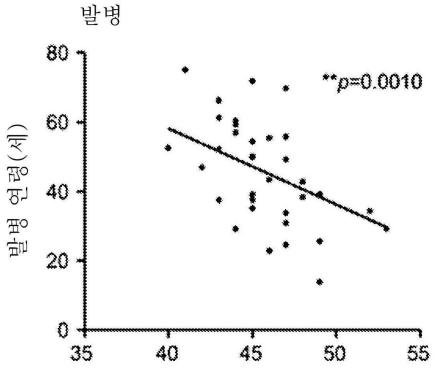
전체 청구항 수 : 총 33 항

(54) 발명의 명칭 **척수 및 연수 근위축증(SBMA) 치료에 유용한 조성물**

(57) 요 약

AAV 캡시드, 그리고 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 인코딩하는 서열을 포함하는 벡터 게놈을 포함하며, miRNA가 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)의 투여를 포함하는 척수 및 연수 근위축증(SBMA) 치료에 유용한 조성물이 제공된다. 또한, rAAV 벡터를 함유하는 조성물 및 rAAV 벡터의 투여를 포함하는 환자의 SBMA를 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A61K 48/0075 (2013.01)
A61K 48/0083 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
C12N 15/1138 (2013.01)
C12N 2310/141 (2013.01)
C12N 2330/50 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2830/48 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(30) 우선권주장
63/187,883 2021년05월12일 미국(US)
63/173,885 2021년04월12일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

벡터 게놈이 패키징되는 AAVhu68 캡시드를 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV)로서, 상기 벡터 게놈은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하며, 상기 핵산 서열은 대상체에서 상기 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, 상기 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하며, 상기 발현 카세트는 측부 영역에 5’ AAV ITR 및 3’ AAV ITR을 갖는 AAV.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 miRNA 표적 부위는

a) GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1); 또는

b) CTA CAT CAA GGA ACT CGA TCG(서열식별번호: 27)를 포함하는 AAV.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 AAV.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 AAV.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 4 또는 서열식별번호: 5 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 AAV.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 11 또는 서열식별번호: 12 또는 최대 60개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 AAV.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 프로모터, 인트론, WPRE 및 폴리 A 중 하나 이상을 포함하는 AAV.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 프로모터는 CB7 프로모터인 AAV.

청구항 9

제7항 또는 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 WPRE를 포함하는 AAV.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 인트론을 포함하는 AAV.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 토끼 베타 글로빈 폴리 A를 포함하는 AAV.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV 및 약제학적으로 허용 가능한 수성 현탁액, 부형제 및/또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 13

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV 또는 제12항에 따른 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 단계를 포함하는 척수 및 연수 근위축증(SBMA)을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법.

청구항 14

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV 또는 제12항 또는 제25항에 따른 조성물을 척수 및 연수 근위축증(SBMA)을 갖는 환자의 치료에 사용하는 용도.

청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 상기 조성물은 상기 rAAV의 1×10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33×10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량으로 척수강내로 투여되도록 제제화되는 방법 또는 용도.

청구항 16

제13항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 성인이며 상기 rAAV의 1.44×10^{13} 내지 4.33×10^{14} GC의 투여량으로 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 17

제13항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달되는 방법 또는 용도.

청구항 18

제13항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)로 단일 투여량으로 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 19

제13항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 SBMA를 갖는 방법 또는 용도.

청구항 20

제13항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 AAV 또는 제12항에 따른 조성물이 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 21

제13항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 척수강내로 상기 rAAV의 1×10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33×10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량이 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 22

제13항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 환자는 성인이며 상기 rAAV의 1.44×10^{13} 내지 4.33×10^{14} GC의 투여량으로 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 23

제13항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 miR 코딩 서열을 포함하는 상기 rAAV는 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달되는 방법 또는 용도.

청구항 24

제13항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)로 단일 투여량으로 투여되는 방법 또는 용도.

청구항 25

인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트로서, 상기 핵산 서열은 대상체에서 상기 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, 상기 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하며, 상기 발현 카세트는 측부 영역에 5' AAV ITR 및 3' AAV ITR을 갖는 발현 카세트.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 miRNA 표적 부위는

a) GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1); 또는

b) CTA CAT CAA GGA ACT CGA TCG(서열식별번호: 27)를 포함하는 발현 카세트.

청구항 27

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

청구항 28

제25항 또는 제26항에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

청구항 29

제25항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 프로모터, 인트론, WPRE 및 폴리 A 중 하나 이상을 포함하는 발현 카세트.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 프로모터는 CB7 프로모터인 발현 카세트.

청구항 31

제29항 또는 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 WPRE를 포함하는 발현 카세트.

청구항 32

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 인트론을 포함하는 발현 카세트.

청구항 33

제29항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조절 서열은 토끼 베타 글로빈 폴리 A를 포함하는 발현 카세트.

발명의 설명

기 술 분 야

배 경 기 술

[0001] 척수 및 연수 근위축증(본원에서 SBMA 또는 케네디병으로 지칭됨)은 안드로겐 수용체(AR)의 엑손 1 내의 폴리글루타민(CAG) 확장 관에 의해 야기되는 X와 연관되는 서서히 진행되는 운동 신경 질환이다. 확장은 안드로겐 매

개 독성 활성화로 인해 거의 독점적으로 남성의 운동 뉴런 퇴화를 야기하는 AR 단백질의 핵 응집을 초래한다. 현재까지, SBMA에 대한 효과적인 치료법은 승인되지 않았다. 뉴런에서 안드로겐 수용체의 녹다운이 유해 효과를 초래하는 것으로 알려져 있지 않기 때문에 SBMA에서 AR 수준을 낮추는 것은 질환 치료를 위한 매력적인 전략이다.

[0002] 파보바이러스 패밀리의 구성원인 아데노-연관 바이러스(AAV)는 약 4.7 킬로베이스(kb) 길이의 단일 가닥 선형 DNA(ssDNA) 게놈을 갖는 소형 비외피 이십면체 바이러스이다. 야생형 게놈은 DNA 가닥의 양 말단의 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat; ITR) 및 2개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame; ORF)인 *rep* 및 *cap*을 포함한다. *Rep*은 AAV 생활 주기에 필요한 rep 단백질을 코딩하는 4개의 중첩 유전자로 구성되며, *cap*은 캡시드 단백질: VP1, VP2 및 VP3의 중첩 뉴클레오타이드 서열을 함유하며, 이는 자가 조립되어 이십면체 대칭을 형성한다.

[0003] AAV는 바이러스가 정제된 아데노바이러스 스톡(stock)에서 오염물질로서 발견되었기 때문에 데펜도바이러스(*Dependovirus*) 속에 속한다. AAV의 생활사는 감염 후 AAV 게놈이 특정 부위로 숙주 염색체에 통합되는 잠복기 및 아데노바이러스 또는 단순 포진 바이러스 감염 후에 통합된 게놈이 후속적으로 구조(rescued), 복제 및 감염 바이러스에 패키징되는 감염기를 포함한다. 비병원성, 비분할 세포를 포함하는 광범위 숙주 감염성 및 잠재적 부위-특이적 염색체 통합의 특성은 AAV를 유전자 전달을 위한 매력적인 도구로 만든다.

[0004] SBMA 치료를 위한 치료제가 바람직하다.

발명의 내용

[0005] SBMA와 연관되는 증상의 치료 및/또는 감소를 필요로 하는 인간 환자에서 이와 연관되는 증상을 치료 및/또는 감소시키는 데 유용한 치료적, 재조합(r), 복제-결함, 아데노-연관 바이러스(AAV)가 제공된다. rAAV는 바람직하게는 복제-결함이 있으며, 안드로겐 수용체를 표적화하는 miRNA를 발현하는 벡터 게놈을 운동 뉴런으로 운반한다.

[0006] 일 양태에서, 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 본원에서 제공된다. 코딩 서열은 대상체에서 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, miRNA 표적 부위는 GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1) 또는 서열식별번호: 1과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(또는 절단)을 갖는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2 - 3610 표적화 서열)의 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3 - 3613 표적화 서열)의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, miRNA 표적화 서열은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위와 정확한 상보성보다 적은 상보성을 공유한다. 일부 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 a) TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2 - 3610)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열; 또는 b) CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3 - 3613)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 4(3610-64량체) 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 5(3613-64량체) 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0007] 다른 양태에서, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)가 제공된다. rAAV는 벡터 게놈이 패키징되는 AAV 캡시드를 포함하며, 벡터 게놈은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함하며, 발현 카세트는 측부 영역에 5’ AAV ITR 및 3’ AAV ITR을 갖는다. 특정 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV9, AAVhu68, AAV1 및 AAVrh91로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAVhu68이다.

[0008] 다른 양태에서, 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 조성물이 제공되며, 핵산 서열은 대상체에서 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제한다. 일 실시양태에서, 조성물은 약제학적 조성물이며 약제학적으로 허용 가능한 수성 현탁액, 부형제 및/또는 희석제를 포함한다.

[0009] 다른 양태에서, 척수 및 연수 근위축증(SBMA)이 있는 대상체를 치료하기 위한 방법이 제공된다. 방법은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화

서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트, 벡터, rAAV 또는 조성물의 유효량을 SBMA가 있는 대상체에게 전달하는 단계를 포함한다. 일 실시양태에서, 표적 부위는 서열식별번호: 1의 서열 또는 서열식별번호: 1과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(또는 절단)을 갖는 서열을 갖는다.

[0010] 다른 양태에서, 발현 카세트, 벡터, rAAV 또는 조성물을 척수 및 연수 근위축증(SBMA)이 있는 환자의 치료에 사용하는 용도가 제공된다. 발현 카세트, 벡터, rAAV 또는 조성물은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. 일 실시양태에서, 표적 부위는 서열식별번호: 1의 서열 또는 서열식별번호: 1과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(또는 절단)을 갖는 서열을 갖는다.

[0011] 다른 양태에서, 척수 및 연수 근위축증이 있는 인간 환자를 치료하는 방법이 제공된다. 방법은 중추 신경계(CNS)에 아데노-연관 바이러스 hu.68(AAVhu.68)의 AAV 캡시드를 갖는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 전달하는 단계를 포함하며, 상기 rAAV는 AAV 캡시드 내 패키징되는 벡터 게놈을 더 포함하고, 상기 벡터 게놈은 AAV 반전 말단 반복부, 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열(miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제함), 및 상기 miRNA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함한다. 일 실시양태에서, miRNA는 miR 3610이다. 다른 실시양태에서, miRNA는 miR 3163이다. 일 실시양태에서, 환자는 척수강내로 rAAV의 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량이 투여된다. 다른 실시양태에서, 환자는 성인이며 rAAV의 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC의 투여량으로 투여된다. 다른 실시양태에서, miR 코딩 서열을 포함하는 rAAV는 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달된다. 다른 실시양태에서, rAAV는 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)로 단일 투여량으로 투여된다.

[0012] 본 발명의 이러한 및 다른 양태는 본 발명의 하기 상세한 설명으로부터 명백하게 된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a 내지 도 1d는 SBMA 발병이 CAG 반복부 수와 상관관계가 있음을 나타내는 4개의 그래프이다.

도 2a 내지 도 2c는 SBMA 질환 진행 속도가 <47 CAG 또는 >47 CAG 반복부를 갖는 모든 환자에 대해 유사함을 나타내는 3개의 그래프이다. 그래프는 각 증상을 나타내는 환자의 비율 대 연령을 나타낸다. 군은 <47 반복부 또는 >47 반복부를 갖는 환자로 나뉜다.

도 3a 내지 도 3d는 SBMA 질환 진행 속도가 <47 CAG 또는 >47 CAG 반복부를 갖는 모든 환자에 대해 유사함을 나타내는 4개의 그래프이다. 첫 증상(쇠약)부터 계단을 오르기 위한 난간 필요, 지팡이 사용, 휠체어 의존 및 사망까지의 시간은 환자 사이에서 재현성이 높다. >47 CAG 반복부를 갖는 환자는 더 일찍 발병하나 진행은 동일하다.

도 4a 내지 도 4b는 HEK293 세포에서 AR 표적화 miRNA의 스크리닝 결과를 나타낸다. HEK293 세포는 시험관 내 블록-iT 플라스미드로 형질감염되었다. 블록-IT 플라스미드는 CMV 프로모터, emGFP, miRNA 및 TK 폴리A에 대한 클로닝 부위를 함유한다. miRNA를 블록-iT 온라인 소프트웨어를 사용하여 설계하였다. 도 4a는 여러 개별 miRNA의 녹다운 후 안드로겐 수용체의 mRNA 수준을 나타낸다. 도 4b는 여러 개별 miRNA의 녹다운 후 안드로겐 수용체의 단백질 수준을 나타낸다. mRNA 및 단백질 데이터는 모두 miR 3610이 시험관 내에서 안드로겐 수용체를 녹다운되게 하는 효과적인 miRNA임을 강조한다.

도 5a 내지 도 5c는 마우스 내 투여의 평가를 나타낸다. 도 5a에서, 신생아 마우스에 PBS 또는 miR NeuN을 1e11 GC로 ICV를 통해 주사하였다. 뇌를 14일차에 채취하였으며 NeuN 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 위해 처리하였다. β-액틴을 로딩 대조군으로서 사용하였다. 도 5b는 각 군에서 NeuN의 백분율로서 단백질의 정량화를 나타낸다. 도 5c에서, 성체 마우스에 PBS, AAV.CB7.miR.NeuN 또는 AAV.CB57.GFP를 3e11 GC로 IV를 통해 주사하였다. 뇌를 14일차에 채취하였으며 NeuN 항체를 사용하여 웨스턴 블롯 분석을 위해 처리하였다. 산점도 그래프는 각 군에서 NeuN의 백분율로서 단백질의 정량화를 나타낸다.

도 6a 내지 도 6c는 miR 3610을 통한 안드로겐 수용체의 녹다운 효율을 나타낸다. 야생형 마우스에 3e11 GC의 AAV.PHP.eB.CB7.miR을 미부 정맥을 통해 주사하였다. 뇌 및 척수를 14일차에 채취하였으며 RNA 및 단백질 분석을 위해 처리하였다. 도 6a 및 도 6b는 PBS 및 miR 3610 처리된 뇌의 안드로겐 수용체 mRNA 발현 수준을 나타낸

다 도 6a(% 대조군); 도 6b(배수 발현). 도 6c는 PBS 및 miR 3610 처리된 뇌의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다.

도 7a 내지 도 7e는 뇌 및 척수에 있는 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 2개의 miRNA를 비교한다. 성체 수컷 야생형 마우스(6주령 내지 8주령)에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 또는 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.AR.miR3613.WPRE.rBG의 단일 IV 투여를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 투여하였다(N=5/군). 추가로 야생형 마우스에 대조군(N=5)으로서 비히클(PBS)을 투여하였다. 14일차에, 마우스를 부검하였다. 뇌의 1개의 반구를 AR mRNA 발현을 평가하기 위해 수집하였다(TaqMan qPCR). 도 7a는 PBS 처리된 뇌, miR 3610 처리된 뇌 또는 miR3613 처리된 뇌의 안드로겐 수용체 mRNA 발현 수준을 나타낸다. 각 동물의 발현 배수 변화를 비교 Ct 방법을 기반으로 계산하였고 Gapdh로 정규화하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다. 도 7b는 PBS 처리된 척수, miR 3610 처리된 척수 또는 miR3613 처리된 척수의 안드로겐 수용체 mRNA 발현 수준을 나타낸다. 도 7c 및 도 7d는 miR NT 및 miR 3610 처리된 뇌(C) 또는 miR3613 처리된 뇌(D)의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다. 도 7e는 네 군 모두에서 안드로겐 단백질 수준의 정량화를 백분율로 나타낸다.

도 8은 CB7 및 Syn의 프로모터 효율을 평가한다. 야생형 마우스에 3e11 GC의 다음의 벡터: AAV9-PHP.eB.CB7.CI.miR.NT.WPRE.rBG, AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG, AAV9-PHP.eB.Syn.PI.miR.NT.WPRE.bGH 또는 AAV9-PHP.eB.hSyn.PI.hARmiR3610.WPRE.bGH를 주사하였다. 척수를 14일차에 채취하였으며 RNA 단리 및 qPCR을 위해 처리하였다. 그래프는 대조군과 비교하여 2개의 프로모터의 안드로겐 수용체의 녹다운 효율을 나타낸다.

도 9a 내지 도 9b는 AR97Q SBMA 전이유전자 마우스 군집의 안드로겐 수용체 단백질 수준 및 생존기간을 나타낸다. 도 9a에서, 척수를 전이유전자 마우스으로부터 채취하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 블롯은 AR97Q WT 및 HET 수컷 및 암컷 마우스의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다. 도 9b는 수컷 및 암컷 AR97Q 전이유전자 마우스에 대한 생존기간 도표를 나타낸다.

도 10a 내지 도 10c는 AR97Q SBMA 전이유전자 마우스에서 miR 3610의 효과를 나타낸다. 5주령 내지 6주령 수컷 전이유전자 마우스에 3e11 GC의 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 미부 정맥을 통해 주사하였거나 마우스를 주사하지 않은 채로 두었다. 마우스의 생존기간을 추적하였다. 뇌를 채취하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 도 10a는 두 군 모두의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다. 연령은 주사 후 뇌를 채취한 시기를 나타낸다. 도 10b는 주사되지 않은 군과 비교하여 처리된 마우스에서 두 가지 형태의 안드로겐 수용체의 단백질 정량화를 나타낸다. 도 10c는 주사되지 않은 마우스 및 처리된 마우스에 대한 생존기간 도표를 나타낸다.

도 11a 내지 도 11c는 AR97Q SBMA 전이유전자 마우스에서 miR 3610의 효과를 나타낸다. 3주령 수컷 전이유전자 마우스에 3e11 GC의 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 안와후 정맥(ROV)을 통해 주사하였거나 마우스를 주사하지 않은 채로 두었다. 마우스의 생존기간을 추적하였다. 뇌를 채취하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 도 11a는 처리된 마우스 및 AR97Q 전이유전자 마우스에 대한 생존기간 도표를 나타낸다. 도 11b는 두 군 모두의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다. 연령은 주사 후 뇌를 채취한 시기를 나타낸다. 도 11c는 주사되지 않은 군과 비교하여 처리된 마우스에서 두 가지 형태의 안드로겐 수용체의 단백질 정량화를 나타낸다.

도 12a 내지 도 12i는 AR97Q SBMA 신생아 전이유전자 마우스에서 miR 3610의 효과를 나타낸다. 성별 및 유전형이 알려지지 않은 신생아 전이유전자 마우스에 3e11 GC의 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG(군 2)를 측두 정맥을 통해 또는 PBS(군 1)를 주사하였다. 마우스의 생존기간을 추적하였으며 유전형/성별을 결정하였다. 뇌를 채취하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 각 군의 수컷 마우스는 대략 3개월령에 줄에 매달리는 비교시험(wire hang test)을 거쳤다. 도 12a는 두 군 모두의 안드로겐 수용체 단백질 수준을 나타낸다. 도 12b 및 도 12c는 암컷(B) 및 수컷(C)에 대한 두 군 모두에 대한 생존기간 도표를 나타낸다. 도 12d는 수컷 WT SBMA 마우스 척수의 마우스 AR 발현, 웨스턴 블롯 및 정량화 도표를 나타낸다. 도 12e는 암컷 het SBMA 마우스 척수의 인간 및 마우스 AR 발현, 웨스턴 블롯 및 정량화 도표를 나타낸다. 도 12f는 암컷 WT SBMA 마우스 척수의 마우스 AR 발현, 웨스턴 블롯 및 정량화 도표를 나타낸다. 도 12g 및 도 12h는 시간 경과에 따른 수컷(G) 및 암컷(H)에 대한 PBS 또는 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 투여한 HET 및 WT 마우스의 체중을 나타낸다. 도 12i에서, 각 군의 수컷 마우스는 대략 3개월령에 줄에 매달리는 비교시험을 거쳤다. 마우스를 케이지 상단의 상단에 배치한 후 뒤집어 홈 케이지 위에 배치한다. 마우스 낙하 시기까지의 지연 시간을 초 단위로 기록하였다.

도 13a 내지 도 13c는 비인간 영장류(NHP)에서 miR 3610의 효과를 입증한다. 5세 수컷 붉은털 원숭이에 3e13 GC의 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 ICM으로 주사하였다. 35일차에 동물을 안락사하고 척수 및 간을 채

취하였다. 척수를 레이저 포착 현미해부(LCM)를 위해 처리하였다. 운동 뉴런을 척수 부분으로부터 절단하여 qPCR을 위해 처리하였다. 또한, 간을 qPCR을 위해 처리하였다. 척수(A) 및 간(B) 모두 miR 3610으로 처리한 후 안드로겐 수용체의 효과적인 녹다운을 나타낸다. 도 13c 또한, 붉은털 원숭이 AR 단백질 발현을 대조군 동물에 대한 발현 백분율을 기반으로 간 검체에서 측정(웨스턴 블롯)하였다. 발현을 β-액틴으로 정규화하였다. 오차 막대는 표준 편차를 나타낸다.

도 14a 내지 도 14d는 실시예 9에서 설명되는 실험의 결과를 나타낸다. 도 14a는 PBS 및 pAAV.CB7.CI.AR.miR3610.WPRE.RBG 처리된 SBMA 수컷 마우스에 대한 생존기간 곡선을 나타낸다. 도 14b, 도 14c 및 도 14d는 PBS 및 벡터 처리된 마우스에 대한 낙하까지의 지연시간(초)을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 대상체에게 대상체의 인간 안드로겐 수용체 유전자 또는 전사체에 있는 부위를 특이적으로 표적화하는 적어도 하나의 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 투여하기 위한 서열, 벡터 및 조성물이 본원에서 제공된다. 신규 miRNA 서열 및 이를 포함하는 작제물이 본원에서 제공된다. 이들은 SBMA의 치료를 위해 단독으로 또는 서로 및/또는 다른 치료제와 조합하여 사용될 수 있다.

[0015] 본원에서 사용되는 용어 “안드로겐 수용체”는 인간에서 단백질 안드로겐 수용체(AR)를 코딩하는 안드로겐 수용체(*AR*) 유전자를 지칭한다[서열식별번호: 6에서 재생성됨](Uniprot P10275-1). 안드로겐 수용체(AR)는 리간드 의존성 핵 전사 인자이고 스테로이드 호르몬 핵 수용체 패밀리의 구성원이며 광범위한 세포 및 조직에서 발현됩니다. AR 단백질은 활성화 클래스 I 스테로이드 수용체로 지칭되는 핵 수용체 클래스에 속하며, 이는 글루코코르티코이드 수용체, 프로게스테론 수용체 및 미네랄코르티코이드 수용체도 포함한다. 이러한 수용체는 표준 안드로겐 반응 요소(ARE)를 인식한다. AR의 주요 도메인은 활성화 기능-1(AF-1) 및 AF-2로 지정된 N-말단 및 C-말단 활성화 도메인, 리간드 결합 도메인 및 폴리글루타민 관을 포함한다. 이러한 유전자는 다음과 같이 지칭될 수도 있다: 디하이드로테스토스테론 수용체(DHTR); 핵 수용체 서브패밀리 3, 군 C, 구성원 4(NR3C4). (OMIM.ORG/entry/313700 참조)

[0016] 케네디병으로도 알려져 있는 X 연관 척수 및 연수 근위축증(SBMA, SMAX1)은 안드로겐 수용체(AR; 313700.0014)를 코딩하는 유전자의 엑손 1에 있는 트라이클레오타이드 CAG 반복부 확장으로 인해 야기된다. CAG 반복부 수는 SBMA 환자에서 38개 내지 62개인 반면, 건강한 개체는 CAG 반복부 수가 10개 내지 36개이다. SBMA 발병은 CAG 반복부 수와 상관관계가 있는 것으로 나타났다(도 1a 내지 도 1d; Fratta P, Nirmalananthan N, Masset L 등 Correlation of clinical and molecular features in spinal bulbar muscular atrophy. Neurology. 2014;82(23):2077-2084. doi:10.1212/WNL.0000000000000507, 이는 참조에 의해 본원에 원용됨). 그러나, 진행 속도는 모든 환자 사이에서 유사하다(도 2a 내지 도 3d; Natural history of spinal and bulbar muscular atrophy (SBMA): a study of 223 Japanese patients; Brain. 2006;129(6):1446-1455, 이는 참조에 의해 본원에 원용됨).

[0017] 내인성 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 인공 마이크로RNA(miRNA)를 발현하는 벡터가 본원에서 설명된다. SBMA의 전이유전자 마우스 모델에서, 이러한 벡터는 척수에서 돌연변이 안드로겐 수용체의 발현을 극적으로 감소시키고 운동 기능 및 생존기간을 향상시키는 것으로 나타났다.

[0018] 본원에서 사용되는 "miRNA"는 메신저 RNA(mRNA)를 조절하여 단백질 번역을 억제하는 소형 비코딩 RNA 분자인 마이크로RNA를 지칭한다. miRNA는 전miRNA(pre-miRNA) 헤어핀 구조(스템 루프로도 지칭됨)로 존재하며, 이는 결국 성숙한 miRNA로 처리된다. 본원에서 사용되는 용어 "miRNA" 및 "miR"은 처리되지 않은 또는 성숙한 miRNA(또는 이를 코딩하는 서열)를 지칭하는 데 사용될 수 있다. 일반적으로, 헤어핀 형성 RNA는 루프 서열에 의해 안티센스 가닥(예를 들어, 가이드 가닥)에 연결되는 센스 가닥(예를 들어, 패신저 가닥)을 포함하는 듀플렉스(duplex)를 갖는 스템 부분을 코딩하는 단일 핵산을 포함하는 자가 상보성 “스템 루프” 구조를 갖는다. 패신저 가닥 및 가이드 가닥은 상보성을 공유한다. 일부 구현예에서, 패신저 가닥 및 가이드 가닥은 100% 상보성을 공유한다. 일부 구현예에서, 패신저 가닥 및 가이드 가닥은 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99% 상보성을 공유한다. 패신저 가닥 및 가이드 가닥은 염기 쌍 불일치로 인해 상보성이 결여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 헤어핀 형성 RNA의 패신저 가닥 및 가이드 가닥은 적어도 1개, 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개 또는 적어도 10개의 염기 쌍 불일치를 갖는다.

[0019] 일반적으로, (루프 대비) 스템의 처음 2개 내지 8개의 뉴클레오타이드는 "시드(seed)" 잔기로 지칭되며 표적 인

식 및 결합에 중요한 역할을 한다. (루프 대비) 스템의 첫 번째 잔기는 "앵커" 잔기로 지칭된다. 일부 구현예에서, 헤어핀-형성 RNA는 앵커 잔기에서 미스매치를 갖는다. 본원에서 사용되는 miRNA는 상보적 염기 쌍에 의해 (예를 들어, 인간 안드로겐 수용체에서) 표적 mRNA에 특이적으로 결합하여 mRNA의 파괴 또는 침묵을 유발하는 뉴클레오티드 영역인 "시드 서열"을 포함한다. 이러한 침묵은 내인성 hAR의 완전한 소실보다는 하향 조절을 초래할 수 있다. 본원에서 제공되는 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함한다. 표적화 서열은 시드 서열을 포함한다.

[0020] 본원에서 제공되는 코딩된 miRNA는 SBMA를 갖는 환자의 내인성 인간 안드로겐 수용체 유전자를 특이적으로 표적화하도록 설계되었다. 특정 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 다음 표 1의 안티 센스 서열을 포함한다.

표 1

[0021]

miR #	표적 hAR 서열	서열번호	miRNA 안티센스 서열	서열번호
3610	GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA	1	TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC	2
3613	CTA CAT CAA GGA ACT CGA TCG	27	CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG	3

[0022] 본원에서 사용되는 “miRNA 표적 부위”, “표적 서열” 또는 “표적 영역”은 (예를 들어, hAR의) DNA 양성 가닥(5'에서 3'로)상에 위치되는 서열이며 miRNA 시드 서열(또는 표적화 서열)을 포함하는 miRNA 서열에 대해 적어도 부분적으로 상보적이다. 전형적으로, miRNA 표적 서열은 적어도 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드, 7개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 8개의 뉴클레오타이드 내지 18개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 약 20개 내지 약 26개의 뉴클레오타이드, 약 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개 또는 26개의 뉴클레오타이드이며 miRNA 시드 서열에 대해 상보적인 적어도 하나의 연속 영역(예컨대, 7개 또는 8개의 뉴클레오타이드)을 함유한다. 특정 실시형태에서, 표적 서열은 일부 비스매치와 함께 miRNA 시드 서열과 정확한 상보성(100%) 또는 부분 상보성을 갖는 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 서열은 miRNA 시드 서열과 100% 상보성인 적어도 7 내지 8개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 서열은 miRNA 시드 서열에 대해 100% 상보성인 서열로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 표적 서열은 시드 서열에 대해 100% 상보성인 서열의 다중 카피(예를 들어, 2 또는 3개의 카피)를 함유한다. 특정 실시형태에서, 100% 상보성의 영역은 표적 서열 길이의 적어도 30%를 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적 서열의 나머지는 miRNA에 대한 적어도 약 80% 내지 약 99% 상보성을 갖는다. 특정 실시형태에서, DNA 양성 가닥을 함유한 발현 카세트에서, miRNA 표적 서열은 miRNA의 역보체이다.

[0023] 특정 실시양태에서, miRNA는 AR 표적 부위: GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1) 또는 이로부터 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(절단 포함)을 갖는 서열에 결합하는 표적화 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 표적화 서열은 서열식별번호: 2이다. 다른 실시양태에서, 표적화 서열은 서열식별번호: 3이다. 특정 실시양태에서, 시드 서열은 성숙한 miRNA(5'에서 3')상에 위치하며 일반적으로 miRNA의 miRNA 센스 가닥의 5' 말단(센스(+) 가닥의 5' 말단)으로부터 2번 내지 7번, 2번 내지 8번 또는 약 6번의 뉴클레오타이드 위치에서 시작되나 길이가 더 길 수 있다. 특정 실시양태에서, 시드 서열의 길이는 성숙한 miRNA 서열 길이의 약 30% 이상이며, 이는 적어도 7개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드, 적어도 8개의 뉴클레오타이드 내지 약 28개의 뉴클레오타이드, 7개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 8개의 뉴클레오타이드 내지 18개의 뉴클레오타이드, 12개의 뉴클레오타이드 내지 28개의 뉴클레오타이드, 약 20개 내지 약 26개의 뉴클레오타이드, 약 18개, 19개, 20개, 21개, 22개, 23개, 24개, 25개 또는 26개의 뉴클레오타이드일 수 있다. 본원에서 제공되는 예에서, miRNA는, 예를 들어, 길이가 약 50개 내지 약 80개의 뉴클레오타이드, 또는 약 55개의 뉴클레오타이드 내지 약 70개의 뉴클레오타이드, 또는 길이가 60개 내지 65개의 뉴클레오타이드인, 스템 루프 miRNA 전구체 서열의 형태로 전달된다. 일부 실시양태에서, 스템 루프 miRNA 전구체 서열은 64개의 뉴클레오타이드이다. 특정 실시양태에서, 이러한 miRNA 전구체는 약 5개의 뉴클레오타이드, 약 21개의 뉴클레오타이드 표적화 서열(이는 시드 서열을 함유함), 약 21개의 뉴클레오타이드 스템 루프 및 약 20개의 뉴클레오타이드의 센스 서열을 포함하며, 센스 서열은 1개, 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드가 불일치하는 안티센스 서열에 상응한다. 다른 실시양태에서, 이러한 miRNA 전구체는 약 5개의 뉴클레오타이드, 약 21개의 뉴클레오타이드 표적화 서열, 약 21개의 뉴클레오타이드 스템 루프 및 약 18개의 뉴클레오타이드 센스 서열을 포함하며, 센스 서열은 1개, 2개 또는 3개의 뉴클레오타이드가 불일치하는 안티센스 서열에 상응한다. 특정 실시양태에서, miRNA는 인간 안드로겐

수용체상에서 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 27, 또는 이로부터 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(절단 포함)을 갖는 서열의 miRNA 표적 부위를 표적으로 한다.

[0024] 일 양태에서, 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 본원에서 제공된다. 코딩 서열은 대상체에서 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된다. 일부 실시양태에서, miRNA 표적 부위는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 1과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(또는 절단)을 갖는 서열을 갖는다. 일부 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2 - 3610 표적화 서열)의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, miRNA 표적 부위는 서열식별번호: 27 또는 서열식별번호: 27과 비교하여 1, 2, 3, 4 또는 5개의 치환(또는 절단)을 갖는 서열을 갖는다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3 - 3613 표적화 서열)의 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, miRNA 표적화 서열은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위와 정확한 상보성보다 적은 상보성을 공유한다. 일부 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 a) TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2 - 3610)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열; 또는 b) CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3 - 3613)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 4 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 5 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함한다.

[0025] 적합한 miRNA 코딩 서열의 예는 전miRNA 헤어핀의 코딩 서열을 제공하며 성숙한 miR인 miR3610을 포함하는 서열식별번호: 4의 서열이다. 특정 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 4; 서열식별번호: 4의 적어도 60개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 miRNA 서열; 또는 서열식별번호: 4의 약 뉴클레오티드 6 내지 약 뉴클레오티드 26과 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 4와 적어도 90% 동일성을 포함하는 miRNA 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 4의 위치 6 내지 26이 유지되며, 대안적인 서열이 스템 루프 백본에 대해 선택된다. 다른 실시양태에서, miRNA 서열은 5' 및/또는 3' 측접 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 서열은 서열식별번호: 11, 또는 서열식별번호: 11의 적어도 60개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 miRNA 서열; 또는 서열번호 11과 적어도 90% 동일성을 포함하는 miRNA 서열을 포함한다.

