



등록특허 10-2450833



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년10월05일
(11) 등록번호 10-2450833
(24) 등록일자 2022년09월29일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 9/10 (2006.01) *A61P 7/04* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/0058 (2013.01)
A61K 48/0075 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2018-7032617
- (22) 출원일자(국제) 2017년04월13일
심사청구일자 2020년03월23일
- (85) 번역문제출일자 2018년11월09일
- (65) 공개번호 10-2019-0032274
- (43) 공개일자 2019년03월27일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/027396
- (87) 국제공개번호 WO 2017/180857
국제공개일자 2017년10월19일

(30) 우선권주장
62/323,336 2016년04월15일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2014064277 A1*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 19 항

심사관 : 혜명숙

(54) 발명의 명칭 혈우병 A 치료용 유전자 요법

(57) 요 약

혈우병 A 치료에 유용한 조성물 및 레지멘이 제공된다. 조성물은 인간 인자 VIII의 발현을 구동시키는 프로모터 및 트랜스티레틴 인핸서를 가진 재조합 아데노-관련 바이러스 (rAAV)를 포함한다.

(52) CPC특허분류

A61K 9/0019 (2013.01)
A61K 9/10 (2013.01)
A61P 7/04 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 7/00 (2013.01)
C12N 2750/14132 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020010082234 A*
Blood. 2006. Vol.108. NO.1, pp.107-115.*
Gene Therapy. 2008. Vol.15, pp.289-297.
US20070243168 A1
US20150071883 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

62/331,807 2016년05월04일 미국(US)
62/428,866 2016년12월01일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

재조합 아데노-관련 바이러스 (rAAV)를 포함하는 혈우병 A 치료용 약제학적 조성물로서, 상기 rAAV가 AAV 캡시드, 및 그 안에 패키징된 벡터 게놈을 포함하고, 상기 벡터 게놈이

(a) AAV 5' 역 말단 반복부 (ITR) 서열;

(b) En34 인핸서, 단축된 α1-마이크로글로бу린/비쿠닌 전구체 (ABPS) 인핸서, 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR) 및 이들의 조합으로부터 선택된 인핸서;

(c) TBG-S1 프로모터, A1AT 프로모터 및 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터로부터 선택된 프로모터;

(d) 응고 기능을 갖는 인간 인자 VIII을 인코딩하는 코딩 서열; 및

(e) AAV 3' ITR 서열

을 포함하며,

상기 코딩 서열은 서열 식별 번호: 2의 핵산을 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1 항에 있어서, 상기 인간 인자 VIII은 길이가 1457 아미노산 잔기인 B 도메인 결실된 인자 VIII SQ인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 3

제1 항에 있어서, 상기 프로모터는 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터이고, 상기 TTR 프로모터는 서열 식별 번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 4

제1 항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 hu37 캡시드인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 5

제1 항에 있어서, 상기 AAV 5' ITR 서열 및/또는 AAV3' ITR 서열은 AAV2로부터인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 6

제1 항에 있어서, 상기 인핸서는 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR)이고, 상기 enTTR은 서열 식별 번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 7

제1 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 polyA 서열을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 8

제7 항에 있어서, 상기 polyA 서열은 서열 식별 번호: 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 9

제1 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 크기 5 킬로베이스 내지 5.5 킬로베이스인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 10

제1 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 서열 식별 번호: 13의 뉴클레오타이드 서열의 nt 1-5110을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 11

제1 항에 있어서,

상기 인핸서는 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR)이고, 상기 enTTR은 서열 식별 번호: 5의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고; 및

상기 프로모터는 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터이고, 상기 TTR 프로모터는 서열 식별 번호: 7의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 12

제11 항에 있어서,

상기 AAV 5' ITR 서열은 서열 식별 번호: 11의 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 AAV3' ITR 서열은 서열 식별 번호: 12의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 13

제11 항에 있어서, 상기 벡터 게놈은 폴리A 서열을 추가로 포함하고, 상기 폴리A 서열은 서열 식별 번호: 10의 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 14

