



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0008863
(43) 공개일자 2022년01월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/005 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-7040160
(22) 출원일자(국제) 2020년05월07일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2021년12월07일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2020/062713
(87) 국제공개번호 WO 2020/225363
국제공개일자 2020년11월12일

(30) 우선권주장
19173365.8 2019년05월08일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
유럽피안 몰레쿨러 바이올로지 레보러토리
독일, 하이델버그 디-69117, 메예르호프스트라세 1

(72) 발명자
헵펜스틀, 폴
독일, 69117 하이델버그 메예르호프스트라세 1 유럽피안 몰레쿨러 바이올로지스 레보러토리 사내
마페이, 마리아노
독일, 69117 하이델버그 메예르호프스트라세 1 유럽피안 몰레쿨러 바이올로지스 레보러토리 사내
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **유전자 치료를 위한 변형된 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자들**

(57) 요약

본 발명은 유전자 전달 및 유전자 치료를 위한 개선된 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자들에 관한 것이다. 변형된 캡시드를 포함하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자들이 제공된다. 본 발명은 또한 아데노 연관 바이러스(AAV) 캡시드들의 천연 결합 부위들을 제거하고 리간드 결합 부위들을 관심 있는 특정 세포만으로 형질도입하는 AAV들을 제공하기 위해 상기 캡시드로 도입함으로써 본 발명의 개선된 AAV 입자들을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추가적인 측면은 질병의 치료에 사용하기 위한 변형된 AAV 입자들 및 변형된 AAV 입자들을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 질병의 치료 방법들에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 예를 들어 기초 연구에서 유전자 전달 도구로서 세포들의 형질주입을 위한 본 발명의 AAV 입자들에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)

C07K 14/005 (2013.01)

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14145 (2013.01)

(72) 발명자

데 카스트로 레이스, 페르난다

독일, 69117 하이델버그 메예르호프스트라세 1 유
럽피안 몰레큘러 바이올로지스 래보러토리 사내

포우, 카닌, 모리스

독일, 69117 하이델버그 메예르호프스트라세 1 유
럽피안 몰레큘러 바이올로지스 래보러토리 사내

명세서

청구범위

청구항 1

아데노 연관 바이러스 (AAV) 입자로서,
상기 입자는 변형된 캡시드를 포함하고,

상기 변형된 캡시드는 상기 캡시드의 천연 결합 부위의 제거, 및 상기 캡시드로의 리간드 결합 부위의 도입으로부터 선택되는 적어도 하나의 변형을 포함하는, 아데노 연관 바이러스 입자.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 및 AAV12로부터 선택되는 것인, AAV 입자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 캡시드의 적어도 하나의 단백질은 변형된 것이고, 바람직하게는 상기 적어도 하나의 단백질은 VP1, VP2 및 /또는 VP3인, AAV 입자.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 캡시드의 상기 변형은 적어도 하나의 천연 결합 부위의 제거 및 적어도 하나의 리간드 결합 부위의 도입을 포함하는 것인, AAV 입자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 천연 결합 부위는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸들에 대한 결합을 가능하게 하는 천연 결합 부위이고, 바람직하게는 상기 천연 결합 부위는 VP1의 아르기닌 585 및 588 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌을 알라닌과 같은 다른 아미노산으로 대체함으로써 제거되는 것인, AAV 입자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 리간드 결합 부위는 리간드의 공유 부착에 적합한 리간드 결합 부위이고,

바람직하게는 상기 리간드 결합 부위는 벤질구아닌 그룹, 벤질시토신 그룹, 클로로알칸 그룹, 아지드 그룹, 디벤조사이클로옥틴 그룹, 포스핀 또는 이들의 조합으로부터 선택되는, AAV 입자.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 AAV 입자는 상기 벤질구아닌 그룹, 상기 벤질시토신 그룹, 상기 클로로알칸 그룹, 상기 아지드 그룹, 상기 디벤조사이클로옥틴 그룹, 및/또는 상기 포스핀, 특히 HaloTagTM, SNAP-tagTM, 또는 CLIP-tagTM, 아지드, 디벤조사이클로옥틴 그룹 또는 포스핀에 부착된 리간드를 추가로 포함하는, AAV 입자.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

상기 리간드는 단백질 리간드, 독소 서브유닛, 렉틴, 부착 인자, 항체, 펩타이드 및 유전자 편집 뉴클레아제로부터 선택되는 것인, AAV 입자.

청구항 9

개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자의 제조 방법으로서,

상기 방법은

상기 AAV의 캡시드로 적어도 하나의 변형을 도입하는 단계로서, 상기 캡시드의 천연 결합 부위가 제거되는 단계, 및/또는

상기 캡시드로 적어도 하나의 리간드 결합 부위를 도입하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 천연 결합 부위는 헤파란 셀페이트 프로테오글리칸에 대한 결합을 가능하게 하는 천연 결합 부위이고,

바람직하게는 상기 천연 결합 부위는 VP1의 아르기닌 585 및 588 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌을 알라닌과 같은 다른 아미노산으로 대체함으로써 제거되는 것인, 방법.

청구항 11

제9항 또는 제10항에 있어서,

상기 리간드 결합 부위는 리간드의 공유 부착에 적합한 리간드 결합 부위이고,

바람직하게는 상기 리간드 결합 부위는 벤질구아닌 그룹, 벤질시토신 그룹, 클로로알칸 그룹, 아지드 그룹, 디벤조사이클로옥틴 그룹, 포스핀 또는 이들의 조합으로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 AAV 입자를 적어도 하나의 약학적으로 허용되는 담체 및/또는 희석제와 함께 포함하는 약학 조성물.

청구항 13

질병을 치료에 사용하기 위한 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 AAV입자 또는 제12항에 따른 약학 조성물로서,

상기 질병은 바람직하게는 암, 유전성 단일 유전자 질환, 유전성 피부 질환, 감염성 질환, 제1형 당뇨병 및 상처 치유와 같은 유전자 치료에 의해 치료될 수 있는 것인, AAV 입자 또는 약학 조성물.

청구항 14

유전자 치료에 의해 치료될 수 있는 질병의 치료 방법으로서,

상기 방법은 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 AAV 입자 또는 제12항에 따른 약학 조성물을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하고,

상기 질병은 바람직하게는 암, 유전성 단일 유전자 질환, 유전성 피부 질환, 감염성 질환, 제1형 당뇨병 및 상처 치유와 같은 유전자 치료에 의해 치료될 수 있는 것인, 방법.

청구항 15

세포의 형질 주입을 위한, 예를 들어 유전자 전달 도구로서의 제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 AAV 입자의 용도.

청구항 16

제15항에 있어서,

상기 용도는 미용 목적을 위한 것인, AAV 입자의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유전자 전달 및 유전자 치료를 위한 개선된 아데노-연관 바이러스(AAV) 입자들에 관한 것이다. 변형된 캡시드를 포함하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자들이 제공된다. 본 발명은 또한 아데노 연관 바이러스(AAV) 캡시드들의 천연 결합 부위들을 제거하고 리간드 결합 부위들을 관심 있는 특정 세포들만으로 형질도입하는 AAV들을 제공하기 위해 상기 캡시드로 도입함으로써 본 발명의 개선된 AAV 입자들을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 추가적인 측면은 질병의 치료에 사용하기 위한 변형된 AAV 입자들 및 변형된 AAV 입자들을 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 것을 포함하는 질병의 치료 방법들에 관한 것이다. 본 발명의 또 다른 측면은 예를 들어 기초 연구에서 유전자 전달 도구로서 세포들의 형질주입을 위한 본 발명의 AAV 입자들에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전 정보를 전달하는 분자들의 세포들로의 도입은 현대 의학 및 기초 연구에 유용한 도구이다. 바람직한 방법들은 아데노바이러스, 레트로바이러스, 백시나 바이러스 및 아데노 연관 바이러스를 포함하는 바이러스 유래의 유전자 전달 비히클들의 사용을 포함한다. 이들 중 아데노-연관 바이러스(AAV)는 유전자 치료 방법으로 선호되는 바이러스이다. 야생형 AAV들은 그들이 감염시키는 세포들의 계놈에 안정적이고 부위-특이적 방식으로 통합되는 비교적 작은 크기의 DNA 바이러스이다. 중요하게도, 아직까지 AAV 감염과 관련된 인간 질병은 발견되지 않았다. 따라서, 아데노-연관 바이러스(AAV)는 병원성이 없기 때문에 선택되는 유전자 치료 벡터가 되었다. 흥미롭게도, 100개 초과 임상의 시험들이 AAV-기반 벡터를 사용하여 진행 중이며, 중요하게는, 첫 AAV 유전자 치료가 최근 FDA 승인을 받았으며 이는 유전성 망막 질환 치료용 보레티진 네파보백(Voretigene neparvovec)이다.

[0003] 아데노-연관 바이러스는 외피막이 없는 20면체 캡시드를 포함하는 파보바이러스과(Parvoviridae)의 테펜도바이러스(Dependovirus) 속 구성원이다. AAV 계놈은 길이가 대략 4.7 킬로베이스이고 선형 단일가닥 테옥시리보핵산(ssDNA)로 구성되며 이는 양성 또는 음성으로 감지될 수 있다. 상기 계놈은 DNA 가닥의 양 끝에 역말단 반복부(inverted terminal repeat, ITR)들, 및 두 개방 판독 프레임(OFR)들: rep 및 cap를 포함한다. rep 프레임은 AAV 수명 주기에 필요한 비구조적 복제(Rep) 단백질을 인코딩하는 4개의 중첩 유전자로 구성된다. cpa 프레임은 구조적 VP 캡시드 단백질들(VP1, VP2 및 VP3)의 중첩 뉴클레오티드 서열을 포함하며, 이들은 함께 상호작용하여 20면체 대칭의 캡시드를 형성한다. 말단 145 nt는 자기 상보적이며, T자형 헤어핀을 형성하는 에너지적으로 안정한 분자내 이중체를 형성할 수 있도록 구성된다. 이 헤어핀 구조들은 세포 DNA 중합효소 복합체의 프라이머 역할을 하는 바이러스 DNA 복제의 기원으로 기능한다. 포유동물 세포들에서 AAV 감염 후 rep 유전자들(즉, Rep78 및 Rep52)은 각각 P5 프로모터 및 P19 프로모터로부터 발현되고, 두 Rep 단백질들 모두 바이러스 계놈의 복제 기능을 갖는다. rep OFR에서 스플라이싱은 4개의 Rep 단백질들(즉, Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40)의 발현을 초래한다.