[0026] 적합한 miRNA 코딩 서열의 다른 예는 전miRNA 헤어핀을 코딩하는 서열을 제공하며 성숙한 miR인 miR3613을 포함하는 서열식별번호: 5의 서열이다. 특정 실시양태에서, miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 5; 서열식별번호: 5의 적어도 60개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 miRNA 서열; 또는 서열식별번호: 5의 약 뉴클레오티드 9 내지 약 뉴클레오티드 29와 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 5와 적어도 90% 동일성을 포함하는 miRNA 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 5의 위치 9 내지 29가 유지되며, 대안적인 서열이 스템 루프 백본에 대해 선택된다. 다른 실시양태에서, miRNA 서열은 5' 및/또는 3' 측접 서열을 포함한다. 다른 실시양태에서, miRNA 서열은 서열식별번호: 12, 또는 서열식별번호: 12의 적어도 60개의 연속 뉴클레오티드를 포함하는 miRNA 서열; 또는 서열번호 12과 적어도 90% 동일성을 포함하는 miRNA 서열을 포함한다.

[0027] 특정 실시양태에서, 서열식별번호: 26 또는 이와 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.9% 동일성을 공유하는 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다.

[0028] 특정 실시양태에서, 핵산 분자(예를 들어, 발현 카세트 또는 벡터 게놈)는 하나 이상의 miRNA 코딩 서열을 함유할 수 있다. 이러한 핵산 분자는 (a) 서열식별번호: 4를 포함하는 miRNA 코딩 서열; (b) 서열식별번호: 4의 적어도 60개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 miRNA 코딩 서열; (c) 서열식별번호:4의 약 뉴클레오타이드 6 내지 약 뉴클레오타이드 26과 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 4와 적어도 50% 동일성을 포함하는 miRNA 코딩 서열; 및/또는 (d) TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2)를 포함하는 miRNA 코딩 서열 중 1개, 2개 또는 그 이상의 서열을 갖는 miRNA 코딩 서열을 포함할 수 있다. 다른 실시양태에서, 핵산 분자는 (a) 서열식별번호: 5를 포함하는 miRNA 코딩 서열; (b) 서열식별번호: 5의 적어도 60개의 연속 뉴클레오타이드를 포함하는 miRNA 코딩 서열; (c) 서열식별번호:5의 약 뉴클레오타이드 6 내지 약 뉴클레오타이드 26과 100% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 5와 적어도 50% 동일성을 포함하는 miRNA 코딩 서열; 및/또는 (d) CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3)를 포함하는 miRNA 코딩 서열 중 1개, 2개 또는 그 이상의 서열을 갖는 miRNA 코딩 서열을 포함할 수 있다.

[0029] 본원에서 사용되는 용어 “AAV.AR-miR” 또는 “rAAV.AR.miR”은 조절 서열의 제어하에서 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하며 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 벡터 게놈을 내에 갖는 AAV 캡시드를 갖

는 재조합 아데노-연관 바이러스를 지칭하는 데 사용된다. 일부 실시양태에서, 표적 서열은 서열식별번호: 1에 나타나 있다.

[0030] 예를 들어, AAV1 캡시드를 갖는 재조합 AAV를 지칭하는 AAV1.AR.miR; AAVhu68 캡시드를 갖는 재조합 AAV를 지칭하는 AAVhu68.AR.miR과 같은 특정 캡시드 유형이 지정될 수 있다.

[0031] "재조합 AAV" 또는 "rAAV"는 2개의 요소, 즉, AAV 캡시드 및 AAV 캡시드 내에 패키징되는 적어도 비AAV 코딩 서열을 함유하는 벡터 게놈을 함유하는 DNAse 저항성 바이러스 입자이다. 달리 명시되지 않는 한, 이러한 용어는 어구 "rAAV 벡터"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. rAAV는 기능성 AAV rep 유전자 또는 기능성 AAV cap 유전자가 결여되어 있고 자손을 생성할 수 없기 때문에, "복제-결함 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"이다. 특정 실시양태에서, 유일한 AAV 서열은 반전 말단 반복부 서열(ITR) 사이에 위치하는 유전자 및 조절 서열이 AAV 캡시드 내에 패키징되도록 전형적으로 벡터 게놈의 5' 및 3' 극단에 위치하는 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)이다. 5’ 및 3’ ITR 서열은 각각 서열식별번호: 7 및 서열식별번호: 14에 나타나 있다. 일반적으로 AAV 캡시드는 60개의 캡시드(cap) 단백질 하위단위인 VP1, VP2 및 VP3으로 구성되며, 이는 선택된 AAV에 따라 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비율로 이십면체 대칭으로 배열된다. 다양한 AAV가 위에서 식별되는 바와 같이 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 출처로서 선택될 수 있다. 일 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAVhu.68 캡시드 또는 이의 변이체이다(예를 들어, WO 2018/160582 및 미국 가특허 출원 제63/093,275호(2020년 10월 18일 출원) 참조, 이는 참조에 의해 본원에 원용됨). 서열식별번호: 17 참조. 다른 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV.PHP.eb 캡시드(서열식별번호: 21)이다. 특정 실시양태에서, 캡시드 단백질은 rAAV 벡터의 명칭에서 용어 "AAV" 다음에 오는 숫자 또는 숫자 및 문자의 조합에 의해 지정된다. 달리 명시되지 않는 한, 본원에 기재된 AAV 캡시드, ITR, 및 기타 선택된 AAV 구성요소는 제한 없이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37, AAVrh32.33, AAV8bp, AAV7M8 및 AAVAnc80, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9.47, AAV9(hu14), AAV10, AAV11, AAV12, AAVrh8, AAVrh74, AAV-DJ8, AAV-DJ, AAVhu68로 확인된 AAV를 제한없이 포함하는 임의의 AAV 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2007-0036760-A1호; 미국 특허 출원 공개 제2009-0197338-A1호; EP 제1310571호를 참조한다. 또한, WO 2003/042397(AAV7 및 다른 유인원 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), WO 2005/033321 및 US 7,906,111(AAV9), 및 WO 2006/110689, 및 WO 2003/042397(rh.10), WO 2005/033321, WO 2018/160582 및 미국 가특허 출원 제63/093,275호(2020년 10월 18일 출원)(AAVhu68) 참조, 이는 참조에 의해 본원에 원용됨. 또한, WO 2019/168961호 및 WO 2019/169004호를 참조하고, 이들 및 다른 AAV 캡시드에 대한 탈아미드화 프로파일을 기술한다. 다른 적합한 AAV는 AAVrh90[PCT/US20/30273, 2020년 4월 28일 출원], AAVrh91[PCT/US20/30266, 2020년 4월 28일 출원; 미국 가특허 출원 제63/065,616호, 2020년 8월 14일 출원], AAVrh92[PCT/US20/30281, 2020년 4월 28일 출원], AAVrh93[PCT/US20/30281, 2020년 4월 28일 출원], AAVrh91.93[PCT/US20/30281, 2020년 4월 28일 출원]을 포함하나 이에 제한되지 않으며, 이는 참조에 의해 본원에 원용된다. 다른 적합한 AAV는 AAV3B.AR2.01, AAV3B.AR2.02, AAV3B.AR2.03, AAV3B.AR2.04, AAV3B.AR2.05, AAV3B.AR2.06, AAV3B.AR2.07, AAV3B.AR2.08, AAV3B.AR2.10, AAV3B.AR2.11, AAV3B.AR2.12, AAV3B.AR2.13, AAV3B.AR2.14, AAV3B.AR2.15, AAV3B.AR2.16, 또는 AAV3B.AR2.17을 기재하는 2019년 10월 21일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/924,112호 및 2020년 5월 15일자로 출원된 미국 가출원 특허 제63/025,753호에 기재된 AAV3B 변이체를 포함하고, 이는 본원에 원용된다. 또한, 이러한 문헌은 rAAV를 생성하기 위해 선택될 수 있는 다른 AAV 캡시드를 설명하며 이는 참조로 원용된다. 인간 또는 비인간 영장류(NHP)로부터 단리되거나 조작되고 잘 특성화된 AAV 중에서, 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로서 개발된 최초의 AAV이며, 이는 상이한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험에 널리 사용되었다.

[0032] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "벡터 게놈"은 바이러스 입자를 형성하는 rAAV 캡시드 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 이러한 핵산 서열은 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)을 함유한다. 본원의 예에서, 벡터 게놈은 최소한, 5'에서 3'으로, AAV 5’ ITR, miRNA 코딩 서열 및 AAV 3’ ITR을 함유한다. 캡시드와 상이한 공급원의 AAV인 AAV2로부터의 ITR, 또는 전장 ITR 이외의 것이 선택될 수 있다. 특정 실시양태에서, ITR은 생성 동안 rep 기능을 제공하는 AAV 또는 트랜스상보성(transcomplementing) AAV와 동일한 AAV 공급원으로부터 유래된다. 또한, 다른 ITR이 사용될 수 있다. 또한, 벡터 게놈은 miRNA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함한다. 벡터 게놈의 적합한 구성요소는 본원에서 보다 상세히 논의된다.

[0033] 특정 실시양태에서, 척수강내 주사에 적합한 수성 액체 및 중추 신경계 및/또는 배근 신경절(예를 들어, CNS)의 세포, 예를 들어, 신경 세포(예컨대, 추상 세포, 푸르키네 세포, 과립 세포, 방추 세포 및 사이신경 세포) 및 아교 세포(예컨대, 성상교세포, 희소돌기아교세포, 미세아교세포 및 뇌실막 세포)를 우선적으로 표적으로 하는

AAV 캡시드를 갖는 벡터 스톡(예를 들어, rAAV)을 포함하는 조성물이 제공되며, 벡터는 중추 신경계(CNS)로의 전달을 위해 AR에 특이적인 적어도 하나의 miRNA를 갖는다. 특정 구현예에서, 본원에 기술된 바와 같은 하나 이상의 벡터를 포함하는 조성물은 대조(대수조 내)로 후두하 주사를 위해 제형화된다. 특정 실시양태에서, 조성물은 컴퓨터 단층촬영(CT) rAAV 주사를 통해 투여된다. 특정 실시양태에서, 환자에게 조성물의 단일 투여량을 투여한다.

[0034] 본원에서 사용되는 "발현 카세트"는 인간 AR을 표적으로 하는 miRNA 코딩 서열, 프로모터를 포함하며 이를 위한 다른 조절 서열을 포함할 수 있는 핵산 중합체를 지칭하며, 카세트는 벡터(예를 들어, rAAV, 렌티바이러스, 레트로바이러스 등)로 패키징될 수 있다.

[0035] rAAV

[0036] 재조합 파르보바이러스는 SBMA의 치료를 위한 벡터로 특히 잘 적합하다. 본원에서 설명되는 바와 같이, 재조합 파르보바이러스는 AAV 캡시드(또는 보카바이러스 캡시드)를 함유할 수 있다. 특정 실시양태에서, 캡시드는 배근 신경절 내에 있는 세포 및/또는 하위 운동 뉴런 및/또는 일차 감각 뉴런 내에 있는 세포를 표적으로 한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 제공되는 조성물은 내인성 hAR 수준을 하향 조절하기 위해 hAR을 특이적으로 표적화하는 miRNA를 포함하는 rAAV를 포함하는 단일 rAAV 스톡을 가질 수 있다.

[0037] 예를 들어, 클레드 F(예를 들어, AAVhu68 또는 AAV9)로부터 유래한 AAV 캡시드를 사용하여 생성되는 벡터는 CNS에서 miR를 표적으로 하고 발현하는 벡터를 생성하는 데 사용될 수 있다. 대안적으로, 클레드 A (예를 들어, AAV1, AAVrh91) 유래 AAV 캡시드를 사용하여 생성된 벡터가 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 다른 파르보바이러스 또는 다른 AAV 바이러스는 AAV 캡시드의 적합한 공급원일 수 있다.

[0038] AAV1 캡시드는 AAV vp1 단백질, AAV vp2 단백질 및 AAV vp3 단백질을 갖는 캡시드를 지칭한다. 특정 구현예에서, AAV1 캡시드는 총 60개의 vp 단백질의 T1 이십면체 캡시드 내로 조립된 약 1:1:10의 AAV vp1 단백질, AAV vp2 단백질 및 AAV vp3 단백질의 사전-결정된 비율을 포함한다. AAV1 캡시드는 게놈 서열을 패키징하여 AAV 입자 (예를 들어, 게놈이 벡터 게놈인 재조합 AAV)를 형성할 수 있다. 전형적으로, 가장 긴 vp 단백질, 즉, VP1을 암호화하는 캡시드 핵산 서열은 AAV1 캡시드를 갖는 rAAV의 생성 동안 *트랜스로* 발현되고, 예를 들어, 미국 특허 제6,759,237호, 미국 특허 제7,105,345호, 미국 특허 제7,186,552호, 미국 특허 제8,637,255호, 및 미국 특허 제9,567,607호에 기술되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 또한, 참조로 포함된 WO 2018/168961호를 참조한다. 특정 실시양태에서, AAV1은 질량분석법을 사용하여 결정된 바와 같이, 캡시드 내 VP 단백질의 총량을 기준으로, 다음의 표에 정의된 바와 같은 탈아마이드화된 VP 동형의 이종 집단의 캡시드 조성물을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, AAV 캡시드는 질량분석법을 사용하여 결정된 바와 같이, 하기 제공되는 범위로, 하기 위치 중 하나 이상에서 변형된다. 적합한 변형은 본원에 원용되는 탈아마이드화의 변조로 표지된 위의 단락에서 설명되는 변형을 포함한다. 특정 구현예에서, 다음 위치 중 하나 이상, N 다음의 글리신이 다음에 설명된 바와 같이 변형된다 특정 구현예에서, 위치 57, 383, 512 및/또는 718에서 N 다음의 글리신이 보존된 (즉, 변형되지 않은 채로 남아 있는) AAV1 돌연변이가 구성된다. 특정 실시형태에서, 앞의 문장에서 확인된 4개 위치에서 NG는 천연 서열과 함께 보존된다. 특정 실시형태에서, 인공 NG는 상기 표에서 확인되는 위치 중 하나와 상이한 위치에 도입된다.

[0039] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, AAVhu68 캡시드는 본 명세서에 참조에 의해 원용되는 WO 2018/160582호에 정의된 바와 같은 캡시드를 지칭한다. 서열식별번호: 17 참조. AAVhu68에 대한 생성 서열은 서열식별번호: 16 및 서열식별번호: 18(캡시드 전용 코딩 서열)에서 찾을 수 있다.

[0040] 단일 vp1 핵산 서열을 사용하여 생성된 rAAVhu68은 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질의 이종 집단을 생성한다. 이러한 하위집단은 최소한 탈아마이드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴-글라이신 쌍의 아스파라긴은 고도로 탈아마이드화되어 있다. 특정 실시양태에서, vp2 및/또는 vp3 단백질은, 예를 들어, 선택된 발현 시스템에서 vp 단백질의 비율을 변경하기 위해, vp1과 상이한 핵산 서열로부터 추가적으로 또는 대안적으로 발현될 수 있다.

[0041] 특정 실시양태에서, AAVhu68 캡시드는 각각 서열식별번호: 17의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736인 AAVhu68 VP1, VP2 및 VP3 단백질 및/또는 이들의 변이체를 포함하며, 상기 변이체는 상기 AAVhu68 VP1, VP2 및 VP3 단백질이나, 적합한 방법(예를 들어, 질량분석법)을 사용하여 결정되는 바와 같이, (i) 아세틸화 라이신, 인산화 세린 및/또는 트레오닌, 이성질체화 아스파트산, 산화 트립토판 및/또는 메티오닌, 또는 아마이드화 아미노산으로부터 선택되는 하나 이상의 변형; 및/또는 (ii) N57, N66, N94, N113,

N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N314, N319, N328, N329, N336, N409, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735 또는 이들의 조합의 탈아마이드화를 갖는다.

[0042] 특정 실시양태에서, AAVhu68 캡시드는 서열식별번호: 17의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로부터 발현하여 생성되는 vp1 단백질, 서열식별번호: 18로부터 생성되는 vp1 단백질 또는 서열식별번호: 17의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 서열식별번호: 18과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산서열로부터 생성되는 vp1 단백질로부터 선택되는 AAVhu68 vp1 단백질의 이종 집단, 서열식별번호: 17의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로부터 발현하여 생성되는 vp2 단백질, 서열식별번호: 18의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생성되는 vp2 단백질 또는 서열식별번호: 17의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 서열식별번호: 18의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열로부터 생성되는 vp2 단백질로부터 선택되는 AAVhu68 vp2 단백질의 이종 집단 및 서열식별번호: 17의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로부터 발현하여 생성되는 vp3, 서열식별번호: 18의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생성되는 vp3 단백질 또는 서열식별번호: 17의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 코딩하는 서열식별번호: 18의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211과 적어도 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 핵산 서열로부터 생성되는 vp3 단백질로부터 선택되는 AAVhu68 vp3 단백질의 이종 집단을 포함한다.

[0043] 특정 실시양태에서, AAVhu68 캡시드는 (a) 서열식별번호: 17의 1 내지 736의 아미노산 서열을 코딩하는 핵산 서열로부터 발현하여 생성되는 AAVhu68 VP1, AAVhu68 VP2 및 AAVhu68 VP3 단백질; 및/또는 (b) 각각 서열식별번호: 17의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736인 AAVhu68 VP1, AAVhu68 VP2 및 AAVhu68 VP3을 포함하며, 이들은 질량분석법을 사용하여 결정되는 바와 같이 서열식별번호: 17의 위치 57, 329, 452 및 512에서 아미노산의 적어도 60% 탈아마이드화를 더 포함한다. 특정 실시양태에서, 질량분석법을 사용하여 측정되는 바와 같이, 탈아마이드화는 서열식별번호: 17의 위치 57, 329, 452 및 512에서 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 이상 또는 100%이다. AAVhu68 캡시드는 위치 67에 글루탐산을 유지하고 위치 157에 발린을 유지하면서 다른 위치에서 탈아마이드화를 포함하는 다른 번역 후 변형을 포함할 수 있다.

[0044] 특정 실시양태에서, AAVhu68 캡시드는 조작된 AAVhu68 코딩 서열을 사용하여 생성된다. 예를 들어, 미국 가특허 출원 제63/093,275호(2020년 10월 18일 출원) 및 국제 특허 출원 제PCT/US21/55436호(2021년 10월 18일 출원) 참조, 이는 각각 참조에 의해 본원에 원용됨. 캡시드는 세포 배양, 부착 세포 또는 세포 현탁을 포함하는 임의의 적합한 생성 세포 시스템에서 생성될 수 있다.

[0045] AAV 캡시드로 패키징되고 숙주 세포에 전달되는 게놈 서열은 전형적으로 최소한 전이유전자(예를 들어, miRNA) 및 이의 조절 서열, 및 AAV 반전 말단 반복부(ITR)로 구성된다. 단일 가닥 AAV 및 자가 상보성(sc) AAV 둘 모두 rAAV에 포함된다. 이식유전자는 벡터 서열에 대해 이종성인 핵산 코딩 서열이며, 이는 폴리펩타이드, 단백질, 기능성 RNA 분자(예를 들어, miRNA, miRNA 저해제) 또는 관심 있는 다른 유전자 산물을 인코딩한다. 핵산 코딩 서열은 표적 조직의 세포에서 전이유전자의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 조절 구성요소에 작동적으로 연결된다.

[0046] 벡터의 AAV 서열은 전형적으로 시스-작용 5' 및 3' 반전 말단 반복부 서열을 포함한다(예를 들어, 문헌[B. J. Carter, "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)] 참조). ITR 서열은 길이가 약 130 또는 145 bp이다. 바람직하게는, 실질적으로 ITR을 코딩하는 전체 서열이 분자에서 사용되나, 이러한 서열의 어느 정도의 사소한 변형은 허용된다. 이러한 ITR 서열을 변형시키는 능력은 당해 기술분야의 기술 범위 내에 있다. (예를 들어, Sambrook 등, "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989); 및 K. Fisher 등, J. Virol., 70:520 532 (1996)과 같은 텍스트 참조). 본 발명에서 사용되는 이러한 분자의 예는 전이유전자를 함유하는 "시스 작용성" 플라스미드이며, 선택된 전이유전자 서열 및 연관된 조절 요소는 측부 영역에 5' 및 3' AAV ITR 서열을 갖는다. 일 실시양태에서, ITR은 캡시드를 공급하는 AAV와 상이한 AAV로부터 유래된다. 일 구현예에서, ITR 서열은 AAV2 유래이다. D-서열 및 말단 분해 부위(trs)가 결실된 ΔITR로 지칭되는 5' ITR의 단축 형태가 설명된 바 있다. 다른 실시양태에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터 유래한 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2부터 유래하고 AAV 캡시드가 다른 AAV 공급원으로부터 유래하는 경우, 생성된 벡터는 위형으로 지칭될 수 있다. 그러나, 이러한 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다.

[0047] 벡터(예를 들어, rAAV)에 대해 위에서 식별되는 주요 요소에 더하여, 벡터는 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 전이유전자에 작동 가능하게 연결되는 필수적인 종래의 제어 요소를 또한 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "발현" 또는 "유전자 발현"은 유전자로부터 유래한 정보가 기능성 유전자 생성물의 합성에서 사용되는 과정을 지칭한다. 유전자 생성물은 miRNA, 단백질, 펩타이드 또는 핵산 중합체(예컨대, RNA, DNA 또는 PNA)일 수 있다.

[0048] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "조절 서열", 또는 "발현 제어 서열"은 작동 가능하게 연결된 단백질을 인코딩하는 핵산 서열의 전사를 유도, 억제, 또는 다르게는 제어하는 개시자 서열, 인핸서 서열, 및 프로모터 서열과 같은 핵산 서열을 지칭한다.

[0049] 본원에 사용된 바와 같이, "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 일정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다.

[0050] 조절 제어 요소는 전형적으로 예를 들어, 선택된 5' ITR 서열과 암호화 서열 사이에 위치한, 발현 제어 서열의 일부로서 프로모터 서열을 함유한다. 특정 실시양태에서, 프로모터는 CMV 인핸서 요소를 갖는 닭 베타 액틴 프로모터, 예를 들어, CB7 프로모터(서열식별번호: 23)이다. 다른 실시양태에서, CB8 프로모터는 서열식별번호: 24의 서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, CB7 프로모터는 CMV 인핸서(서열식별번호: 8), 닭 베타 액틴 프로모터(서열식별번호: 9) 및 키메라 인트론(서열식별번호: 10)을 포함한다. 특정 실시양태에서, 중추 신경계에 대한 조직 특이적 프로모터가 선택된다. 예를 들어, 프로모터는 신경 세포 프로모터, 예를 들어, gfaABC(1)D 프로모터(Addgene #50473) 또는 인간 Syn 프로모터(서열은 Addgene, Ref. #50465로부터 이용 가능함, 서열식별번호: 15)일 수 있다.

[0051] 다른 적합한 프로모터는, 예를 들어, 구성적 프로모터, 조절 가능한 프로모터[예를 들어, WO 2011/126808호 및 WO 2013/04943호 참조] 또는 생리학적 신호에 반응하는 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터는 상이한 공급원, 예를 들어, 인간 거대세포바이러스(CMV) 급초기 인핸서/프로모터, SV40 초기 인핸서/프로모터, JC 폴리모바이러스 프로모터, 미엘린 염기성 단백질(MBP) 또는 아교 섬유질 산성 단백질(GFAP) 프로모터, 단순 헤르페스 바이러스(HSV-1) 잠복 연관 프로모터(LAP), 라우스 육종 바이러스(RSV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 뉴런 특이적 프로모터(NSE), 혈소판 유래 성장 인자(PDGF) 프로모터, 멜라닌 응집 호르몬(MCH) 프로모터, CBA, 기질 금속단백질 프로모터(MPP) 및 닭 베타 액틴 프로모터로부터 선택될 수 있다.

[0052] 프로모터 이외에, 벡터는 하나 이상의 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 효율적인 RNA 처리 신호 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (폴리A) 신호; 세포질 mRNA 예를 들어 WPRE를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 바람직한 경우, 암호화된 산물의 분비를 향상시키는 서열을 함유할 수 있다. 적합한 인핸서의 예는 CMV 인핸서이다. 다른 적합한 인핸서는 목적하는 표적 조직 적응증에 적절한 것을 포함한다. 일 구현예에서, 발현 카세트는 하나 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 구현예에서, 발현 카세트는 2개 이상의 발현 인핸서를 함유한다. 이들 인핸서는 동일할 수 있거나 서로 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 CMV 급초기 인핸서를 포함할 수 있다. 이러한 인핸서는 서로 인접하여 위치한 2개의 복제체에 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 복제체는 하나 이상의 서열에 의해 분리될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 발현 카세트는 인트론, 예를 들어, 닭 베타-액틴 인트론을 추가로 함유한다. 다른 적합한 인트론은 예를 들어, WO 2011/126808호에 기재된 바와 같이 당업계에 공지된 것들을 포함한다. 적합한 폴리A 서열의 예는. 예를 들어, 토끼 베타 글로빈(서열식별번호: 25), SV40, SV50, 소 성장 호르몬(bGH), 인간 성장 호르몬 및 합성 폴리A를 포함한다. 선택적으로, 하나 이상의 서열이 mRNA를 안정화하기 위해 선택될 수 있다. 이와 같은 서열의 예는, 폴리A 서열의 상류 및 코딩 서열의 하류에서 조작될 수 있는 변형된 WPRE 서열이다[예를 들어, 문헌[MA Zanta-Boussif, 등, Gene Therapy (2009) 16: 605-619] 참조]. 적합한 WPRE의 예는 서열식별번호: 13에 나타나 있다.

[0053] 일 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, 프로모터, 선택적 인핸서, 선택적 인트론, 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, 폴리A 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, 프로모터, 선택적 인핸서, 선택적 인트론, 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, 선택적 WPRE, 폴리A 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, 프로모터, 인핸서, 인트론, 인간 서열식별번호: 1의 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, WPRE, 폴리A 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5’ ITR, CB7 프로모터/인핸서, 닭 베타 인트론, 서열식별번호: 1의 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, WPRE, 토끼 베타 글로빈 폴리 A 및 AAV 3’ ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5’ ITR, CB7 프로모

터/인핸서, 닭 베타 인트론, 서열식별번호: 2 또는 이로부터의 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 1의 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, WPRE, 토끼 베타 글로빈 폴리 A 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, CB7 프로모터/인핸서, 닭 베타 인트론, 서열식별번호: 3 또는 이로부터의 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 서열식별번호: 27의 인간 안드로겐 수용체를 표적으로 하는 miRNA에 대한 코딩 서열, WPRE, 토끼 베타 글로빈 폴리 A 및 AAV 3' ITR을 포함한다. miRNA 코딩 서열은 본 명세서에서 정의되는 서열로부터 선택된다. 이들 서열에 대한 벡터 게놈 또는 변이의 다른 요소는 본 발명의 특정 실시형태에 대한 벡터 게놈에 대해 선택될 수 있다.

[0054] 벡터 생성

[0055] AAV 바이러스 벡터(*예를 들어*, 재조합(r) AAV)를 생산하는 데 사용하기 위해, 발현 카세트는 패키징 숙주 세포로 전달되는 임의의 적합한 벡터, *예를 들어*, 플라스미드로 운반될 수 있다. 본 발명에서 유용한 플라스미드는 특히, 원핵 세포, 곤충 세포, 포유류 세포에서 *시험관 내* 복제 및 패키징에 적합하도록 조작될 수 있다. 적합한 형질감염 기법 및 패키징 숙주 세포는 알려져 있고/있거나 통상의 기술자에 의해 용이하게 설계될 수 있다.

[0056] 특정 실시양태에서, 생성 플라스미드는 환자에서 miRNA의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되는 SBMA 환자의 인간 안드로겐 수용체에 특이적인 적어도 하나의 miRNA 서열을 포함하는 캡시드로 패키징하기 위한 벡터 게놈을 포함한다.

[0057] 벡터로서 사용하기에 적합한 AAV를 생성하고 단리하는 방법은 당해 기술분야에 알려져 있다 일반적으로, *예를 들어,* Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," *Adv. Biochem. Engin/Biotechnol.* 99: 119-145; Buning *등,* 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," *J. Gene Med.* 10:717-733; 및 하기에 인용된 참고문헌을 참조하고, 이들 각각은 그 전체가 본원에 참조로 포함된다. 이식유전자를 비리온으로 패키징하기 위해, ITR은 발현 카세트를 포함하는 핵산 분자와 동일한 작제물에서 *시스로* 필요한 유일한 AAV 구성성분이다. cap 및 rep 유전자는 *트랜스로* 공급될 수 있다.

[0058] 일 실시양태에서, 본원에서 설명되는 발현 카세트는 바이러스 벡터 생성을 위해 내부에 운반된 miRNA 작제물 서열을 패키징 숙주 세포로 전달하는 유전적 요소(*예를 들어,* 셔틀 플라스미드)로 조작된다. 일 실시형태에서, 선택된 유전자 요소는 형질감염, 전기천공법, 리포좀 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 AAV 패키징 세포에 전달될 수 있다. 안정한 AAV 패키징 세포가 또한 제조될 수 있다. 대안적으로, 발현 카세트는 AAV 이외의 바이러스 벡터를 생성하기 위해 또는 시험관 내에서 항체 혼합물의 생성을 위해 사용될 수 있다. 이러한 작제물을 제조하는 데 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있으며 유전 공학, 재조합 공학 및 합성 기법을 포함한다. *예를 들어*, 문헌[Molecular Cloning: A Laboratory Manual, ed. Green and Sambrook, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]을 참조한다.

[0059] 용어 "AAV 중간체" 또는 "AAV 벡터 중간체"는 그 안에 패키징된 목적으로 하는 게놈 서열이 없는 조립된 rAAV 캡시드를 지칭한다. 또한, 이들은 "중공(empty)" 캡시드로 지칭될 수 있다. 이러한 캡시드는 발현 카세트의 검출 가능하지 않은 게놈 서열, 또는 유전자 산물의 발현을 달성하는 데 불충분한 부분적으로 패키징된 게놈 서열을 함유할 수 있다. 이러한 중공 캡시드는 숙주 세포에 관심 유전자를 전달하도록 비기능성이다.

[0060] 본 명세서에 기재된 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV)는 알려진 기법을 사용하여 생성될 수 있다. (*예를 들어,* WO 2003/042397; WO 2005/033321, WO 2006/110689; US 7588772 B2 참조) 이와 같은 방법은 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소한 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 이식유전자로 구성되는 발현 카세트; 및 AAV 캡시드 단백질로 발현 카세트의 패키징을 허용하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다. 캡시드를 생성하는 방법, 이를 위한 코딩 서열 및 rAAV 바이러스 벡터의 생성 방법이 설명되어 있다. *예를 들어*, Gao 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 및 US 2013/0045186A1 참조.

[0061] 하나의 실시형태에서, 재조합 AAV를 생성하는 데 유용한 세포 배양물의 생성이 제공된다. 이러한 세포 배양물은 숙주 세포에서 AAV 캡시드 단백질을 발현하는 핵산; AAV 캡시드로 패키징하기에 적합한 핵산 분자, 예를 들어, 숙주 세포에서 전이유전자의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결되는 전이유전자(예를 들어, miRNA)를 코딩하는 비AAV 핵산 서열 및 AAV ITR을 함유하는 벡터 게놈; 및 재조합 AAV 캡시드로 핵산 분자의 패키징을 허

용하기에 충분한 AAV rep 기능 및 아데노바이러스 헬퍼 기능을 함유한다. 일 구현예에서, 세포 배양물은 포유동물 세포(예를 들어, 특히 인간 배아 신장 293 세포) 또는 곤충 세포(예를 들어, 바큘로바이러스)로 구성된다.

[0062] 전형적으로, rep 기능은 벡터 게놈 측면에 있는 ITR을 제공하는 AAV와 동일한 AAV 공급원으로부터 유래된다. 본 명세서의 예에서, AAV2 ITR이 선택되고 AAV2 rep가 사용된다. 선택적으로, 다른 rep 서열 또는 다른 rep 공급원(및 선택적으로 다른 ITR 공급원)이 선택될 수 있다. 예를 들어, rep은, 이에 제한되지는 않으나, AAV1 rep 단백질, AAV2 rep 단백질; 또는 rep 78, rep 68, rep 52, rep 40, rep68/78 및 rep40/52; 또는 이들의 단편; 또는 또 다른 공급원일 수 있다. 선택적으로, rep 및 cap 서열은 세포 배양물에서 동일한 유전적 요소에 있다. rep 서열과 cap 유전자 사이에 스페이서가 있을 수 있다. 임의의 이들 AAV 또는 돌연변이 AAV 캡시드 서열은 숙주 세포에서 이의 발현을 지시하는 외인성 조절 제어 서열의 제어 하에 있을 수 있다.

[0063] 일 실시양태에서, 세포는 적합한 세포 배양물(예를 들어, HEK 293)에서 제조된다. 본원에서 설명되는 치료 벡터를 제조하는 방법은 치료 벡터의 생성을 위해 사용되는 플라스미드 DNA의 생성, 벡터의 생성 및 벡터의 정제와 같이 당해 기술분야에 잘 알려진 방법을 포함한다. 일부 실시양태에서, 치료 벡터는 AAV 벡터이며 생성되는 플라스미드는 AAV 게놈 및 관심 유전자를 코딩하는 AAV 시스 플라스미드(예를 들어, miRNA), AAV rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 트랜스 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드이다. 벡터 생성 과정은 세포 배양의 개시, 세포의 계대, 세포의 시딩, 플라스미드 DNA를 사용한 세포의 형질감염, 형질감염 후 무혈청 배지로 배지 교환 및 벡터 함유 세포 및 배양 배지의 채취와 같은 방법 단계를 포함할 수 있다.