제11 항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 hu37 캡시드인 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 15

제1 항 내지 제14 항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 혼탁액을 추가로 포함하고, 상기 약제학적 조성물은 1×10^{12} 개놈 카페(GC)/mL 내지 1×10^{14} GC/mL의 rAAV를 포함하고, 상기 약제학적 조성물은 수성 혼탁액의 형태로 되어있는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 16

제15 항에 있어서, 상기 수성 혼탁액은 정맥내 주사에 적합한 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 17

제15 항에 있어서, 상기 수성 혼탁액은 계면활성제, 보존제, 및/또는 수성 혼탁 액체에 용해된 완충액을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 18

제1 항 내지 제14 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 rAAV는 수성 혼탁액에서 1×10^{12} 내지 1×10^{14} 개놈 카페(GC)/kg가 전달되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

청구항 19

제18 항에 있어서, 상기 rAAV는 나중 시점에 재투여되는 것을 특징으로 하는 약제학적 조성물.

발명의 설명**기술 분야**

전자 형태로 제출된 자료의 참조에-의한-편입

[0002] 출원인은 이로써 이와 함께 전자 형태로 출원된 서열 목록 자료를 참조로 편입시킨다. 이 파일은 "UPN-16-7798PCT_ST25.txt" 표지된다.

관련 출원에 대한 교차 참조

[0004] 본원은 2016년 4월 15일 출원된 미국 특허 출원 번호 62/323,336, 2016년 5월 4일 출원된 62/331,807, 그리고 2016년 12월 1일 출원된 62/428,866에 우선권을 주장한다. 이들 출원은 본 명세서에서 참조로 그 전문이 편입된다.

1. 도입

[0006] 본원은 혈우병 A에 대하여 유전자 요법에 유용한 구현예에 관한 것이다.

배경 기술

2. 배경

[0008] 혈우병 A (HA 또는 HemA)는 가장 흔한 선천적 출혈성 장애이다. 미국 질병 통제 예방 센터에 따르면, 혈우병 A는 5,000 명 중 대략 1명에서 발생한다. 미국에서 혈우병 A를 가진 약 20,000 명이 있다. 혈우병 A는 혈우병 B의 4배만큼 흔하고, 혈우병 A를 가진 환자의 절반 초과는 혈우병의 중증 형태를 갖는다. 주로 FVIII의 수준에서 보통의 증가 (정상의 >1%)가 중증 출혈 표현형을 완화시킬 수 있기 때문에, HA는 인자 VIII (FVIII)의 결핍에 의해 야기되고 유전자 대체 접근법에 널리 맞춤화된다. 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터는 현재 그것의 탁월한 안전성 프로파일 그리고 유사분열후 조직 예컨대 간으로부터 장기간 이식유전자 발현을 유도하는 능력 때문에 유전자 요법 적용에 대하여 가장 큰 전망을 보여준다.

[0009] HA 유전자 요법에 대하여 AAV 벡터의 용도는, 그러나, 인간 FVIII ("hFVIII")의 구별되는 분자적 및 생화학적 특성 때문에 신규한 과제를 안고 있다. 유사한 크기의 다른 단백질과 비교하여, hFVIII의 발현은 고도로 비효율적이다. FVIII 분자의 생물공학은 FVIII 발현의 개선을 초래하였다. 예를 들어, 공-인자 활성에 요구되지 않는, hFVIII B 도메인은 결실되었고 (BDD) 전장 야생형 FVIII에 대해 mRNA 수준에서 17-배수 증가 및 분비된 단백질에서 30% 증가율을 초래하는 짧은 14 아미노산 링커 (FVIII SQ)에 의해 대체되었다. 참조, Ward, Natalie J., 등 "Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression". Blood 117.3 (2011): 798-807 및 WO 2011/005968로서 또한 공개된, 미국 특허 번호 9,393,323. 재조합 FVIII-BDD-SQ는 대체 재조합 FVIII 생성물 (Refacto, Wyeth Pharma; Xyntha, Pfizer)로서 임상 용도이다.