[0004] 일반적으로, 바이러스들은 원형질막에서 직접적인 막 융합/침투 반응을 통해 또는 초기 엔도솜에서 세포막의 유사한 파괴가 뒤따르는 엔도사이토시스(endocytosis)를 겪음으로써 다양한 방식으로 세포에 들어갈 수 있다. 바이러스 내재화의 가장 일반적인 형태는 클라트린(clathrin)-매개 엔도사이토시스를 통한 것이다. 이 과정은 다음을 포함하는 여러 단계로 분리될 수 있다: (1) 클라트린 코팅된 피트(pit)의 결정핵생성(nucleation); (2) 코팅된 피트들에서 카고(cargo) 포획; (3) 곡률 유도 및 막 함입; 및 (4) 베지클 절단 및 탈외피. 베지클은 바이러스 내용물을 초기 엔도솜에 전달한다. 흥미롭게도, 엔도사이토시스의 전체 과정은 인 비보로 몇 초의 순으로 발생한다. 클라트린-매개 엔도사이토시스를 통해 내재화되는 바이러스의 예들은 dsDNA, 예를 들어, 아데노바이러스과, 아데노바이러스 2형, 아데노바이러스 5형, 아데노바이러스 8형, 아데노바이러스 37형, 개 아데노바이러스 2형(CAV-2), 아데노-연관 바이러스 2 및 아데노-연관 바이러스 5(테펜도바이러스)이다.

[0005] 바이러스들은 또한 원형질막의 50-70 nm 플라스크 모양의 함입들을 형성하는 특수 지질 유동섬(lipid raft)들인 카베올라(caveolae)를 통해 내재화될 수 있다. 카베올린(caveolin)들은 카베올라의 구조적 근간을 형성한다. 카베올라를 통한 내재화는 구성 과정이 아니라 세포 자극시에만 발생한다. 그들의 숙주 세포 수용체에 결합된 내재화된 바이러스는 초기 엔도솜으로 전달된다. 카베올라는 낮은 능력이지만 규제된 경로를 나타낸다. 또한, 일부 바이러스들은 클라트린 또는 카베올린 코트를 사용하지 않은 여러 경로들을 사용하여 내재화되며 때로는 숙

주 세포에 접근하기 위해 박테리아 및 바이러스에 의해 이용된다. 이러한 경로들은 콜레스테롤, DNM2/디나민-2, 또는 작은 GTPases 또는 티로신 키나제와 같은 다양한 분자들에 대한 의존성에 의해 추가로 정의될 수 있다.

- [0006] 감염된 세포의 게놈에 안정적이고 부위-특이적인 통합 및 병원성의 결핍 때문에 AAV 벡터들은 표적 유전자 치료를 위한 벡터클로 탐구되고 있다.
- [0007] Kern et al. (in: Identification of a Heparin-Binding Motif on Adeno-Associated Virus Type 2 Capsids, Journal of Virology Sep 2003, 77 (20) 11072-11081)은 아데노-연관 바이러스(AAV) 2형 (AAV-2)에 의한 세포들의 감염이 헤파린 설페이트 프로테오글리칸에 대한 결합에 의해 매개되고 헤파린에 의해 경쟁될 수 있음을 개시한다. AAV-2 캡시드 단백질들의 돌연변이 분석은 염기성 아미노산들의 그룹(아르기닌 484, 487, 585 및 588 및 라이신 532)이 헤파린 및 HeLa 세포 결합에 기여한다는 것을 보여주었다. 이 아미노산들은 AAV-2 캡시드의 3중 스파이크 영역에서 3개의 클러스터들에 위치한다. R484 및 R585에서 돌연변이된 재조합 AAV-2의 마우스에서의 조직 분포는 야생형 재조합 AAV에 의한 감염과 비교하여 현저하게 감소된 간의 감염을 나타내었지만 심장의 감염은 계속 되었다. 그들은 헤파린 결합이 AAV-2의 감염성에 영향을 미치지만 반드시 필요한 것은 아니라고 제안했다.
- [0008] US 5,756,283은 조절 서열들의 제어 하에 선택된 이식유전자를 포함하는 재조합 AAV 벡터들을 개시한다. 감염된 세포는 단일 가닥 재조합 바이러스의 이중 가닥 형태로의 전환을 촉진하는 제제와 접촉되어 재조합 AAV의 표적 세포로의 형질도입 효율을 향상시킨다.
- [0009] EP 1664314 B1은 캡시드 단백질 도메인 및 헤파린 결합에 관여하는 상응 아미노산 잔기의 식별에 기초하여 감소되거나 제거된 헤파린 결합 기능을 초래하는 캡시드 단백질 변형(들)을 운반하는 재조합 AAV 벡터들을 개시한다.
- [0010] WO 2017/143100 A1은 비변이 모 캡시드 폴리펩타이드들과 비교하여 인간 간 조직 또는 간세포들에서 강화된 중화 프로파일, 증가된 형질도입 및/또는 항성을 나타내도록 AAV 캡시드 폴리펩타이드를 변형시키는 방법들을 개시한다.
- [0011] 인간 유전자 치료의 안전성과 효능은 계속해서 상당한 논쟁의 대상이 되고 있다. 현재 벡터의 문제들은 의도하지 않은 특정 조직의 형질도입과 면역 부작용을 포함한다. 유전자 전달을 위해 AAV 입자들을 사용하는 현재 접근법들은 효율적인 형질도입의 부족, 즉, 효과적이기 위해 AAV 벡터들의 매우 높은 역가들이 일반적으로 필요한 것으로 인해 문제가 된다. 현재 접근법들의 또 다른 한계는 많은 AAV 벡터들이 일부 특정 세포 유형을 형질도입하는 데 효과적이지 않고 AAV 벡터들이 부적절한 세포 유형의 형질도입을 통해 표적 외 효과를 가질 수 있다는 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 상기 한계들을 고려하여, 유전자 전달을 위한 개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자들을 제공하는 것이 본 발명의 근본적인 과제이다. 상기는 특정 관심 세포들을 형질도입하고/하거나 더 낮은 역가로 전달될 수 있지만 여전히 효과적인 아데노 연관 바이러스(AAV) 캡시드를 조작함으로써 달성된다. 상기 문제는 리간드 부착을 수용하도록 바이러스 캡시드를 변형하고 상기 캡시드에 관심 리간드를 부착함으로써 해결된다. 선택적으로, 리간드 부착을 수용하도록 바이러스를 변형하기 전에 AAV 캡시드의 천연 결합 부위가 제거될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명의 제1 측면에 따르면, 상기 목적은 변형된 캡시드를 포함하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자를 제공함으로써 해결되며, 상기 변형된 캡시드는 상기 캡시드 내의 천연 결합 부위의 제거, 및 상기 캡시드로의 리간드 결합 부위의 도입으로부터 선택된 적어도 하나의 변형을 포함한다.
- [0014] 본원에서 상호교환적으로 사용되는 용어 “아데노-연관 바이러스 벡터”, “AAV 벡터”, “아데노-연관 바이러스”, “AAV 바이러스”, “AAV 비리온”, “AAV 바이러스 입자” 및 “AAV 입자”는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질과 캡시드화된 재조합 바이러스 게놈으로 구성된 바이러스 입자를 의미한다. 이중성 폴리뉴클레오티드 및 AAV 역 말단 반복부들 옆에 배치된 포유동물 세포에 전달될 프로모터를 포함하는 전사 조절 영역을 갖는 재조합 바이러스 게놈을 포함하는 AAV 입자는 일반적으로 “AAV 벡터 입자” 또는 “AAV 벡터”로 지칭된다.

- [0015] 한 바람직한 구현예에서, 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 및 AAV12로부터 선택된다. 가장 일반적으로 사용되는 유전자 전달 시스템들은 바이러스, 예를 들어, 아데노 연관 바이러스 2형 (AAV-2)의 파생물들이다. AAV-2 및/또는 AAV-9가 바람직하다.
- [0016] 현재, 다른 세포 유형들을 형질도입할 수 있는 특정 세포 표면 수용체들에 대한 캡시드 단백질의 결합 능력이 다른 식별된 100개 초과 AAV 항원형들이 있다. AAV2는 박테리아 플라스미드에 클로닝된 최초의 항원형이었으며 이후 다른 항원형들을 식별하기 위한 비교로 사용되어 왔다. 12개의 항원형들 (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 AAV12)은 특정 세포 유형들을 형질도입하는 능력에 대해 철저히 테스트되었으며 세포 부착을 위해 특정 세포 표면 수용체들에 결합하는 캡시드 단백질 모티프들 사이에 분화되었다. 본 발명의 맥락에서, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12로부터 선택된 AAV 입자가 바람직하다. 그러나, 본 발명의 맥락에서 임의의 다른 AAV 입자가 사용될 수 있음이 이해되어야 한다.
- [0017] AAV의 캡시드는 고유한 VP1 N-말단, VP1/VP2 공통 부분 및 VP1, VP2 및 VP3에 공통인 부분을 포함하는 3개의 중첩 캡시드 단백질(VP1, VP2, VP3)로 구성된다.
- [0018] 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자가 추가로 바람직하며, 여기서 AAV 입자의 상기 캡시드 내의 적어도 하나의 단백질은 변형되고, 바람직하게는 상기 적어도 하나의 단백질은 VP1, VP2, 및/또는 VP3이다. 대안적으로, 상기 캡시드 내의 단백질 VP1, VP2 및/또는 VP3 중 2개가 변형되거나, 또는 상기 캡시드 내의 단백질 VP1, VP2 및 VP3 중 3개 모두가 변형된다. 바람직하게는, 상기 캡시드에서 변형될 단백질들 중 적어도 하나의 적어도 하나의 부분, 예를 들어, 하나의 아미노산이 변형된다. 그러나, 상기 캡시드에서 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 여러 부분들, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 임의의 다른 수의 부분 또는 아미노산과 같은 여러 아미노산들을 변형하는 것도 가능하다. 바람직하게는 VP1의 아르기닌 484, 487, 585 및 588 및 라이신 532 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌은 알라닌과 같은 다른 아미노산으로 그들을 대체함으로써 제거된다.
- [0019] 캡시드 변형이 적어도 하나의 천연 결합 부위의 제거 및 적어도 하나의 리간드 결합 부위의 도입 모두를 포함하는 것이 더 바람직하다. 대안적으로, 상기 AAV의 적어도 하나의 천연 결합 부위는 변하지 않고 유지, 즉, 제거되지 않을 수 있지만, 적어도 하나의 리간드 결합 부위가 도입된다.
- [0020] 상기 캡시드 내의 상기 천연 결합 부위가 존재하고 제거되지 않고 적어도 하나의 추가 리간드 결합 부위가 변형에 의해 상기 캡시드로 도입되는 경우, 본 발명의 AAV 입자는 사용된 바이러스 입자의 더 낮은 역가에서 더 높은 감염률을 갖는다. 반대로, 변형에 의해 상기 캡시드에 적어도 하나의 추가 리간드 결합 부위를 도입하기 전에 상기 캡시드의 상기 천연 결합 부위가 제거되면, 본 발명의 AAV 입자의 항성이 변형된다.
- [0021] 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자가 바람직하며, 여기서, 상기 천연 결합 부위는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 대한 결합을 가능하게 하는 결합 부위이고, 바람직하게는 VP1의 아르기닌 585 또는 아르기닌 588 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌을 상이한 아미노산, 예컨대 알라닌으로 대체함으로써 제거된다.
- [0022] 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자가 추가적으로 바람직하며, 여기서 상기 리간드 결합 부위는 리간드의 공유 부착을 가능하게 하는 결합 부위이다. 상기 리간드 결합 부위가 벤질구아닌 그룹, 벤질시토신 그룹, 클로로알칸 그룹, 디벤조시클로옥틴 그룹, 아지드 그룹, 포스핀, 또는 이들의 조합을 포함하는 것이 추가로 바람직하다. 대안적으로 임의의 할로알칸 그룹이 사용될 수 있다. 벤질구아닌 또는 다른 그룹이 이용가능한 라이신 잔기에 부착되는 것이 추가적으로 바람직하다. 도입된 상기 리간드 결합 부위는 바람직하게는 상기 이용가능한 라이신 잔기의 ε-아미노기 그룹 또는 1차 아민에 부착된다.
- [0023] 상기 벤질구아닌 그룹, 상기 벤질시토신 그룹, 상기 클로로알칸 그룹, 상기 디벤조시클로옥틴 그룹, 상기 아지드 그룹, 및/또는 상기 포스핀, 특히 HaloTag™, SNAP-tag™, 또는 CLIP-tag™, 또는 포스핀 또는 아지드 또는 디벤조시클로옥틴 그룹에 부착된 리간드를 추가로 포함하는 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자가 추가로 바람직하다. 본 발명은 바람직하게는 SNAP-tag, CLIP-tag, Halo Tag, Lumio Tag 등과 같은 특정 리간드에 높은 친화도로 결합할 수 있는 태그(tag)들을 사용한다.
- [0024] 벤질구아닌, 벤질시토신 및 클로로알칸은 SNAP와 같은 "자살" 효소에 의해 인식된다. 본 발명의 맥락에서, 벤질구아닌, 또는 벤질시토신 유도체들은 추가로 사용될 수 있다. 벤질구아닌 유도체들 또는 벤질시토신 유도체들은