[0064] 특정 실시양태에서, rAAV.AR-miR에 대한 제조 과정은 플라스미드 DNA를 사용한 HEK293 세포의 일시적 형질감염을 수반한다. 단일 배치(batch) 또는 다중 배치는 PALL iCELLis 바이오리액터에서 HEK293 세포의 PEI-매개 삼중 형질주입에 의해 생성된다. 수확된 AAV 물질은 가능한 경우 일회용 폐쇄 바이오프로세싱 시스템에서 정화, TFF, 친화성 크로마토그래피, 및 음이온 교환 크로마토그래피에 의해 순차적으로 정제된다.

[0065] 채취된 벡터 함유 세포 및 배양 배지는 본원에서 조(crude) 세포 채취물로 지칭된다. 다른 시스템에서, 치료 벡터는 바큘로바이러스 기반 벡터를 사용한 감염에 의해 곤충 세포에 도입된다. 이러한 생성 시스템에 대한 검토를 위해 일반적으로 예를 들어, 문헌[Zhang 등, 2009, “Adenovirus-adeno-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production,” Human Gene Therapy 20:922-929]을 참조하며, 이의 내용은 전문이 참조에 의해 본원에 원용된다. 또한, 이러한 및 상이한 AAV 생산 시스템을 제조하고 사용하는 방법은 다음 미국 특허에서 설명되어 있으며, 이의 내용은 전문이 참조에 의해 본원에 원용된다: 제5,139,941호; 제5,741,683호; 제6,057,152호; 제6,204,059호; 제6,268,213호; 제6,491,907호; 제6,660,514호; 제6,951,753호; 제7,094,604호; 제7,172,893호; 제7,201,898호; 제7,229,823호; 및 제7,439,065호, 이는 참조에 의해 본원에 원용된다.

[0066] 조 세포 채취물은 이후 추가적인 방법 단계, 예컨대, 벡터 채취물의 농축, 벡터 채취물의 정용여과, 벡터 채취물의 미세유동화, 벡터 채취물의 뉴클레아제 분해, 미세유동화 중간체의 여과, 크로마토그래피에 의한 조 정제, 초원심분리에 의한 조 정제, 접선 유동 여과에 의한 완충제 교환, 및/또는 벌크 벡터를 제조하기 위한 제제화 및 여과를 거칠 수 있다.

[0067] 높은 염 농도에서 2단계 친화성 크로마토그래피 정제 이후 음이온 교환 수지 크로마토그래피는 벡터 약물 생성물을 정제하고 중공 캡시드를 제거하기 위해 사용된다. 이러한 방법은 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허출원 PCT/US2016/065970호에 보다 상세히 기술되어 있으며, 이는 본원에 참조로 포함된다. 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허출원 PCT/US2016/065976호의 AAV8에 대한 정제 방법, 및 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허출원 PCT/US16/66013호, 또한 2015년 12월 11일자로 출원된 명칭이 "Scalable Purification Method for AAVrh10"인 rh10에 대한 정제 방법, 및 2016년 12월 9일자로 출원된 국제 특허출원 PCT/US2016/065974호, 2015년 12월 11일자로 출원된 "Scalable Purification Method for AAV1"인 AAV1에 대한 정제 방법은 모두 본원에 참조로 포함된다.

[0068] 빈 입자 및 채워진 입자 함량을 계산하기 위해, 선택된 샘플에 대한 VP3 밴드 부피(*예를 들어*, 본 명세서의 예에서 아이오딕사놀 구배-정제 제제, 여기서, GC의 # = 입자의 #임)는 로딩된 GC 입자에 대해 플로팅된다. 생성된 선형 방정식(y = mx+c)은 시험 항목 피크의 밴드 부피에서 입자 수를 계산하는 데 사용된다. 그 다음 로딩된 20 μL당 입자 수(pt)에 50을 곱하여 입자(pt)/mL를 제공한다. Pt/mL를 GC/mL로 나눈 값은 입자 대 게놈 복제체의 비율(pt/GC)을 제공한다. Pt/mL-GC/mL은 빈 pt/mL를 제공한다. 중공 pt/mL를 pt/mL로 나누고 100을 곱하여서 중공 입자의 백분율을 제공한다.

[0069] 일반적으로, 빈 캡시드 및 패키징된 게놈이 있는 AAV 벡터 입자에 대한 분석 방법은 당업계에 알려져 있다. 예를 들어, Grimm 등, *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer 등, Molec. Ther. (2003) 7:122-128을 참조한다. 변성 캡시드를 시험하기 위해, 방법은 처리된 AAV 스톡이 3가지 캡시드 단백질을 분리한 수 있는 임의의 겔, 예를 들어, 완충제 중 3 내지 8% 트리스-아세테이트를 함유하는 구배 겔로 구성되는 SDS-폴리아크릴아마이드 겔 전기영동을 거치는 단계, 그 후, 검체 물질이 분리될 때까지 겔을 진행하는 단계 및 겔을 나일론 또는 나이트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론상에 블롯팅하는 단계를 포함한다. 이어서, 항-AAV 캡시드 항체는 변성된 캡시드 단백질, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론성 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론성 항체에 결합하는 1차 항체로서 사용된다(Wobus 등, *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). 그 후, 1차 항체에 결합하고 1차 항체와의 결합을 검출하기 위한 수단을 함유하는 2차 항체, 더 바람직하게는 1차 항체에 공유 결합되는 검출 분자를 함유하는 항IgG 항체, 가장 바람직하게는 호스래디쉬 퍼옥시다제에 공유 연결되는 양 항마우스 IgG 항체가 사용된다. 결합을 검출하기 위한 방법, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출을 검출할 수 있는 검출 방법, 전자기 복사 또는 비색 변화, 가장 바람직하게는 화학발광 검출 키트는 1차 항체와 2차 항체 사이의 결합을 반정량적으로(semi-quantitatively) 결정하기 위해 사용된다. 예를 들어, 에스디에스-페이지(SDS-PAGE)에 대해, 칼럼 분획으로부터 유래한 검체를 취할 수 있고 환원제(*예를 들어*, DTT)를 함유하는 SDS-PAGE 로딩 완충제에서 가열될 수 있으며, 캡시드 단백질은 주조전 구배 폴리아크릴아마이드 겔(*예를 들어*, 노벡스(Novex)) 상에서 분해되었다. 은 염색은 제조업자의 설명서 또는 다른 적합한 염색 방법, 즉, SYPRO 루비 또는 쿠마시 염색에 따라 SilverXpress(캘리포니아주 Invitrogen)를 사용하여 수행될 수 있다. 일 실시양태에서, 칼럼 분획 중 AAV 벡터 게놈(vg) 농도는 정량적 실시간 PCR(Q-PCR)에 의해 측정될 수 있다. 외인성 DNA를 제거하기 위해 샘플은 DNase I(또는 다른 적합한 뉴클레아제)를 이용하여 희석되고 분해된다. 뉴클레아제의 비활성화 후, 검체는 더 희석되며 프라이머 사이의 DNA 서열에 특이적인 TaqMan™ 형광원 프로브 및 프라이머를 사용하여 증폭된다. 정의된 형광 수준에 도달하는 데 필요한 주기(역치 주기, Ct)의 수를 Applied Biosystems Prism 7700 서열 검출 시스템상에서 각 검체에 대해 측정한다. AAV 벡터에 포함된 것과 동일한 서열을 포함하는 플라스미드 DNA가 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성하기 위해 이용된다. 검체로부터 수득한 주기 역치(Ct) 값은 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값으로 정규화하여 벡터 게놈 역가를 결정하는 데 사용된다. 또한, 디지털 PCR에 기반하는 종점 분석을 사용할 수 있다.

[0070] 일 양태에서, 광역 세린 프로테아제, 예를 들어 프로테이나제 K(예컨대, Qiagen으로부터 상업적으로 입수 가능함)를 이용하는 최적화된 q-PCR 방법이 사용된다. 더 구체적으로는, 최적화된 qPCR 게놈 역가 검정은 DNase I 분해 후, 검체가 프로테이나제 K 완충제에 의해 희석되고 프로테이나제 K로 처리된 후에 열 비활성화된다는 것을 제외하면 표준 검정과 유사하다. 적합하게는 검체는 검체 크기와 동일한 양으로 프로테이나제 K 완충제에 의해 희석된다. 프로테이나제 K 완충액은 2배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2 mg/mL이나, 0.1 mg/mL 내지 약 1 mg/mL로 다를 수 있다. 처리 단계는 일반적으로 약 55℃에서 약 15분 동안 수행되지만, 더 낮은 온도(예를 들어, 약 37℃ 내지 약 50℃)에서 더 오랜 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 5 내지 10분) 동안 수행될 수 있다. 유사하게, 열 불활성화는 일반적으로 약 95℃에서 약 15분 동안 이루어지지만, 온도가 더 낮아질 수 있고(예를 들어, 약 70 내지 약 90℃) 시간이 연장될 수 있다(예를 들어, 약 20분 내지 약 30분). 그 후, 검체를 희석하고(예를 들어, 1000배), TaqMan 분석을 표준 검정에서 설명되는 바와 같이 수행한다.

[0071] 추가적으로, 또는 대안적으로, 점적 디지털 PCR(ddPCR)이 사용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의해 단일 가닥 및 자가 상보성 AAV 벡터 게놈 역가를 결정하는 방법이 설명되었다. 예를 들어, M. Lock 등, Hu Gene Therapy Methods, Hum Gene Ther Methods. 2014년 4월;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014년 2월 14일를 참조한다.

[0072] 요약하면, 게놈 결핍 AAV 중간체로부터 패키징되는 게놈 서열을 갖는 rAAV 입자를 분리하기 위한 방법은 재조합 AAV 바이러스 입자 및 AAV 캡시드 중간체를 포함하는 현탁액이 고속 액체 크로마토그래피를 거치게 하는 단계를 포함하며, 여기서 AAV 바이러스 입자 및 AAV 중간체는 높은 pH에서 평형화되는 강한 음이온 교환 수지에 결합되고, 약 260 및 약 280에서 자외선 흡광도에 대해 용출액을 모니터링하면서 염 구배를 거친다. pH는 선택된 AAV에 따라 조절될 수 있다. 예를 들어, WO2017/160360호 (AAV9), WO2017/100704호 (AAVrh10), WO 2017/100676호 (예를 들어, AAV8), 및 WO 2017/100674호 (AAV1)를 참조하고, 이는 본원에 참조로 포함된다. 이러한 방법에서, AAV 전체 캡시드는 A260/A280의 비율이 변곡점에 도달할 때 용리되는 분획으로부터 수집된다. 일 예에서, 친화성 크로마토그래피 단계의 경우, 정용여과된 산물은 AAV2 혈청형을 효율적으로 포획하는 Capture Select™ Poros-AAV2/9 친화성 수지(Life Technologies)에 적용될 수 있다. 이러한 이온 조건하에서, 유의한 비율의 잔류

세포성 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해 유동하는 반면, AAV 입자는 효율적으로 포획된다.

[0073] 비-AAV 및 비-바이러스 벡터

[0074] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "벡터"는 상기 핵산 서열의 복제 또는 발현을 위해 적절한 표적 세포 내로 도입될 수 있는 핵산 서열을 포함하는 생물학적 또는 화학적 모이어티이다. 벡터의 예는 재조합 바이러스, 플라스미드, 리포플렉스, 폴리머좀, 폴리플렉스, 덴드리머, 세포 투과 펩타이드(CPP) 접합체, 자성 입자 또는 나노입자를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 일 실시양태에서, 벡터는 외인성 또는 이종성 또는 조작된 miRNA가 삽입될 수 있는 핵산 분자이며, 이는 그 후 적절한 표적 세포로 도입될 수 있다. 이러한 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제 기점 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 종종 벡터를 갖는 세포가 벡터가 없는 세포로부터 선택될 수 있는 수단을 가지며, 예를 들어, 벡터는 약물 저항성 유전자를 인코딩한다. 일반적인 벡터는 플라스미드, 바이러스 게놈, 및 "인공 염색체"를 포함한다. 벡터의 생성, 생산, 특성화, 또는 정량화의 통상적인 방법은 당업계의 기술자에게 이용가능하다.

[0075] 일 실시양태에서, 벡터는 이의 설명되는 발현 카세트, 예를 들어, "네이키드 DNA(naked DNA)", "네이키드 플라스미드 DNA(naked plasmid DNA)", RNA, mRNA, shRNA, RNAi 등을 포함하는 비바이러스 플라스미드이다. 선택적으로 플라스미드 또는 다른 핵산 서열은 적합한 장치를 통해, 예를 들어 전기분무, 전기천공을 통해 전달된다. 다른 구현예에서, 핵산 분자는 예를 들어, 미셀, 리포좀, 양이온성 지질-핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 다른 중합체, 지질 및/또는 콜레스테롤-기반 핵산 컨쥬게이트, 및 본원에 기술된 것과 같은 다른 작제물을 포함하는, 다양한 조성물 및 나노입자와 커플링된다. 예를 들어, WO2014/089486, US 2018/0353616A1, US2013/0037977A1, WO2015/074085A1, US9670152B2 및 US 8,853,377B2, X. Su 등, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787; 웹 공개; 2011년 3월 21일; WO2013/182683, WO 2010/053572 및 WO 2012/170930 참조, 이들 모두는 참조에 의해 본원에 원용됨.

[0076] 특정 실시양태에서, 비바이러스 벡터는, 예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 27에서, 내인성 hAR을 표적으로 하는 miRNA 전사체의 전달을 위해 사용된다. 일부 실시양태에서, miRNA는 투여량당 miRNA의 약 0.5 mg/kg 초과(예를 들어, 약 1.0 mg/kg, 1.5 mg/kg, 2.0 mg/kg, 2.5 mg/kg, 3.0 mg/kg, 4.0 mg/kg, 5.0 mg/kg, 6.0 mg/kg, 7.0 mg/kg, 8.0 mg/kg, 9.0 mg/kg 또는 10.0 mg/kg 초과) 체중의 양으로 전달된다. 일부 실시양태에서, miRNA는 투여량당 miRNA의 약 0.1 내지 100 mg/kg(예를 들어, 약 0.1 내지 90 mg/kg, 0.1 내지 80 mg/kg, 0.1 내지 70 mg/kg, 0.1 내지 60 mg/kg, 0.1 내지 50 mg/kg, 0.1 내지 40 mg/kg, 0.1 내지 30 mg/kg, 0.1 내지 20 mg/kg, 0.1 내지 10 mg/kg) 체중의 양으로 전달된다. 일부 실시양태에서, miRNA는 투여량당 약 1 mg, 5 mg, 10 mg, 15 mg, 20 mg, 25 mg, 30 mg, 35 mg, 40 mg, 45 mg, 50 mg, 55 mg, 60 mg, 65 mg, 70 mg, 75 mg, 80 mg, 85 mg, 90 mg, 95 mg, 100 mg, 150 mg, 200 mg, 250 mg, 300 mg, 350 mg, 400 mg, 450 mg 또는 500 mg 초과의 양으로 전달된다.

[0077] 특정 실시양태에서, miRNA 전사체는 지질 나노입자(LNP)에 캡슐화된다. 본원에서 사용되는 어구 "지질 나노입자"는 하나 이상의 지질(예를 들어, 양이온성 지질, 비양이온성 지질 및 PEG 변형 지질)을 포함하는 전달 비히클을 지칭한다. 바람직하게는, 지질 나노입자는 하나 이상의 miRNA를 하나 이상의 표적 세포(예를 들어, 배근 신경절, 하부 운동 뉴런 및/또는 상위 운동 뉴런 또는 CNS에 있는 위에서 식별되는 세포 유형)를 전달하기 위해 제제화된다. 적합한 지질의 예는 예를 들어, 포스파티딜 화합물 (예를 들어, 포스파티딜글리세롤, 포스파티딜콜린, 포스파티딜세린, 포스파티딜에탄올아민, 스핑고지질, 세레브로시드 및 강글리오시드)을 포함한다. 단독으로 또는 다른 전달 비히클과 조합하여, 중합체를 전달 비히클로 사용하는 것도 고려된다. 적합한 중합체는 예를 들어, 폴리아크릴레이트, 폴리알킬시아노아크릴레이트, 폴리락타이드, 폴리락타이드-폴리글리콜라이드 공중합체, 폴리카프로락톤, 덱스트란, 알부민, 젤라틴, 알지네이트, 콜라겐, 키토산, 사이클로덱스트린, 덴드리머 및 폴리에틸렌이민을 포함할 수 있다. 일 구현예에서, 전달 비히클은 표적 세포로 miRNA의 형질주입을 용이하게 하는 능력을 기반으로 선택된다. miRNA에 유용한 지질 나노입자는 단백질 생성을 위한 저장소 역할을 할 표적 세포로의 miRNA 전달을 캡슐화하고/하거나 향상시키기 위한 양이온성 지질을 포함한다. 본원에서 사용되는 어구 "양이온성 지질"은 선택된 pH, 예컨대, 생리학적 pH에서 순 양전하를 운반하는 임의의 다수의 지질 종을 지칭한다. 상기 고안된 지질 나노입자는 하나 이상의 양이온성 지질, 비-양이온성 지질 및 PEG-변형 지질을 사용하는 다양한 비율의 다성분 지질 혼합물을 포함함으로써 제조될 수 있다. 여러 양이온성 지질이 문헌에 기재되어 있으며, 이들 중 다수는 상업적으로 입수 가능하다. 예를 들어, WO2014/089486, US 2018/0353616A1 및 US 8,853,377B2 참조, 이는 참조에 의해 원용됨. 특정 구현예에서, LNP 제형은 콜레스테롤, 이온화 지질, 헬퍼 지질, PEG-지질 및 캡슐화된 mRNA 주위에 지질 이중층을 형성하는 중합체를 포함하는 정례적인 절차를 사용하여 수행된다(Kowalski 등, 2019, Mol. Ther. 27(4):710-728). 일부 실시양태에서, LNP는 헬퍼 지질 DOPE를 갖는

양이온성 지질(즉, N-[1-(2,3-디올레오일옥시)프로필]-N,N,N-트라이메틸암모늄 클로라이드(DOTMA) 또는 1,2-디올레오일-3-트라이메틸암모늄-프로판(DOTAP))을 포함한다. 일부 구현예에서, LNP는 이온화 지질 Dlin-MC3-DMA 이온화 지질, 또는 디케토피페라진계 이온화 지질(cKK-E12)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 중합체는 폴리에틸렌이민(PEI) 또는 폴리(β-아미노)에스테르(PBAE)를 포함한다. (예를 들어, WO2014/089486, US 2018/0353616A1, US2013/0037977A1, WO2015/074085A1, US9670152B2 및 US 8,853,377B2 참조, 이는 참조에 의해 원용됨)

[0078] 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 벡터는 발현 카세트가 적어도 하나의 miRNA 표적화 hAR을 코딩하는 핵산 서열을 함유하는 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하는 "복제-결함 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"이다. 복제-결함성 바이러스는 자손 비리온을 생성할 수 없지만, 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 실시양태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제에 필요한 효소를 코딩하는 유전자를 포함하지 않으나(게놈은 "무기력"(인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호가 측접한 E2를 인코딩하는 핵산 서열만을 함유함)하도록 조작될 수 있음), 이러한 유전자는 생성 동안 공급될 수 있다. 따라서, 자손 비리온에 의한 복제 및 감염은 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재를 제외하고 발생할 수 없기 때문에 이는 유전자 요법에서 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

[0079] 본원에서 사용되는 재조합 바이러스 벡터는 예를 들어, 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV), 아데노바이러스, 보카바이러스, 하이브리드 AAV/보카바이러스, 단순 헤르페스 바이러스 또는 렌티바이러스를 포함하는 임의의 적합한 복제-결함 바이러스 벡터일 수 있다.

[0080] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "숙주 세포"는 벡터(예를 들어, 재조합 AAV)가 생성되는 패키징 세포주를 지칭할 수 있다. 숙주 세포는 임의의 수단, 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 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 이종성 DNA를 함유하는 원핵 또는 진핵 세포(예를 들어, 인간, 곤충 또는 효모)일 수 있다. 숙주 세포의 예는 단리된 세포, 세포 배양물, 대장균(에스케리치아 콜라이(Escherichia coli)) 세포, 효모 세포, 인간 세포, 비-인간 세포, 포유동물 세포, 비-포유동물 세포, 곤충 세포, HEK-293 세포, 간 세포, 신장 세포, 중추신경계 세포, 뉴런, 신경아교세포, 또는 줄기 세포를 포함할 수 있지만 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본원에서 사용되는 용어 "표적 세포"는 miRNA의 발현이 요망되는 임의의 표적 세포를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 용어 "표적 세포"는 SBMA에 대해 치료되는 대상체의 세포를 지칭하도록 의도된다. 표적 세포의 예는, 이에 제한되지는 않으나, 중추 신경계 내의 세포를 포함할 수 있다.

[0082] 조성물

[0083] 인간 안드로겐 수용체(예를 들어, rAAV.AR-miR 스톡)을 표적화하는 miRNA를 코딩하는 서열을 포함하는 적어도 하나의 벡터 및/또는 AR-miR을 포함하는 적어도 하나의 벡터 및/또는 AR-miR 스톡을 포함하는 적어도 하나의 벡터, 및 선택적 담체, 부형제 및/또는 보존제를 함유하는 조성물이 본원에서 제공된다. 벡터(예를 들어, rAAV) 스톡은 농도 및 투약 단위의 논의에서 아래에서 설명되는 양과 동일한 복수의 벡터를 지칭한다.

[0084] 특정 실시양태에서, 조성물은 적어도 SBMA를 단독으로 또는 다른 벡터 스톡 또는 조성물과 조합하여 치료하는 데 사용하기에 적합한 재조합 AAV(rAAV)인 바이러스 스톡을 포함한다. 특정 실시양태에서, 조성물은 SBMA를 치료하는 데 사용하기에 적합한 재조합 AAV(rAAV)인 바이러스 스톡을 포함하며, 상기 rAAV는 (a) 아데노-연관 바이러스 캡시드 및 (b) AAV 캡시드 내 패키징되는 벡터 게놈으로서, 상기 벡터 게놈은 AAV 반전 말단 반복부, 인간 안드로겐 수용체를 특이적으로 표적으로 하는 적어도 하나의 miRNA에 대한 코딩 서열 및 miRNA의 발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는, 벡터 게놈을 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 프로모터, 인핸서, 인트론, 서열식별번호: 1의 hAR 서열을 표적화하는 miRNA 코딩 서열, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 특정 구현예에서, 벡터 게놈은 벡터 게놈의 모든 요소의 측면에 있는 AAV2 5' ITR 및 AAV2 3' ITR을 추가로 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 프로모터, 인핸서, 인트론, miR 3610을 코딩하는 miRNA 코딩 서열, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다. 특정 실시양태에서, 벡터 게놈은 프로모터, 인핸서, 인트론, miR 3613을 코딩하는 miRNA 코딩 서열, WPRE 및 폴리아데닐화 신호를 포함한다.

[0085] rAAV.AR-miR은 생리학적으로 양립 가능한 담체에 현탁되어 인간 SBMA 환자에게 투여될 수 있다. 특정 실시양태에서, 인간 환자에 대한 투여를 위해, 벡터는 식염수, 계면활성제 및 생리학적으로 양립 가능한 염 또는 염의 혼합물을 함유하는 수용액에서 적합하게 현탁된다. 적합하게는, 제제는 생리학적으로 허용 가능한 pH로, 예를

들어, pH 6 내지 9, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8의 범위로 조정된다. 척수강내 전달을 위해, 뇌척수액의 pH는 약 7.28 내지 약 7.32, 또는 pH 7.2 내지 7.4이므로, 이 범위 내의 pH가 바람직할 수 있으며; 한편, 정맥내 전달을 위해, 약 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이러한 하위범위 내의 다른 pH가 다른 전달 경로에 대해 선택될 수 있다.

[0086] 특정 실시형태에서, 제형은 중탄산나트륨을 포함하지 않는 완충 식염수 수용액을 함유할 수 있다. 이러한 제형은 수 중에 인산나트륨, 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 및 이들의 혼합물 중 하나 이상을 포함하는 완충 식염수 수용액, 예컨대, 하버드 완충제을 함유할 수 있다. 수용액은 이전에 상표명 Lutrol® F68로 판매되었던 BASF로부터 상업적으로 입수 가능한 폴록사머인 Kolliphor® P188을 추가로 함유할 수 있다. 수용액은 pH 7.2 또는 pH 7.4일 수 있다.

[0087] 다른 실시양태에서, 제제는 1 mM 인산 나트륨(Na3PO4), 150 mM 염화 나트륨(NaCl), 3 mM 염화 칼륨(KCl), 1.4 mM 염화 칼슘(CaCl2), 0.8 mM 염화 마그네슘(MgCl2), 및 0.001% Kolliphor® 188을 포함하는 완충 식염수 수용액을 함유할 수 있다. (예를 들어, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html 참조) 특정 구현예에서, 하버드 완충액이 바람직하다.

[0088] 다른 실시양태에서, 제제는 하나 이상의 투과 향상제를 함유할 수 있다. 적합한 투과 증진제의 예는, 예를 들어, 만니톨, 소듐 글리콜레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 데옥시콜레이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 카프릴레이트, 소듐 카프레이트, 소듐 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우렐 에터, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.

[0089] 다른 실시형태에서, 조성물은 담체, 희석제, 부형제 및/또는 아쥬반트를 포함한다. 적합한 담체는 전달 바이러스가 지시되는 지표를 고려하여 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 적합한 한 가지 담체는 식염수를 포함하며, 이는 다양한 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 식염수)으로 제형화될 수 있다. 다른 예시적인 담체는 멸균 식염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 덱스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참깨유 및 물을 포함한다. 완충액/담체는 rAAV가 주입 튜브에 달라붙는 것을 방지하지만, 생체내에서 rAAV 결합 활성을 방해하지 않는 성분을 포함하여야 한다.

[0090] 선택적으로, 조성물은, 벡터(예를 들어, rAAV) 및 담체에 더하여, 다른 종래의 약제학적 성분, 예컨대, 보존제, 또는 화학적 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 소르빈산 칼륨, 소르빈산, 이산화 황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0091] 본원에서 사용되는 "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장화제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁제, 콜로이드 등을 포함한다. 약제학적 활성 물질에 대한 이러한 매질 및 작용제의 용도는 당해 기술분야에서 잘 알려져 있다. 또한, 보충 활성 성분은 조성물 내에 혼입될 수 있다. 어구 "약제학적으로 허용 가능한"은 숙주에게 투여될 때 알레르기 또는 유사한 원치 않는 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다. 리포좀, 나노캡슐, 마이크로입자, 미소구체, 지질 입자, 소포체 등과 같은 전달 비히클은 본 발명의 조성물을 적합한 숙주 세포에 도입하기 위해 사용될 수 있다. 특히, rAAV 벡터로 전달되는 전이유전자는 지질 입자, 리포좀, 소포, 나노스피어, 또는 나노입자 등에 캡슐화된 전달을 위해 제형화될 수 있다.

[0092] 일 실시형태에서, 조성물은 대상체에게 전달하기에 적합한 최종 제형을 포함하고, 예를 들어, 생리학적으로 양립 가능한 pH 및 염 농도로 완충된 수성 액체 현탁액이다. 선택적으로, 하나 이상의 계면활성제가 제제에 존재한다. 다른 실시형태에서, 조성물은 대상체에 투여를 위해 희석되는 농축물로서 수송될 수 있다. 다른 실시양태에서, 조성물은 동결건조될 수 있으며 투여 시 재구성될 수 있다.

[0093] 적합한 계면활성제 또는 계면활성제의 조합은 무독성인 비이온성 계면활성제 중으로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 예를 들어, pH가 중성이며 평균 분자량이 8400인 폴록사머(Poloxamer) 188로도 알려진 Pluronic® F68[BASF]과 같은 1차 하이드록실 기로 종결되는 이작용성 블록 공중합체 계면활성제가 선택된다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 사슬이 측면에 있는 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 삼중블록 공중합체, SOLUTOL HS 15(마크로골-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴릭 글리세라이드), 폴리옥시 10 올레일 에테르, TWEEN(폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다. 일 실시양태에서, 제제는 폴록사머를 함유한다. 이러한 공중합체는 일반적으로 문자 "P"(폴록사머의 경우)와 그 뒤

의 세 자리 숫자로 명명되며: 처음 두 자리×100은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략적인 분자량을 제공하고, 마지막 숫자×10은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 현탁액의 최대 약 0.0005 % 내지 약 0.001%까지의 양으로 존재할 수 있다.

[0094] 벡터는 세포를 트랜스펙션시키고, 의학 분야의 숙련자에 의해 결정될 수 있는, 과도한 부작용 없이 또는 의학적으로 허용되는 생리학적 효과와 함께 치료적 이점을 제공하기 위한 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하기에 충분한 양으로 투여된다. 선택적으로, 예를 들어, 목적한 장기(*예를 들어*, 간(선택적으로 간동맥을 통해), 폐, 심장, 안구, 신장)으로의 직접 전달, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 및 다른 비경구 투여 경로와 같은, 척수강내 투여 이외의 경로가 사용될 수 있다. 원하는 경우 투여 경로는 조합될 수 있다.

[0095] 벡터의 투약량은 주로 치료될 병태, 환자의 연령, 체중 및 건강과 같은 인자에 따라 달라지며 따라서 환자에 따라 달라질 수 있다. 예를 들어, 바이러스 벡터의 치료학적으로 효과적인 인간 투약량은 (체중이 70 kg인 평균 대상체를 치료하기 위해) 일반적으로 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 약 1 x 10^{9} 내지 1 x 10^{16} 게놈 바이러스 벡터의 농도를 함유하는 약 25 내지 약 1000 마이크로리터 내지 약 100 mL의 용액이고, 바람직하게는 인간 환자의 경우 1.0 x 10^{12} GC 내지 1.0 x 10^{14} GC이다. 일 실시양태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{9}, 2x10^{9}, 3x10^{9}, 4x10^{9}, 5x10^{9}, 6x10^{9}, 7x10^{9}, 8x10^{9} 또는 9x10^{9} GC를 함유하도록 제제화된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{10}, 2x10^{10}, 3x10^{10}, 4x10^{10}, 5x10^{10}, 6x10^{10}, 7x10^{10}, 8x10^{10}, 또는 9x10^{10}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 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}개 GC를 포함하도록 제형화된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{12}, 2x10^{12}, 3x10^{12}, 4x10^{12}, 5x10^{12}, 6x10^{12}, 7x10^{12}, 8x10^{12} 또는 9x10^{12} GC를 함유하도록 제제화된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분할량을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{13}, 2x10^{13}, 3x10^{13}, 4x10^{13}, 5x10^{13}, 6x10^{13}, 7x10^{13}, 8x10^{13} 또는 9x10^{13} GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분할량을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{14}, 2x10^{14}, 3x10^{14}, 4x10^{14}, 5x10^{14}, 6x10^{14}, 7x10^{14}, 8x10^{14} 또는 9x10^{14} GC를 함유하도록 제형화된다. 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분할량을 포함하여 용량당 적어도 1x10^{15}, 2x10^{15}, 3x10^{15}, 4x10^{15}, 5x10^{15}, 6x10^{15}, 7x10^{15}, 8x10^{15} 또는 9x10^{15} GC를 함유하도록 제형화된다. 일 실시양태에서, 인간 적용의 경우, 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC의 범위일 수 있다.

[0096] 특정 실시양태에서, 투여량은 약 1 x 10^{9} GC/g 뇌 질량 내지 약 1 x 10^{12} GC/g 뇌 질량의 범위이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 약 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량의 범위이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량 내지 약 1.1 x 10^{12} GC/g 뇌 질량의 범위이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 1.1 x 10^{12} GC/g 뇌 질량 내지 약 3.33 x 10^{13} GC/g 뇌 질량의 범위이다. 특정 구현예에서, 투여량은 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량 미만이다. 특정 구현예에서, 용량은 1.1 x 10^{12} GC/g 뇌 질량 미만이다. 특정 구현예에서, 용량은 3.33 x 10^{13} GC/g 뇌 질량 미만이다. 특정 실시양태에서, 투여량은 약 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 2 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 2 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 3 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 4 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 5 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 6 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 7 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 8 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 투여량은 약 9 x 10^{10} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 1 x 10^{11} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 2 x 10^{11} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 3

x 10^{11} GC/g 뇌 질량이다. 특정 구현예에서, 용량은 약 4 x 10^{11} GC/g 뇌 질량이다. 특정 실시양태에서, 투여량은 rAAV의 약 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC 범위의 고정 용량(flat dose)으로 인간에게 투여된다. 특정 구현예에서, 투여량은 rAAV 중 약 1.44 x 10^{13} 내지 2 x 10^{14} GC 범위의 고정 투여량으로 인간에게 투여된다. 특정 구현예에서, 투여량은 rAAV 중 약 3 x 10^{13} 내지 1 x 10^{14} GC 범위의 고정 투여량으로 인간에게 투여된다. 특정 구현예에서, 투여량은 rAAV 중 약 5 x 10^{13} 내지 1 x 10^{14} GC 범위의 고정 투여량으로 인간에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 조성물은 rAAV의 1 x 10^{13} 내지 8 x 10^{14} GC 범위인 AAV의 양을 함유하도록 투약량 단위로 제제화될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 rAAV 중 약 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC 범위 내에 있는 rAAV의 양을 함유하도록 투여량 단위로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 rAAV 중 약 3 x 10^{13} 내지 1 x 10^{14} GC 범위 내에 있는 rAAV의 양을 함유하도록 투여량 단위로 제형화될 수 있다. 일부 구현예에서, 조성물은 rAAV 중 약 5 x 10^{13} 내지 1 x 10^{14} GC 범위 내에 있는 rAAV의 양을 함유하도록 투여량 단위로 제형화될 수 있다.