[0010] HA 유전자 요법에 대하여 AAV-매개된 유전자 전달에 또 다른 장애물은, 7.0 kb에서, AAV 벡터의 정상 패키징 수용력을 훨씬 초과하는, FVIII 코딩 서열의 크기이다. AAV 벡터 속에 큰 발현 카셋트의 패키징은 보고되었지만, 이것은 감소된 감염성을 가진 벡터 입자의 저 수율을 초래하는 그리고 간 손상을 유도할 수 있는 고 용량을 요구하는 고도로 불일치된 공정이다. 참조, 예를 들면 Sarkar, R., W. Xiao, 및 H. H. Kazazian. "A single adeno-associated virus (AAV)-murine factor VIII vector partially corrects the hemophilia A phenotype". Journal of Thrombosis and Haemostasis 1.2 (2003): 220-226; and McIntosh, Jenny, 등 "Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant". Blood 121.17 (2013): 3335-3344.

[0011] 따라서, 더욱 효율적인 AAV.FVIII 벡터가 HA 치료에 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

과제의 해결 수단

3. 요약

[0013] 본 명세서에서 기재된 구현예는, 출혈 결함의 임상적으로 유의미한 정정의, 장기간, 아마 10 년 이상을 초래하는 벡터의 정맥내 투여 이후, 필요로 하는 대상체에게 정상 인간 FVIII 전달을 위한 AAV 유전자 요법 벡터에 관한 것이다. 대상체 환자 모집단은 보통 내지 중증 혈우병 A를 가진 환자이다. 의도된 벡터 용량은 대략 3-10%

또는 5%의 FVIII 혈액 수준을 전달하도록 의도된다. AAV 벡터 치료용 목표는 중증 혈우병 A 환자의 어느 한쪽 중간 정도 또는 온화한 혈우병 A로의 전환이고 따라서 예방 레지멘되고 있는 필요성의 그와 같은 환자를 완화시키는 것이다.

[0014] 본 명세서에서 기재된 유전자 요법 생성물은 중증 혈우병 A의 관리에 대한 현재 이용가능한 예방적 접근법에 다중 중요한 이점을 제공한다. 첫째, 조사적 생성물로 전임상 결과는, 상기 표적 환자 모집단에서 형질전환성일 수준인, 정상의 10% 이상의 인자 VIII의 순환 수준을 달성하기 위한 그것의 잠재력과 일치한다. 둘째, 생성물은, 외인성 인자의 투여로 현재 보여진 트러프 수준을 피하는, 효과적으로 일정한 인자 VIII 혈액 수준으로 이어질 수 있다. 셋째, 단지 단일 투여 요구에 의해, 빈번한 정맥내 투여용 요건은 연장된 기간 동안, 아마 10년 이상 동안 감소될 수 있다.

[0015] 본원은 혈우병 A로 진단된 환자 (인간 대상체)의 간 세포에 인간 인자 VIII (hFVIII 또는 hF8) 유전자를 전달하기 위한 복제 결핍된 아데노-관련 바이러스 (AAV)의 용도를 제공한다. hFVIII 유전자 ("rAAV.hFVIII") 전달을 위하여 사용된 재조합 AAV 벡터 (rAAV)는 간에 대하여 굴성 (예를 들면, AAVhu.37 또는 AAVrh.10 캡시드를 보유하는 rAAV)를 가질 수 있고, hFVIII 이식유전자는 간-특이적 발현 제어 요소에 의해 제어될 수 있다. 일 구현예에서, 발현 제어 요소는 하기의 하나 이상을 포함한다: 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR); 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터; 및 polyA 신호. 또 다른 구현예에서, 발현 제어 요소는 하기의 하나 이상을 포함한다: 단축된 α1-마이크로글로불린/비쿠닌 전구체 (ABPS) 인핸서, 및 enTTR; 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터; 및 polyA 신호. 일 구현예에서, 발현 제어 요소는 하기의 하나 이상을 포함한다: 트랜스티레틴 인핸서 (enTTR); 알파 1 항-트립신 (A1AT) 프로모터; 및 polyA 신호. 또 다른 구현예에서, 발현 제어 요소는 하기의 하나 이상을 포함한다: ABPS 인핸서, 및 enTTR; A1AT 프로모터; 및 polyA 신호. 그와 같은 요소는 본 명세서에서 추가로 기재된다.