벤질구아닌 또는 벤질시토신 그룹을 의미하는 것으로 이해되며, 이는 변형되지만 그럼에도 불구하고 자살 효소에 의해 인식된다.

- [0025] 태그 분자는 추가 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자 또는 생체분자일 수 있다. 예들은 SNAP-tag, CLIP-tag, Lumio-Tag, 또는 Halo-Tag를 포함할 수 있다. 예를 들어, 친화성 태그는 알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제의 돌연변이체인 SNAP-tag일 수 있다. 중요하게도, SNAP-tga의 기질 중 하나는 벤질구아닌이다. 본 발명에 유용한 상업적으로 입수가 가능한 제품들은, 예를 들어, Promega의 HaloTag, Life Technologies의 Lumio Tag, 및 NEB의 SNAP/CLIP Tags를 포함한다.
- [0026] 당업자는 캡시드에 리간드를 부착하는 추가 방법들, 예를 들어 항-태그 항체, 스트렙타비딘-비오틴, 또는 화학적 가교를 잘 알고 있다. 임의의 공지된 방법들이 본 발명의 맥락에서 사용될 수 있다. 예를 들어, 비천연 아미노산들은 리간드뿐만 아니라 캡시드에도 포함될 수 있다. 후속적으로, 생물직교 가교제들과 같은 가교제들이 리간드를 캡시드에 공유 부착하기 위해 사용될 수 있다. 추가 예에서, 포스핀 또는 디벤조시클로옥틴 그룹은 캡시드에 포함되고 아지드는 리간드에 통합될 수 있거나 그 반대의 경우도 가능하다. 그 다음 상기 리간드는 슈타우딩거(Staudinger) 반응 또는 변형-촉진 클릭 반응을 통해 캡시드에 공유 부착될 수 있다.
- [0027] 임의의 종류의 리간드가 상기 리간드 결합 부위에 부착될 수 있다. 바람직하게는, 부착될 리간드는 성장 인자 또는 사이토카인과 같은 단백질 리간드; 콜레라 독소 B 서브유닛과 같은 독소 서브유닛; 이소렉틴 B4 또는 밀배아 응집소와 같은 렉틴; 락타데린과 같은 부착 인자; 항 CD-34 항체와 같은 항체; 델토르핀 오피오이드 수용체 리간드와 같은 펩타이드; 및 Cas9와 같은 유전자 편집 뉴클레아제로부터 선택된다.
- [0028] 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자 내부에 패키징된 핵산 분자들은 임의의 종류의 핵산 분자일 수 있다. 바람직하게는, 상기 핵산 분자는 세포내 항체들(예를 들어, 세포들 내의 특정 단백질을 중화하기 위한), 펩타이드 독소들을 인코딩하는 핵산 분자들(예를 들어 통증 경로에서 이온 채널을 차단하기 위한), 광유전적 작동자를 인코딩하는 핵산 분자들(예를 들어, 빛을 사용하여 신경 활동을 켜거나 끄기 위한), 약학적 도구들을 인코딩하는 핵산 분자들(예를 들어, 간섭하는 약학적 효과가 없는 화학적 리간드를 사용하여 신경 신호를 켜거나 끄기 위한), 정밀 유전자 편집을 위한 CRISPR 기반 편집자들을 인코딩하는 핵산 분자, 유전자 발현을 조절하기 위한 CRISPR-후생유전학적 도구들을 암호화하는 핵산 분자들, 및/또는 세포 사멸을 유도하는 자살 유전자들을 인코딩하는 핵산 분자들이다.
- [0029] 바람직하게는, 리간드가 Cas9와 같은 유전자 편집 뉴클레아제인 경우, 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자는 숙주 계놈으로 삽입될 gRNA 및/또는 특정 DNA와 같은 핵산 분자를 카고로서 추가로 운반한다.
- [0030] 당업자는 Cas9 외에 다른 유전자 편집 뉴클레아제, 예컨대 Cpf1, TALEN, ZFN 또는 귀소 엔도뉴클레아제를 알고 있다. 또한 DNA-안내 아르코너트 간섭 시스템(DNA-guided Argonaute interference system, DAIS)를 사용하여 조작하는 것이 편리할 수 있다. 기본적으로, 상기 아르코너트(Ago) 단백질은 미리 선택된 유전자좌에 대해 상기 Ago 단백질에 대한 절단 특이성을 제공하는 적어도 하나의 외인성 올리고뉴클레오티드(DNA 가이드)의 존재 하에 상기 세포 내로 도입된 폴리뉴클레오티드로부터 이중 발현된다. TALEN 및 Cas9 시스템은 WO 2013/176915 및 WO 2014/191128에 각각 설명되어 있다. 아연-핑거 뉴클레아제(Zinc-finger nuclease, ZFN)들은 Kim, YG; Cha, J.; Chandrasegaran, S. ("Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain" (1996). Proc Natl Acad Sci USA 93 (3): 1156-60) 에서 처음으로 설명된다. Cpf1은 Zhang et al. (Cpf1 is a single RNA-guided Endonuclease of a Class 2 CRIPR-Cas System. (2015). Cell;163:759-771)에 의해 설명된 class 2 CRISPR Cas 시스템이다. 아르코너트(AGO) 유전자 패밀리는 Guo S, Kempfues KJ. (Par-1, a gene required for establishing polarity in C. elegans embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. (1995). Cell;81(4):611-20)에서 처음으로 설명되었다.
- [0031] 본 발명의 또 다른 측면은 질병의 치료에 사용하기 위한 본 발명에 따른 AAV 입자에 관한 것이다.
- [0032] 임의의 종류의 질병은 본 발명에 따라 사용하기 위한 AAV 입자에 의해 치료 또는 예방될 수 있다. 바람직하게는 본 발명에 따라 사용하기 위한 AAV 입자에 의해 치료 또는 예방될 수 있는 질병들은 유전자 치료에 의해 치료될 수 있는 질병들, 예를 들어, 암, 유전성 단일 유전자 질환, 예컨대 유전성 망막 질환, 유전성 피부 질환, 예컨대 옴스테드 증후군 또는 가족성 원발성 국소 피부 아밀로이드증, 감염성 질환, 부신백질이영양증 (adrenoleukodystrophy), 알파-1 항트립신 결핍증, 방항축 L-아미노산 결핍증, 바텐버그(Batten disease), 베커 근이영양증(Becker muscular dystrophy), 베타 지중해빈혈, 카나반병(Canavan disease), 만성 육아종 질환, 크리글러-나자르 증후군(Crigler-Najjar syndrome), 낭포성 섬유증, 뒤센 근이영양증(Duchenne muscular

dystrophy), 파브리병(Fabry disease), 가족성 선종성 용종증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 결핍증, 판코니 빈혈(Fanconi anaemia), 갈락토시알리드증, 고셔병(Gaucher's disease), 혈우병 A 및 B, 헐러(Hurler) 증후군(점액다당증 1형), 헌터(Hunter) 증후군(점액다당증 2형), 헌팅턴 무도병, 수포 접합부 표피박리증, 후기 영아 신경원성세로이드 리포푸신증, 백혈구 부착 결핍 증후군, 지대형 근육영양장애, 지단백 리파제 결핍증, 이염성 백질디스트로피, 슬라이(Sly) 증후군 점액다당증 7형), 네더톤(Netherton) 증후군, 오르니틴 트랜스카르바미라제 결핍증, 폼페병(Pompe disease), 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 결핍증, 이영양형 수포성 표피박리증, 산필리포 A(점액다당증 IIIA형), 산필리포 B(점액다당증 IIIB형), 낮형세포병, 중증 복합 면역결핍증, 척수성 근위축증, 테이 삭스병(Tay Sachs disease), 비스킷-알드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군, 폰 지에르케(von Gierke)병(글리코겐 저장 질환 Ia형), X-연관 근세관 근육병증, 말기 신장 질환의 빈혈, 협심증(안정, 불안정, 불안성), 관상동맥 협착증, 임계하지 허혈, 심부전, 간혈성 파행, 심근허혈, 말초혈관질환, 폐고혈압, 정맥쇄양, 아데노바이러스 감염, 사이토메갈로바이러스 감염, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 감염, B형 간염 감염, C형 간염 감염, HIV/AIDS, 인플루엔자, 일본뇌염, 말라리아, 소아 호흡기 질환, 호흡기 세포융합 바이러스, 파상풍, 결핵, 부인과암, 유방, 난소, 자궁경부, 외음부, 신경계암, 교모세포종, 연수막 암종증, 신경아교종, 성상세포종, 신경모세포종, 망막모세포종, 위장관암, 결장, 결장직장, 간 전이, 간염후 간암, 췌장암, 담낭암, 간세포암종, 비뇨생식기암, 전립선암, 신장암, 방광암, 생식기종양, 피부암, 흑색종(악성/전이), 두경부암, 비인두암, 편평세포암, 식도암, 폐암, 선암, 소세포/비소세포, 중피종, 혈액암, 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 육종, 생식세포암, 리프라우메니(Li-Fraumeni) 증후군, 갑상선암, 알츠하이머 병, 근위축성 측삭 경화증, 수근관 증후군, 만성 외상성 뇌 손상, 손목 터널 증후군, 당뇨병성 신경병증, 간질, 거대 축삭 신경병증, 후기 영아 신경원성세로이드 리포푸신증, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 통증, 파킨슨병, 말초신경병증, 척수성 근위축증 2형, 색맹, 연령관련 황반변성, 맥락막혈증, 당뇨병성 황반부종, 녹내장, 레베르선천성흑암시(Leber congenital amaurosis), 황반모세혈관확장증 2형, 색소성 망막염, 표재성 각막 혼탁, X-연관 관절염 (류마티스, 염증, 퇴행성), 퇴행성 관절 질환, 직장의 중증 염증성 질환, 궤양성 대장염, 만성 신질환, 당뇨병성 궤양/족부궤양, 배뇨근 과활동성, 발기부전, 골절, 청력 상실, 유전성 봉입체 근육병증, 이식편대숙주병/이식 환자, 구강점막염, 이차성 타액 기능저하, 전신 경피증, 제1형 당뇨병 및/또는 상처 치유이다.