[0097] 특정 실시양태에서, 벡터는 대상체에게 단일 용량으로 투여된다. 특정 구현예에서, 벡터는 요구되는 다중 주사(예를 들어, 2회 용량)를 통해 전달될 수 있다.

[0098] 투약량은 임의의 부작용에 대한 치료적 이익의 균형을 맞추기 위해 조정될 것이며, 이와 같은 투약량은 재조합 벡터가 이용되는 치료적 적용에 따라 달라질 수 있다. 전이유전자의 발현 수준은 바이러스 벡터, 바람직하게는 미니유전자를 함유하는 AAV 벡터를 생성하는 투여 빈도를 결정하기 위해 모니터링될 수 있다. 선택적으로, 치료 목적을 위해 기술된 것과 유사한 투여 요법이 본원의 조성물을 사용한 면역화에 이용될 수 있다.

[0099] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "척추강내 전달" 또는 "척추강내 투여"는 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 주사를 통해 척추관으로, 보다 구체적으로는 지주막하 공간으로의 투여 경로를 지칭한다. 척추강내 전달은 요추 천자, 뇌실내(뇌실내(ICV)를 포함), 후두하/수조내, 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 요추 천자를 통해 지주막하 공간 전체에 걸친 확산을 위해 물질이 도입될 수 있다. 다른 예에서, 대조 내로 주사될 수 있다. 특정 실시예에서, 전달은 오마야(Ommaya) 저장소와 같은 경막하 이식형 장치를 사용하여 달성된다.

[0100] 본원에서 사용되는 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여"는 소뇌연수 대조의 뇌척수액으로, 보다 구체적으로는 후두하 천자를 통해 또는 대조 내로의 직접 주사에 의해 또는 영구적으로 위치한 튜브를 통해 직접 투여하는 경로를 지칭한다.

[0101] (예를 들어, SBMA 환자에서) 내인성 hAR를 억제하기 위해 본원에서 설명되는 miR 표적 서열을 포함하는 조성물은 일반적으로 뉴런(예를 들어, 하위 운동 뉴런 및/또는 1차 감각 뉴런을 포함함. 이는 추상 세포, 푸르키네 세포, 과립 세포, 방추 세포 및 사이신경 세포를 포함할 수 있음)을 포함하나 이에 제한되지 않는 중추 신경계 내에 있는 하나 이상의 상이한 세포 유형을 표적으로 한다.

[0102] 용도

[0103] 본원에서 제공되는 벡터 및 조성물은 척수 및 연수 근위축증(SBMA) 또는 이와 연관되는 다양한 증상이 있는 환자를 치료하는 데 유용하다. SBMA가 있는 환자를 치료하기 위한 요법이 제공된다. 특정 실시양태에서, 요법은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 재조합 핵산 서열을 투여하는 단계를 포함하며, 핵산 서열은 대상체에서 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제한다. 특정 실시양태에서, miRNA 표적 부위는 GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 본원에서 설명되는 AAV, 발현 카세트, 핵산 또는 조성물이 사용된다.

[0104] 특정 실시양태에서, 조성물은 rAAV의 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량으로 척수강내로 투여되도록 제제화된다. 다른 실시양태에서, 환자는 성인이며 rAAV의 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC의 투여량으로 투여된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달된다. 다른 실시양태에서, 조성물은 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)(ICM)로 단일 투여량으로 투여된다.

[0105] 선택적으로, 본원에 제공되는 벡터 및 조성물은 아세트아미노펜, 비스테로이드성 항염증 약물(NSAID), 삼환계 항우울제 또는 항간질 약물, 예컨대 카르바마제핀 또는 가바펜틴으로부터 선택되는 하나 이상의 공동 요법과 조

합하여 사용될 수 있다. 다른 공동 요법은 페길화된 IGF-1 모방체(예를 들어, BVS857)(예를 들어, Grunseich C, 등, BVS857 study group. Safety, tolerability, and preliminary efficacy of an IGF-1 mimetic in patients with spinal and bulbar muscular atrophy: a randomised, placebo-controlled trial. Lancet Neurol. 2018년 12월;17(12):1043-1052. doi: 10.1016/S1474-4422(18)30320-X. Epub 2018년 10월 15일. PMID: 30337273 참조), AR 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드(예를 들어, Cell Rep. 2014년 5월 8일; 7(3): 774-784. doi:10.1016/j.celrep.2014.02.008 참조), 인트라바디(예를 들어, INT41), 소분자 Nrf1 또는 Nrf2 활성화제(예를 들어, AJ201, ALZ002, ASC-JM17로 알려짐)(예를 들어, Human Molecular Genetics, 2016, 25권, No. 10 참조), 루프로렐린 아세테이트(예를 들어, Lancet Neurol 2010; 9: 875-84 참조), 두타스테라이드(합성 4-아자스테로이드 화합물) (예를 들어, 1 Lancet Neurol. 2011년 2월; 10(2): 140-147. doi:10.1016/S1474-4422(10)70321-5 참조), mrR-196a, Src 키나아제 억제제(예를 들어, A419259), AR 동형 45(예를 들어, AAV9-AR45) 및 클렌부테롤(예를 들어, Querin G, D'Ascenzo C, Peterle E 등 Pilot trial of clenbuterol in spinal and bulbar muscular atrophy. Neurology 2013;80:2095-8 참조)를 포함한다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 하나 이상의 스테로이드, 예를 들어 프레드니손을 포함하는 면역조절 요법과 조합하여 전달될 수 있다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 컴퓨터 단층촬영(CT)은 신체 구조의 3차원 영상이 축을 따라서 만들어진 일련의 횡단면 영상으로부터 컴퓨터에 의해 구성되는 방사선 촬영을 지칭한다.

[0107] "자가 상보성 핵산"은 핵산 가닥 내의 뉴클레오타이드의 상보성(예를 들어, 염기 쌍)으로 인해 자체적으로 혼성화(즉, 자체적으로 폴딩)되어 단일 가닥 듀플렉스 구조를 형성할 수 있는 핵산을 지칭한다. 자가 상보성 핵산은 다양한 2차 구조, 예컨대 헤어핀 루프, 루프, 돌출부, 접합부 및 내부 돌출부를 형성할 수 있다. 특정 자가 상보성 핵산(예를 들어, miRNA 또는 AmiRNA(인공 miRNA))은 조절 기능, 예컨대, 유전자 침묵을 수행한다.

[0108] 핵산 또는 이의 단편을 지칭하는 경우 용어 "실질적인 상동성" 또는 "실질적인 유사성"은 다른 핵산(또는 이의 상보성 가닥)에 의한 적절한 뉴클레오타이드 삽입 또는 결실로 최적으로 정렬되는 경우 정렬된 서열의 적어도 약 95 내지 99%에서 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 상동성은 길이가 적어도 15개의 뉴클레오타이드인 전장 서열, 또는 이의 오픈 리딩 프레임 또는 다른 적합한 단편에 걸쳐 있다. 적합한 단편의 예가 본원에서 설명된다.

[0109] 핵산 서열과 관련하여 용어 "서열 동일성" "서열 동일성 백분율" 또는 "동일성 백분율"은 최대 대응도로 정렬될 때 동일한 두 서열의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 게놈의 전장에 걸쳐 있을 수 있으며, 유전자 코딩 서열의 전장 또는 적어도 약 500 내지 5000개의 뉴클레오타이드의 단편이 요망된다. 그러나, *예를 들어*, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 보통 적어도 약 20 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 이상의 뉴클레오타이드의 보다 작은 단편 간의 동일성이 또한 요망될 수 있다. 유사하게, "서열 동일성 백분율"은 아미노산 서열에 대해, 단백질의 전장 또는 이의 단편에 걸쳐 용이하게 결정될 수 있다. 적합하게는, 단편은 길이가 적어도 약 8개의 아미노산이며 최대 약 700개의 아미노산일 수 있다. 적합한 단편의 예가 본원에서 설명된다.

[0110] 아미노산, 또는 이의 단편을 언급할 때, 용어 "실질적인 상동성" 또는 "실질적인 유사성"은 다른 아미노산(또는 이의 상보성 가닥)에 의한 적절한 아미노산 삽입 또는 결실로 최적으로 정렬될 때, 정렬된 서열의 적어도 약 95 내지 99%에 뉴클레오타이드 서열 동일성이 있다는 것을 나타낸다. 바람직하게는, 상동성은 적어도 8개의 아미노산, 더 바람직하게는, 적어도 15개의 아미노산 길이인 전장 서열 또는 이의 단백질, *예를 들어*, cap 단백질, rep 단백질 또는 이의 단편에 걸쳐있다. 적합한 단편의 예가 본원에서 설명된다.

[0111] 용어 "고도로 보존된"은 적어도 80% 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 동일성, 더 바람직하게는 97% 이상의 동일성을 의미한다. 동일성은 당업자에 의해 공지된 알고리즘 및 컴퓨터 프로그램의 의존함으로써 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0112] 일반적으로, 두 상이한 아데노-연관 바이러스 사이의 "동일성", "상동성" 또는 "유사성"을 언급할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열에 대해 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 참조 서열과 비교하여 상실되거나 추가되는 염기 또는 아미노산에 대한 수정을 종종 함유하는 다중 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다. 예에서, 참조 지점으로서 공개된 AAV9 서열을 이용하는 AAV 정렬이 수행된다. 임의의 다양한 공개적으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 정렬이 수행된다. 이러한 프로그래의 예는 인터넷 상에서 웹 서버를 통해 액세스 가능한 "Clustal Omega", "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" 및 "MEME"을 포함한다. 이러한 프로그램에 대한 다른 공급원은 통상의 기술자에게 알려져 있다. 대안적으로, Vector NTI 유틸리티가 또한 사용된다. 또한 상기 기재한 프로그램에 포함된 것을 비

롯하여, 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 당업계에 공지된 다수의 알고리즘이 있다. 다른 예로서, GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta™을 사용하여 폴리뉴클레오타이드 서열을 비교할 수 있다. Fasta™는 질의 서열과 검색 서열 사이의 가장 잘 겹치는 영역의 정렬 및 서열 동일성 백분율을 제공한다. 예를 들어, 핵산 서열 사이의 서열 동일성 백분율은 본원에 참조에 의해 원용되는 GCG 버전 6.1에 제공된 바와 같은 기본 매개변수(단어 크기 6 및 점수화 매트릭스에 대해 NOPAM 인자)를 갖는 Fasta™을 이용하여 결정될 수 있다. 다중 서열 정렬 프로그램, *예를 들어*, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램을 또한 아미노산 서열에 대해 이용 가능하다. 일반적으로, 임의의 이러한 프로그램은 기본 설정에서 사용되나, 통상의 기술자는 필요한 경우 이러한 설정을 변경할 수 있다. 대안적으로, 통상의 기술자는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 바와 같은 동일성 또는 정렬 수준을 제공하는 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. *예를 들어*, J. D. Thomson 등, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)을 참조한다.

[0113] 단수 표현의 용어는 하나 이상을 지칭한다는 점에 유의해야 한다. 이와 같이, 용어 "하나", "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 호환 가능하게 사용된다.

[0114] 단어 "포함", "포함하다" 및 "포함하는"은 배타적이 아니라 포괄적으로 해석되어야 한다. 단어 "구성", "구성되는" 및 이의 변형은 포괄적이 아니라 배타적으로 해석되어야 한다. 본 명세서에서 다양한 실시양태가 "포함"이라는 표현을 사용하여 제시되나, 다른 상황하에서, 관련된 실시양태는 또한 "구성" 또는 "본질적으로 구성"이라는 표현을 사용하여 해석되고 설명되는 것으로 의도된다.

[0115] 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한, 주어진 참조값으로부터 10%의 가변성(±10%, 예를 들어, ±1, ±2, ±3, ±4, ±5, ±6, ±7, ±8, ±9, ±10 또는 그 사이의 값)을 의미한다.

[0116] 본원에 사용된 바와 같이, "질환", "장애" 및 "병태"는 대상체에서 비정상적인 상태를 나타내기 위해 상호교환적으로 사용된다.

[0117] 본원에서 사용되는 용어 "SBMA 관련 증상" 또는 "증상"은 SBMA 환자 뿐만 SBMA 동물 모델에서 발견되는 증상을 지칭한다. SBMA의 초기 증상은 팔 및 다리 근육의 약화/경련, 얼굴, 입 및 혀 근육의 약화, 발화 및 연하 곤란, 연축(다발형성), 특정 위치의 진전 및 떨림, 유방 확대, (여성형유방증), 무감각, 불임 및 고환 위축 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 해당 질환은 다리, 팔, 입 및 목의 많은 근육의 움직임을 담당하는 하위 운동 뉴런에 영향을 미친다. 영향을 받은 개체는 종종 혀 및/또는 손에 경련의 징후를 나타낸 후 근육 약화 및 안면 근육 문제를 나타낸다. 척수와 근육을 연결하는 이러한 뉴런은 결함이 생겨 죽게 되어 근육이 수축할 수 없게 된다. 이러한 신경의 파괴는 무감각, 근육 약화 및 근육 수축 제어 불능의 주요 원인이다. 정상적인 신경근 기능이 결여되면, 환자는 근육 경련으로 인해 종아리 근육이 두꺼워지는 종아리 비대를 경험할 수 있다. 일부 경우, 환자의 신체 한쪽이 다른 쪽보다 더 영향을 받을 수도 있다.

[0118] 또한, 이러한 질환은 호흡, 발화, 연하에 중요한 연수 근육을 제어하는 신경에 영향을 미친다. 또한, 안드로겐 무감각이 발생할 수 있으며, 때로는 청소년기에서 시작하여 성인기까지 계속되며 유방 확대, 남성적인 외모 감소 및 불임을 특징으로 한다. 환자는 낮은 정자 수 및 발기 부전과 같은 문제를 경험할 수 있다.

[0119] 본원에서 사용되는 "환자" 또는 "대상체"는 임상 연구에 사용되는 남성 또는 여성 인간, 개 및 동물 모델을 의미한다. 일 실시양태에서, 이러한 방법 및 조성물의 대상체는 SBMA로 진단된 인간이다. 특정 실시양태에서, 이러한 방법 및 조성물의 인간 대상체는 태아기, 신생아, 유아, 보행기 영아(toddler), 미취학 아동, 초등학생, 십대, 청소년 또는 성인이다. 추가 실시양태에서, 이러한 방법 및 조성물의 대상체는 성인 SBMA 환자이다. 추가 실시양태에서, 대상체는 남성이다.

[0120] 용어 "발현"은 가장 넓은 의미로 본원에서 사용되었으며 RNA 또는 RNA 및 단백질의 생성을 포함한다. RNA에 대해, 용어 "발현" 또는 "번역"은 특히 펩타이드 또는 단백질의 생산에 관한 것이다. 발현은 일시적일 수 있거나 안정할 수 있다.

[0121] 본원에 사용되는 "발현 카세트"는 코딩 서열, 프로모터를 포함하고, 이에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있는 핵산 분자를 지칭하며, 카세트는 유전적 요소(*예를 들어*, 플라스미드)를 통해 패키징 숙주 세포로 전달될 수 있으며 바이러스 벡터(*예를 들어*, 바이러스 입자)의 캡시드 내로 패키징될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성하기 위한 이러한 발현 카세트는 측부 영역에 바이러스 게놈의 패키징 신호를 갖는 본원에서 설명되는 miRNA에 대한 코딩 서열 및 본원에서 설명되는 바와 같은 다른 발현 제어 서열을 함유한다.

[0122] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 일정 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 지칭한다.

[0123] 용어 "이종성"은 단백질 또는 핵산에 대해 사용되는 경우 단백질 또는 핵산이 자연에서 서로 동일한 관계에서 발견되지 않는 2개 이상의 서열 또는 후속 서열을 포함한다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 새로운 기능성 핵산을 만들도록 배열된 관련없는 유전자로부터의 둘 이상의 서열을 갖는 핵산은 전형적으로 재조합적으로 생성된다. 예를 들어, 일 실시양태에서, 핵산은 상이한 유전자로부터의 코딩 서열의 발현을 지시하도록 배열되는 하나의 유전자로부터의 프로모터를 갖는다. 따라서, 코딩 서열에 관해, 프로모터는 이종성이다.

[0124] 본 발명의 맥락에서, 용어 "번역"은 리보솜에서의 과정에 관한 것이며, 상기 mRNA 가닥은 아미노산 서열의 조립을 제어하여 단백질 또는 펩티드를 생성한다.

[0125] 특정 실시양태

[0126] 실시양태 1. 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 miRNA 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트로서, 상기 핵산 서열은 대상체에서 상기 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, 상기 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 발현 카세트.

[0127] 실시양태 2. 실시양태 1에 있어서, 상기 miRNA 표적 부위는 GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1)를 포함하는 발현 카세트.

[0128] 실시양태 3. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2)의 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0129] 실시양태 4. 실시양태 1 또는 실시양태 2에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3)의 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0130] 실시양태 5. 실시양태 1 내지 실시양태 4 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 표적화 서열은 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위와 완전한 상보성 미만을 공유하는 발현 카세트.

[0131] 실시양태 6. 실시양태 1 내지 실시양태 5 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은

[0132] a) TCG AGT TCC TTG ATG TAG TTC(서열식별번호: 2)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열; 또는

[0133] b) CGA TCG AGT TCC TTG ATG TAG(서열식별번호: 3)의 서열 또는 최대 10개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0134] 실시양태 7. 실시양태 1 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 4 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0135] 실시양태 8. 실시양태 1 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 5 또는 최대 30개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0136] 실시양태 9. 실시양태 1 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 11 또는 최대 60개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0137] 실시양태 10. 실시양태 1 내지 실시양태 6 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miRNA 코딩 서열은 서열식별번호: 12 또는 최대 60개의 치환을 갖는 서열을 포함하는 발현 카세트.

[0138] 실시양태 11. 실시양태 1 내지 실시양태 10 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 프로모터, 인트론, WPRE 및 폴리 A 중 하나 이상을 포함하는 발현 카세트.

[0139] 실시양태 12. 실시양태 11에 있어서, 상기 조절 서열은 CB7 프로모터 또는 Syn 프로모터를 포함하는 발현 카세트.

[0140] 실시양태 13. 벡터 게놈이 패키징되는 AAV 캡시드를 포함하는 아데노-연관 바이러스(AAV)로서, 상기 벡터 게놈은 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태의 발현 카세트를 포함하며, 상기 발현 카세트는 측부 영역에 5’ AAV ITR 및 3’ AAV ITR을 갖는 AAV.

[0141] 실시양태 14. 실시양태 13에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 AAV9, AAVhu68, AAV1 및 AAVrh91로부터 선택되는 AAV.

[0142] 실시양태 15. 실시양태 14에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 AAVhu68인 AAV.

[0143] 실시양태 16. 실시양태 13 내지 실시양태 15 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 뉴런 특이적 프로모터를 포함하는 AAV.

[0144] 실시양태 17. 실시양태 16에 있어서, 상기 프로모터는 인간 시냅신 프로모터인 AAV.

[0145] 실시양태 18. 실시양태 13 내지 실시양태 17 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 구성적 프로모터를 포함하는 AAV.

[0146] 실시양태 19. 실시양태 18에 있어서, 상기 프로모터는 CB7 프로모터인 AAV.

[0147] 실시양태 20. 실시양태 13 내지 실시양태 19 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 WPRE를 포함하는 AAV.

[0148] 실시양태 21. 실시양태 13 내지 실시양태 20 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 인트론을 포함하는 AAV.

[0149] 실시양태 22. 실시양태 13 내지 실시양태 21 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조절 서열은 토끼 베타 글로빈 폴리 A를 포함하는 AAV.

[0150] 실시양태 23. 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 조성물로서, 상기 핵산 서열은 대상체에서 상기 핵산 서열의 발현을 지시하는 조절 서열에 작동 가능하게 연결되며, 상기 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현을 억제하는 조성물.

[0151] 실시양태 24. 실시양태 23에 있어서, 상기 miRNA 표적은 인간 안드로겐 수용체 mRNA상에 있는 부위: GAA CTA CAT CAA GGA ACT CGA(서열식별번호: 1)를 표적으로 하는 조성물.

[0152] 실시양태 25. 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 발현 카세트, 실시양태 13 내지 실시양태 22 중 어느 한 실시양태에 따른 AAV 또는 실시양태 23 또는 실시양태 24에 따른 조성물, 및 약제학적으로 허용가능한 수성 현탁액, 부형제, 및/또는 희석제를 포함하는 약제학적 조성물.

[0153] 실시양태 26. 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 발현 카세트, 실시양태 13 내지 실시양태 22에 따른 AAV 또는 실시양태 23 또는 실시양태 25에 따른 조성물의 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하는 단계를 포함하는 척수 및 연수 근위축증(SBMA)을 갖는 대상체를 치료하기 위한 방법.

[0154] 실시양태 27. 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 발현 카세트, 실시양태 13 내지 실시양태 22에 따른 AAV 또는 실시양태 23 또는 실시양태 25에 따른 조성물을 척수 및 연수 근위축증(SBMA)을 갖는 환자의 치료에 사용하는 용도.

[0155] 실시양태 28. 실시양태 27에 있어서, 상기 조성물은 상기 rAAV의 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량으로 척수강내로 투여되도록 제제화되는 용도.

[0156] 실시양태 29. 실시양태 27 또는 실시양태 28 중 어느 한 실시양에 있어서, 상기 환자는 성인이며 상기 rAAV의 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC의 투여량으로 투여되는 용도.

[0157] 실시양태 30. 실시양태 27 내지 실시양태 29 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 rAAV는 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달되는 용도.

[0158] 실시양태 31. 실시양태 27 내지 실시양태 29 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 조성물은 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)로 단일 투여량으로 투여되는 용도.

[0159] 실시양태 32. 실시양태 19 내지 실시양태 25 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 환자는 SBMA를 갖는 용도.

[0160] 실시양태 33. 척수 및 연수 근위축증이 있는 인간 환자를 치료하는 방법으로서, 중추 신경계(CNS)에 아데노-연관 바이러스 hu.68(AAVhu.68)의 AAV 캡시드를 갖는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)를 전달하는 단계를 포함하며, 상기 rAAV는 AAV 캡시드에 패키징되는 벡터 게놈을 더 포함하며, 상기 벡터 게놈은 AAV 반전 말단 반복부, 인간 안드로겐 수용체의 mRNA상에 있는 표적 부위에 결합하는 표적화 서열을 포함하는 적어도 하나의 헤어핀 형성 miRNA를 코딩하는 핵산 서열(상기 miRNA는 인간 안드로겐 수용체의 발현 억제함) 및 상기 miRNA의

발현을 지시하는 조절 서열을 포함하는 방법.

[0161] 실시양태 34. 실시양태 33에 있어서, 상기 환자에게 실시양태 1 내지 실시양태 12 중 어느 한 실시양태에 따른 발현 카세트, 실시양태 13 내지 실시양태 22에 따른 AAV 또는 실시양태 23 또는 실시양태 25에 따른 조성물이 투여되는 방법.

[0162] 실시양태 35. 실시양태 33 내지 실시양태 34 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 환자는 척수강내로 상기 rAAV의 1 x 10^{10} GC/g 뇌 질량 내지 3.33 x 10^{11} GC/g 뇌 질량의 투여량이 투여되는 방법.

[0163] 실시양태 36. 실시양태 33 내지 실시양태 35 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 환자는 성인이며 상기 rAAV의 1.44 x 10^{13} 내지 4.33 x 10^{14} GC의 투여량으로 투여되는 방법.

[0164] 실시양태 37. 실시양태 33 내지 실시양태 36 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 miR 코딩 서열을 포함하는 상기 rAAV는 척수강내로, 뇌실내 전달을 통해 또는 뇌실질내 전달을 통해 전달되는 방법.

[0165] 실시양태 38. 실시양태 33 내지 실시양태 37 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 rAAV는 컴퓨터 단층촬영(CT) 유도 후두하 주사를 통해 대조(대조내)로 단일 투여량으로 투여되는 방법.

[0166] 실시양태 39. 실시양태 27 내지 실시양태 35 중 어느 한 실시양태에 있어서, 상기 환자는 SBMA를 갖는 방법.

[0167] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 기술 및 과학 용어는 당해 기술분야의 통상의 기술자에 의해 그리고 본 출원에서 사용되는 많은 용어에 대한 일반적인 가이드를 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 제공하는 공개된 문헌을 참조하여 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

[0168] 실시예

[0169] 다음의 실시예는 단지 예시적이며, 본 발명을 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

[0170] 실시예 1: 시험관 내 안드로겐 수용체(AR) 표적화 miRNA의 스크리닝

[0171] HEK293 세포가 블록-iT 플라스미드로 형질감염되었다. 블록-IT 플라스미드는 CMV 프로모터, emGFP, miRNA 및 TK 폴리A에 대한 클로닝 부위 및 miRNA를 함유하였으며 블록-iT 온라인 소프트웨어를 사용하여 설계되었다. miRNA 측접 영역은 miR155를 기반으로 하였다. 세포 용해물을 추출하였고 RNA 추출 및 qPCR 또는 웨스턴 블롯을 위해 제조하였다. 세포에서 추출한 RNA를 cDNA로 역전사하고 qPCR을 AR에 대한 TaqMan 검정을 사용하여 수행하였다. 그래프는 상이한 miRNA를 사용한 형질감염 후 AR의 녹다운 수준을 나타낸다. qPCR은 miR 3160을 시험관 내에서 AR을 녹다운시키는 가장 효율적인 miRNA로 강조하였다(도 4a). 제한된 수의 miRNA에 대한 단백질 분석을 통해 miR 3610이 AR의 단백질 발현을 효과적으로 녹다운시키는 것을 확인하였다(도 4b).

[0172] 실시예 2: 투여 경로의 평가

[0173] 투여 경로를 평가하기 위해, 야생형 성체 마우스에 미부 정맥을 통해 주사하였고 신생아 마우스에 PBS, AAV.CB7.miR_NeuN (3 x 10^{11} GC) 또는 AAV.CB7.GFP (3 x 10^{11} GC)를 뇌실내를 통해 주사하였다. 주사 후 14일째에 마우스를 희생시켰다. 뇌 및 척수를 채취하였고 균질화하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. NeuN 단백질 수준은 miR NeuN이 주사되었던 신생아 마우스 및 성체 마우스 모두에서 감소되었다(도 5a 내지 도 5c).

[0174] 실시예 3: 생체 내 안드로겐 수용체의 녹다운 평가

[0175] 마우스에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG(100 μL 중 3 x 10^{11} GC) 또는 PBS를 미부 정맥 주사를 통해 투여하였다. 마우스는 주사 후 14일차에 안락사되었다. 뇌 및 척수를 채취하였으며 RNA 및 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. miR 3610은 인간 및 마우스 AR mRNA와 교차 반응한다. RNA를 단리하였고, cDNA를 합성하였으며, hAR에 대한 TaqMan 프라이머를 사용하여 qPCR을 수행하였다. miR 3610 주사군의 모든 마우스는 PBS 주사군과 비교하여 AR mRNA 수준이 40% 감소한 것으로 나타났다(도 6a, 6b). 또한, AR 단백질 수준이 PBS 주사군과 비교하여 miR 3610 주사군에서 감소하였다(도 6c).

[0176] 또한, 상이한 miRNA의 시험관 내 스크리닝을 통해 miR 3613이 AR을 녹다운하는 잠재적인 치료 표적으로 식별되었다. miR 3610과 비교하여 생체 내에서 miR 3613을 평가하기 위해 마우스에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiRNT.WPRE.rBG, AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG, AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 또는 PBS를 미부 정맥을 통해 투여하였다. 마우스는 14일차에 안락사되었다. 뇌 및 척수를 채취하였으며 RNA 및 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 두 miRNA 모두 뇌(도 7a) 및 척수

(도 7b)에서 AR mRNA 수준의 감소를 유발하였다. miR 3610이 miR 3613과 비교하여 유전자 및 단백질 수준에 대한 더 확연한 영향을 미쳤음에도 불구하고 뇌의 단백질 수준에 대해 두 miRNA 모두에서 유사한 결과가 나타났다(도 7c 내지 7e).

[0177] 실시예 4: 상이한 프로모터의 평가

[0178] 이 연구에서는 비표적 인공 miRNA(miR.NT) 또는 AR 표적 인공 miRNA(miR3610)를 발현하는 2개의 상이한 프로모터(CB7 또는 hSyn)를 포함하였다는 점을 제외하면 동일하였던 4개의 상이한 AAV9-PHP.eB 벡터를 평가하였다. CB7 프로모터(GTP-211에 포함됨)는 편재하는 닭 β-액틴 프로모터이며 임의의 CNS 세포 유형에서 높은 수준의 발현을 초래하기 때문에 평가되었다. hSyn 프로모터는 인간 시냅신 프로모터이며, 이는 특히 뉴런에서 높은 수준의 발현을 초래하고 비뉴런 세포 유형에서 발현을 최소화할 것으로 예상된다. miR.NT는 마우스에서 발현된 다른 유전자와 서열 유사성이 거의 또는 전혀 없을 것으로 예상되는 비표적 인공 miRNA이며 음성 대조 벡터 역할을 한다. hAR.miR3610(GTP-211에 포함됨)은 인간 AR mRNA를 표적으로 하는 인공 miRNA 서열이며 이전에 수집된 데이터를 기반으로 선택되었다.

[0179] 성체 수컷 야생형 마우스(6 내지 8주령)에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.miR.NT.WPRE.rBG, AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG, AAV9.PHP.eB.Syn.PI.miR.NT.WPRE.bGH 또는 AAV9.PHP.eB.hSyn.PI.hARmiR3610.WPRE.bGH의 단일 IV 투여를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 투여하였다. 14일차에, 마우스를 부검하였다. 척수 수집하여 마우스 AR mRNA 발현을 평가하였다(TaqMan qPCR).

[0180] AAV 투여는 내약성이 양호하였으며 모든 마우스는 예정된 부검까지 생존하였다.

[0181] 도 8에서 나타낸 바와 같이. 비표적 인공 miRNA(miR.NT)를 발현하는 AAV9.PHP.eB 벡터의 투여는 AR mRNA 발현에 영향을 미치지 않았으며, 유사한 수준의 발현이 CB7 및 hSyn 프로모터 둘 모두에서 관찰되었다. 이에 비해, 인간 AR mRNA를 표적으로 하는 인공 miRNA 서열(hAR.miR3610)을 발현하는 AAV9.PHP.eB 벡터로 처리된 마우스는 마우스 AR mRNA 전사체의 녹다운을 입증하였으며, 이는 CB7 및 hSyn 프로모터 둘 모두 hAR.miR3610의 강력한 발현을 초래하였다는 점을 나타낸다.

[0182] 실시예 5: 생체 내 SBMA AR97Q 전이유전자 마우스 연구

[0183] SBMA 전이유전자 마우스는 Katsuno 등(Neuron. 2002년 8월 29일;35(5):843-54. doi: 10.1016/s0896-6273(02)00834-6, 참조에 의해 본원에 원용됨)에 의해 설명되었다. 마우스 모델은 97개의 CAG를 함유하는 전장 AR을 운반한다. AR97Q 전이유전자 마우스에서 발현된 AR의 수준을 평가하기 위해, 척수를 야생형 수컷 마우스 및 이형접합성 수컷 및 암컷 마우스로부터 채취하였다. 척수를 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다. 수컷 및 암컷 이형접합성 마우스는 강력한 수준의 hAR(AR97Q)를 나타내었던 반면, WT 수컷 마우스는 hAR의 발현을 나타내지 않았다. 모든 마우스는 mAR에서 다양한 수준을 나타내었다(도 9a). 또한, 생존기간을 이러한 군집에서 추적하였다. 도표는 중앙 생존기간이 92일인 수컷의 경우 생존기간의 급격한 감소를 나타낸 반면, 중앙 생존기간이 192일인 암컷의 경우 생존기간의 점진적 감소가 관찰되었다(도 9b).

[0184] 전이유전자 계열에서 miR 3610의 효과를 평가하기 위해, 성체 수컷 SBMA 마우스(5 내지 6주령)에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG의 단일 IV 투여를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 미부 정맥을 통해 투여하였다. 추가로 연령 일치 수컷 SBMA 마우스는 대조군으로 주사되지 않은 상태로 유지되었다. 동물의 생존 가능성(생존기간)을 매일 확인하였다. 인도적 종료시점에서, 마우스를 부검하였고 뇌를 수집하여 웨스턴 블롯에 의해 돌연변이 인간 AR 단백질 및 내인성 마우스 AR 단백질의 발현을 평가하였다.

[0185] AAV 투여는 내약성이 양호하였다. 모든 마우스는 신체 상태 점수가 2/5 이하이거나 생쥐가 스스로 일어설 수 없거나 사지가 2개 이상 마비된 것을 특징으로 하는 질환 진행으로 인한 인도적 종료시점에 도달하였다.