[0016] 일 구현예에서, hFVIII 유전자는 인자 VIII의 B-도메인 결실된 (BDD) 형태를 인코딩하고, 여기에서 B-도메인은 짧은 아미노산 링커 (FVIII-BDD-SQ, 또한 본 명세서에서 hFVIII로서 지칭됨)에 의해 대체된다. 일 구현예에서, FVIII-BDD-SQ 단백질 서열은 서열 식별 번호: 3에서 보여진다. 일 구현예에서, FVIII-BDD-SQ 코딩 서열은 서열 식별 번호: 1에서 보여진다. hFVIII용 코딩 서열은, 일 구현예에서, 인간에서 발현을 위하여 코돈 최적화된다. 그와 같은 서열은 원상태 hFVIII 코딩 서열 (서열 식별 번호: 1)에 80% 미만 동일성을 공유할 수 있다. 일 구현예에서, hFVIII 코딩 서열은 서열 식별 번호: 2에서 보여진 것이다.

[0017] 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 rAAV를 포함하는 혈우병 A 환자에게 투여에 적합한 수성 혼탁액이 본 명세서에서 제공된다. 일부 구현예에서, 혼탁액은 수성 혼탁 액체 그리고 rAAV의 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{14} 게놈 카피 (GC)/mL를 포함한다. 혼탁액은, 일 구현예에서, 정맥내 주사에 적합하다. 다른 구현예에서, 혼탁액은 추가로 계면활성제, 보존제, 및/또는 수성 혼탁 액체에 용해된 완충액을 포함한다.

[0018] 또 다른 구현예에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 rAAV로 혈우병 A를 갖는 환자의 치료 방법이 본 명세서에서 제공된다. 일 구현예에서, rAAV의 약 1×10^{11} 내지 약 3×10^{13} 게놈 카피 (GC)/kg 환자 체중이 수성 혼탁액으로 환자에게 전달된다.

[0019] 치료의 목표는 이러한 질환을 치료하기 위해 그리고 현행 요법에 반응을 개선하기 위해 생존가능한 접근법으로서 rAAV-기반 간-유도 유전자 요법을 통해 환자의 불량성 hFVIII를 기능적으로 대체하는 것이다. 본원에서 기재된 구현예는, 부분적으로, 유효한 용량의 안전한 전달을 허용하는 방법 및 치료제 조성물; 그리고 인간 대상체에서 유효한 투약용 정제 생산 요건을 충족시키기 위한 개선된 제조 방법의 개발에 기반된다.

4. 도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 pAAV.E03.P3.hF8co-SQ.PA75 시스 플라스미드의 약도이다.

[0022] 도 2는 pAAV.E12.P3.hF8co-SQ.PA75 시스 플라스미드의 약도이다.

[0023] 도 3은 pAAV.E03.P2.hF8co-SQ.PA75 시스 플라스미드의 약도이다.

[0024] 도 4는 pAAV.E12.P2.hF8co-SQ.PA75 시스 플라스미드의 약도이다.

[0025] 도 5는 FVIII KO 마우스에서 항체 생성에 앞서 hFVIII 활성에서 변화를 보여준다. FVIII KO 마우스는 42 인핸서 /프로모터 조합 중 하나로부터 hFVIIIco-SQ를 발현시키는 AAVrh10 벡터의 10^{10} GC로 IV 투여되었다. 각각의 인핸서 배열 (E01-E14로서 언급됨, 표 1)은 TBG-S1 (각각의 그룹화로부터 좌측 집단), A1AT (중간 집단) 및 TTR (우측 집단) 프로모터와 조합되었다. hFVIII 활성 (A) 및 항-hFVIII IgG 역가 (B)는 COATEST 검정 및 항-

hFVIII IgG ELISA, 각각에 의해 결정되었다. 검정은 벡터 투여후 2 주째에 단리된 마우스 혈장에서 수행되었다. 마우스는 보여진 활성에 대하여 평균 \pm SEM 값으로 개별적으로 플롯팅된다 ($n = 10/\text{그룹}$).