[0033] 본원에 사용된 용어 "예방하는 및/또는 억제하는"은 이미 존재하는 질병을 치료하는 것을 포함할 것이다. 치료, 예방 및/또는 억제는 예를 들어 질병 진행을 치료, 지연 또는 완화, 증상을 감소시키거나, 질병 또는 상태를 치유하는 것을 포함하는 것을 의미한다. "유효량"은 상기 언급된 임의의 질병들과 같은 치료될 질병에 대해 발견되는 증상을 완화시키는 본 발명의 AAV 입자의 양이다. 완화는 예를 들어, 질병 또는 상태를 예방, 치료, 증상을 감소 또는 치유하는 것을 포함하는 것을 의미한다. 본 발명은 또한 질병의 발병 및/또는 진행의 위험에 있는 대상을 치료하는 방법을 포함하며, 여기서 이 발명의 본 발명의 AAV 입자의 치료적 유효량은 환자에게 투여된다. 질병에 걸릴 위험이 있는 것은 예를 들어 질병에 걸리기 쉬운 표현형 증상으로 인해 발생할 수 있다. 본원에 사용된 바와 같은 용어 "예방" 또는 "예방하는"은 대상의 맥락에서 사용될 때 질병, 특히 질병과 관련된 증상의 발병 또는 발병을 중지, 방해 및/또는 늦추는 것을 지칭한다.

[0034] 본 발명의 또 다른 구현에는 질병의 치료에 사용하기 위한 전술한 AAV 입자에 관한 것으로, 상기 AAV는 액체, 건조 또는 반고체 형태, 예컨대, 예를 들어, 정제, 코팅된 정제, 발포 정제, 캡슐, 분말, 과립, 당-코팅된 정제, 로젠지(lozenge), 환제, 앰플, 점적제, 좌제, 유제, 연고, 젤, 덩크제, 페이스트, 크림, 스프, 가글 용액, 식물 주스, 비강 약제, 흡입 혼합물, 에어로졸, 구강 세척제, 구강 스프레이, 코 스프레이 또는 림 스프레이의 형태로 대상에게 투여된다.

[0035] 본 발명의 또 다른 측면은 개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자를 제조하는 방법에 관한 것으로, 이는 상기 AAV의 캡시드로 적어도 하나의 변형을 도입하는 단계를 포함하고, 바람직하게는 상기 변형은 적어도 하나의 리간드 결합 부위를 상기 캡시드로 도입하는 것을 포함하고, 선택적으로 상기 캡시드의 천연 결합 부위는 이전에 제거되는 것과 같이 제거된다.

[0036] 상기 언급된 바와 같이, 상기 캡시드 내의 상기 천연 결합 부위가 존재하며 제거되지 않고, 적어도 하나의 추가 리간드 결합 부위가 변형에 의해 상기 캡시드에 도입되는 경우, 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자는 사용된 바이러스 입자의 더 낮은 역가에서 더 높은 감염률을 갖는다. 반대로, 변형에 의해 상기 캡시드에 적어도 하나의 추가 리간드 결합 부위를 도입하기 전에 상기 캡시드의 상기 천연 결합 부위가 제거되는 경우, 본 발명의 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자의 향성이 변형된다.

[0037] 상기 방법에 의해 제조된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자는 바람직하게는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5,

AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12 및 이들의 혼합물로부터 선택된다.

- [0038] 상기 방법에 의해 제조되는 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자의 임의의 단백질들은 변형될 수 있다. 바람직하게는, 상기 캡시드 내의 단백질 VP1, VP2 또는 VP3 중 적어도 하나는 상기 방법에서 변형된다. 대안적으로, 상기 캡시드 내의 단백질 VP1, VP2 및/또는 VP3 중 2개가 변형되거나, 또는 상기 캡시드 내의 단백질 VP1, VP2 및 VP3 3개 모두가 변형된다. 바람직하게는, 상기 캡시드에서 변형될 적어도 하나의 단백질 중 적어도 하나의 부분, 예를 들어, 적어도 하나의 아미노산이 변형된다. 그러나, 상기 캡시드에서 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 여러 부분들, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 임의의 다른 수의 부분 또는 아미노산과 같은 여러 아미노산들을 변형하는 것도 가능하다. 바람직하게는 VP1의 아르기닌 484, 487, 585 및 588 및 라이신 532 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌은 알라닌과 같은 다른 아미노산으로 그들을 대체함으로써 제거된다.
- [0039] VP1, VP2 또는 VP3과 같은 단백질은 특정 아미노산들을 반응시켜 화학적으로 변형될 수 있다. 이러한 변형들의 예들은 당업계에 잘 알려져 있으며 예를 들어 본원에 참조로 통합되는 R. Lundblad, *Chemical Reagents for Protein Modification*, 3rd ed. CRC Press, 2005에서 요약된다. 아미노산들의 화학적 변형에는 아실화, 아미드화, 라이신의 피리독실화, 환원성 알킬화, 2,4,6-트리니트로벤젠 설폰산(TNBS)을 사용한 아미노 그룹들의 트리니트로벤질화, 카르복실 그룹들의 아미드 변형 및 시스테인을 시스테인산으로의 과산화포름산 산화에 의한 설프히드릴 변형, 수은 유도체들의 형성, 다른 티올 화합물과 혼합된 이황화물의 형성, 말레이미드와의 반응, 요오도아세트산 또는 요오도아세트아마이드와의 카르복시메틸화 및 알칼리성 pH에서 시아네이트와의 카르바모일화에 의한 변형을 포함하지만 이에 제한되지 않는다. 이와 관련하여, 당업자는 단백질의 화학적 변형과 관련된 보다 광범위한 방법론에 대한 *Current Protocols In Protein Science*, Eds. Coligan et al. (John Wiley & Sons NY 1995-2000)의 Chapter 15를 참조한다.
- [0040] 개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자를 제조하기 위한 상기 방법은 바람직하며, 여기서 상기 캡시드 변형은 천연 결합 부위의 제거 및 리간드 결합 부위의 도입 모두를 포함한다. 대안적으로, 상기 AAV의 천연 결합 부위는 변하지 않고 유지, 즉 제거되지 않을 수 있으나 적어도 하나의 리간드 결합 부위가 도입된다.
- [0041] 바람직한 구현예에서, 상기 천연 결합 부위는 개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자를 제조하기 위한 상기 방법에 의해 제거되며, 여기서 상기 결합 부위는 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 대한 결합을 가능하게 하는 천연 결합 부위이고, 바람직하게는 VP1의 아르기닌 585 및 588 중 적어도 하나 및/또는 VP2 또는 VP3의 유사 아르기닌을 다른 아미노산, 예컨대 알라닌으로 대체함으로써 제거된다.
- [0042] 도입된 리간드 결합 부위가 리간드의 공유 부착을 가능하게 하는 것이고, 바람직하게는 이용가능한 라이신 잔기에 부착된 벤질구아닌 그룹으로부터, 보다 바람직하게는 상기 캡시드를 벤질구아닌 N-하이드록시숙신이미드(BG-NHS), 및/또는 벤질시토신 N-하이드록시숙신이미드(BC-NHS)와 반응시킴으로써 선택되는 것이 보다 바람직하다.
- [0043] 본 발명은 바람직하게는 SNAP-tag, CLIP-tag, Halo-Tag, Lumio-Tag 등과 같은 특정 리간드에 높은 친화도로 결합할 수 있는 태그를 사용한다. 상기 방법에서 도입된 태그 분자는 추가 분자에 특이적으로 결합할 수 있는 임의의 분자 또는 생체분자일 수 있다. 예들은 SNAP-tag, CLIP-tag, Lumio-Tag 또는 Halo-Tag를 포함할 수 있다. 예를 들어, 친화성 태그는 알킬구아닌-DNA 알킬트랜스퍼라제의 돌연변이인 SNAP-tag일 수 있다. 중요하게는, SNAP-tag의 기질들 중 하나는 벤질구아닌이다. 본 발명에 유용한 상업적으로 입수가능한 제품들은, 예를 들어, Promega의 HaloTag, Life Technologies의 Lumio Tag, 및 NEB의 SNAP/CLIP Tga들을 포함한다. 도입된 상기 리간드 결합 부위는 바람직하게는 상기 이용가능한 라이신 잔기의 ε-아미노기 또는 1차 아민에 부착된다.
- [0044] 따라서, 개선된 아데노 연관 바이러스(AAV) 입자를 제조하기 위한 상기 방법이 더욱 바람직하며, 여기서 상기 방법은 리간드를 상기 벤질구아닌 및/또는 상기 벤질시토신 그룹, 특히 HaloTagTM, SNAP-tagTM 또는 CLIP-tagTM에 부착하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0045] 부착되는 상기 리간드는 임의의 종류의 리간드일 수 있으며, 바람직하게는 단백질 리간드, 예컨대 성장 인자 또는 사이토카인; 독소 서브유닛, 예컨대 콜레라 독소 B 서브유닛; 렉틴, 예컨대 이소렉틴 B4 또는 밀 배아 응집소; 부착 인자, 예컨대 락타데린; 항체, 예컨대 항 CD-34 항체; 펩타이드, 예컨대 델토르핀 오피오이드 수용체 리간드; 및 유전자 편집 뉴클레아제, 예컨대 Cas9로부터 선택된다.
- [0046] 본 발명의 추가 측면은 본 발명에 따른 AAV 입자를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 유전자 치료에 의해 치료될 수 있는 질병을 치료하는 방법에 관한 것이다.