[0186] AAV 처리된 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 81일이었던 반면, 주사되지 않은 대조군 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 75일이었다(도 10c). AAV 처리된 SBMA 마우스와 주사되지 않은 대조군 사이의 생존기간의 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

[0187] 뇌에서, 내인성 마우스 AR 단백질 및 돌연변이 인간 AR 단백질 둘 모두의 실질적인 녹다운이 AAV 처리된 SBMA 마우스의 웨스턴 블롯에 의해 관찰되었으나 주사되지 않은 대조군에서는 관찰되지 않았다(도 10a). 웨스턴 블롯 정량화는 AAV 처리된 SBMA 마우스가 주사되지 않은 SBMA 대조 마우스와 비교하여 뇌에서 내인성 마우스 AR 단백질 및 돌연변이 인간 AR 단백질의 발현에서 대략 2배 감소를 나타내었다는 것을 나타내었다(도 10b).

[0188] AAV 처리된 SBMA 마우스 중에서, 더 긴 생존기간이 돌연변이 인간 AR 단백질의 더 큰 녹다운을 나타내었던 동물에서 관찰되었다. 주목할 만한 하게도, 동물 140번 및 동물 163번이 돌연변이 인간 AR 단백질 발현의 가장 큰 감소를 나타내었으며 생존기간이 각각 111일 및 158일이었다(도 10a). 대조적으로, 동물 147번, 149번 및 154번은 돌연변이 인간 AR 단백질의 더 높은 발현을 입증하였으며 생존기간이 73일 내지 81일 범위로 더 짧았다(도 10a, 10c).

[0189] 어린 수컷 SBMA 마우스(3주령)에 AAV9.PHP.eB.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG의 단일 IV 투여를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 안와후 정맥을 통해 투여하였다. SBMA 마우스 군집 또는 주사되지 않은 SBMA 마우스의 자연사 데이터를 과거 대조군으로 사용하였다. 동물의 생존 가능성(생존기간)을 매일 확인하였다. 인도적 종료시점에서, 마우스를 부검하였고 뇌를 수집하여 웨스턴 블롯에 의해 돌연변이 인간 AR 단백질 및 내인성 마우스 AR 단백질의 발현을 평가하였다.

[0190] AAV 투여는 내약성이 양호하였다. 모든 마우스는 신체 상태 점수가 2/5 이하이거나 생쥐가 스스로 일어설 수 없거나 사지가 2개 이상 마비된 것을 특징으로 하는 질환 진행으로 인한 인도적 종료시점에 도달하였다.

[0191] AAV 처리된 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 105.5일인 반면, 주사되지 않은 과거 대조군 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 92일이었다(도 11a). AAV 처리된 SBMA 마우스 및 주사되지 않은 과거 대조군 사이의 생존기간 차이는 통계적으로 유의하지 않았다.

[0192] 뇌에서, 내인성 마우스 AR 단백질 및 돌연변이 인간 AR 단백질 둘 모두의 실질적인 녹다운이 AAV 처리된 SBMA 마우스의 웨스턴 블롯에 의해 관찰되었으나 주사되지 않은 과거 대조군에서는 관찰되지 않았다(도 11b). 웨스턴 블롯 정량화는 AAV 처리된 SBMA 마우스가 주사되지 않은 SBMA 과거 대조군 마우스와 비교하여 내인성 마우스 AR 단백질 및 인간 돌연변이 AR 단백질의 발현에서 각각 대략 5배 및 8배 감소를 나타내었다는 것을 나타내었다(도 11c).

[0193] AAV 처리된 SBMA 마우스 중에서, 더 긴 생존기간이 돌연변이 인간 AR 단백질의 더 큰 녹다운을 나타내었던 동물에서 관찰되었다. 주목할 만한 하게도, 동물 225번, 226번 및 230번이 돌연변이 인간 AR 단백질 발현의 가장 큰 감소를 나타내었으며 생존기간이 112일 내지 123일이었다(도 11b). 대조적으로, 동물 232번, 235번 및 237번은 돌연변이 인간 AR 단백질 발현에서 덜 실질적인 감소를 나타내었으며 생존기간이 87일 내지 99일로 더 짧았다(도 11b).

[0194] 신생아(PND 0-1) 수컷 및 암컷 SBMA 마우스에게 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 또는 비히클(PBS)을 측두 정맥을 통해 단일 IV 투여를 투여하였다. 추가로 연령 일치 수컷 및 암컷 C57BL/6J(야생형)는 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 3.0 x 10^{11} GC의 투여량으로 또는 비히클(PBS)을 측두 정맥을 통해 단일 IV 투여를 대조군으로서 투여하였는데, 유전형을 PND 21 경 이유한 후에야 확인할 수 있기 때문이다. 동물의 생존 가능성(생존기간)에 매일 확인하며 체중을 매주 측정한다. 두 치료군의 수컷 마우스는 대략 90일령에 줄에 매달리는 비교시험을 거쳤다. 인도적 종료시점에서, 마우스를 부검하고 뇌를 수집하여 웨스턴 블롯에 의해 돌연변이 인간 AR 단백질 및 내인성 마우스 AR 단백질 발현을 평가한다. AR 단백질의 발현은 도 12a에서 나타나 있다.

[0195] AAV 투여는 일일 생존 가능성 확인을 기반으로 내약성이 양호하였다. 원인 불명의 이유로 55일차, 168일차 및 238일차에 사망하였다고 확인된 3/4의 AAV 처리된 수컷 SBMA 마우스를 제외하면 현재까지 부검된 모든 SBMA 마우스는 질환 진행(신체 상태 점수가 2/5 이하이거나 생쥐가 스스로 일어설 수 없거나 사지가 2개 이상 마비된 것으로 정의됨)으로 인해 인도적 종료시점에 도달하였다. 원인 불명의 이유로 109일 및 143일차에 사망하였다고 확인된 2/11 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 처리된 수컷 야생형 마우스를 제외하면 모든 야생형 마우스는 여전히 생존하고 있다.

[0196] AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 투여는 성별 일치 비히클 처리된 SBMA 대조 마우스와 비교되는 경우 수컷 및 암컷 SBMA 마우스 둘 모두의 중앙 생존기간의 실질적인 증가를 초래하였다. 수컷 마우스 중에서, 비히클 처리된 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 101.5일이었던 반면, GTP-211 처리된 SBMA 마우스의 경우 유의하게 더 긴 203일의 중앙 생존기간이 관찰되었다. 암컷 마우스 중에서 비히클 처리된 SBMA 마우스의 중앙 생존기간은 175일이었던 반면, 모든 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 처리된 SBMA 마우스(N=8/8)는 현재 366일령 내지 373일령의 연령으로 생존하고 있으며, 이는 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 처리에 따른 생존기간이 유의하게 증가함을 입증한다(도 12b 및 도 12c).

[0197] 수컷 및 암컷 GTP-211 처리된 SBMA 마우스는 모두 성별 일치 비히클 처리된 SBMA 대조군과 비교하여 시간 경과에 따른 체중 증가 및 유지가 개선되었으며, 이는 질환 진행과 연관된 신체 소모 표현형의 개선을 나타낸다(도 12g, 도 12h).

[0198] 대략 90일령에, 수컷 쥐를 대상으로 줄에 매달리는 비교시험을 수행하여 근력 및 협응력을 평가하였다. 비히클 처리된 SBMA 마우스는 비히클 및 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 처리된 야생형 대조군과 비교하여 낙하 지연시간이 유의하게 감소한 것으로 나타났다. 대조적으로, AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 투여는 비히클 처리된 SBMA 마우스와 비교하여 SMBA 마우스에서 낙하 지연시간의 유의한 증가로 이어졌다. 또한, AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 처리된 동물은 야생형 마우스뿐만 아니라 이러한 행동 검정을 수행하였으며, 이는 AAVhu68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG가 SBMA 마우스에서 근력 및 협응력을 완전히 보존했음을 나타낸다(도 12i).

[0199] 실시예 6: NHP에서 miR3610의 평가

[0200] 5세 수컷 붉은털 원숭이(rhesus macaque)에 3 x 10^{13} GC의 AAVhu.68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG를 대조내(ICM)를 통해 투여하였다. 대조 샘플은 주사되지 않은 NHP 샘플로부터 유래되었다. NHP는 35일차에 안락사되었다. 척수를 채취하고 포르말린으로 고정한 후 레이저 포착 현미해부(LCM)를 위해 포매하였다. 포르말린 고정 파라핀 포매 블록을 절단하였으며 LCM에 적합한 PEN 막 슬라이드상에 배치하였다. 운동 뉴런을 척수 부분으로부터 절단하였다. RNA를 추출하였으며 qPCR을 수행하였다. 또한, 간을 채취하였으며 RNA 단리 및 qPCR을 위해 처리하였다. 운동 뉴런(도 13a) 및 간(도 13b)은 둘 모두 miR 3610 주사 후 AR mRNA 수준의 유의한 감소(대략 75%)를 나타내었다. 또한, AR 단백질 발현은 miR 3610을 주사한 후 감소되었다(도 13c). 케이지 측면 관찰, 혈청 화학, 온 혈구 계산, 신경 전도 연구, CSF 화학 및 세포학을 포함하는 생전 안전성 종료시점에서 35일 후 벡터 관련 독성의 증거가 입증되지 않았다. 유의한 병리학적 소견이 DRG를 포함하는 임의의 조직에서 관찰되지 않았다.

[0201] 실시예 7: 마우스 MED 연구

[0202] 이 계획된 GLP 준수 약리학 연구는 수컷 SBMA 마우스 모델(AR-97Q 마우스)에서 IV 투여된 AAVhu.68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG의 효능을 평가하고 MED를 결정하는 것을 목표로 한다.

[0203] 이 연구를 통해 N=60 신생아(PND 0-1) 수컷 SBMA 마우스 및 N=12 연령 일치 수컷 야생형 C57BL/6J 마우스를 대조군으로서 평가한다. 연구는 1회 부검 시점(180일)을 포함한다. AAVhu.68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG의 4가지 투여량 수준이 IV 투여를 사용하여 평가된다. 복용량 수준은 성체 붉은털 원숭이 NHP를 대상으로 수행되는 완료된 예비 안전성 및 약리학 연구에 더하여 신생아 SBMA 마우스의 치료를 평가하는 진행 중인 연구의 POC 효능 데이터를 기반으로 선택된다. 평가되는 용량 수준은 예상되는 임상 투여량을 포함한다.

[0204] IV 투여가 이 연구를 위해 현재 계획되어 있으나, 신생아 마우스를 대상으로 진행 중인 예비 연구에서 질환 관련 세포 유형(척수 운동 뉴런)을 표적화하기 위해 CSF에 직접 벡터를 전달하기 위한 ICV 경로를 평가하고 있다(데이터는 아직 제공되지 않음). ICV 투여를 사용하여 전신 투여와 같은 유사한 척추 운동 뉴런 표적화를 달성할 수 있는 경우, 이러한 척수강내 경로를 사용하여 이 연구를 위해 의도된 임상 ROA(ICM 투여)를 보다 근접하게 모델링할 것이다.

[0205] 실시예 8: GLP NHP 약리학/독성 연구

[0206] 180일간의 GLP 준수 독성학 연구를 통해 성인 남성 붉은털 원숭이(5세 내지 7세)에게 저용량, 중간 용량 또는 고용량(N=4/투여량)으로 단일 ICM 투여 후 안전성, 내약성, 약리학(원숭이 AR의 인공 miRNA 매개 녹다운), 생물분포 및 배설 프로파일을 평가한다. 추가로 연령 일치 수컷 NHP에 대조군(N=2)으로서 비히클(ITFFB)이 투여된다.

[0207] 14마리의 성체 수컷 붉은털 원숭이에 3가지 투여량(투여량당 NHP 4마리; 비히클 투여 NHP 2마리)의 AAVhu.68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG 중 하나를 이미지 유도 대조내(ICM)를 통해 투여한다. 절반은 90일차에 안락사되며 나머지는 180일차에 안락사된다. 척수를 채취하고 포르말린으로 고정한 후 레이저 포착 현미해부(LCM)를 위해 포매한다. 포르말린 고정 파라핀 포매 블록을 절단하여 LCM에 적합한 PEN 막 슬라이드상에 배치한다. 운동 뉴런을 척수 부분으로부터 절단한다. RNA를 추출하며 qPCR을 수행한다. 또한, 간을 채취하며 RNA 단리 및 qPCR을 위해 처리한다. 또한, 다음 시험이 수행된다: CBC/chem/Coags; CSF 화학 및 세포학; 맹검 신경학적 검사; 신경 전도 속도 검사; 및 조직병리학.

[0208] 실시예 9: SBMA 신생아 마우스에서 AAVhu.68.CB7.CI.hARmiR3610.WPRE.rBG의 ICV 전달 평가

[0209] 신생아 SBMA 전이유전자 마우스에 3e11 GC의 AAVhu68.CB7.CI.ARmiR3610.WPRE.rBG를 ICV 또는 PBS를 통해 투여하였다. 마우스의 생존기간 및 체중을 추적하였으며 성별 및 유전형을 결정하였다. 마우스는 줄 매달기 시험을 거쳤다. 뇌를 사망 당시 채취하였으며 웨스턴 블롯을 위해 처리하였다.

[0210] 수컷 SBMA 마우스의 평균 수명은 PBS 처리된 마우스의 경우 135일이었으며 AAV 처리된 마우스의 경우 181.5일이었다(도 14a). PBS 처리된 마우스의 평균 발병 연령은 PBS 처리된 마우스의 경우 80일이었으며 AAV 처리된 마우스의 경우 150일이었다(도 14a). PBS 처리된 Het는 PBS 처리된 WT 및 AAV 처리된 Het와 비교하여 매달기 시간이 유의하게 감소하였다(도 14b). PBS 처리된 Het의 경우 14주차(도 14c) 및 16주차(도 14d)에 매달기 시간이 현저히 감소하였다.

[0211] 실시예 10: 제1상/제2상 임상 시험

[0212] 인간을 대상으로 한 제1상/제2상 임상 시험이 제안되었다. 프로토콜은 최신 FDA preIND 피드백 및 유사한 응용 분야에 대한 업계 지침을 포함한다 또한, 투여량 증량/안전성 연구는 주요 생체표지(MRI로 측정한 대퇴근량)를 평가할 수 있도록 설계되었다. 동시 무작위 대조(FDA 기준)는 비교 데이터를 제공한다.

[0213] 2가지 벡터 투여량의 안전성 및 내약성을 평가한다. 총 12명의 대상체가 등록되며, 2:1 벡터:위약으로 무작위 배정된다. 벡터군에 무작위 배정된 8명의 대상체: 저용량 2명, 고용량 2명, MTD 4명. 처음 4명의 대상체에 대해, 30일간의 데이터를 후속 대상체에게 투약 전 DSMB에서 검토하였다. 위약군에 무작위로 배정된 4명의 대상체. 1년차에 안전성 및 MRI 변화를 분석하며 5년간 장기 추적 관찰한다.

[0214] 29명의 SBMA 환자를 대상으로 한 덴마크 자연사 연구는 18개월 동안 진행되었다(Dahlqvist JR 등 Disease progression and outcome measures in spinobulbar muscular atrophy. Ann Neurol. 2018년 11월;84(5):754-765(참조에 의해 본원에 원용됨)). Dahlqvist는 여러 근육의 종합 Dixon MRI 점수가 매우 유의미한 감소를 나타내어 임상 시험에서 MRI 점수의 사용을 검증하였다는 점을 나타내었다. 또한, 6MWT, 계단 오르기 및 악력이 통계적으로 유의하게 감소한 것으로 입증되었으나. 이러한 결과 측정은 중재 시험에서 더 큰 힘을 필요로 한다.

[0215] 본 명세서에서 인용된 모든 문헌은 "21-9557.PCT_ST25.txt"로 표지된 서열목록과 같이 참조에 의해 본원에 원용된다. 또한, 미국 가출원 번호 제63/293,505호, 제63/187,883호 및 제63/173,885호가 참조에 의해 본원에 원용된다. 본 발명은 특정 실시양태를 참조하여 설명되었으나, 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 변형이 이루어질 수 있음이 이해될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범위 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0216] (서열목록 자유 텍스트)

[0217] 하기의 정보는 수치 식별자<223> 하에서 자유 텍스트를 함유하는 서열에 대하여 제공된다.

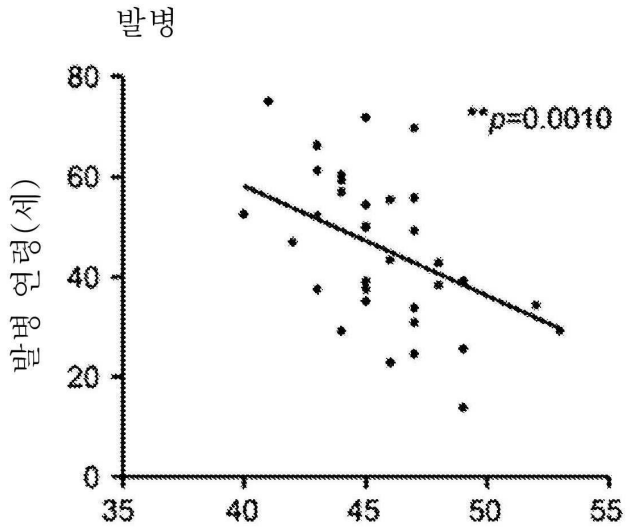
표 2

[0218]

서열번호(자유 텍스트 포함)	<223>하의 자유 텍스트
2-5	작제 서열
7-14	작제 서열
15	hSynapsin 프로모터
16	생성 플라스미드 pAAV2hu68n.KanR
17	합성 작제물
18	Hu68
19	Hu68 M191
20	생성 플라스미드 pAAV-PHP.eB
21	합성 작제물
22	작제 서열
23	CMV 인핸서를 갖는 CB7 프로모터
24	CAG 프로모터
25	토끼 베타-글로빈
26	작제 서열

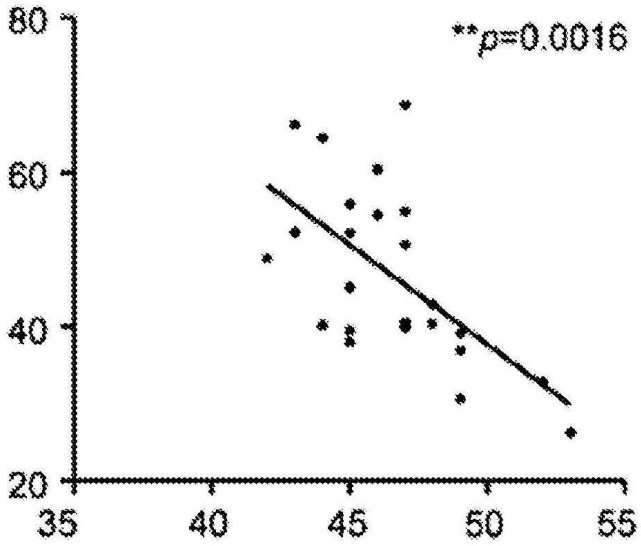
도면

도면1a

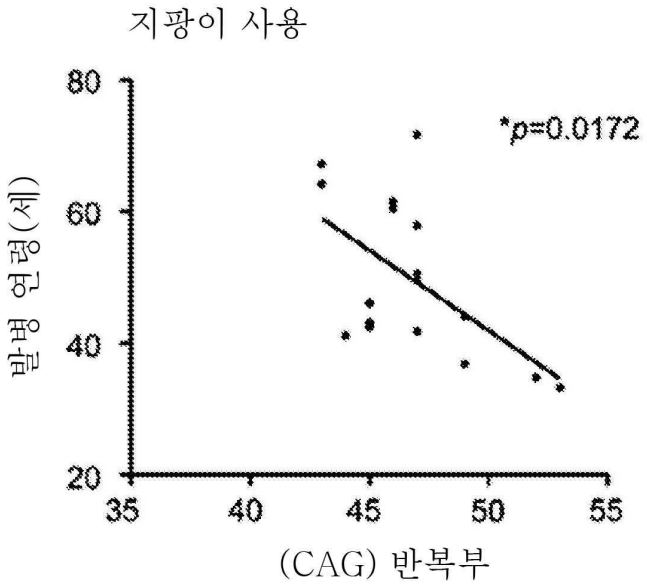


도면1b

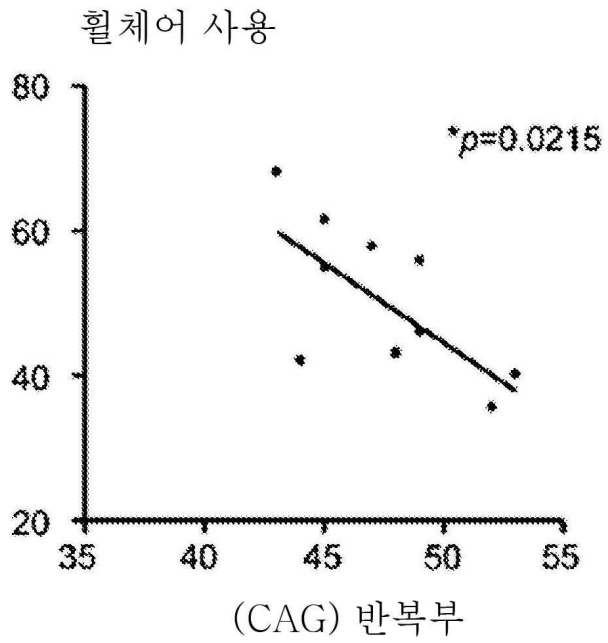
난간 필요



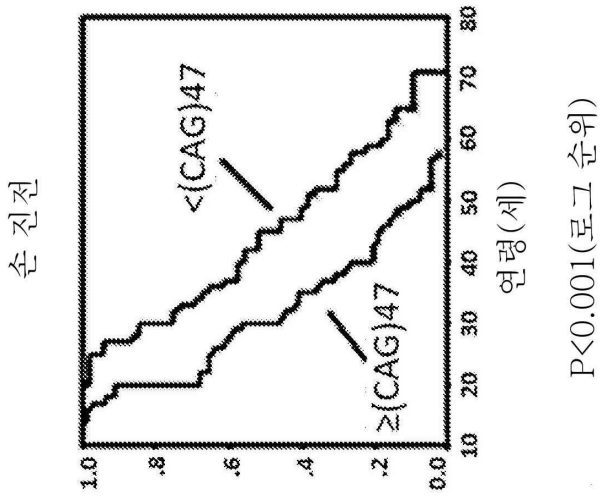
도면1c



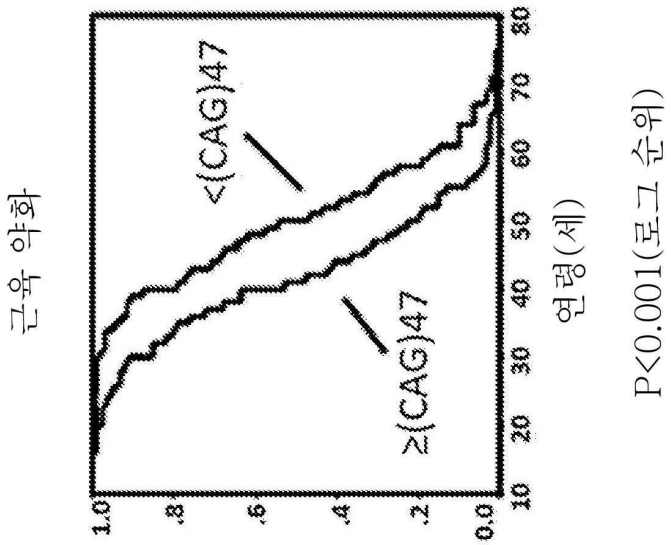
도면1d


휠체어 사용
*p=0.0215
80
60
40
20
35
40
45
50
55
(CAG) 반복부

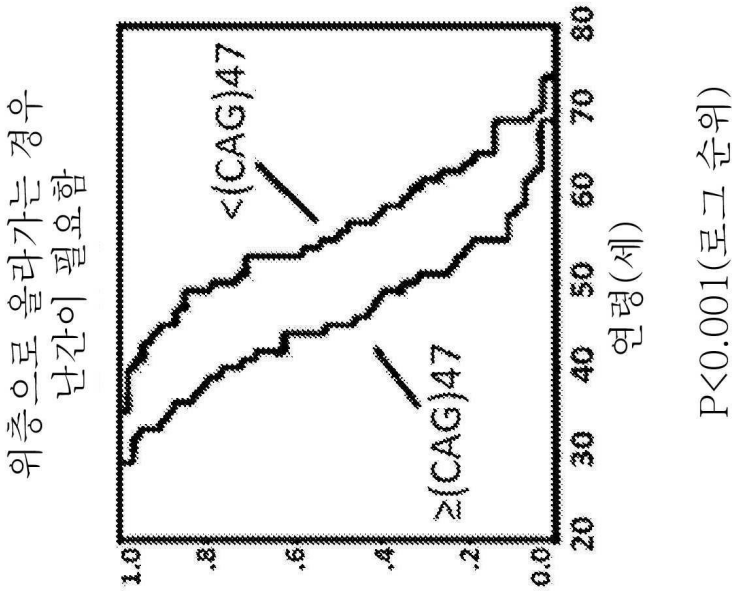
도면2a


순 진전
<(CAG)47
≥(CAG)47
1.0
.8
.6
.4
.2
0.0
10
20
30
40
50
60
70
80
연령(세)
P<0.001(로그 순위)

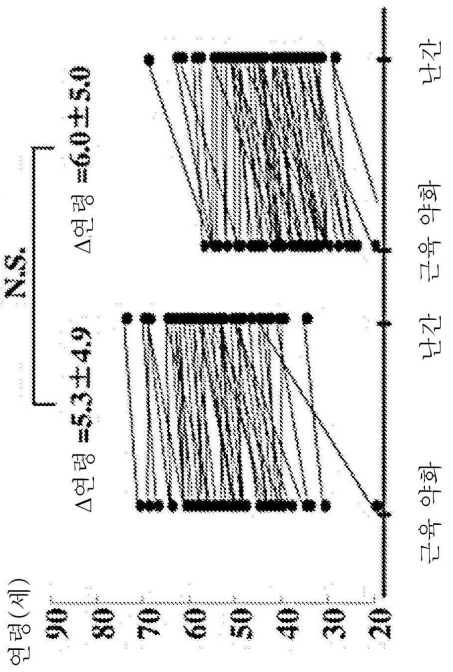
도면2b


근육 약화
<(CAG)47
≥(CAG)47
1.0
.8
.6
.4
.2
0.0
10
20
30
40
50
60
70
80
연령(세)
P<0.001(로그 순위)

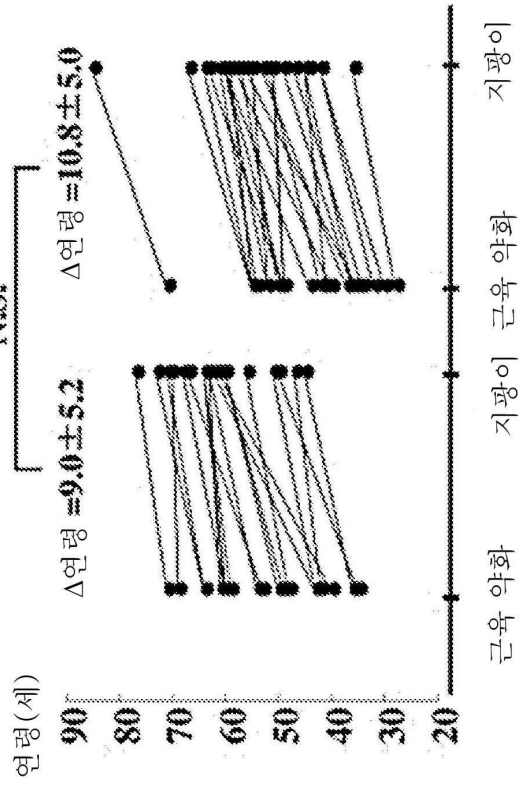
도면2c


위층으로 올라가는 경우
난간이 필요함
<(CAG)47
≥(CAG)47
1.0
.8
.6
.4
.2
0.0
20
30
40
50
60
70
80
연령(세)
P<0.001(로그 순위)

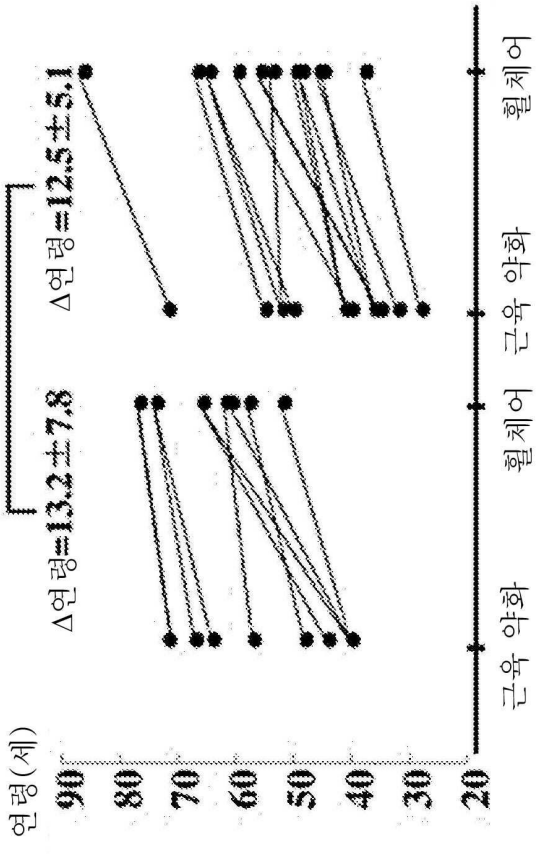
도면3a


< (CAG)47
N.S.
≥ (CAG)47
Δ연령 =5.3±4.9
Δ연령 =6.0±5.0
연령(세)
90
80
70
60
50
40
30
20
근육 약화
난간
근육 약화
난간

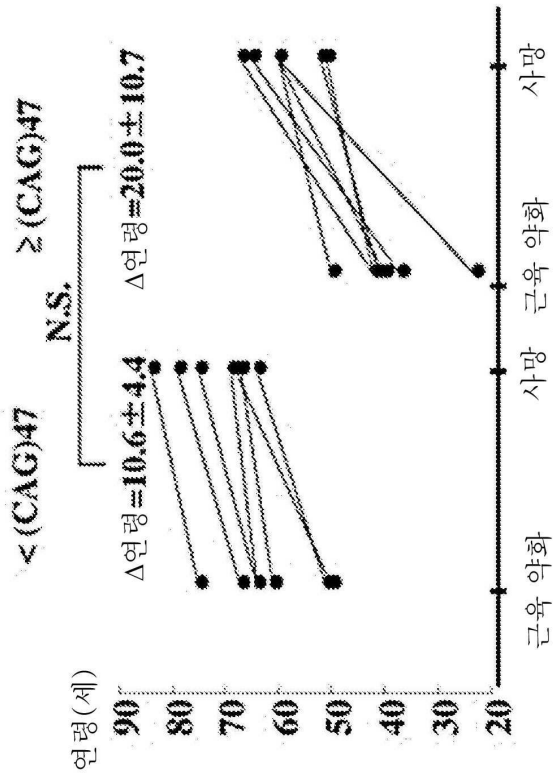
도면3b


< (CAG)47
N.S.
≥ (CAG)47
Δ연령 =9.0±5.2
Δ연령 =10.8±5.0
연령(세)
90
80
70
60
50
40
30
20
근육 약화
지팡이
근육 약화
지팡이

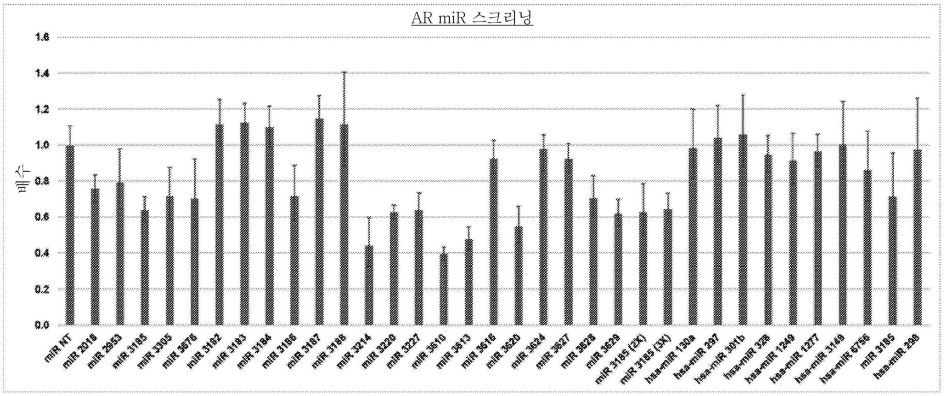
도면3c


< (CAG)47
N.S.
≥ (CAG)47
Δ연령=13.2±7.8
Δ연령=12.5±5.1
연령(세)
90
80
70
60
50
40
30
20
근육 약화
휠체어
근육 약화
휠체어

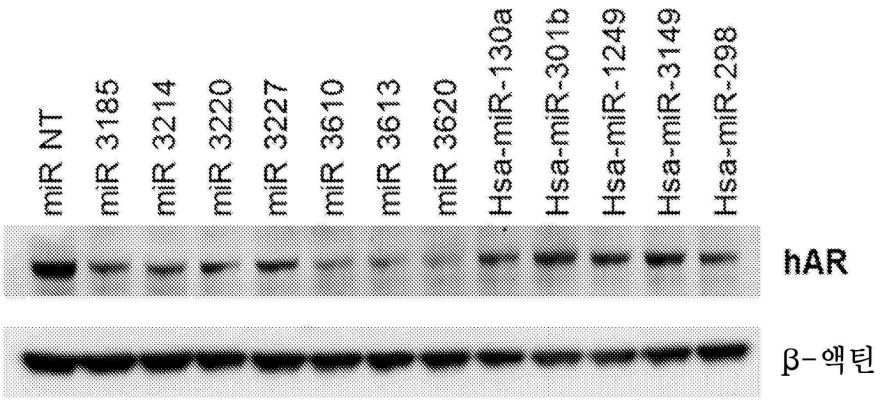
도면3d


< (CAG)47
N.S.
≥ (CAG)47
Δ연령=10.6±4.4
Δ연령=20.0±10.7
연령(세)
90
80
70
60
50
40
30
20
근육 약화
사망
근육 약화
사망