[0026] 도 6은 FVIII KO 마우스에서 IV 벡터 투여 이후 8 주째에 hFVIII 활성 및 항-hFVIII 항체 역가를 보여준다. FVIII KO 마우스는 42 인핸서/프로모터 조합 중 하나로부터 hFVIIIco-SQ를 발현시키는 AAVrh10 벡터의 10^{10} GC로 IV 투여되었다. 각각의 인핸서 배열 (E01-E14로서 언급됨, 표 1)은 TBG-S1 (각각의 그룹화로부터 좌측 집단), A1AT (중간 집단) 및 TTR (우측 집단) 프로모터와 조합되었다. hFVIII 활성 (A) 및 항-hFVIII IgG 역가 (B)는 COATEST 검정 및 항-hFVIII IgG ELISA, 각각에 의해 결정되었다. 검정은 벡터 투여후 8 주째에 단리된 마우스 혈장에서 수행되었다. 마우스는 보여진 활성에 대하여 평균 \pm SEM 값으로 개별적으로 플롯팅된다 ($n = 10/\text{그룹}$).

[0027] 도 7은 경시적으로 42 인핸서/프로모터 조합 벡터의 IV 투여 이후 FVIII KO 마우스에서 hFVIII 활성을 보여준다. FVIII KO 마우스는 42 인핸서/프로모터 조합 중 하나로부터 hFVIIIco-SQ를 발현시키는 AAVrh10 벡터의 10^{10} GC로 IV 투여되었다. 각각의 인핸서 배열 (E01-E14로서 언급됨, 표 1)은 TBG-S1 (각각의 그룹화로부터 좌측 집단), A1AT (중간 집단) 및 TTR (우측 집단) 프로모터와 조합되었다. hFVIII 활성은 벡터 투여후 격주로 단리된 마우스 혈장에서 COATEST 검정에 의해 결정되었다. 마우스는 평균 \pm SEM으로 개별적으로 플롯팅된다 ($n = 10/\text{그룹}$).

[0028] 도 8은 경시적으로 42 인핸서/프로모터 조합 벡터의 IV 투여 이후 FVIII KO 마우스에서 항-hFVIII 항체 역가를 보여준다. FVIII KO 마우스는 42 인핸서/프로모터 조합 중 하나로부터 hFVIIIco-SQ를 발현시키는 AAVrh10 벡터의 10^{10} GC로 IV 투여되었다. 각각의 인핸서 배열 (E01-E14로서 언급됨, 표 1)은 TBG-S1 (좌측 집단), A1AT (중간 집단) 및 TTR (우측 집단) 프로모터와 조합되었다. 항-hFVIII IgG 역가는 격주로 단리된 마우스 혈장에서 항-hFVIII IgG ELISA에 의해 결정되었다. 마우스는 개별적으로 플롯팅된다 ($n = 10/\text{그룹}$).

[0029] 도 9는 여러가지의 벡터 캡시드에 의한 E06.TTR.hFVIIIco-SQ 계놈의 IV 투여 이후 hFVIII 활성 및 항-hFVIII 항체 역가의 비교를 제공한다. FVIII KO 마우스는 E06.TTR로부터 hFVIIIco-SQ를 발현시키는 AAVrh10, AAV8, AAV9, AAvh37, 또는 AAVrh64R1 벡터의 10^{10} GC로 IV 투여되었다. 혈장은 격주로 수집되었고 hFVIII 활성 (A) 및 항-hFVIII IgG 역가 (B)는 COATEST 검정 및 항-hFVIII IgG ELISA, 각각에 의해 결정되었다. 마우스는 보여진 활성에 대하여 평균 \pm SEM 값으로 개별적으로 플롯팅된다 ($n = 10/\text{그룹}$).