- [0047] 본 발명의 맥락에서, 특정 구현예들에서 사용되는 용어 "대상"은 바람직하게는 마우스, 랫, 기니피그, 토끼, 고양이, 개, 원숭이, 또는 바람직하게는 인간과 같은 포유동물을 지칭한다. 용어 "환자"는 바람직하게는 마우스, 랫, 기니피그, 토끼, 말, 소, 젖소, 고양이, 개, 원숭이 또는 바람직하게는 인간과 같은 포유동물, 예를 들어, 진단, 예후 또는 치료가 필요한 인간 환자를 지칭한다. 본 발명의 대상은 세균 감염, 바이러스 감염, 진균 감염 또는 기생충 감염과 같은 질병으로 고통받을 위험이 있을 수 있다. 본 발명의 맥락에서 의학적 징후에 대한 보다 상세한 설명은 본원의 다른 곳에서 제공된다.
- [0048] 본 발명의 AAV 입자들로 치료될 세포들 및/또는 대상들은 바람직하게는 인간 기원과 같은 포유동물 기원이다. 그럼에도 불구하고, 본 발명은 세포로의 진입 기전의 유사성에 따라 수의학, 세포 배양 절차, 또는 식물 세포 질병에서도 유리하게 사용될 수 있다. 바람직하게는, 상기 처리될 세포는 포유동물 세포, 원핵 세포 또는 식물 세포이다. 가장 바람직하게는 치료될 상기 세포는 인간 세포이다.
- [0049] 본 발명의 또 다른 구현예는 질병을 치료하기 위한 전술한 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 본 발명에 따른 AAV 입자를 이를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 AAV 입자는 액체, 건조 또는 반고체 형태, 예를 들어 정제, 코팅된 정제, 발포 정제, 캡슐, 분말, 과립, 당-코팅된 정제, 로젠지, 환제, 앰플, 점적제, 좌제, 유제, 연고, 젤, 텅크제, 페이스트, 크림, 습포, 가글 용액, 식물 주스, 비강 약제, 흡입 혼합물, 에어로졸, 구강 세척제, 구강 스프레이, 코 스프레이 또는 림 스프레이의 형태로 대상에게 투여된다.
- [0050] AAV 입자를 대상에게 투여하는 것을 포함하는 질병을 치료하기 위한 상기 방법에 의해 치료될 질병은 바람직하게는 암, 유전성 단일 유전자 질환, 예컨대 유전성 망막 질환, 유전성 피부 질환, 예컨대 움스테드 증후군 또는 가족성 원발성 국소 피부 아밀로이드증, 감염성 질환, 부신백질이영양증(adrenoleukodystrophy), 알파-1 항트립신 결핍증, 방향족 L-아미노산 결핍증, 바텐병(Batten disease), 베커 근이영양증(Becker muscular dystrophy), 베타 지중해빈혈, 카나반병(Canavan disease), 만성 육아종 질환, 크리글러-나자르 증후군(Crigler-Najjar syndrome), 낭포성 섬유증, 뒤센 근이영양증(Duchenne muscular dystrophy), 파브리병(Fabry disease), 가족성 선종성 용종증, 가족성 고콜레스테롤혈증, 가족성 레시틴-콜레스테롤 아실트랜스퍼라제 결핍증, 판코니 빈혈(Fanconi anaemia), 갈락토시알리드증, 고셔병(Gaucher's disease), 유전성 망막위축증, 혈우병 A, 혈우병 B, 헐러(Hurler) 증후군(점액다당증 1형), 헌터(Hunter) 증후군(점액다당증 2형), 헌팅턴 무도병, 수포 접합부 표피박리증, 후기 영아 신경원성세로이드 리포푸신증, 백혈구 부착 결핍 증후군, 지대형 근육영양장애, 지단백 리파제 결핍증, 이염성 백질디스트로피, 슬라이(Sly) 증후군 점액다당증 7형), 네더톤(Netherton) 증후군, 오르니틴 트랜스카르바밀라제 결핍증, 폼페병(Pompe disease), 퓨린 뉴클레오시드 포스포릴라제 결핍증, 이영양형 수포성 표피박리증, 산필리포 A(점액다당증 IIIA형), 산필리포 B(점액다당증 IIIB형), 낮형세포병, 중증 복합 면역결핍증, 척수성 근위축증, 테이 삭스병(Tay Sachs disease), 비스콧-알드리치(Wiskott-Aldrich) 증후군, 폰 지에르케(von Gierke)병(글리코겐 저장 질환 Ia형), X-연관 근세관 근육병증, 말기 신장 질환의 빈혈, 협심증(안정, 불안정, 불안정), 관상동맥 협착증, 임계하지 허혈, 심부전, 간혈성 파행, 심근허혈, 말초혈관질환, 폐고혈압, 정맥계양, 아데노바이러스 감염, 사이토메갈로바이러스 감염, 엡스타인-바(Epstein-Barr) 바이러스 감염, B형 간염 감염, C형 간염 감염, HIV/AIDS, 인플루엔자, 일본뇌염, 말라리아, 소아 호흡기 질환, 호흡기 세포융합 바이러스, 파상풍, 결핵, 부인과암, 유방암, 난소암, 자궁경부암, 외음암, 신경계암, 교모세포종, 연수막 암종, 신경아교종, 성상세포종, 신경모세포종, 망막모세포종, 위장관암, 결장, 결장직장, 간 전이, 간염후 간암, 췌장, 담낭, 간세포암종, 비뇨생식기암, 전립선, 신장, 방광, 항문성기종양, 피부암, 흑색종(악성/전이), 두경부암, 비인두암, 편평세포암, 식도암, 폐암, 선암, 소세포/비소세포, 중피종, 혈액암, 백혈병, 림프종, 다발성 골수종, 육종, 생식세포암, 리프라우메니(Li-Fraumeni) 증후군, 갑상선암, 알츠하이머 병, 근위축성 측삭 경화증, 수근관 증후군, 만성 외상성 뇌 손상, 손목 터널 증후군, 당뇨병성 신경병증, 간질, 거대 측삭 신경병증, 후기 영아 신경원성세로이드 리포푸신증, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 통증, 파킨슨병, 말초신경병증, 척수성 근위축증 2형, 색맹, 연령관련 황반변성, 맥락막혈증, 당뇨병성 황반부종, 녹내장, 레베르선천성흑암시(Leber congenital amaurosis), 황반모세혈관확장증 2형, 색소성 망막염, 표재성 각막 혼탁, X-연관 관절염(류마티스, 염증, 퇴행성), 퇴행성 관절 질환, 직장의 중증 염증성 질환, 궤양성 대장염, 만성 신질환, 당뇨병성 궤양/족부궤양, 배뇨근 과활동성, 발기부전, 골절, 청력 상실, 유전성 봉입체 근육병증, 이식편대숙주병/이식 환자, 구강점막염, 이하선 타액 기능저하, 전신 경피증, 제1형 당뇨 및 상처치유 또는 이들의 조합으로부터 선택된다.
- [0051] 본 발명에 따른 AAV 입자를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 질병을 치료하는 방법이 더욱 바람직하며, 여기서 상기 AAV 입자는 상기 대상 또는 세포에 약제학적 조성물의 형태, 예를 들어, 약학적으로 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 용매, 필터, 운할제, 부형제, 결합제 또는 안정제와 조합되어 투여된다.

바람직하게는, 상기 조성물은 스프레이, 코팅, 폼, 로션, 겔, 구강청결제, 경구 제형 또는 주사의 형태로 상기 대상에게 투여된다. 상기 조성물은 전신적으로, 경구적으로 또는 임의의 다른 임상적/의학적으로 허용되는 방법에 의해 상기 대상에게 투여될 수 있다.

- [0052] 본 발명의 추가 측면은 약학 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 본 발명에 따른 AAV 입자를 하나 이상의 제약상 허용되는 담체 및/또는 희석제와 함께, 즉, 약학적으로 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 용매, 필터, 유회제, 부형제, 결합제 또는 안정제와 조합하여 포함한다. 바람직하게는, 상기 조성물은 스프레이, 코팅, 폼, 로션, 겔, 구강청결제, 경구 제형 또는 주사의 형태로 상기 대상에게 투여된다. 상기 조성물은 전신적으로, 경구적으로 또는 임의의 다른 임상적/의학적으로 허용되는 방법에 의해 상기 대상에게 투여될 수 있다.
- [0053] 본 발명의 추가 측면은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:
- [0054] a) 개시된 바와 같은 및/또는 본 발명에 따라 사용하기 위한 AAV 입자, 또는 본 발명에 따라 개시된 바와 같은 AAV 입자를 포함하는 약학 조성물,
- [0055] b) 상기 AAV 입자 또는 상기 약학 조성물을 표적에 적용하는 것에 대한 서면 지시서; 및
- [0056] 선택적으로, 사용을 위한 AAV 입자 또는 조성물 및 서면 지시서를 보유하는 용기.
- [0057] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 치료를 필요로 하는 대상에서 바이러스 감염을 예방, 치료 및/또는 억제하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다.
- [0058] 본 발명의 또 다른 측면은 예를 들어 연구에서 유전자 전달 도구로서 세포의 형질감염에 사용하기 위한 본 발명에 따른 AAV 입자에 관한 것이다. 상기 용도는 또한 미용 목적을 위한 것일 수 있고, 본 발명은 본원에 개시된 의학적 치료와 유사한 미용 처리 방법을 포함한다. 이를 위해, 본 발명에 따른 AAV 입자를 대상 또는 세포에 투여하는 것은 또한 화장료 조성물의 형태, 예를 들어, 미용적으로 안전하고 허용되는 첨가제, 담체, 희석제, 용매, 필터, 유회제, 부형제, 결합제 또는 안정제와 조합되어 달성될 수 있다. 바람직하게는, 상기 조성물은 스프레이, 코팅, 폼, 로션, 겔, 구강청결제, 경구 제형 또는 주사의 형태로 상기 대상에게 투여된다. 상기 조성물은 전신적으로, 경구로 또는 임의의 다른 임상적/미용적으로 허용되는 방법에 의해 상기 대상체에게 투여될 수 있다.
- [0059] 당업자는 WO 93/09239, US4797368, US 5139941 및 EP 488 528에 설명된 것과 같이 인 비트로(in vitro) 및 인 비보(in vivo)로 유전자를 전달하기 위해 AAV로부터 유래된 벡터들을 사용하는 방법을 알고 있다.
- [0060] 본 발명의 추가적인 측면은 다음을 포함하는 키트에 관한 것이다:
- [0061] a) 세포들의 형질감염을 위한 AAV 입자,
- [0062] b) 세포들의 형질감염을 위한 AAV 입자 사용에 대한 서면 지시서; 및
- [0063] 선택적으로, 상기 AAV 입자 및 서면 지시서를 담고 있는 용기.
- [0064] 본 발명의 각 측면의 바람직한 특징들은 필요한 수정을 가하여 다른 측면들 각각에 대해서도 준용된다. 본원에 언급된 선행 기술 문헌들은 법이 허용하는 최대 범위까지 통합됩니다. 본 발명 및 그 이점이 상세하게 설명되었지만, 첨부된 청구항들에 정의된 본 발명의 사상 및 범위를 벗어나지 않고 다양한 변경, 대체 및 변경이 본원에서 이루어질 수 있음을 이해해야 한다.
- [0065] 본 발명은 다음의 실시예들 및 도면들에서 추가로 예시될 것이며, 이는 단지 예시 목적으로 제공되며 어떠한 방식으로도 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다. 본 발명의 목적을 위해, 인용된 모든 참조문헌은 그 전체가 참조로 본원에 통합된다.
- [0066] 도 1은 BG-변형 바이러스와 함께 SNAP-태그된 리간드들의 개략도를 나타낸다.
- [0067] 도 2는 본 발명에 따른 ΔHSPG 바이러스 입자가 더 이상 감염 활성을 갖지 않음을 나타낸다(어두운 그림); 작제물은 형광 리포터 마우스 모델의 감각 뉴런에서 테스트 되었다. 삽입된 도면은 세포들의 위상차 현미경 이미지를 나타낸다.
- [0068] 도 3은 도 2와 유사하게 형광 리포터 마우스 모델의 감각 뉴런에서 테스트할 때 밀 배아 응집소(WGA) 융합이 바이러스 형질도입 효율을 100%로 완전히 되돌렸다는 것(형광 세포들)을 나타낸다.
- [0069] 도 4는 신경영양 인자 NGF(A), NT3(B) 및 BDNF(C)가 바이러스를 다른 뉴런 집단에 전달한다는 것을 나타낸다.