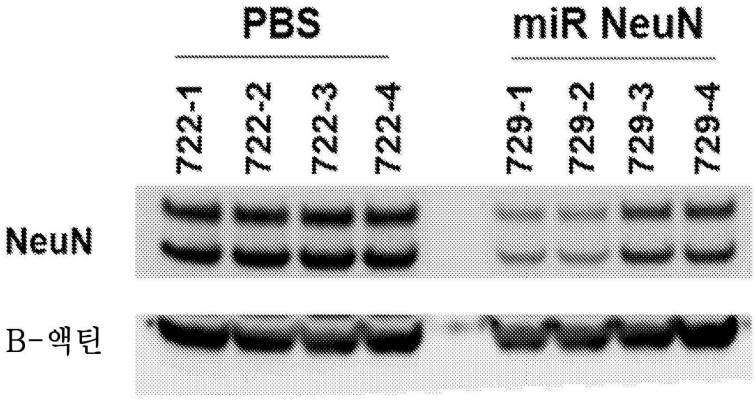
도면4a


AR miR 스크리닝
배수
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
miR NT
miR 2016
miR 2053
miR 3185
miR 3205
miR 3676
miR 3182
miR 3183
miR 3184
miR 3186
miR 3187
miR 3188
miR 3214
miR 3220
miR 3227
miR 3610
miR 3613
miR 3616
miR 3620
miR 3624
miR 3627
miR 3628
miR 3629
miR 3185 (5X)
miR 3185 (3X)
hsa-miR 130a
hsa-miR 297
hsa-miR 301b
hsa-miR 328
hsa-miR 1249
hsa-miR 1277
hsa-miR 1349
hsa-miR 6756
miR 3185
hsa-miR 298

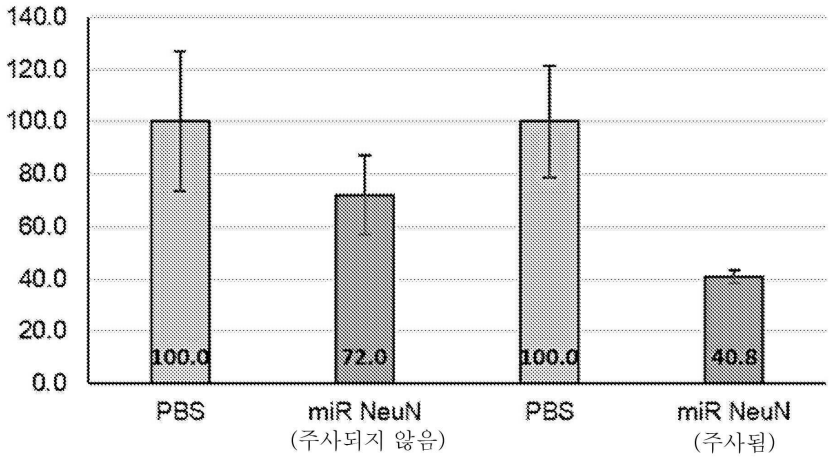
도면4b


miR NT
miR 3185
miR 3214
miR 3220
miR 3227
miR 3610
miR 3613
miR 3620
Hsa-miR-130a
Hsa-miR-301b
Hsa-miR-1249
Hsa-miR-3149
Hsa-miR-298
hAR
β-액틴

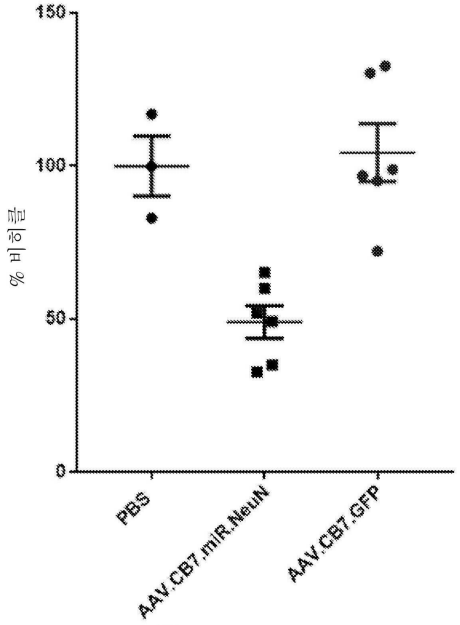
도면5a


PBS
miR NeuN
722-1
722-2
722-3
722-4
729-1
729-2
729-3
729-4
NeuN
B-액틴

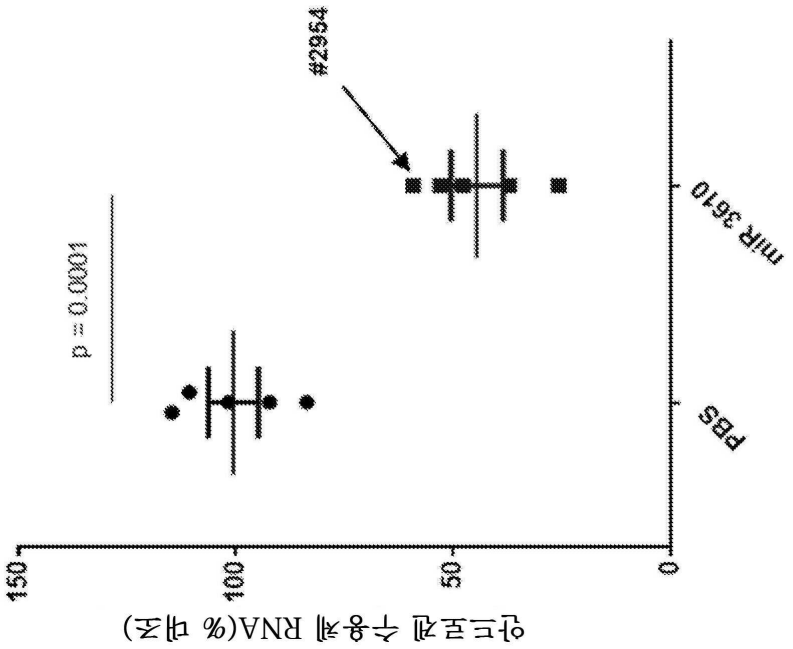
도면5b


140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
100.0
72.0
100.0
40.8
PBS
miR NeuN
(주사되지 않음)
PBS
miR NeuN
(주사됨)

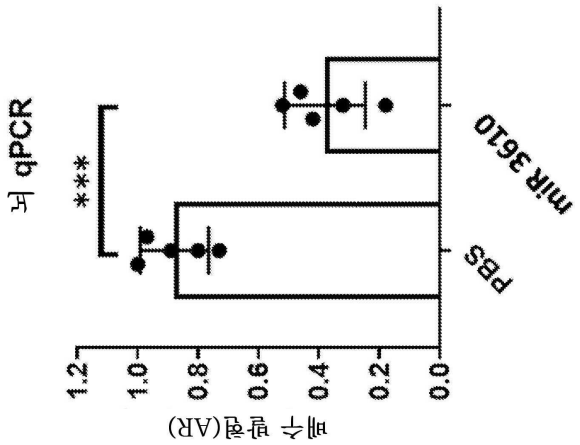
도면5c


150
100
50
0
% 비히클
PBS
AAV.CB7.miR.NeuN
AAV.CB7.GFP

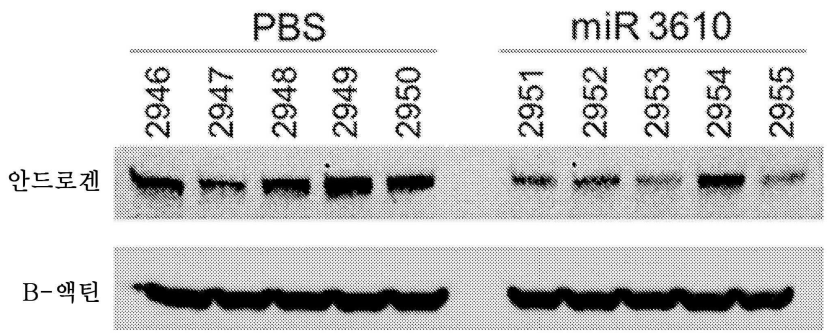
도면6a


안드로겐 수용체 RNA(% 대조)
150
100
50
0
p = 0.0001
#2964
PBS
miR 3610

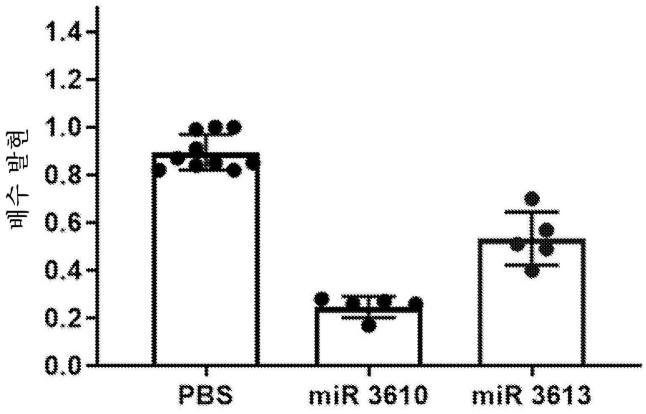
도면6b


배수 발현(AR)
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
***
PBS
miR 3610

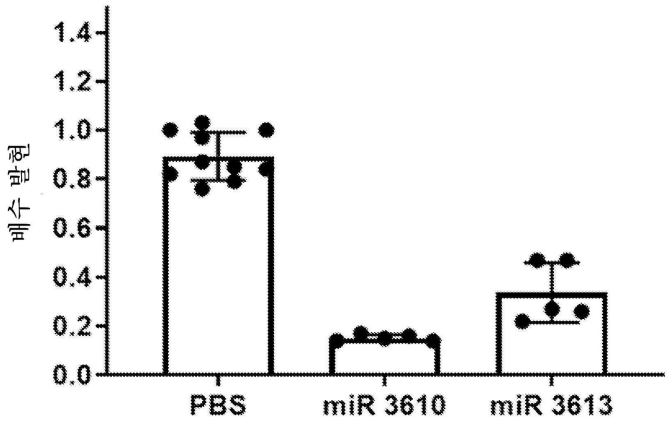
도면6c


PBS
miR 3610
2946
2947
2948
2949
2950
2951
2952
2953
2954
2955
안드로겐
B-액틴

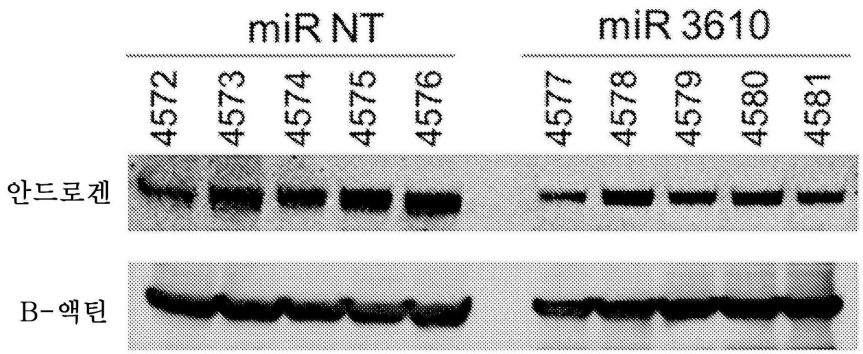
도면7a


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
배수 발현
PBS
miR 3610
miR 3613

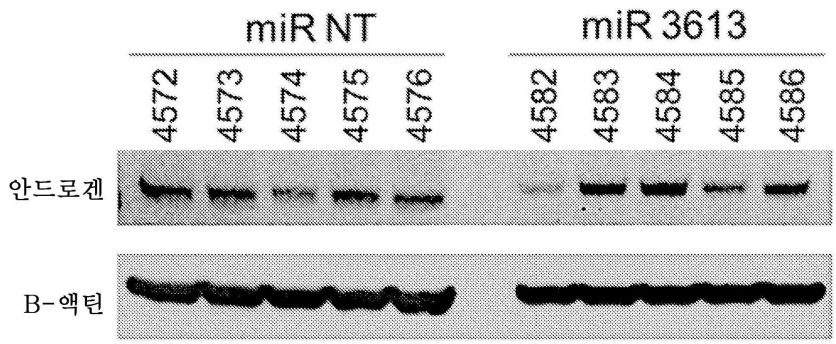
도면7b


1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
배수 발현
PBS
miR 3610
miR 3613

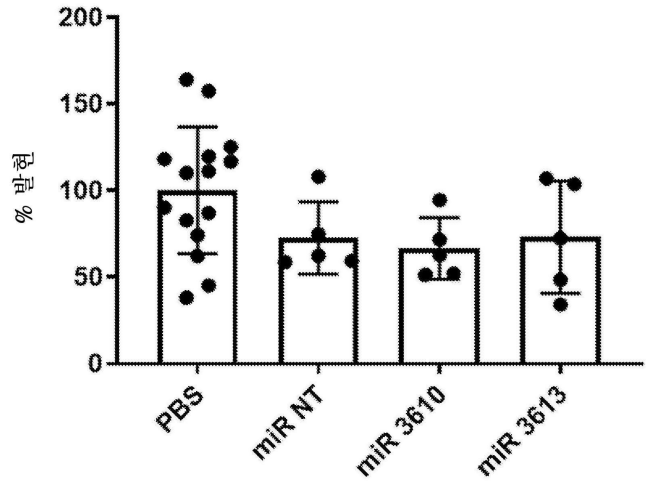
도면7c


miR NT
miR 3610
4572
4573
4574
4575
4576
4577
4578
4579
4580
4581
안드로겐
B-액틴

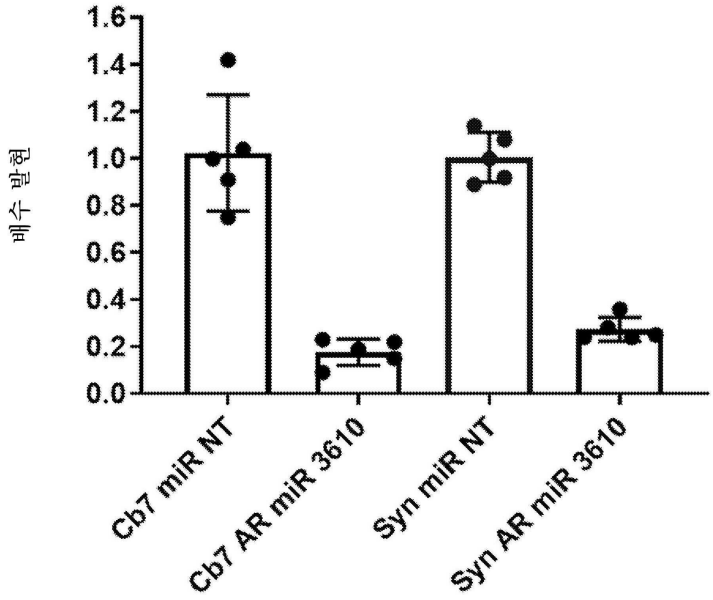
도면7d


miR NT
miR 3613
4572
4573
4574
4575
4576
4582
4583
4584
4585
4586
안드로겐
B-액틴

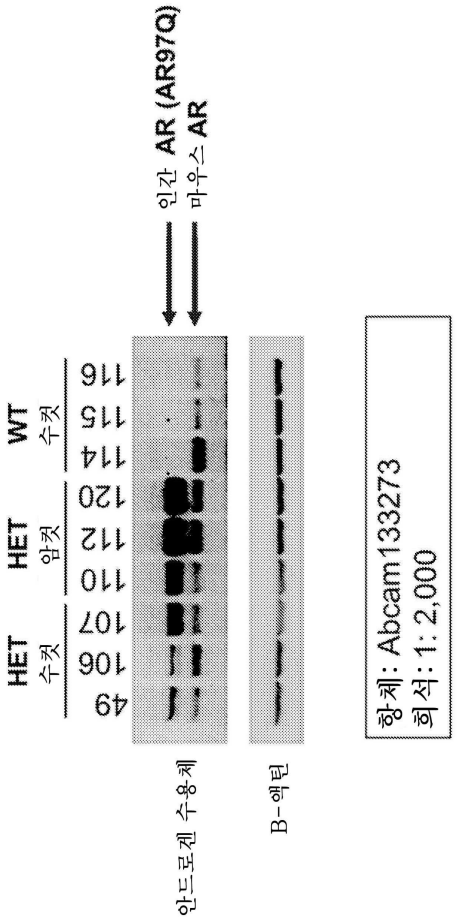
도면7e


200
150
100
50
0
% 발현
PBS
miR NT
miR 3610
miR 3613

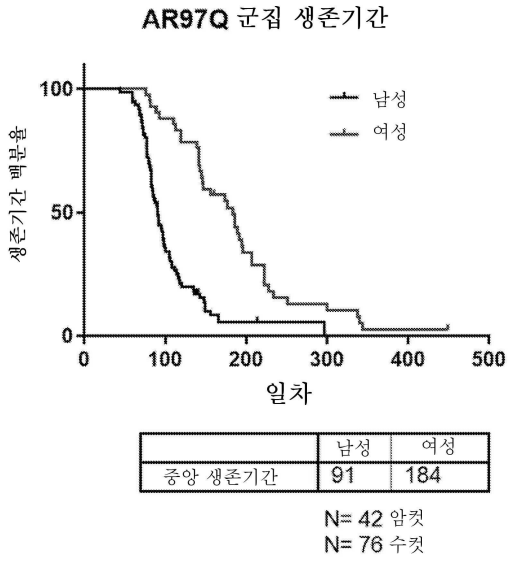
도면8


1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
배수 발현
Cb7 miR NT
Cb7 AR miR 3610
Syn miR NT
Syn AR miR 3610

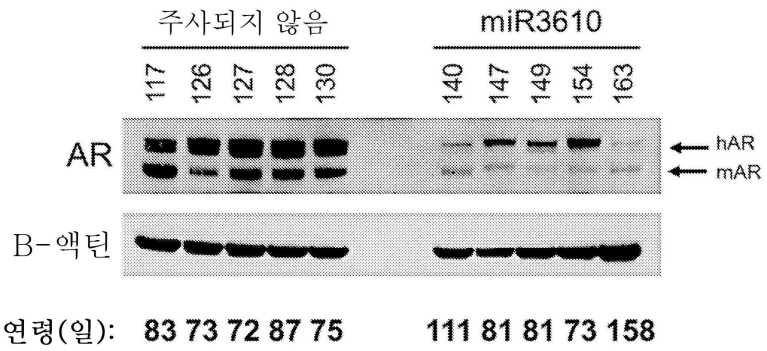
도면9a


인간 AR (AR97Q)
마우스 AR
WT
HET
HET
수컷
암컷
수컷
116
115
114
120
112
110
107
106
49
안드로겐 수용체
B-액틴
항체: Abcam133273
희석: 1: 2,000

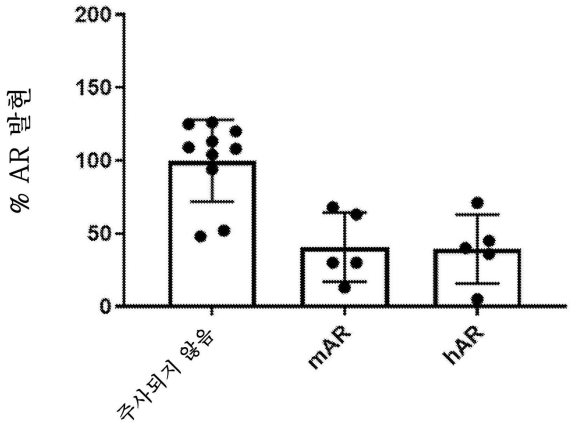
도면9b


AR97Q 군집 생존기간
생존기간 백분율
100
50
0
0
100
200
300
400
500
일차
남성
여성
남성
여성
중앙 생존기간
91
184
N= 42 암컷
N= 76 수컷

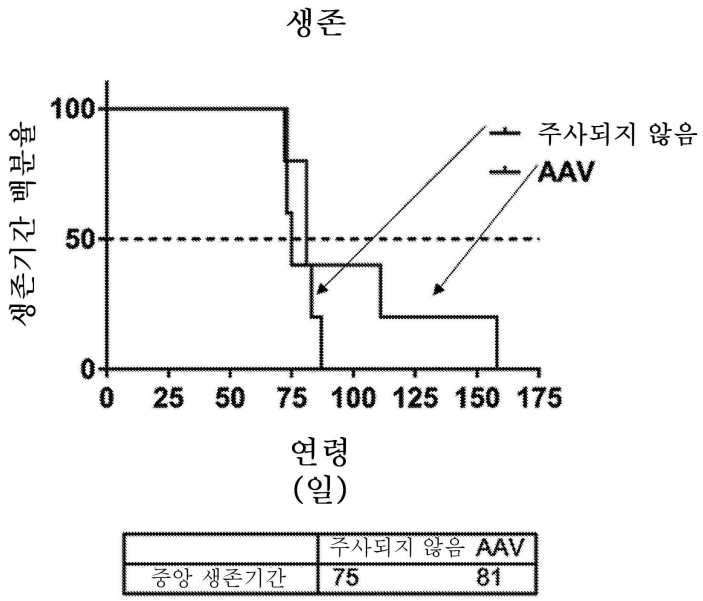
도면10a


주사되지 않음
miR3610
117
126
127
128
130
140
147
149
154
163
AR
hAR
mAR
B-액틴
연령(일): 83 73 72 87 75
111 81 81 73 158

도면10b

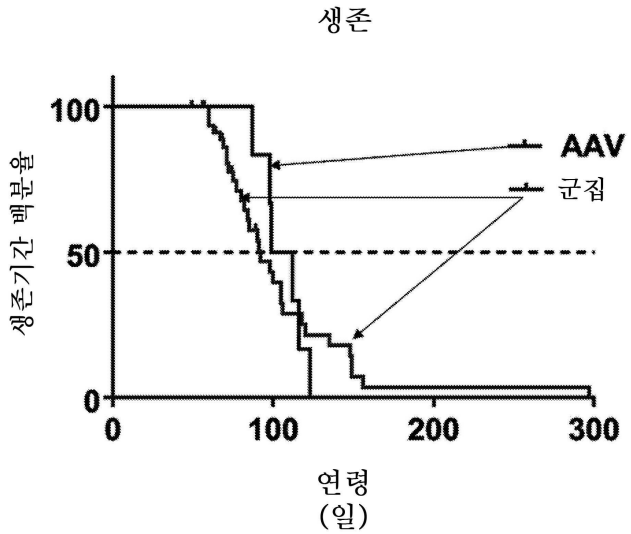

% AR 발현
200
150
100
50
0
주사되지 않음
mAR
hAR

도면10c



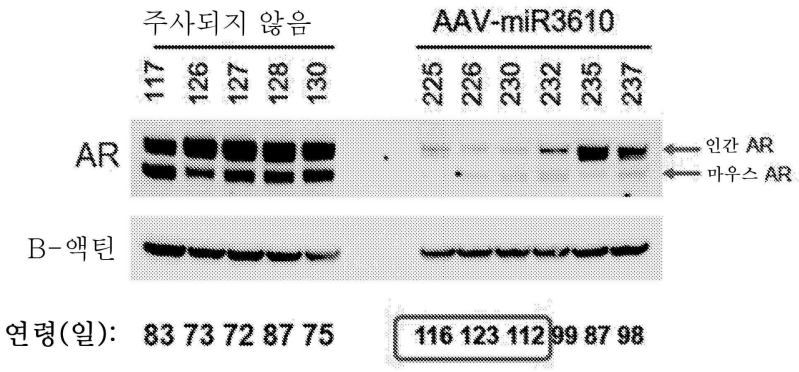
	주사되지 않음	AAV
중앙 생존기간	75	81

도면11a

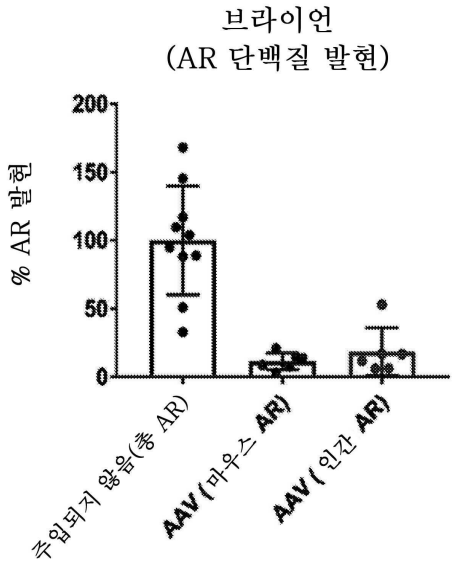


	AAV	군집
중앙 생존기간	105.5	92

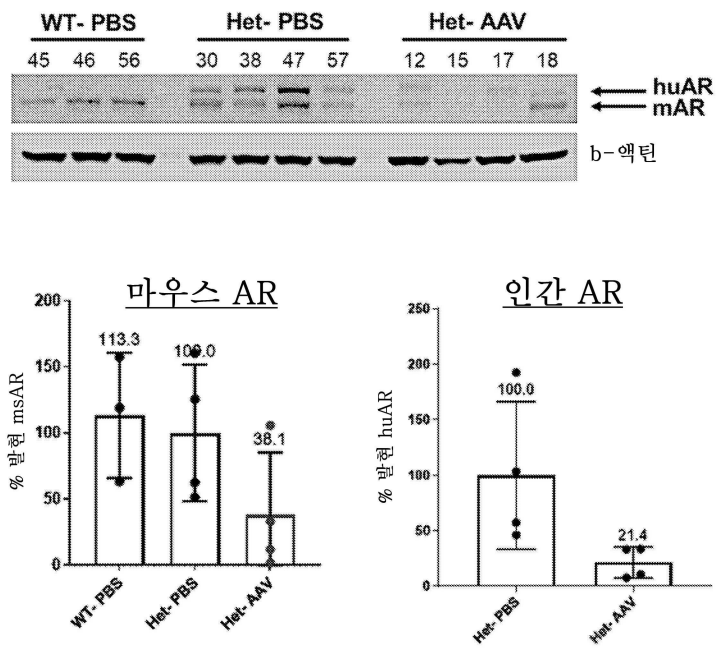
도면11b


주사되지 않음
AAV-miR3610
117
126
127
128
130
225
226
230
232
235
237
AR
인간 AR
마우스 AR
B-액틴
연령(일): 83 73 72 87 75
116 123 112 99 87 98

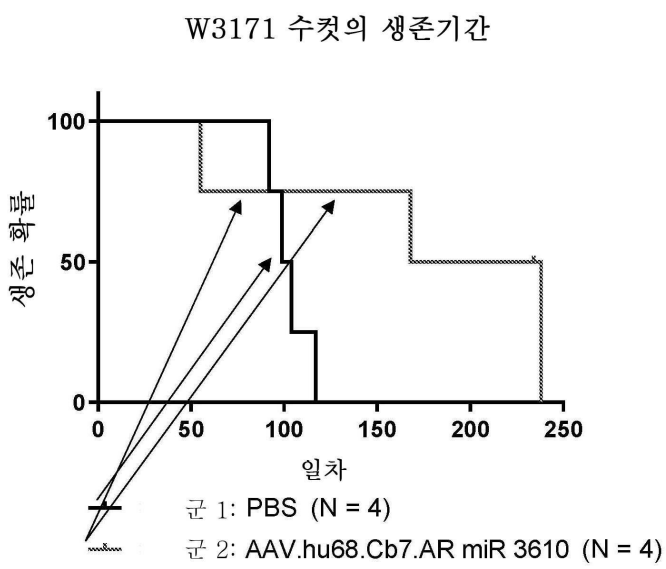
도면11c


브라이언
(AR 단백질 발현)
% AR 발현
200
150
100
50
0
주입되지 않음(총 AR)
AAV (마우스 AR)
AAV (인간 AR)

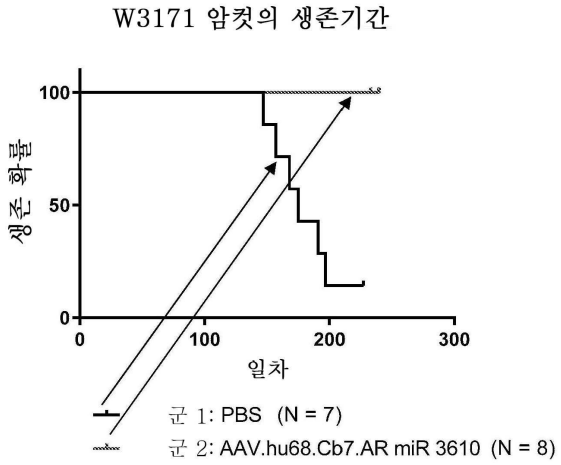
도면12a


WT- PBS
Het- PBS
Het- AAV
45 46 56
30 38 47 57
12 15 17 18
huAR
mAR
b-액틴
마우스 AR
% 발현 msAR
113.3
100.0
38.1
WT- PBS
Het- PBS
Het- AAV
인간 AR
% 발현 huAR
100.0
21.4
Het- PBS
Het- AAV

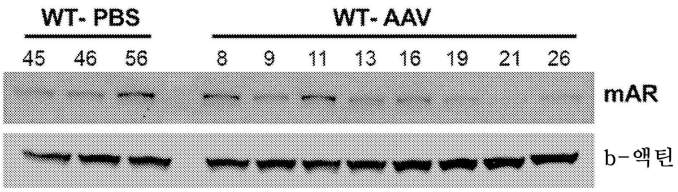
도면12b

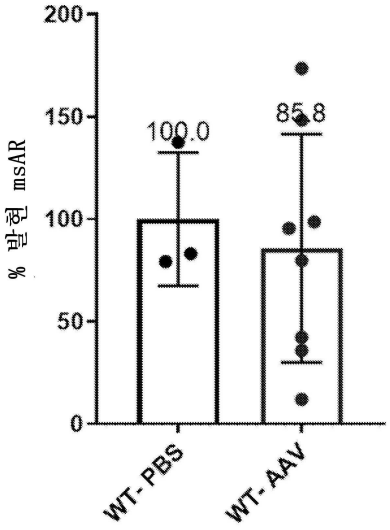

W3171 수컷의 생존기간
생존 확률
일차
군 1: PBS (N = 4)
군 2: AAV.hu68.Cb7.AR miR 3610 (N = 4)

도면12c

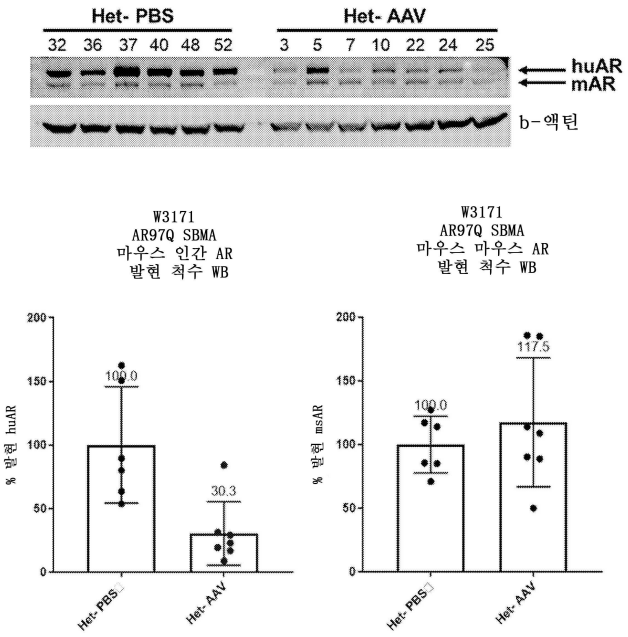

W3171 암컷의 생존기간
생존 확률
100
50
0
0
100
200
300
일차
군 1: PBS (N = 7)
군 2: AAV.hu68.Cb7.AR miR 3610 (N = 8)