[0030] 도 10은 파일럿 비-인간 영장류 (NHP) 연구에서 hFVIII의 발현을 제공한다. (A) 2 숫컷 레수스 마카크는 AAVrh10.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ의 3×10^{12} GC/kg으로 IV 투여되었다. (B) 2 숫컷 사이노몰구스 마카크는 AAvh37.ABP2.TBG-S1.hFVIIIco-SQ의 3×10^{12} GC/kg으로 IV 투여되었다. 마카크는 매주 또는 격주로 채혈되어 hFVIII 이식유전자에 대한 항체의 존재 및 hFVIII 발현을 평가하였다. hFVIII 발현은 혈장에서 ELISA (실선)에 의해 측정되었고 값은 평균 \pm SEM으로서 표현된다. 항-hFVIII IgG 역가는 혈장에서 ELISA (점선)에 의해 또한 결정되었다.

[0031] 도 11은 사이노몰구스 마카크에서 hFVIII의 발현을 제공한다. 5 숫컷 레수스 마카크는 AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75, AAvh37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, 또는 AAvh37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75 중 하나의 1.2×10^{13} GC/kg으로 IV 투여되었다. 마카크는 격주로 채혈되어 혈장에서 ELISA에 의해 hFVIII 발현을 평가하였고 값은 평균 \pm SEM으로서 표현된다.

[0032] 도 12는 사이노몰구스 마카크에서 항-hFVIII 항체의 생성을 보여준다. 5 숫컷 레수스 마카크는 AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75, AAvh37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, 또는 AAvh37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75 중 하나의 1.2×10^{13} GC/kg으로 IV 투여되었다. 마카크는 격주로 채혈되어 hFVIII 이식유전자에 대한 항체의 존재를 평가하였다. 항-hFVIII IgG 역가는 혈장에서 ELISA에 의해 평가되었다. 통계적인 분석은 도 14에서 보여진다.

[0033] 도 13은 제조 반응식을 제공한다.

[0034] 도 14는 도 12에서 보여진 항-FVIII 항체의 생성의 시간 사례 분석을 제공한다. 통계적으로 유의차는 로그-순위 (Mantel-Cox) 시험을 사용하여 AAVrh.10과 AAvh.37 사이 보여졌다.

- [0035] 도 15는 AAVrh10, AAV8, AAV3B 및 AAV5 벡터 (제1 벡터 주사)에 의한 rhCG 발현 수준의 비교를 보여준다.
- [0036] 도 16A-16D는 상이한 시점에 간에서 rhCG 벡터 DNA 카피를 보여준다 (AAVrh10, 도 16A; AAV8, 도 16B; AAV3B, 도 16C; AAV5, 도 16D).
- [0037] 도 17A-17B는 rhAFP를 발현시키는 AAV3B (도 17A) 또는 AAV5 (도 17B) 벡터로 재투여 (제2 벡터 주사) 후 rhAFP 수준을 보여준다.
- [0038] 도 18A-18B는 간에서 rhAFP 벡터 계놈 카피를 보여준다 (도 18A, AAV3B.TBG.rhAFP; 도 18B, AAV5.TBG.rhAFP).
- [0039] 도 19는 마카크에서 차별적인 AAV Nab 반응을 보여준다.
- [0040] 도 20A-20B는 부문 6.3.8에서 기재된 바와 같이 hFVIIico IV를 발현시키는 AAVrh10 인핸서/프로모터 벡터로 주사된 마우스의 간에서 간 벡터 GC (도 20A) 또는 RNA 전사체 수준 (도 20B)을 제공한다.
- [0041] 도 21은 부문 6.3.8에서 기재된 바와 같이 hFVIIico IV를 발현시키는 AAVrh10 인핸서/프로모터 벡터로 주사된 마우스의 근육 (우측 비복근), 우측 고환, 췌장, 우측 신장, 비장, 우측 폐, 및 심장에서 hFVIII RNA 전사체 수준을 제공한다.
- [0042] 도 22는 3×10^{12} GC/kg에서 AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75의 단일 정맥내 주사 이후 사이노몰구스 마카크 (35개월)에서 인간 FVIII의 장기간 안정한 발현을 보여주는 그래프이다.
- [0043] 도 23은 도 22의 마카크에서 간 효소 수준 (ALT, U/mL, 정사각형; AST, U/mL, 원형)을 보여주는 그래프이다.
- [0044] 도 24는 AAVhu.37 캡시드에 중화 항체 (Nab) 반응을 보여주는 그래프이다.
- [0045] 도 25는 hFVIIico 서열 (서열 식별 번호: 2) 대 hFVIII 원상태 (서열 식별 번호: 1) 서열의 정렬이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