삽입된 도면은 세포들의 현미경 이미지를 보여주며, 작제물은 도 2와 유사하게 형광 리포터 마우스 모델의 감각 뉴런에서 테스트되었다.

[0070] 도 5는 피부에 주사했을 때 콜레라 독소 B 서브유닛이 바이러스를 신경 세포체로 역행적으로 수송하는 것을 나타낸다. 삽입된 도면은 세포들의 현미경 이미지를 보여주며, 작제물은 도 2와 유사하게 형광 리포터 마우스 모델의 감각 뉴런에서 테스트되었다.

[0071] 도 6은 TrkA에 대한 항체로 염색된(NGF에 대한 수용체, B), 본 발명에 따른 NGF 리간드 IV가 있는 바이러스 주사 3주 후 삼차신경절의 감각 뉴런 조직(A)을 나타낸다. 적어도 80%의 겹침을 볼 수 있다(C).

[0072] 도 7은 주로 다른 뉴런들(기계수용기(녹색/회색) 및 비펩타이드성 통각수용기, 각각 (파란색/진한 회색))을 표시하는 NF200 및 IB4에 대한 항체로 도 6의 부분을 염색한 것을 나타낸다. 빨간색(밝은 회색) 감염된 세포들은 주로 녹색 및 파란색 세포들과 다르다.

[0073] 도 8은 유전자 전달이 리간드 바이러스에서 더 효율적임을 나타낸다. WGA 변형 작제물은 전달의 강력한 증가를 초래했다(B). A) 보통 AAV9 변종 PHP.S; B) WGA로 변형된 A)의 PHP.S 변형.

[0074] **실시예들**

[0075] 본 발명의 맥락에서 수행된 실험의 목적은 바이러스가 관심 세포만을 형질도입하도록 아데노 연관 바이러스(AAV) 캡시드를 조작하는 것이었다. 이것은 천연 AAV 캡시드 단백질(들)에서 세포들에 대한 천연 결합 부위를 제거함으로써 달성되었다. 그 후 변형된 바이러스는 선택적으로 제어된 리간드 부착을 수용하기 위해 적절히(특히 화학적으로) 변형된다. 그 후 이 원하는 리간드들은 바이러스에 공유적으로 부착되고 세포에서 인 비트로로, 마우스에서 인비보로 테스트된다. AAV2가 사용되지만 이 예들은 다른 AAV 캡시드들에도 쉽게 적용될 수 있다.

[0076] **1. AAV2에서 천연 결합 부위의 제거**

[0077] AAV2는 아르기닌 585 및 588을 통해 헤파란 설페이트 프로테오글리칸에 결합한다. 이 위치들은 결실 ΔHSPG를 생성하기 위해 알라닌으로 돌연변이되었다.

[0078] 플라스미드 pTAV2-0은 pBluescript II의 *Bam*HI 부위에 복제된 두 역 말단 반복부들을 포함하는 pAV-2의 전체 AAV-2 게놈을 함유한다. AAV-2의 적합한 단편을 함유하는 서브-플라스미드가 생성되고 부위-지정 돌연변이유발 반응들을 위한 템플레이트로 사용되었다. 돌연변이유발은 제조자의 프로토콜에 따라 Stratagene(암스테르담, 네덜란드) QuikChange 부위-지정 돌연변이유발 키트를 사용하여 수행되었다. 각 돌연변이에 대해 두 상보적 PCR 프라이머들이 돌연변이의 각 측면에 15 내지 20개의 상동 염기쌍 옆에 배치된 치환의 서열을 함유하도록 설계되었다. 돌연변이 플라스미드들은 DNA 시퀀싱에 의해 식별되었다. 적절한 돌연변이를 함유하는 단편이 그 후 나머지 단백질을 함유하는 플라스미드 백본(예: pTAV2-0)으로 서브클로닝되었고, 완전한 단편이 추가 PCR 돌연변이들을 확인하기 위해 시퀀싱되었다.

[0079] **2. 리간드들을 수용하기 위한 ΔHSPG의 화학적 변형**

[0080] 일반적으로, 단백질들에 대한 리간드들의 선택적 부착, 예를 들어, 단백질 라벨링은 생물직교 그룹들을 단백질로 통합한 다음 화학선택적 변형들에 의해 달성된다. 이 접근법은 또한 "태그-및-변형"으로도 지정된다. 다양한 생물직교 반응들이 개발되었으며, 이는 다음으로 분류될 수 있다: (1) 카르보닐들을 통한 축합 반응들, (2) 아지드들을 통한 "클릭" 반응들, (3) 역 전자-요구 딜스-알더(Diels-Alder) 고리 첨가(DAINV) 및 기타 고리 첨가 반응들, (4) 전이 금속 촉매 결합 및 분해 반응들, 및 (5) 시스테인 잔기에서의 라벨링 반응들.

[0081] 벤질구아닌 (BG)은 이어서 바이러스를 벤질구아닌 NHS 에스테르 (SNAP tag 기질 또는 BG--NHS)와 반응시킴으로써 노출된 라이신에 부착되었다. 이를 위해, 바늘을 사용하여 비수성 DMSO가 실온에서 원하는 최종 농도(예를 들어, 20mM)로 건조 SNAP tag 리간드 BG-NHS와 함께 바이알에 첨가되었다. 아민-관능화될 단백질은 용매(PBS)에서 원하는 최종 농도로 희석되었다. 두 제제들이 혼합되었고 실온에서 180분 동안 배양된 후 원심 100Kda MWC0 필터 유닛을 사용하여 미반응 성분들을 제거하였다.

[0082] **3. 리간드들의 공유 부착**

[0083] 이 시스템을 사용하기 위한 두 단계가 있다: SNAP-tag[®] 융합으로서 관심 단백질의 클로닝 및 발현, 및 선택한 SNAP-tag 기질을 사용한 융합의 라벨링. 상기 SNAP-tag는 DNA 복구 단백질인 인간 O⁶-알킬구아닌-DNA-알킬트랜스퍼라제 (hAGT)를 기반으로 하는 작은 단백질이다. 이 경우 SNAP-tag 기질은 벤질 링커에 연결된 구아닌 이탈

그룹이다. 상기 라벨링 반응에서 기질의 치환된 벤질 그룹은 SNAP-tag에 공유적으로 부착된다.

[0084] 상기 SNAP-tag 단백질 라벨링 시스템은 관심 단백질에 대한 사실상 임의의 분자의 특이적인 공유 부착이 가능하다(본 발명에 대한, 하기의 4. 참조).

[0085] C 말단 SNAP 태그들을 포함하는 재조합 리간드들은 E. coli 또는 헌탁액 배양의 포유동물 세포에서 생성되었다. 공유 부착들의 경우 SNAP-태그된 리간드들은 포화 농도의 리간드를 추가하고 실온에서 밤새 배양됨으로써 BG-변형된 바이러스에 부착되었습니다(도 1 참조). 과량의 미반응 리간드는 원심분리 100Kda MWCO 필터 유닛을 통해 반응물을 통과시킴으로써 제거되었다.

[0086] 본 발명의 경우, 실험들이 본 목적을 위한 변형들과 함께, 관심 유전자를 클로닝하기 위해 제한 부위들 옆에 배치된 SNAP-tag[®] 를 인코딩하는 포유동물 발현 플라스미드(pSNAPf)를 함유하는 SNAP-Cell[®] Starter Kit (NEB)의 지침에 따라 수행되었다.

[0087] **4. 인 비트로 및 인 비보 테스트들**

[0088] 본 발명의 맥락에서, 상기 계획은 다양한 부류의 리간드들, 즉 성장 인자, 사이토카인 등과 같은 단백질 리간드; 콜레라 독소 B 서브유닛과 같은 독소 서브유닛; 이소렉틴 B4 또는 밀 배아 응집소와 같은 렉틴; 락타데린과 같은 부착 인자들; 항 CD-34 (줄기 세포들의 마커)와 같은 항체들; 및 델토르핀 오피오이드 수용체 리간드와 같은 펩타이드로 테스트되었다.

[0089] 본 발명에 따른 ΔHSPG 바이러스 입자는 형광 리포터 마우스 모델에서 감각 뉴런에 대해 테스트된 바와 같이 더 이상 감염 활성을 갖지 않는 것으로 먼저 나타났다(도 2). 밀 배아 응집소(WGA, 렉틴) 융합은 동일한 형광 리포터 마우스 모델의 감각 뉴런에서 테스트할 때 바이러스 형질도입 효율을 100%로 완전히 되돌렸다(도 3).

[0090] 그 후, 신경영양 인자 NGF, NT3 및 BDNF(단백질 리간드들)가 형광 리포터 마우스 모델에 사용된 인자에 따라 다른 특정 신경 집단에 바이러스를 전달하는 여러 요인들이 테스트되었다(도 4). 콜레라 독소 B 서브유닛(독소)은 바이러스를 신경 세포체들로 역행하게 지시했다(즉, 세포 구획/특정 부분) (도 5). 유사한 테스트들에서 락타데린(부착 인자)은 포스포타일세린을 노출하는 대식세포 및 뉴런에 바이러스를 특이적으로 지시했고, 델토르핀(펩타이드)은 뮤(Mu) 및 델타(Delta) 오피오이드 수용체들을 발현하는 뉴런에 바이러스를 특이적으로 지시했다.

[0091] 도 6에 나타난 실험들에서, NGF 리간드 IV를 포함하는 바이러스가 삼차신경절로 주입되었고, 그 다음 감각 뉴런 조직이 3주 후에 채워지고 분석되었다. 절단된 조직은 TrkA(NGF에 대한 수용체)에 대한 항체로 염색되었고 매우 우수한 중첩이 발견되었다. TrkA 항체는 완벽하지 않으므로 80% 중복은 매우 유의미하다.

[0092] 도 7에 표시된 실험들에서 도 6의 부분들은 NF200 및 IB4에 대한 항체로 염색되었으며, 이는 다른 뉴런들을 표지한다(각각 기계수용체 및 비펩타이드성 통각수용체). 다시 말하면, 이 마커들은 완벽하지 않지만 녹색 및 파란색 세포들은 빨간색의 감염된 세포와 다른 것을 알 수 있다.

[0093] 음성 대조군으로서, IL31 리간드를 IL31 수용체 녹아웃 마우스에 바이러스로 도입하는 것은 감염으로 이어지지 않는다.