도면12d

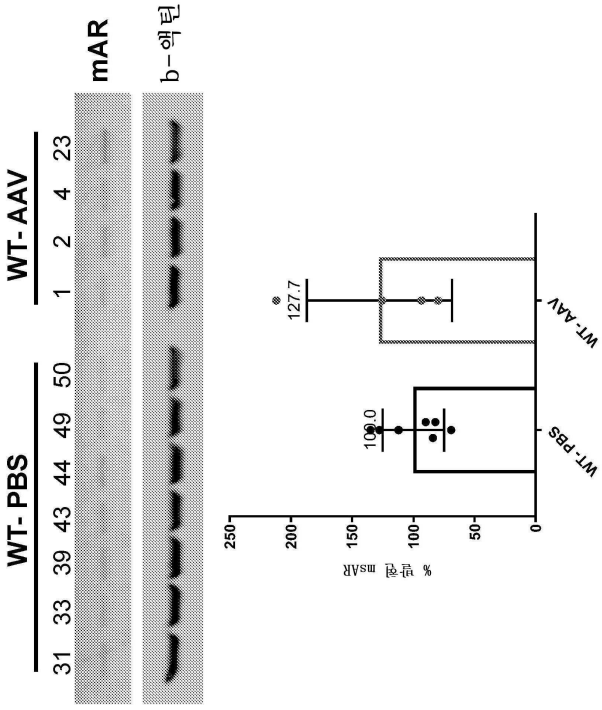

WT- PBS
WT- AAV
45 46 56 8 9 11 13 16 19 21 26
mAR
b-액틴


% 발현 msAR
200
150
100
50
0
100.0
85.8
WT- PBS
WT- AAV

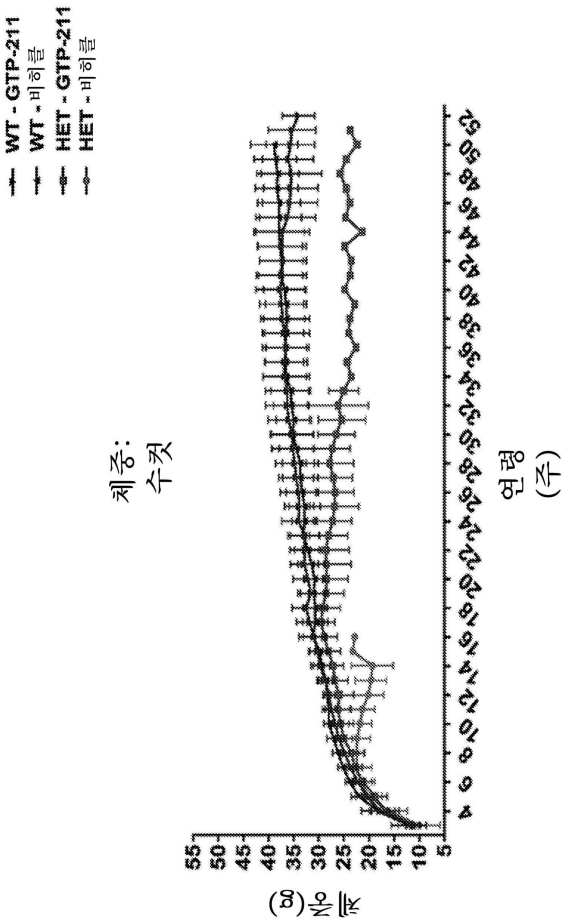
도면12e


Het- PBS
32 36 37 40 48 52
Het- AAV
3 5 7 10 22 24 25
huAR
mAR
b-액틴
W3171
AR97Q SBMA
마우스 인간 AR
발현 척수 WB
% 발현 huAR
100.0
30.3
Het- PBS
Het- AAV
W3171
AR97Q SBMA
마우스 마우스 AR
발현 척수 WB
% 발현 msAR
100.0
117.5
Het- PBS
Het- AAV

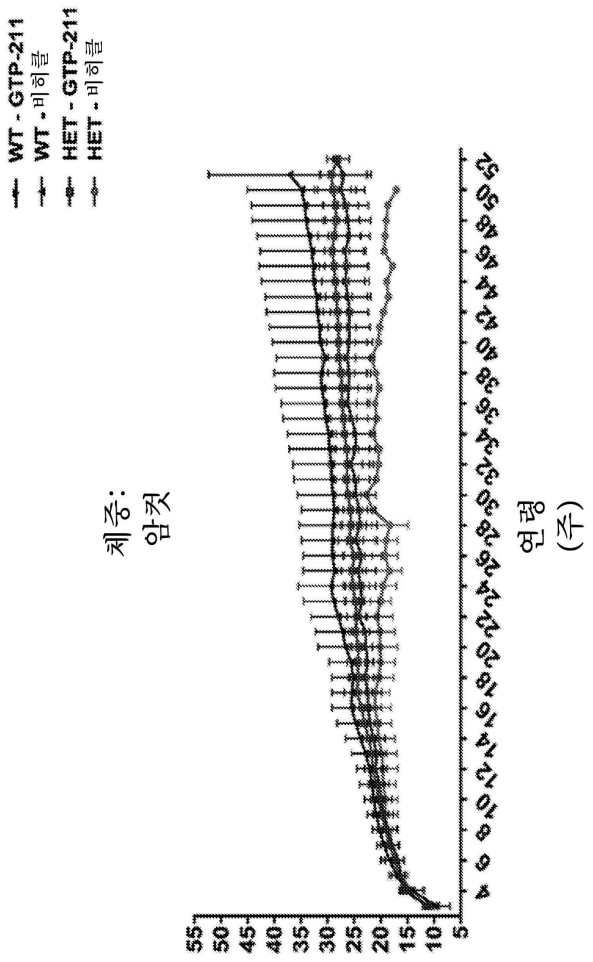
도면12f


mAR
b-액틴
WT- AAV
1 2 4 23
WT- PBS
31 33 39 43 44 49 50
% 발현 msAR
250 200 150 100 50 0
127.7
100.0
WT- AAV
WT- PBS

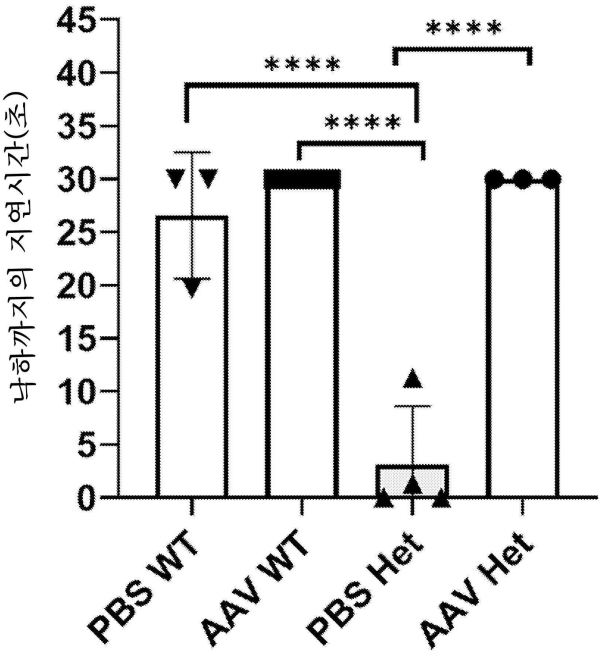
도면12g


WT - GTP-211
WT - 비히클
HET - GTP-211
HET - 비히클
체중:
수컷
체중(g)
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
연령
(주)
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
48
50
52

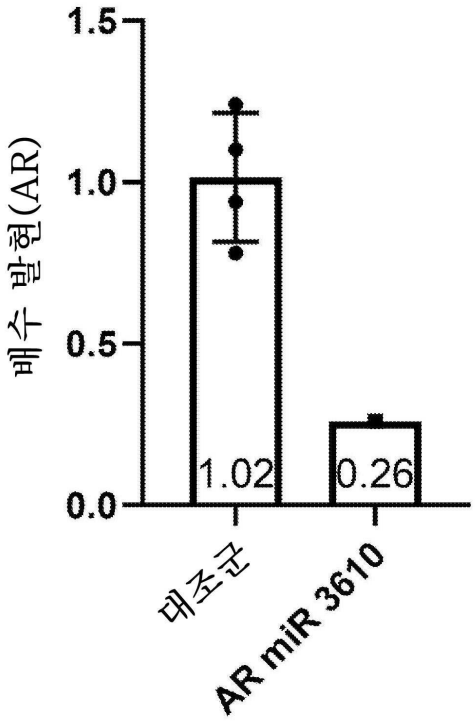
도면12h


WT - GTP-211
WT - 비히클
HET - GTP-211
HET - 비히클
체중:
암컷
55
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24
26
28
30
32
34
36
38
40
42
44
46
48
50
52
연령
(주)

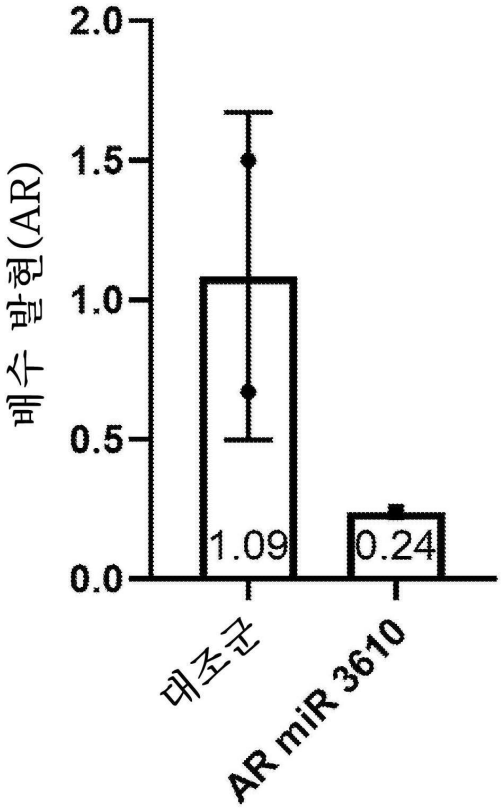
도면12i


낙하까지의 지연시간(초)
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
****
****
****
PBS WT
AAV WT
PBS Het
AAV Het

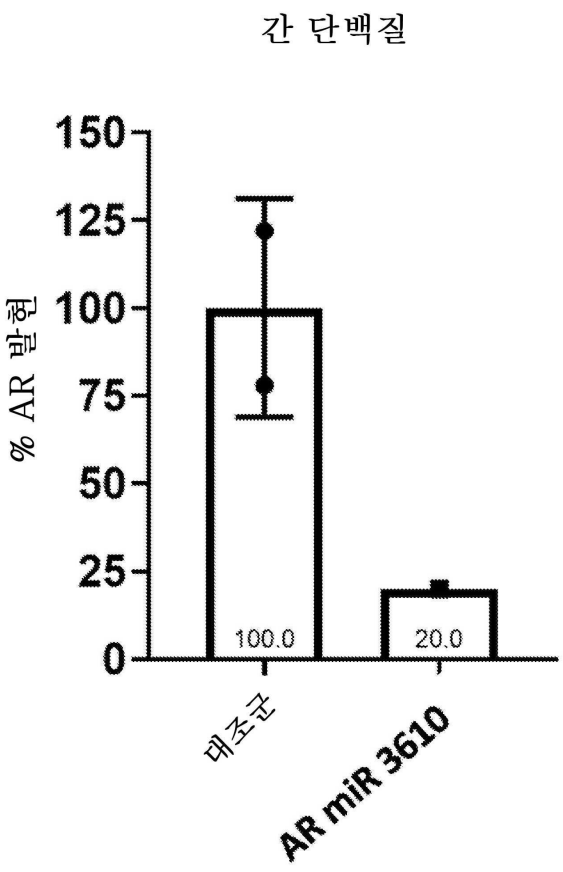
도면13a



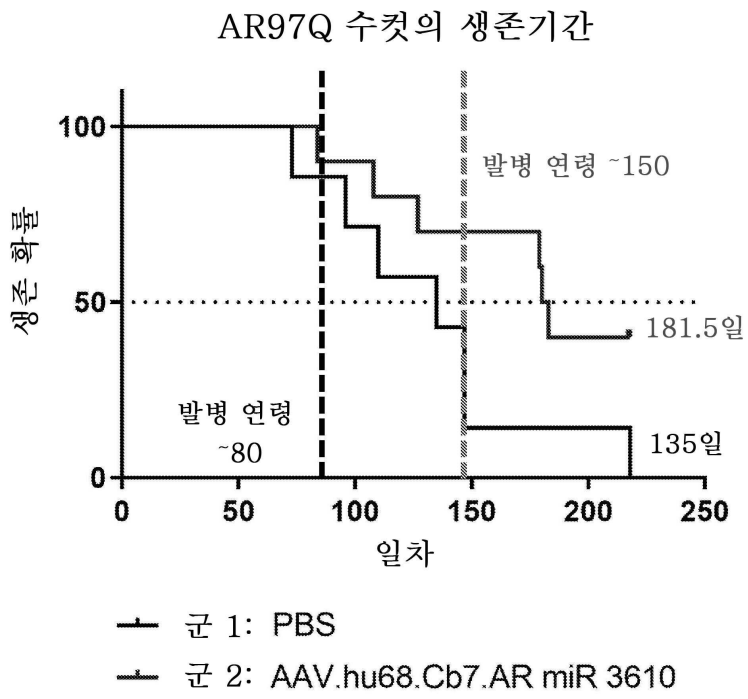
도면13b



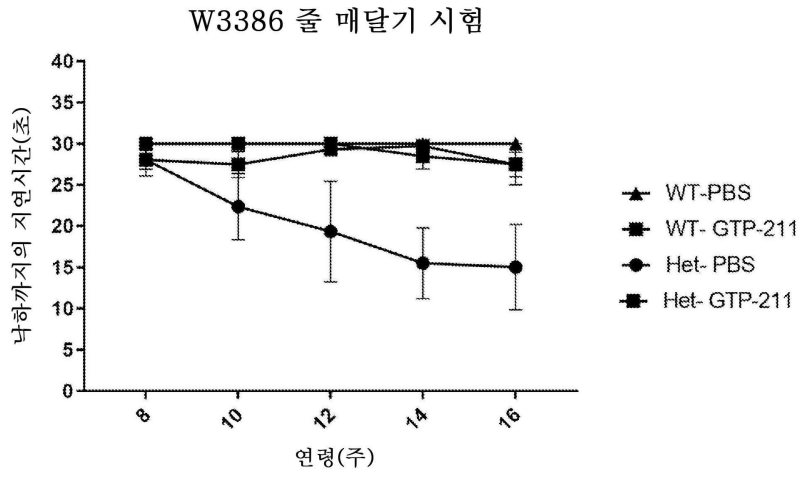
도면13c



도면14a

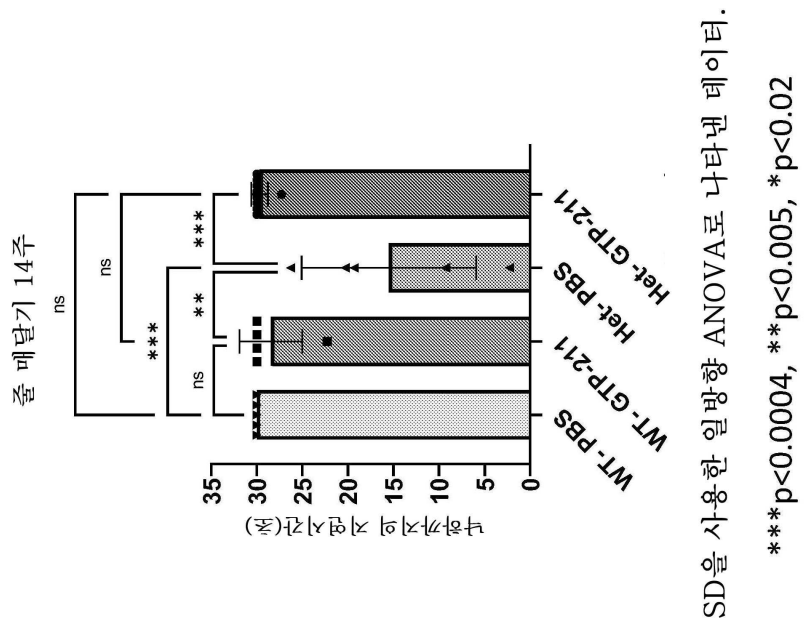


도면14b



SEM을 사용한 일방향 ANOVA로 나타낸 데이터

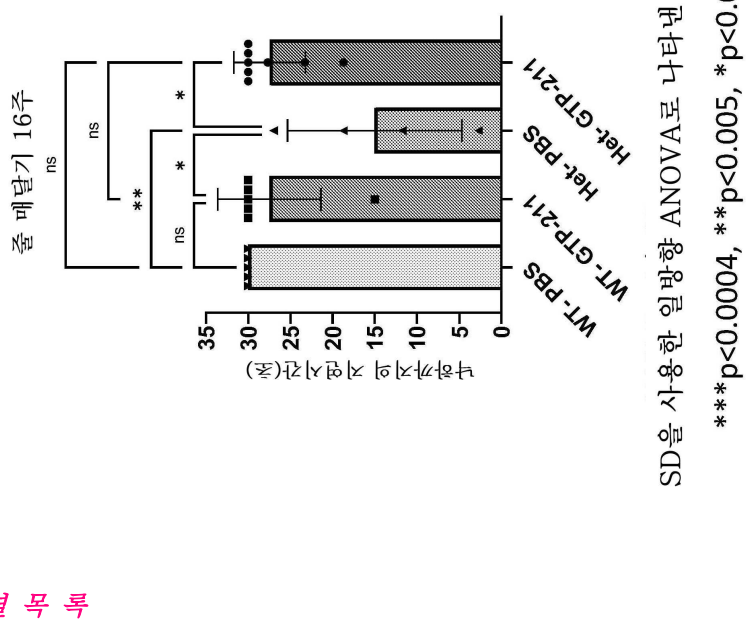
도면14c



SD을 사용한 일방향 ANOVA로 나타낸 데이터.

***p<0.0004, **p<0.005, *p<0.02

도면14d



SD을 사용한 일방향 ANOVA로 나타낸 데이터.

***p<0.0004, **p<0.005, *p<0.02

서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS USEFUL FOR TREATING SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY (SBMA)

<130> UPN-21-9557.PCT

<150> US 63/173885

<151> 2021-04-12

<150> US 63/187883

<151> 2021-05-12

<150> US 63/293505

<151> 2021-12-23

<160> 27

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

gaactacatc aaggaactcg a 21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 2

tcgagttcct tgatgtagtt c 21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 3

cgatcgagtt ccttgatgta g 21

<210> 4

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 4

tgctgtcgag ttccttgatg tagttcgttt tggccactga ctgacgaact acaaaggaac 60

tcga 64

<210> 5

<211> 64

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 5

tgctgcgatc gagttccttg atgtaggttt tggccactga ctgacctaca tcagaactcg 60

atcg 64

<210> 6

<211> 920

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Glu Val Gln Leu Gly Leu Gly Arg Val Tyr Pro Arg Pro Pro Ser
1 5 10 15

Lys Thr Tyr Arg Gly Ala Phe Gln Asn Leu Phe Gln Ser Val Arg Glu
20 25 30

Val Ile Gln Asn Pro Gly Pro Arg His Pro Glu Ala Ala Ser Ala Ala
35 40 45

Pro Pro Gly Ala Ser Leu Leu Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
50 55 60

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln
65 70 75 80

Glu Thr Ser Pro Arg Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly Glu Asp Gly Ser
85 90 95

Pro Gln Ala His Arg Arg Gly Pro Thr Gly Tyr Leu Val Leu Asp Glu
100 105 110

Glu Gln Gln Pro Ser Gln Pro Gln Ser Ala Leu Glu Cys His Pro Glu

115 120 125

Arg Gly Cys Val Pro Glu Pro Gly Ala Ala Val Ala Ala Ser Lys Gly

130 135 140

Leu Pro Gln Gln Leu Pro Ala Pro Pro Asp Glu Asp Asp Ser Ala Ala

145 150 155 160

Pro Ser Thr Leu Ser Leu Leu Gly Pro Thr Phe Pro Gly Leu Ser Ser

165 170 175

Cys Ser Ala Asp Leu Lys Asp Ile Leu Ser Glu Ala Ser Thr Met Gln

180 185 190

Leu Leu Gln Gln Gln Gln Gln Glu Ala Val Ser Glu Gly Ser Ser Ser

195 200 205

Gly Arg Ala Arg Glu Ala Ser Gly Ala Pro Thr Ser Ser Lys Asp Asn

210 215 220

Tyr Leu Gly Gly Thr Ser Thr Ile Ser Asp Asn Ala Lys Glu Leu Cys

225 230 235 240

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

245 250 255

Leu Ser Pro Gly Glu Gln Leu Arg Gly Asp Cys Met Tyr Ala Pro Leu

260 265 270

Leu Gly Val Pro Pro Ala Val Arg Pro Thr Pro Cys Ala Pro Leu Ala

275 280 285

Glu Cys Lys Gly Ser Leu Leu Asp Asp Ser Ala Gly Lys Ser Thr Glu

290 295 300

Asp Thr Ala Glu Tyr Ser Pro Phe Lys Gly Gly Tyr Thr Lys Gly Leu

305 310 315 320

Glu Gly Glu Ser Leu Gly Cys Ser Gly Ser Ala Ala Ala Gly Ser Ser

325 330 335

Gly Thr Leu Glu Leu Pro Ser Thr Leu Ser Leu Tyr Lys Ser Gly Ala

340 345 350

Leu Asp Glu Ala Ala Ala Tyr Gln Ser Arg Asp Tyr Tyr Asn Phe Pro

355 360 365

Leu Ala Leu Ala Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro His Pro His
370 375 380
Ala Arg Ile Lys Leu Glu Asn Pro Leu Asp Tyr Gly Ser Ala Trp Ala
385 390 395 400

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

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

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

Lys Tyr Leu Cys Ala Ser Arg Asn Asp Cys Thr Ile Asp Lys Phe Arg
595 600 605
Arg Lys Asn Cys Pro Ser Cys Arg Leu Arg Lys Cys Tyr Glu Ala Gly

610 615 620

Met Thr Leu Gly Ala Arg Lys Leu Lys Lys Leu Gly Asn Leu Lys Leu

625 630 635 640

Gln Glu Glu Gly Glu Ala Ser Ser Thr Thr Ser Pro Thr Glu Glu Thr

645 650 655

Thr Gln Lys Leu Thr Val Ser His Ile Glu Gly Tyr Glu Cys Gln Pro

660 665 670

Ile Phe Leu Asn Val Leu Glu Ala Ile Glu Pro Gly Val Val Cys Ala

675 680 685

Gly His Asp Asn Asn Gln Pro Asp Ser Phe Ala Ala Leu Leu Ser Ser

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Val Ile Gln Tyr Ser Trp Met Gly Leu Met Val Phe Ala Met Gly Trp

740 745 750

Arg Ser Phe Thr Asn Val Asn Ser Arg Met Leu Tyr Phe Ala Pro Asp

755 760 765

Leu Val Phe Asn Glu Tyr Arg Met His Lys Ser Arg Met Tyr Ser Gln

770 775 780

Cys Val Arg Met Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile

785 790 795 800

Thr Pro Gln Glu Phe Leu Cys Met Lys Ala Leu Leu Leu Phe Ser Ile

805 810 815

Ile Pro Val Asp Gly Leu Lys Asn Gln Lys Phe Phe Asp Glu Leu Arg

820 825 830

Met Asn Tyr Ile Lys Glu Leu Asp Arg Ile Ile Ala Cys Lys Arg Lys

835 840 845

Asn Pro Thr Ser Cys Ser Arg Arg Phe Tyr Gln Leu Thr Lys Leu Leu

850 855 860

Asp Ser Val Gln Pro Ile Ala Arg Glu Leu His Gln Phe Thr Phe Asp
865 870 875 880
Leu Leu Ile Lys Ser His Met Val Ser Val Asp Phe Pro Glu Met Met
885 890 895
Ala Glu Ile Ile Ser Val Gln Val Pro Lys Ile Leu Ser Gly Lys Val
900 905 910

Lys Pro Ile Tyr Phe His Thr Gln
915 920

<210> 7
<211> 130
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> constructed sequence
<400> 7
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt 60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact 120
aggggttcct 130
<210> 8
<211> 304
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> constructed sequence
<
400> 8
cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120
atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180
aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240
catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300
catg 304
<210> 9
<211> 278
<212> DNA
<213

> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 9

tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc ccccccctcc ccacccccaa 60

ttttgtattt atttatttttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg gggggggggg 120

ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg cggagaggtg 180

cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg aggcggcggc 240

ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcg 278

<210> 10

<211> 973

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 10

gtgagcgggc gggacggccc ttctcctccg ggctgtaatt agcgcttggt ttaatgacgg 60

cttgtttctt ttctgtggct gcgtgaaagc cttgaggggc tccgggaggg ccctttgtgc 120

gggggggagcg gctcgggggg tgcgtgcgtg tgtgtgtgcg tggggagcgc cgcgtgcggc 180

tccgcgctgc ccggcggctg tgagcgctgc gggcgcggcg cggggctttg tgcgctccgc 240

agtgtgcgcg aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg gggctgcgag 300

gggaacaaag gctgcgtgcg gggtgtgtgc gtgggggggt gagcaggggg tgtgggcgcg 360

tcggtcgggc tgcaaccccc cctgcacccc cctccccgag ttgctgagca cggcccggct 420

tcgggtgcgg ggctccgtac ggggcgtggc gcggggctcg ccgtgccggg cgggggggtgg 480

cggcaggtgg gggtgccggg cggggcgggg ccgcctcggg ccggggaggg ctcgggggag 540

gggcgcggcg gccccccggag cgccggcggc tgtcgaggcg cggcgagccg cagccattgc 600

cttttatggt aatcgtgcga gagggcgcag ggacttcctt tgtcccaaat ctgtgcggag 660

ccgaaatctg ggaggcgccg ccgcaccccc tctagcgggc gcggggcgaa gcggtgcggc 720

gccggcagga aggaaatggg cggggagggc cttcgtgcgt cgccgcgccg ccgtcccctt 780

ctccctctcc agcctcgggg ctgtccgcgg ggggacggct gccttcgggg gggacggggc 840

agggcggggt tcggcttctg gcgtgtgacc ggcggctcta gagcctctgc taaccatgtt 900

catgccttct tctttttcct acagctcctg ggcaacgtgc tggttattgt gctgtctcat 960

cattttggca aag 973

<210> 11

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 11

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgtc gagttccttg atgtagttcg ttttggccac 60

tgactgacga actacaaagg aactcgacag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120

gaacaaatgg c 131

<210> 12

<211> 131

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 12

ctggaggctt gctgaaggct gtatgctgcg atcgagttcc ttgatgtagg ttttggccac 60

tgactgacct acatcagaac tcgatcgcag gacacaaggc ctgttactag cactcacatg 120

gaacaaatgg c 131

<210> 13

<211> 589

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 13

aatcaacctc tggattacaa aatttgtgaa agattgactg gtattcttaa ctatgttgct 60

ccttttacgc tatgtggata cgctgcttta atgcctttgt atcatgctat tgcttcccgt 120

atggctttca ttttctcctc cttgtataaa tcctggttgc tgtctcttta tgaggagttg 180

tggcccgttg tcaggcaacg tggcgtggtg tgcactgtgt ttgctgacgc aacccccact 240

ggttggggca ttgccaccac ctgtcagctc ctttccggga ctttcgcttt ccccctccct 300

attgccacgg cggaactcat cgccgcctgc cttgcccgct gctggacagg ggctcggctg 360

ttgggcactg acaattccgt ggtgttgtcg gggaaatcat cgtcctttcc ttggctgctc 420

gcctgtgttg ccacctggat tctgcgcggg acgcccttct gctacgtccc ttcggccctc 480

aatccagcgg accttccttc ccgcggcctg ctgccggctc tgcggcctct tccgcgtctt 540

cgccttcgcc ctcagacgag tcggatctcc ctttgggccg cctccccgc 589

<210> 14

<211> 130

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 14

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag 130

<210> 15

<211

> 460

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hSynapsin promoter

<400> 15

tcgagctgca gagggccctg cgtatgagtg caagtgggtt ttaggaccag gatgaggcgg 60

ggtgggggtg cctacctgac gaccgacccc gacccactgg acaagcaccc aacccccatt 120

ccccaaattg cgcatcccct atcagagagg gggaggggaa acaggatgcg gcgaggcgcg 180

tgcgcactgc cagcttcagc accgcggaca gtgccttcgc ccccgcctgg cggcgcgcgc 240

caccgccgcc tcagcactga aggcgcgctg acgtcactcg ccggtccccc gcaaactccc 300

cttcccggcc accttggtcg cgtccgcgcc gccgccggcc cagccggacc gcaccacgcg 360

aggcgcgaga taggggggca cgggcgcgac catctgcgct gcggcgccgg cgactcagcg 420

ctgcctcagt ctgcggtggg cagcggagga gtcgtgtcgt 460

<210> 16

<211> 8030

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> production plasmid pAAV2hu68n.KanR

<220><221> promoter

<222> (1)..(36)

<223> Truncated P5

<220><221> misc_feature

<222> (37)..(1899)

<223> AAV2 Rep

<220><221> CDS

<222> (1919)..(4129)

<223> AAVhu68 Cap

<220><221> promoter

<222> (4220)..(4350)

<

223> P5 promoter

<220><221> promoter

<222> (4398)..(4692)

<223> LacZ promoter

<220><221> misc_feature

<222> (4875)..(5463)

<223> Col E1 ori

<220><221> misc_feature

<222> (6160)..(6975)

<223> KanR

<220><221> misc_feature

<222> (7195)..(7229)

<223> KanR

<220><221> misc_feature

<222> (7325)..(7780)

<223> f1 ori

<400> 16

ccattttgaa gcgggaggtt tgaacgcgca gccgccatgc cggggtttta cgagattgtg 60

attaaggtcc ccagcgacct tgacgagcat ctgcccggca tttctgacag ctttgtgaac 120

tgggtggccg agaaggaatg ggagttgccg ccagattctg acatggatct gaatctgatt 180

gagcaggcac ccctgaccgt ggccgagaag ctgcagcgcg actttctgac ggaatggcgc 240

cgtgtgagta aggccccgga ggctcttttc tttgtgcaat ttgagaaggg agagagctac 300

ttccacatgc acgtgctcgt ggaaaccacc ggggtgaaat ccatggtttt gggacgtttc 360

ctgagtcaga ttcgcgaaaa actgattcag agaatttacc gcgggatcga gccgactttg 420

ccaaactggt tcgcggtcac aaagaccaga aatggcgccg gaggcgggaa caaggtggtg 480

gatgagtgct acatccccaa ttacttgctc cccaaaaccc agcctgagct ccagtgggcg 540

tggactaata tggaacagta tttaagcgcc tgtttgaatc tcacggagcg taaacggttg 600

gtggcgcagc atctgacgca cgtgtcgcag acgcaggagc agaacaaaga gaatcagaat 660

cccaattctg atgcgccggt gatcagatca aaaacttcag ccaggtacat ggagctggtc 720

gggtggctcg tggacaaggg gattacctcg gagaagcagt ggatccagga ggaccaggcc 780

tcatacatct ccttcaatgc ggcctccaac tcgcggtccc aaatcaaggc tgccttggac 840

aatgcgggaa agattatgag cctgactaaa accgcccccg actacctggt gggccagcag 900

cccgtggagg acatttccag caatcggatt tataaaattt tggaactaaa cgggtacgat 960

ccccaatatg cggcttccgt ctttctggga tgggccacga aaaagttcgg caagaggaac 1020

accatctggc tgtttgggcc tgcaactacc gggaagacca acatcgcgga ggccatagcc 1080

cacactgtgc ccttctacgg gtgcgtaaac tggaccaatg agaactttcc cttcaacgac 1140

tgtgtcgaca agatggtgat ctggtgggag gaggggaaga tgaccgccaa ggtcgtggag 1200

tcggccaaag ccattctcgg aggaagcaag gtgcgcgtgg accagaaatg caagtcctcg 1260

gcccagatag acccgactcc cgtgatcgtc acctccaaca ccaacatgtg cgccgtgatt 1320

gacgggaact caacgacctt cgaacaccag cagccgttgc aagaccggat gttcaaattt 1380

gaactcaccc gccgtctgga tcatgacttt gggaaggtca ccaagcagga agtcaaagac 1440

tttttccggt gggcaaagga tcacgtggtt gaggtggagc atgaattcta cgtcaaaaag 1500

ggtggagcca agaaaagacc cgcccccagt gacgcagata taagtgagcc caaacgggtg 1560

cgcgagtcag ttgcgcagcc atcgacgtca gacgcggaag cttcgatcaa ctacgcagac 1620

aggtaccaaa acaaatgttc tcgtcacgtg ggcatgaatc tgatgctgtt tccctgcaga 1680

caatgcgaga gaatgaatca gaattcaaat atctgcttca ctcacggaca gaaagactgt 1740

ttagagtgct ttcccgtgtc agaatctcaa cccgtttctg tcgtcaaaaa ggcgtatcag 1800

aaactgtgct acattcatca tatcatggga aaggtgccag acgcttgcac tgcctgcgat 1860

ctggtcaatg tggatttgga tgactgcatc tttgaacaat aaatgattta aatcaggt 1918

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt 1966

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 2014

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      2062
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      2110
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      2158
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      2206
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      2254

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      2302
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      2350
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      2398
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      2446
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      2494
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 2542