5. 상세한 설명

- [0046] 본원에서 기재된 구현에는 혈우병 A (HA)로 진단된 환자 (인간 대상체)의 간 세포에 인간 인자 VIII (hFVIII) 유전자를 전달하기 위한 복제 결핍된 아데노-관련 바이러스 (AAV)의 용도에 관한 것이다. hFVIII 유전자 전달을 위하여 사용된 재조합 AAV 벡터 (rAAV) ("rAAV.hFVIII")은 간에 대하여 굴성 (예를 들면, AAVhu.37 또는 AAVrh.10 캡시드를 보유하는 rAAV)를 가질 수 있고, hFVIII 이식유전자는 간-특이적 발현 제어 요소에 의해 제어될 수 있다. 일 구현예에서, 발현 제어 요소는 하기의 하나 이상을 포함한다: 트랜스티레틴 (TTR) 인핸서; 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터; 및 polyA 신호. 그와 같은 요소는 본 명세서에서 추가로 기재된다.
- [0047] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "AAVhu.37 캡시드"는, 본 명세서에서 참조로 편입된, 유전자은행, 등록: AAS99285, 서열 식별 번호: 17의 아미노산 서열을 갖는 hu.37을 지칭한다. 이러한 인코딩된 서열로부터 일부 변화는 허용되고, 이는 (본 명세서에서 참조로 편입되는) AAS99285 및 US 2015/0315612에서 참조된 아미노산 서열의 약 99% 동일성을 갖는 서열 (즉, 참조된 서열로부터 약 1% 미만 변화)를 포함할 수 있다. 캡시드의 생성 방법, 따라서 코딩 서열, 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법은 기재되어 있다. 참조, 예를 들면, Gao, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 및 US 2015/0315612.
- [0048] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, "AAVrh10 캡시드"는 본 명세서에서 참조로 편입되는 유전자은행, 등록: AA088201, 서열 식별 번호: 18의 아미노산 서열을 갖는 rh.10을 지칭한다. 이러한 인코딩된 서열로부터 일부 변화는 허용되고, 이는 AA088201 및 US 2013/0045186A1에서 참조된 아미노산 서열에 약 99% 동일성을 갖는 서열 (즉, 참조된 서열로부터 약 1% 미만 변화)를 포함할 수 있고, 단 친화성 포착 정제용 리간드-결합 부위의 완전성은 유지되고 서열에서 변화는 (본 명세서에서 추가로 논의된 바와 같이) 이온교환수지 정제용 캡시드에 대하여 pH 범위를 실질적으로 변경시키지 않는다. 캡시드의 생성 방법, 따라서 코딩 서열, 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법은 기재되어 있다. 참조, 예를 들면, Gao, 등, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003) 및 US 2013/0045186A1.
- [0049] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "NAb 역가"는 그것의 표적화된 에피토프 (예를 들면, AAV)의 생리적 효과를 중화시키는 얼마나 많은 중화 항체 (예를 들면, 항-AAV Nab)가 생산되는 지의 측정이다. 항-AAV NAb 역가는, 예를 들면, 본 명세서에서 참조로 편입되는, Calcedo, R., 등, Worldwide Epidemiology of Neutralizing Antibodies to Adeno-Associated Viruses. Journal of Infectious Diseases, 2009. 199(3): p. 381-390에서

기재된 바와 같이 측정될 수 있다.