[0094] 요약하면, 모든 리간드-표지된 바이러스들은 인 비트로로 배양된 세포들에 적용했을 때와 인 비보로 마우스에 주입했을 때 각각의 수용체를 발현하는 세포들만을 성공적이고 특이적으로 형질도입했으며, 즉, 전신적으로 또는 국지적으로 주입될 수 있고 다른 세포 집단을 선택적으로 표적화할 수 있다.

[0095] **리간드-AA를 사용한 추가 인 비보 테스트들**

[0096] A) TrkA+ 통각수용체 표적화

[0097] 이 예에서 말초 신경계의 TrkA+ 통각수용체들은 리간드 AAV로 표적화되었다. TrkA에 결합하지만 활성화하지 않는 NGF^{R121W} 리간드는 tdTomato 카고와 함께 상기에서 설명한바와 같이 ΔHSPG-AAV2에 접합되었다. 작제물을 마우스에 피하, 신경내, 안와후 또는 복강내로 주사하였다. 3주 후 형광을 TrkA 항체를 사용하여 검출하고 정량하였다.

[0098] 안구 뒤 적용을 위해 TrkA⁺ 세포들의 80%가 NGF-AAV에 의해 감염된 것으로 나타났다. NGF-AAV에 감염된 세포들의 83%는 TrkA⁺였습니다. 또한 상이한 투여 경로들은 그들의 매우 효과적인 결과에서 상당히 다르지 않은 것으로 나타났다.

[0099] B) IL31RA+ 가려움증 수용체 표적화

[0100] 이 예에서 IL31RA는 리간드 AAV로 표적화되었다. IL31RA에 결합하지만 활성화하지 않는 IL31^{K134A} 리간드는 tdTomato 카고와 함께 상기에서 설명한 바와 같이 ΔHSPG-AAV2에 접합되었다. 작제물이 야생형 및 IL31RA 녹아웃 마우스로 주사되었다. 3주 후, 케라틴 14 항체를 사용하여 형광을 검출하였다. 표적 세포들은 기본적으로 K14에 대해 완전히 양성인 것으로 나타났다. IL31RA 녹아웃 마우스에서 중요한 것은 형광이 검출되지 않았다.

[0101] C) 이소렉틴 B4와 함께 AAV를 사용한 표적화

[0102] 이 예에서 이소렉틴 B4(IB4)는 tdTomato 카고와 함께 상기에서 설명한 바와 같이 ΔHSPG-AAV2에 접합되었다. IB4는 혈관계, 비펩타이드성 통각수용체 및/또는 미세아교세포에 대한 마커로 사용될 수 있다. 작제물이 피하, 신경내 또는 척수내로 주사되었다. 3주 후, 형광이 검출되었다. 표적 세포들은 투여 경로에 관계없이 기본적으로 완전히 양성인 것으로 나타났다.

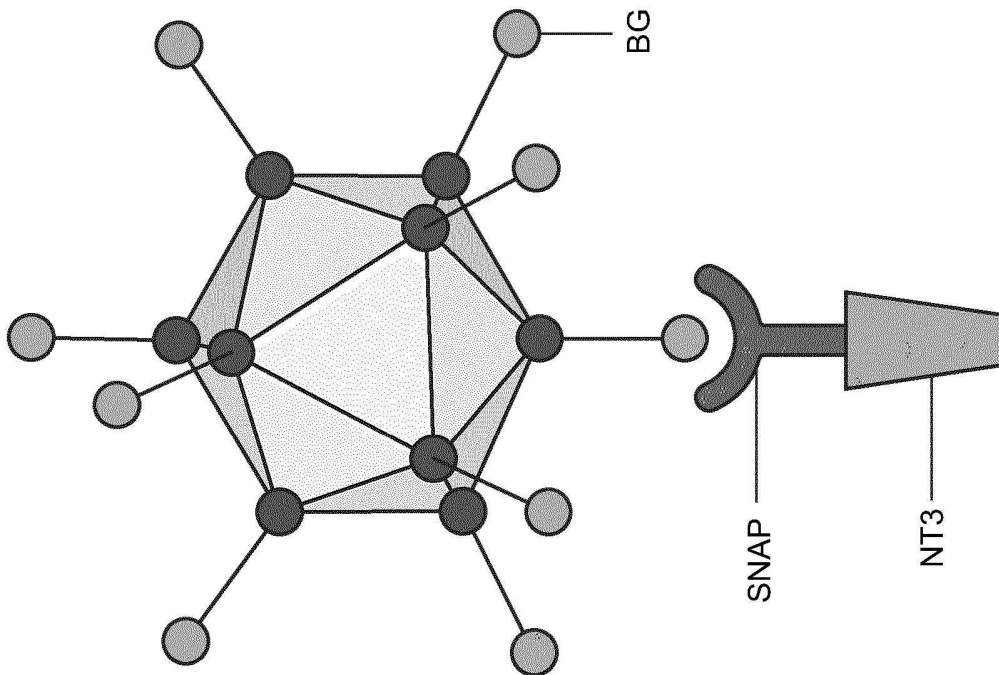
[0103] D) 밀 배아 응집소와 함께 AAV를 사용한 표적화

[0104] 이 예에서 밀 배아 응집소(WGA)는 tdTomato 카고와 함께 상기에서 설명한 바와 같이 ΔHSPG-AAV2에 접합되었다. WGA는 N-아세틸글루코사민 및 대부분의 뉴런의 막에 결합하고 (시냅스 전이) 추적자로 사용된다. 작제물이 P1 신생아의 마우스 i.v.에 또는 성인 마우스에서 피질내로 주입되었다. 3주 후, 형광이 검출되었다.

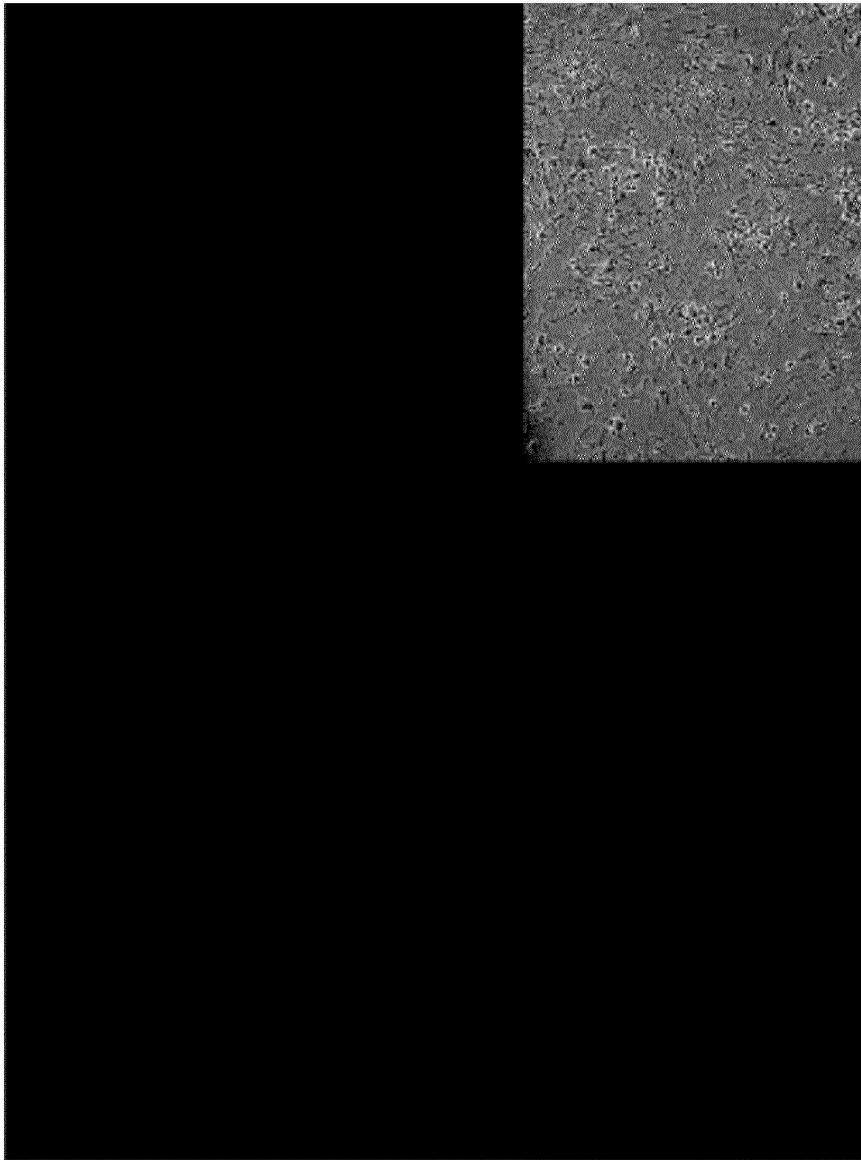
[0105] 유전자 전달은 리간드 바이러스에서 더 효율적인 것으로 나타났다(도 8 참조). 배양된 DRG 뉴런들은 AAV9 변이체 PHP.S로 감염되었고(1E+9 VG), 상기의 WGA 변형 작제물이 전달의 강력한 증가를 초래하는 것으로 나타났다(도 8B 참조).