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 2590

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 2638

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 2686

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 2734

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 2782

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 2830

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 2878

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 2926

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 2974

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 3022

```
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       3070
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       3118
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       3166
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       3214
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       3262

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       3310
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       3358
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       3406
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       3454
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 3502

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 3550

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 3598

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 3646

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 3694

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 3742

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 3790

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 3838

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 3886

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 3934

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 3982

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 4030

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 4078

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 4126

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

725 730 735

taa ttgcttgtta atcaataaac cgtttaattc gtttcagttg aactttggtc 4179

tctgcgaagg gcgaattcgt ttaaacctgc aggactagag gtcctgtatt agaggtcacg 4239

tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat gtggtcacgc tgggtattta agcccgagtg 4299

agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga ggtttgaacg cgcagccgcc aagccgaatt 4359

ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgactagagc ggccgccacc gcggtggagc 4419

tccagctttt gttcccttta gtgagggtta attgcgcgct tggcgtaatc atggtcatag 4479

ctgtttcctg tgtgaaattg ttatccgctc acaattccac acaacatacg agccggaagc 4539

ataaagtgta aagcctgggg tgcctaatga gtgagctaac tcacattaat tgcgttgcgc 4599

tcactgcccg ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaatg aatcggccaa 4659

cgcgcgggga gaggcggttt gcgtattggg cgctcttccg cttcctcgct cactgactcg 4719

ctgcgctcgg tcgttcggct gcggcgagcg gtatcagctc actcaaaggc ggtaatacgg 4779

ttatccacag aatcagggga taacgcagga aagaacatgt gagcaaaagg ccagcaaaag 4839

gccaggaacc gtaaaaaggc cgcgttgctg gcgtttttcc ataggctccg ccccccctgac 4899

gagcatcaca aaaatcgacg ctcaagtcag aggtggcgaa acccgacagg actataaaga 4959

taccaggcgt ttcccccctgg aagctccctc gtgcgctctc ctgttccgac cctgccgctt 5019

accggatacc tgtccgcctt tctcccttcg ggaagcgtgg cgctttctca tagctcacgc 5079

tgtaggtatc tcagttcggt gtaggtcgtt cgctccaagc tgggctgtgt gcacgaaccc 5139

cccgttcagc ccgaccgctg cgccttatcc ggtaactatc gtcttgagtc caacccggta 5199

agacacgact tatcgccact ggcagcagcc actggtaaca ggattagcag agcgaggtat 5259

gtaggcggtg ctacagagtt cttgaagtgg tggcctaact acggctacac tagaagaaca 5319

gtatttggta tctgcgctct gctgaagcca gttaccttcg gaaaaagagt tggtagctct 5379

tgatccggca aacaaaccac cgctggtagc ggtggttttt ttgtttgcaa gcagcagatt 5439
acgcgcagaa aaaaaggatc tcaagaagat cctttgatct tttctacggg gtctgacgct 5499
cagtggaacg aaaactcacg ttaagggatt ttggtcatga gattatcaaa aaggatcttc 5559
acctagatcc ttttgatcct ccggcgttca gcctgtgcca cagccgacag gatggtgacc 5619
accatttgcc ccatatcacc gtcggtactg atcccgtcgt caataaaccg aaccgctaca 5679
ccctgagcat caaactcttt tatcagttgg atcatgtcgg cggtgtcgcg gccaagacgg 5739
tcgagcttct tcaccagaat gacatcacct tcctccacct tcatcctcag caaatccagc 5799

ccttcccgat ctgttgaact gccggatgcc ttgtcggtaa agatgcggtt agcttttacc 5859
cctgcatctt tgagcgctga ggtctgcctc gtgaagaagg tgttgctgac tcataccagg 5919
cctgaatcgc cccatcatcc agccagaaag tgagggagcc acggttgatg agagctttgt 5979
tgtaggtgga ccagttggtg attttgaact tttgctttgc cacggaacgg tctgcgttgt 6039
cgggaagatg cgtgatctga tccttcaact cagcaaaagt tcgatttatt caacaaagcc 6099
gccgtcccgt caagtcagcg taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga 6159
ttagaaaaac tcatcgagca tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat 6219

accatatttt tgaaaaagcc gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca 6279
taggatggca agatcctggt atcggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc 6339
tattaatttc ccctcgtcaa aaataaggtt atcaagtgag aaatcaccat gagtgacgac 6399
tgaatccggt gagaatggca aaagcttatg catttctttc cagacttgtt caacaggcca 6459
gccattacgc tcgtcatcaa aatcactcgc atcaaccaaa ccgttattca ttcgtgattg 6519
cgcctgagcg agacgaaata cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga 6579
atgcaaccgg cgcaggaaca ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata 6639

ttcttctaat acctggaatg ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcatc 6699
atcaggagta cggataaaat gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt 6759
tagtctgacc atctcatctg taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa 6819
caactctggc gcatcgggct tcccatacaa tcgatagatt gtcgcacctg attgcccgac 6879
attatcgcga gcccatttat acccatataa atcagcatcc atgttggaat ttaatcgcgg 6939
cctcgagcaa gacgtttccc gttgaatatg gctcataaca ccccttgtat tactgtttat 6999
gtaagcagac agttttattg ttcatgatga tatatttta tcttgtgcaa tgtaacatca 7059

gagattttga gacactgcac ccaactgatc ttcagcatct tttactttca ccagcgtttc 7119

tgggtgagca aaaacaggaa ggcaaaatgc cgcaaaaaag ggaataaggg cgacacggaa 7179

atgttgaata ctcatactct tccttttca atattattga agcatttatc agggttattg 7239

tctcatgagc ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg 7299

cacatttccc cgaaaagtgc cacctaaatt gtaagcgtta atattttgtt aaaattcgcg 7359

ttaaattttt gttaaatcag ctcatttttt aaccaatagg ccgaaatcgg caaaatccct 7419

tataaatcaa aagaatagac cgagataggg ttgagtgttg ttccagtttg gaacaagagt 7479

ccactattaa agaacgtgga ctccaacgtc aaagggcgaa aaaccgtcta tcagggcgat 7539

ggcccactac gtgaaccatc accctaatca agtttttgg ggtcgaggtg ccgtaaagca 7599

ctaaatcgga accctaaagg gagcccccga tttagagctt gacggggaaa gccggcgaac 7659

gtggcgagaa aggaagggaa gaaagcgaaa ggagcgggcg ctagggcgct ggcaagtgta 7719

gcggtcacgc tgcgcgtaac caccacaccc gccgcgctta atgcgccgct acagggcgcg 7779

tcccattcgc cattcaggct gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg ggcctcttcg 7839

ctattacgcc agctggcgaa aggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca 7899

gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg acggccagtg agcgcgcgta atacgactca 7959

ctatagggcg aattgggtac cgggcccccc ctcgatcgag gtcgacggta tcgggggagc 8019

tcgcagggtc t 8030

<210> 17

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 17

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> 18

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu68

<400> 18

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctcagtga aggcattcgc 60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac 180

aaggggggagc cggtcaacga agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgt gggtattggc 480
aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540
tcagtccccg accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600
cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780
tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcaaaga 900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgctaataa ccttaccagc 1020
acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080
gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatcta 1140

acgcttaatg atggaagcca agccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc 1200
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260
cctttccata gcagctatgc tcacagccaa agcctggacc gactcatgaa tccactcatc 1320
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440
ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500
tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620
ttaatttttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680
accaacgaag aagaaattaa aactaccaac ccagtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800
atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860
aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920
aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980

gctttcaaca aggacaagct gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc 2040

gtggagattg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgtt 2160

tattctgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 19

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> hu68 M191

<400> 19

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctcagtga aggcattcgc 60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcggg gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac 180

aaggggggagc cggtcaacga agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgt gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtccccg accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcaaaga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgctaataa ccttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta tggatacctc 1140

accctgaacg acggcagtca ggcggtgggc cgctcatcct tctactgcct ggagtacttc 1200

ccttcgcaga tgctgaggac tggcaacaac ttccagttca gctacgagtt cgagaacgtc 1260

cctttccaca gcagctacgc ccacagccag agtttggacc gcttgatgaa ccctctgatc 1320

gaccagtacc tgtactacct gtcaaagacg atcaacggtt ctggccagaa ccagcagacg 1380

ctgaagttca gcgtggccgg gcctagcaac atggccgtcc agggcagaaa ctacatccct 1440
gggcccagct accggcagca gagagtctca accactgtga ctcagaacaa caacagtgag 1500
ttcgcctggc ctggcgccag ctcttgggcc ctcaacggcc gcaactcgct gatgaaccca 1560
ggcccagcca tggccagtca caaggagggc gaggaccgtt tcttcccttt gtctggctct 1620
ctgatcttcg gcaagcaggg gaccggcaga gacaacgtgg acgcggacaa ggtcatgatc 1680
acgaacgagg aggagatcaa gaccaccaac cctgtggcaa ccgagtccta cggccaggtg 1740
gcaaccaacc accagagcgc ccaggcacag gcgcagactg gctgggtcca gaaccagggg 1800

atcctgcctg gcatggtgtg gcaggaccgt gacgtgtacc tgcagggccc tatctgggca 1860
aagatccctc acacggacgg caacttccac ccttctcctc tgatgggcgg cttcggcatg 1920
aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaag aacactccgg tcccggcaga ccctccgacg 1980
gccttcaaca aggacaagct gaactcattc atcactcagt actccactgg ccaggtcagc 2040
gtggagatcg agtgggagct gcagaaggag aacagcaagc gttggaaccc agagatccag 2100
tacacttcca actactacaa gtctaacaac gtggagttcg ccgtcaacac tgagggtgtg 2160
tacagtgagc ctcgccctat cggcacccgg tacctcaccc gaaacttgtg a 2211

<210> 20
<211> 8543
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> production plasmid pAAV-PHP.eB
<220><221> promoter
<222> (140)..(158)
<223> T7 promoter
<220><221> misc_feature
<222> (239)..(2104)
<223> AAV2 Rep
<220><221> misc_feature
<222> (648)..(657)
<223> p19 SRE
<220><221> misc_feature
<222> (663)..(683)
<223> p19 SP1 and GGT

<220><221> misc_feature

<222> (737)..(745)

<223> SP1 binding

<220><221> misc_feature

<222> (761)..(767)

<223> p19 TATA

<220><221> misc_feature

<222> (1618)..(1772)

<223> p40

<220><221> misc_feature

<222> (2121)..(2867)

<223> rtTA2S-M2

<220><221> misc_feature

<222> (2748)..(2858)

<223> VP48

<220><221> misc_feature

<222> (2897)..(2915)

<223> SP6 promoter

<220><221> polyA_signal

<222> (2941)..(3165)

<223> bGH poly(A) signal

<220><221> protein_bind

<222> (3264)..(3282)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3301)..(3319)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3338)..(3356)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3375)..(3393)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3412)..(3430)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3449)..(3467)

<223> tet operator

<220><221> protein_bind

<222> (3486)..(3504)

<223> tet operator

<220><221> misc_feature

<222> (3533)..(3825)

<223> AAV5 rep22 sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3826)..(3827)

<223> AAV5 rep sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3826)..(3827)

<223> p41

<220><221> misc_feature

<222> (3828)..(4131)

<223> AAV2 rep sequence

<220><221> misc_feature

<222> (3851)..(3852)

<223> Splice donor

<220><221> misc_feature

<222> (4143)..(4146)

<223> minor VP1 aceptor

<220><221> CDS

<222> (4148)..(6376)

<223> AAVPHP.eB Cap

<220><221> misc_feature

<222> (4559)..(4561)

<223> VP2

<220><221> misc_feature

<222> (4674)..(5264)

<223> AAP

<220><221> misc_feature

<222> (4754)..(4756)

<223

> VP3 start

<220><221> misc_feature

<222> (5907)..(5911)

<223> AAV-PHP.B

<220><221> misc_feature

<222> (5912)..(5932)

<223> PHP.B

<220><221> misc_feature

<222> (6386)..(6441)

<223> AAV2 sequence

<400> 20

ccaatgatac gcgtcggtgc gggcctcttc gctattacgc cagctggcga aaggggatg 60

tgctgcaagg cgattaagtt gggtaacgcc agggttttcc cagtcacgac gttgtaaaac 120

gacggccagt gagcgcgcgt aatacgactc actatagggc gaattgggta catcgacggt 180

atcgggggag ctcgcagggt ctccattttg aagcgggagg tttgaacgcg cagccgccat 240

gccggggttt tacgagattg tgattaaggt ccccagcgac cttgacgagc atctgcccgg 300

catttctgac agctttgtga actgggtggc cgagaaggaa tgggagttgc cgccagattc 360

tgacatggat ctgaatctga ttgagcaggc acccctgacc gtggccgaga agctgcagcg 420

cgactttctg acggaatggc gccgtgtgag taaggccccg gaggctcttt tctttgtgca 480

atttgagaag ggagagagct acttccacat gcacgtgctc gtggaaacca ccggggtgaa 540

atccatggtt ttgggacgtt tcctgagtca gattcgcgaa aaactgattc agagaattta 600

ccgcgggatc gagccgactt tgccaaactg gttcgcggtc acaaagacca gaaatggcgc 660

cggaggcggg aacaaggtgg tggatgagtg ctacatcccc aattacttgc tccccaaaac 720

ccagcctgag ctccagtggg cgtggactaa tatggaacag tatttaagcg cctgtttgaa 780

tctcacggag cgtaaacggt tggtggcgca gcatctgacg cacgtgtcgc agacgcagga 840

gcagaacaaa gagaatcaga atcccaattc tgatgcgccg gtgatcagat caaaaacttc 900

agccaggtac atggagctgg tcgggtggct cgtggacaag gggattacct cggagaagca 960

gtggatccag gaggaccagg cctcatacat ctccttcaat gcggcctcca actcgcggtc 1020

ccaaatcaag gctgccttgg acaatgcggg aaagattatg agcctgacta aaaccgcccc 1080

cgactacctg gtgggccagc agcccgtgga ggacatttcc agcaatcgga tttataaaat 1140

tttggaacta aacgggtacg atccccaata tgcggcttcc gtctttctgg gatgggccac 1200

gaaaaagttc ggcaagagga acaccatctg gctgtttggg cctgcaacta ccgggaagac 1260

caacatcgcg gaggccatag cccacactgt gcccttctac gggtgcgtaa actggaccaa 1320

tgagaacttt cccttcaacg actgtgtgga caagatggtg atctggtggg aggaggggaa 1380

gatgaccgcc aaggtcgtgg agtcggccaa agccattctc ggaggaagca aggtgcgcgt 1440

ggaccagaaa tgcaagtcct cggcccagat agacccgact cccgtgatcg tcacctccaa 1500

caccaatatg tgcgccgtga ttgacgggaa ctcaacgacc ttcgaacacc agcagccgtt 1560

gcaagaccgg atgttcaaat ttgaactcac ccgccgtctg gatcatgact ttgggaaggt 1620

caccaagcag gaagtcaaag actttttccg gtgggcaaag gatcacgtgg ttgaggtgga 1680

gcatgaattc tacgtcaaaa agggtggagc caagaaaaga cccgccccca gtgacgcaga 1740

tataagtgag cccaaacggg tgcgcgagtc agttgcgcag ccatcgacgt cagacgcgga 1800

agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt tctcgtcacg tgggcatgaa 1860

tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat cagaattcaa atatctgctt 1920

cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg tcagaatctc aacccgtttc 1980

tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat cacatcatgg gaaaggtgcc 2040

agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg gatgactgtg tttctgaaca 2100

ataaatgact taaaccaggt atgagtcggc tggataaatc taaagtcata aacggcgctc 2160

tggaattact caatgaagtc ggtatcgaag gcctgacgac aaggaaactc gctcaaaagc 2220

tgggagttga gcagcctacc ctgtactggc acgtgaagaa caagcgggcc ctgctcgatg 2280

ccctggccat cgagatgctg gacaggcatc atacccactt ctgccccctg gaaggcgagt 2340

catggcaaga ctttctgcgg aacaacgcca agtcattccg ctgtgctctc ctctcacatc 2400

gcgacggggc taaagtgcat ctcggcaccc gcccaacaga gaaacagtac gaaaccctgg 2460

aaaatcagct cgcgttcctg tgtcagcaag gcttctccct ggagaacgca ctgtacgctc 2520

tgtccgccgt gggccacttt acactgggct gcgtattgga ggaacaggag catcaagtag 2580

caaaagagga aagagagaca cctaccaccg attctatgcc cccacttctg agacaagcaa 2640

ttgagctgtt cgaccggcag ggagccgaac ctgccttcct tttcggcctg gaactaatca 2700

tatgtggcct ggagaaacag ctaaagtgcg aaagcggcgg gccggccgac gcccttgacg 2760

attttgactt agacatgctc ccagccgatg cccttgacga ctttgacctt gatatgctgc 2820

ctgctgacgc tcttgacgat tttgaccttg acatgctccc cgggtaaatg catgaattcg 2880

atctagaggg ccctattcta tagtgtcacc taaatgctag agctcgctga tcagcctcga 2940

ctgtgccttc tagttgccag ccatctgttg tttgcccctc ccccgtgcct tccttgaccc 3000

tggaaggtgc cactcccact gtcctttcct aataaaatga ggaaattgca tcgcattgtc 3060

tgagtaggtg tcattctatt ctgggggggtg gggtggggca ggacagcaag ggggaggatt 3120

gggaagacaa tagcaggcat gctggggatg cggtgggctc tatggcttct gaggcggaaa 3180

gaaccagctg gggctcgaat caagctatca agtgccacct gacgtctccc tatcagtgat 3240

agagaagtcg acacgtctcg agctccctat cagtgataga gaaggtacgt ctagaacgtc 3300

tccctatcag tgatagagaa gtcgacacgt ctcgagctcc ctatcagtga tagagaaggt 3360

acgtctagaa cgtctcccta tcagtgatag agaagtcgac acgtctcgag ctccctatca 3420

gtgatagaga aggtacgtct agaacgtctc cctatcagtg atagagaagt cgacacgtct 3480

cgagctccct atcagtgata gagaaggtac cccctatata agcagagaga tctgttcaaa 3540

tttgaactga ctaagcggct cccgccagat tttggcaaga ttactaagca ggaagtcaag 3600

gacttttttg cttgggcaaa ggtcaatcag gtgccggtga ctcacgagtt taaagttccc 3660

agggaattgg cgggaactaa aggggcggag aaatctctaa aacgcccact gggtgacgtc 3720

accaatacta gctataaaag tctggagaag cgggccaggc tctcatttgt tcccgagacg 3780

cctcgcagtt cagacgtgac tgttgatccc gctcctctgc gaccgctagc ttcgatcaac 3840

tacgcagaca ggtaccaaaa caagtgttct cgtcacgtgg gcattaatct gattctgttt 3900

ccctgcagac aatgcgagag aatgaatcag aactcaaata tctgcttcac tcacggacag 3960

aaagactgtt tagagtgctt tcccgtgtca gaatctcaac ccgtttctgt cgtcaaaaag 4020

gcgtatcaga aactgtgcta cattcatcat atcatgggaa aggtgccaga cgcttgcact 4080

gcctgcgatc tggtcaatgt ggatttggat gactgcatct ttgaacaata aatgacttaa 4140

gccaggt atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac 4189

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

1 5 10

ctt agt gaa gga att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct 4237

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

15 20 25 30

caa ccc aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct aga ggt ctt gtg 4285

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

```
                35                  40                  45
ctt ccg ggt tac aaa tac ctt gga ccc ggc aac gga ctc gac aag ggg       4333
Leu Pro Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly
            50                  55                  60

gag ccg gtc aac gca gca gac gcg gcg gcc ctc gag cac gac aaa gcc       4381
Glu Pro Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala
        65                  70                  75
tac gac cag cag ctc aag gcc gga gac aac ccg tac ctc aag tac aac       4429
Tyr Asp Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn
    80                  85                  90
cac gcc gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt       4477

His Ala Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe
95                  100                 105                 110
ggg ggc aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt       4525
Gly Gly Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu
                115                 120                 125
gaa cct ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag       4573
Glu Pro Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys

            130                 135                 140
aag agg cct gta gag cag tct cct cag gaa ccg gac tcc tcc gcg ggt       4621
Lys Arg Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly
        145                 150                 155
att ggc aaa tcg ggt gca cag ccc gct aaa aag aga ctc aat ttc ggt       4669
Ile Gly Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly
    160                 165                 170

cag act ggc gac aca gag tca gtc cca gac cct caa cca atc gga gaa       4717
Gln Thr Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu
175                 180                 185                 190
cct ccc gca gcc ccc tca ggt gtg gga tct ctt aca atg gct tca ggt       4765
Pro Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly
                195                 200                 205
```

ggt ggc gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt 4813

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

agt tcc tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga 4861

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

gtc atc acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat 4909

Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn

240 245 250

cac ctc tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat 4957

His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn
255 260 265 270

gac aac gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc 5005

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

aac aga ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg cag cga ctc atc 5053

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

aac aac aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttt 5101

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

aac att cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc 5149

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

320 325 330

gcc aat aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat 5197

Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr
335 340 345 350

cag ctc ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg 5245

Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro

```
                355                 360                 365
ttc cca gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat ctg acg ctt       5293
Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu
            370                 375                 380
aat gat gga agc cag gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa       5341
Asn Asp Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu
        385                 390                 395

tat ttc ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc       5389
Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser
    400                 405                 410
tac gag ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tac gct cac agc caa       5437
Tyr Glu Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln
415                 420                 425                 430
agc ctg gac cga cta atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat       5485

Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr
                435                 440                 445
ctc tct aga act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa       5533
Leu Ser Arg Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys
            450                 455                 460
ttc agt gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac       5581
Phe Ser Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr

        465                 470                 475
ata cct gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act       5629
Ile Pro Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr
    480                 485                 490
caa aac aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct       5677
Gln Asn Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala
495                 500                 505                 510

ctc aat gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc tct       5725
Leu Asn Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser
                515                 520                 525
```

```
cac aaa gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att       5773
His Lys Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile
            530                 535                 540
ttt ggc aaa caa ggt act ggc aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc       5821

Phe Gly Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val
        545                 550                 555
atg ata acc aac gaa gaa gaa att aaa act act aac ccg gta gca acg       5869
Met Ile Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
    560                 565                 570
gag tcc tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gat ggg act ttg       5917
Glu Ser Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Asp Gly Thr Leu

575                 580                 585                 590
gcg gtg cct ttt aag gca cag gcg cag acc ggt tgg gtt caa aac caa       5965
Ala Val Pro Phe Lys Ala Gln Ala Gln Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln
                595                 600                 605
gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag gac aga gat gtg tac ctg caa       6013
Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln
            610                 615                 620

gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac acg gac ggc aac ttt cac cct       6061
Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro
        625                 630                 635
tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg aag cac ccg cct cct cag atc       6109
Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met Lys His Pro Pro Pro Gln Ile
    640                 645                 650
ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg gat cct cca acg gcc ttc aac       6157

Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn
655                 660                 665                 670
aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc cag tat tct act ggt caa gtc       6205
Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
                675                 680                 685
agc gtg gag atc gag tgg gag ctg cag aag gaa aac agc aag cgc tgg       6253
```

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

690 695 700

aac ccg gag atc cag tac act tcc aac tat tac aag tct aat aat gtt 6301

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val

705 710 715

gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gta tat agt gaa ccc cgc ccc att 6349

Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile

720 725 730

ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg taagtcgact tgcttgttaa 6396

Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

735 740

tcaataaacc gtttaattcg tttcagttga actttggtct ctgcgaaggg caattcgttt 6456

aaacctgcag gactagaggt cctgtattag aggtcacgtg agtgttttgc gacattttgc 6516

gacaccatgt ggtcacgctg ggtatttaag cccgagtgag cacgcagggt ctccattttg 6576

aagcgggagg tttgaacgcg cagccgccaa gccgaattct gcagatatca catgtcctag 6636

gaactatcga tccatcacac tggcggccgc tcgactagag cggccgccac cgcggtggag 6696

ctccagcttt tgcggaccga atcggaaaga acatgtgagc aaaaggccag caaaaggcca 6756

ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt ttttccatag gctccgcccc cctgacgagc 6816

atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc gacaggacta taaagatacc 6876

aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt tccgaccctg ccgcttaccg 6936

gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct ttctcatagc tcacgctgta 6996

ggtatctcag ttcggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg ctgtgtgcac gaacccccg 7056

ttcagcccga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct tgagtccaac ccggtaagac 7116

acgacttatc gccactggca gcagccactg gtaacaggat tagcagagcg aggtatgtag 7176

gcggtgctac agagttcttg aagtggtggc ctaactacgg ctacactaga agaacagtat 7236

ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa aagagttggt agctcttgat 7296

ccggcaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag cagattacgc 7356

gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggtct gacgctcagt 7416

ggaacgaaaa ctcacgttaa gggattttgg tcatgagatt atcaaaaagg atcttcacct 7476

agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta aagtatatat gagtaaactt 7536

ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat ctcagcgatc tgtctatttc 7596

gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac tacgatacgg gagggcttac 7656

catctggccc cagtgctgca atgataccgc gagacccacg ctcaccggct ccagatttat 7716

cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag tggtcctgca actttatccg 7776

cctccatcca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt aagtagttcg ccagttaata 7836

gtttgcgcaa cgttgttgcc attgctacag gcatcgtggt gtcacgctcg tcgtttggta 7896

tggcttcatt cagctccggt tcccaacgat caaggcgagt tacatgatcc cccatgttgt 7956

gcaaaaaagc ggttagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt cagaagtaag ttggccgcag 8016

tgttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct tactgtcatg ccatccgtaa 8076

gatgcttttc tgtgactggt gagtactcaa ccaagtcatt ctgagaatag tgtatgcggc 8136

gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatac cgcgccacat agcagaactt 8196

taaaagtgct catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa actctcaagg atcttaccgc 8256

tgttgagatc cagttcgatg taacccactc gtgcacccaa ctgatcttca gcatctttta 8316

ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca aaatgccgca aaaaagggaa 8376

taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttcct ttttcaatat tattgaagca 8436

tttatcaggg ttattgtctc atgagcggat acatatttga atgtatttag aaaaataaac 8496

aaataggggt tccgcgcaca tttccccgaa aagtgccacc tgacgtc 8543

<210> 21

<211> 743

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 21

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

Arg 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 Asp Gly Thr Leu Ala Val
580 585 590

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

Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp
660 665 670
Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val
675 680 685
Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro
690 695 700
Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe
705 710 715 720

Ala Val Asn Thr Glu Gly Val Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr
725 730 735
Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
740

<210> 22
<211> 2229
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> constructed sequence
<400> 22
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60
gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctagag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac 180

aaggggggagc cggtcaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa agcctacgac 240
cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480
aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540
tcagtcccag accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc 720
accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780
tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct ctttaacatt 960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080
gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140
acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc 1200
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320
gaccaatact tgtactatct ctctagaact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500
tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560
ggacctgcta tggcctctca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620
ttaatttttg gcaaacaagg tactggcaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680
accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740
gccacaaacc accagagtga tgggactttg gcggtgcctt ttaaggcaca ggcgcagacc 1800
ggttgggttc aaaaccaagg aatacttccg ggtatggttt ggcaggacag agatgtgtac 1860

ctgcaaggac ccatttgggc caaaattcct cacacggacg gcaactttca cccttctccg 1920

ctgatgggag ggtttggaat gaagcacccg cctcctcaga tcctcatcaa aaacacacct 1980

gtacctgcgg atcctccaac ggccttcaac aaggacaagc tgaactcttt catcacccag 2040

tattctactg gtcaagtcag cgtggagatc gagtgggagc tgcagaagga aaacagcaag 2100

cgctggaacc cggagatcca gtacacttcc aactattaca agtctaataa tgttgaattt 2160

gctgttaata ctgaaggtgt atatagtgaa ccccgcccca ttggcaccag atacctgact 2220

cgtaatctg 2229

<210> 23

<211> 841

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CB7 Promoter with CMV enhancer

<400> 23

ccattgacgt caataatgac gtatgttccc atagtaacgc caatagggac tttccattga 60

cgtcaatggg tggagtattt acggtaaact gcccacttgg cagtacatca agtgtatcat 120

atgccaagta cgccccctat tgacgtcaat gacggtaaat ggcccgcctg gcattatgcc 180

cagtacatga ccttatggga ctttcctact tggcagtaca tctacgtatt agtcatcgct 240

attaccatgg tcgaggtgag ccccacgttc tgcttcactc tccccatctc cccccctcc 300

ccacccccaa ttttgtattt atttatttt taattatttt gtgcagcgat gggggcgggg 360

ggggggggg ggcgcgcgcc aggcggggcg gggcggggcg aggggcgggg cggggcgagg 420

cggagaggtg cggcggcagc caatcagagc ggcgcgctcc gaaagtttcc ttttatggcg 480

aggcggcggc ggcggcggcc ctataaaaag cgaagcgcgc ggcgggcggg agtcgctgcg 540

cgctgccttc gccccgtgcc ccgctccgcc gccgcctcgc gccgcccgcc ccggctctga 600

ctgaccgcgt tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctcctcc gggctgtaat 660

tagcgcttgg tttaatgacg gcttgtttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttgagggg 720

ctccgggagg gccctttgtg cgggggggagc ggctcggggc tgtccgcggg gggacggctg 780

ccttcggggg ggacggggca gggcggggtt cggcttctgg cgtgtgaccg gcggctctag 840

a 841

<210> 24

<211> 1649

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> CAG promoter

<400> 24

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300

catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc 360

cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggg 420

ggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 480

aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 540

gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg 600

ccttcgcccc gtgccccgct ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac 660

cgcgttactc ccacaggtga gcgggcggga cggcccttct cctccgggct gtaattagcg 720

cttggtttaa tgacggcttg tttcttttct gtggctgcgt gaaagccttg aggggctccg 780

ggagggccct ttgtgcgggg ggagcggctc gggggggtgcg tgcgtgtgtg tgtgcgtggg 840

gagcgccgcg tgcggctccg cgctgcccgg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg 900

gctttgtgcg ctccgcagtg tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg ccccgcggtg 960

cgggggggcc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg gggggtgagc 1020

agggggtgtg ggcgcgtcgg tcgggctgca acccccccctg caccccccctc cccgagttgc 1080

tgagcacggc ccggcttcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcgg ggctcgccgt 1140

gccgggcggg gggtggcggc aggtgggggt gccgggcggg gcggggccgc ctcgggccgg 1200

ggagggctcg ggggaggggc gcggcggccc ccggagcgcc ggcggctgtc gaggcgcggc 1260

gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac ttcctttgtc 1320

ccaaatctgt gcggagccga aatctgggag gcgccgccgc acccccctcta gcgggcgcgg 1380

ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc gtgcgtcgcc 1440

gcgccgccgt ccccttctcc ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg acggctgcct 1500

tcgggggggа cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc 1560

ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca acgtgctggt 1620

tattgtgctg tctcatcatt ttggcaaag 1649

<210> 25

<211> 127

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> rabbit beta-globin

<400> 25

gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 60

tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120

tcactcg 127

<210> 26

<211> 2701

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Constructed sequence

<400> 26

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc cccgcccatt 60

gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca 120

atgggtggag tatttacggt aaactgccca cttggcagta catcaagtgt atcatatgcc 180

aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgcccagta 240

catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac gtattagtca tcgctattac 300

catggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc 360

cccaattttg tatttattta ttttttaatt attttgtgca gcgatggggg cgggggggg 420

ggggggggcgc gcgccaggcg gggcggggcg gggcgagggg cggggcgggg cgaggcggag 480

aggtgcggcg gcagccaatc agagcggcgc gctccgaaag tttcctttta tggcgaggcg 540

gcggcggcgg cggccctata aaaagcgaag cgcgcggcgg gcgggagtcg ctgcgcgctg 600

ccttcgcccc gtgccccgct ccgccgccgc ctcgcgccgc ccgccccggc tctgactgac 660

cgcgttactc ccacaggtga gcgggcggga cggcccttct cctccgggct gtaattagcg 720

cttggtttaa tgacggcttg tttcttttct gtggctgcgt gaaagccttg aggggctccg 780

ggagggccct ttgtgcgggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg tgtgcgtggg 840

gagcgccgcg tgcggctccg cgctgcccgg cggctgtgag cgctgcgggc gcggcgcggg 900

gctttgtgcg ctccgcagtg tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg ccccgcggtg 960

cgggggggggc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggt gtgtgcgtgg gggggtgagc 1020

agggggtgtg ggcgcgtcgg tcgggctgca acccccccctg cacccccctc cccgagttgc 1080

tgagcacggc ccggcttcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcgg ggctcgccgt 1140

gccgggcggg gggtggcggc aggtgggggt gccgggcggg gcggggccgc ctcgggccgg 1200

ggagggctcg ggggaggggc gcggcggccc ccggagcgcc ggcggctgtc gaggcgcggc 1260

gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcagggac ttcctttgtc 1320

ccaaatctgt gcggagccga aatctgggag gcgccgccgc acccccctcta gcgggcgcgg 1380

ggcgaagcgg tgcggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc gtgcgtcgcc 1440

gcgccgccgt ccccttctcc ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg acggctgcct 1500

tcgggggggа cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc 1560

ctctgctaac catgttcatg ccttcttctt tttcctacag ctcctgggca acgtgctggt 1620

tattgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcacgcgt gctagctctg gaggcttgct 1680

gaaggctgta tgctgtcgag ttccttgatg tagttcgttt tggccactga ctgacgaact 1740

acaaaggaac tcgacaggac acaaggcctg ttactagcac tcacatggaa caaatggccc 1800

agatctaggg tggggccacc tgccggtagg tgtgcggtag gcttttctcc gtcgcaggac 1860

gcagggttcg ggcctagctt atcgataatc aacctctgga ttacaaaatt tgtgaaagat 1920

tgactggtat tcttaactat gttgctcctt ttacgctatg tggatacgct gctttaatgc 1980

ctttgtatca tgctattgct tcccgtatgg ctttcatttt ctcctccttg tataaatcct 2040

ggttgctgtc tctttatgag gagttgtggc ccgttgtcag gcaacgtggc gtggtgtgca 2100

ctgtgtttgc tgacgcaacc cccactggtt ggggcattgc caccacctgt cagctccttt 2160

ccgggacttt cgctttcccc ctccctattg ccacggcgga actcatcgcc gcctgccttg 2220

cccgctgctg gacaggggct cggctgttgg gcactgacaa ttccgtggtg ttgtcgggga 2280

aatcatcgtc ctttccttgg ctgctcgcct gtgttgccac ctggattctg cgcgggacgc 2340

ccttctgcta cgtcccttcg gccctcaatc cagcggacct tccttcccgc ggcctgctgc 2400

cggctctgcg gcctcttccg cgtcttcgcc ttcgccctca gacgagtcgg atctcccttt 2460

gggccgcctc cccgcctgct gatcgccctg agcctggccc tggtgaccaa cagccaggtg 2520

caattgaagc tttctagagt cgacccgggc ggcggcggcc gcctaaggct cgaggatctt 2580

tttccctctg ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc 2640

taataaagga aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttttgtg tctctcactc 2700

g 2701

<210> 27

<211> 21

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 27

ctacatcaag gaactcgatc g 21