도면

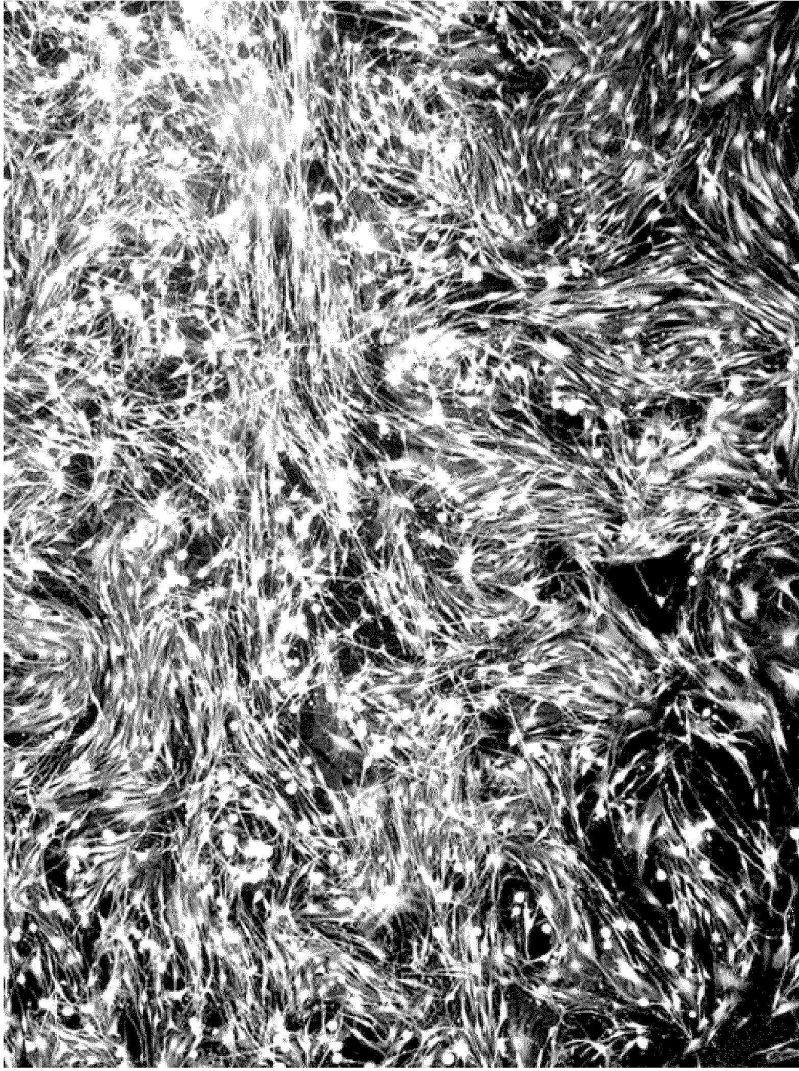
도면1



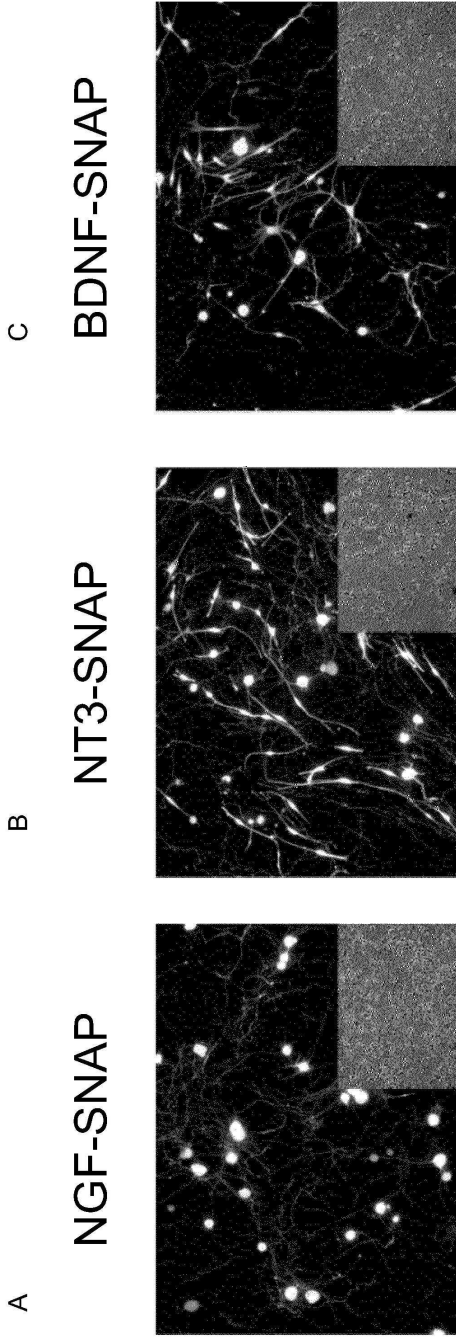
도면2



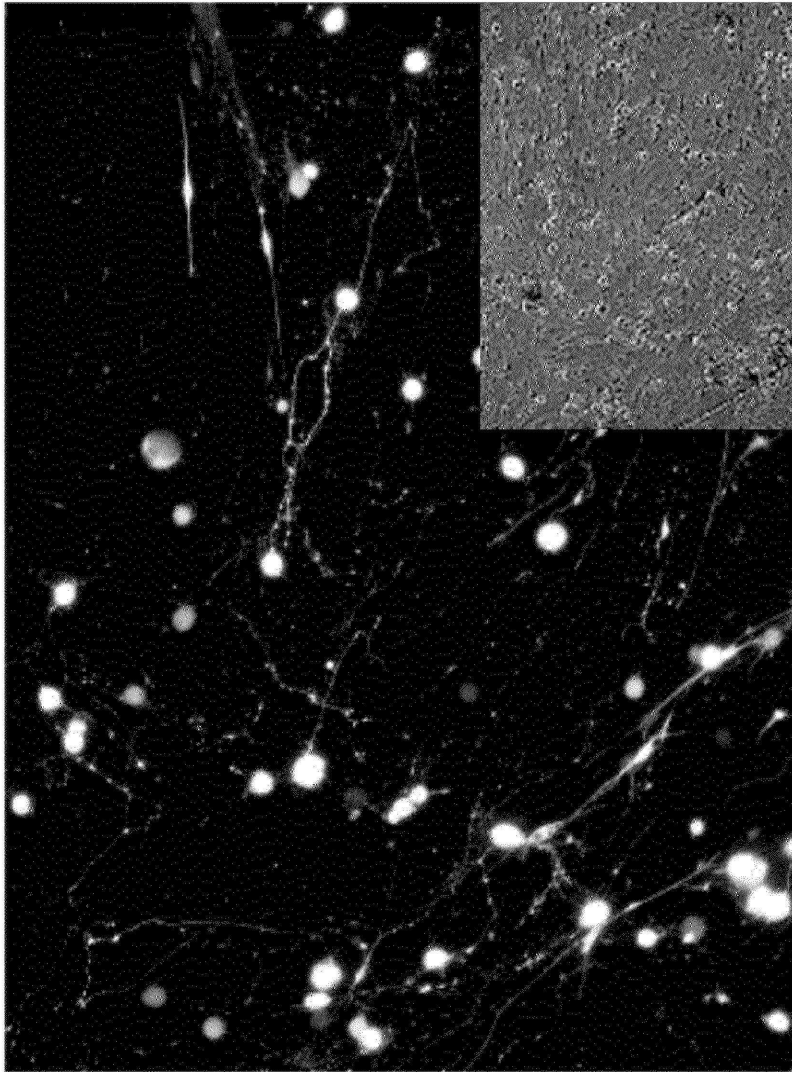
도면3



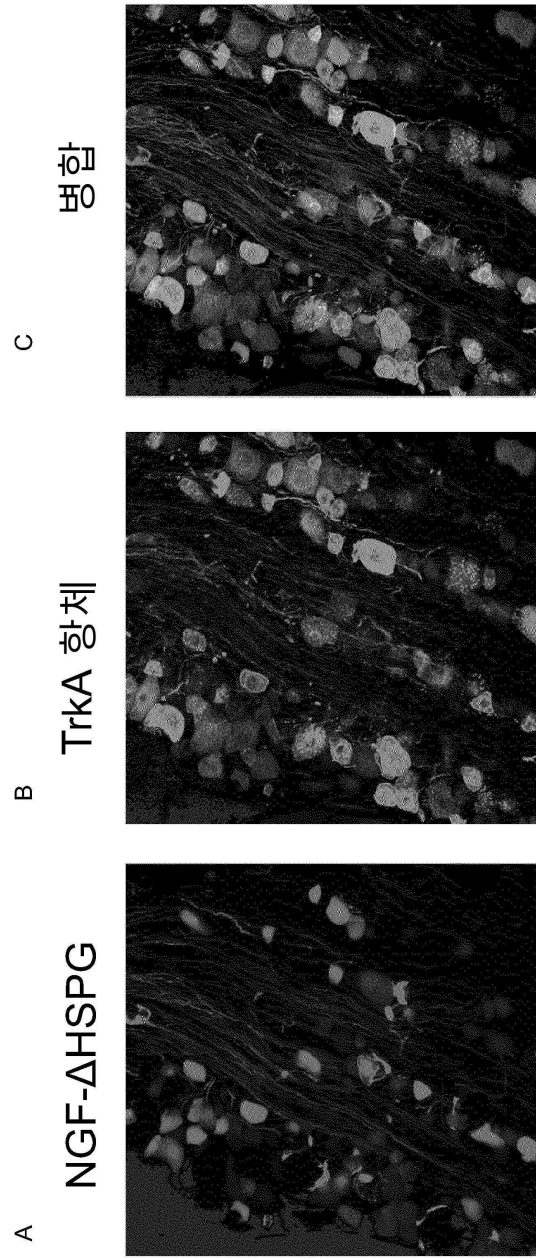
도면4



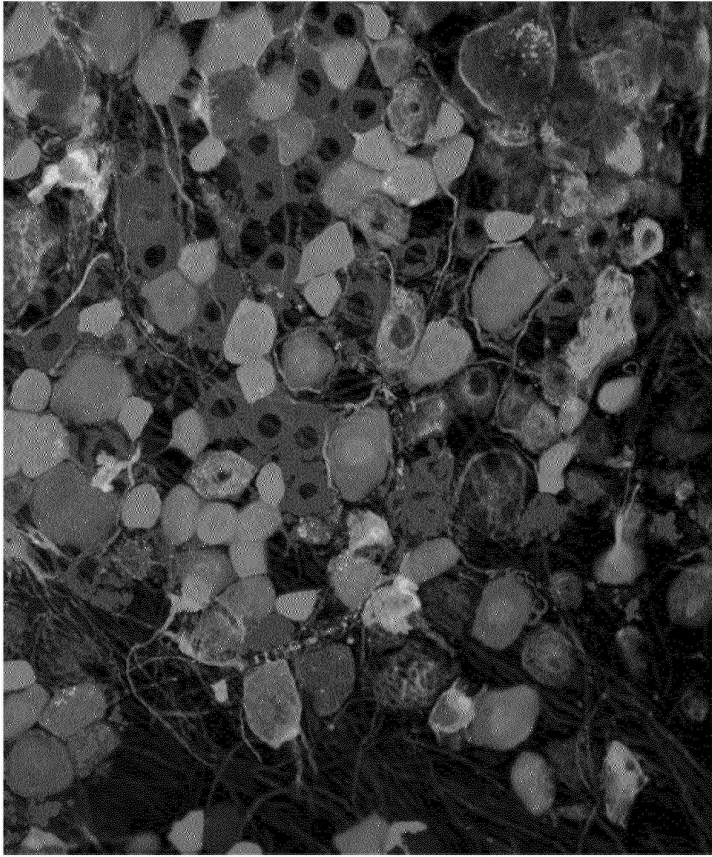
도면5



도면6

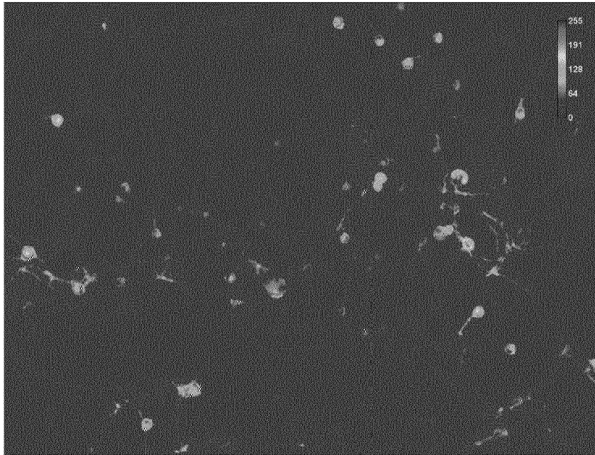


도면7



도면8

A)



B)