[0051] 아미노산 서열의 문맥에서 용어 "퍼센트 (%) 동일성", "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성", 또는 "퍼센트 동일한"은 관련성으로 정렬된 경우 동일한 2 서열에서 잔기를 지칭한다. 퍼센트 동일성은 단백질, 폴리펩타이드, 약 32 아미노산, 약 330 아미노산, 또는 이의 펩타이드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 시퀀서의 전장에 걸쳐 아미노산 서열에 대하여 쉽게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 길이 적어도 약 8 아미노산일 수 있고, 최대 약 700 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 사이 "동일성", "상동성", 또는 "유사성"을 지칭하는 경우, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열에 관련하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 참조 서열에 비교된 경우 누락 또는 추가의 염기 또는 아미노산용 정정을 종종 함유하는, 다중 핵산 서열 또는 단백질 (아미노산) 서열을 지칭한다. 참조 정렬은 임의의 여러가지의 공공연하게 또는 상업적으로 입수가능한 다중 서열 정렬 프로그램을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램은 아미노산 서열, 예를 들면, "Clustal Omega", "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME", 및 "Match-Box" 프로그램에 이용가능하다. 일반적으로, 당해 분야의 숙련가가 이를 설정을 필요에 따라 변경할 수 있어도, 임의의 이를 프로그램은 디폴트 설정에서 사용된다. 대안적으로, 당해 분야의 숙련가는 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공된 것으로서 정렬 또는 동일성의 수준을 적어도 제공하는 또 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다. 참조, 예를 들면, J. D. Thomson 등, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999).

[0052] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "작동가능하게 연결된"은 관심 유전자와 인접하는 발현 제어 서열 그리고 관심 유전자를 제어하기 위한 거리에서 또는 트랜스로 작동하는 발현 제어 서열 양쪽을 지칭한다.

[0053] "복제-불량성 바이러스" 또는 "바이러스 백터"는 관심 유전자를 함유하는 발현 카셋트가 바이러스 캡시드 또는 외피에서 패키징되는 재조합, 합성 또는 인공 바이러스 입자를 지칭하고, 여기에서 바이러스 캡시드 또는 외피 내에 또한 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열이 복제-결핍되고; 즉, 이들은 자손 비리온을 생성할 수 없지만 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 구현예에서, 바이러스 백터의 게놈은 복제하도록 요구된 효소를 인코딩하는 유전자를 포함하지 않지만 (게놈은 인공 게놈의 증폭 및 패키징이 요구된 신호에 의해 측첩된 관심 이식유전자만을 함유하는 - "실질없는" 것으로 조작될 수 있다), 이를 유전자는 생산 동안 공급될 수 있다. 따라서, 자손 비리온에 의한 복제 및 감염이 복제를 위하여 요구된 바이러스 효소의 존재 하에서를 제외하고 발생할 수 없기 때문에 유전자 요법에서 사용하기에 안전한 것으로 간주된다.

[0054] 용어 "한" 또는 "하나"가 하나 이상을 지칭한다는 것이 주목된다. 이와 같이, 용어 "한" (또는 "하나"), "하나 이상", 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호교환적으로 사용된다.

[0055] 단어 "포함한다", "포함하다", 및 "포함하는"은 배타적으로 보다는 포괄적으로 해석되어야 한다. 단어, "구성된다", "구성하는", 및 그것의 변형은, 포괄적으로 보다는, 배타적으로 해석되어야 한다. 명세서에서 다양한 구현 예가 "포함하는" 언어를 사용하여 제시되는 한편, 다른 상황 하에서, 관련된 구현예는 "으로 구성되는" 또는 "으로 본질적으로 구성되는" 언어를 사용하여 해석되고 기재되도록 또한 의도된다.

[0056] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "약"은, 달리 구체화되지 않는 한, 주어진 참조로부터 10%의 가변성을 의미한다.

[0057] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 기술적 및 과학적 용어들은, 본원에서 사용된 많은 용어에 일반적인 안내로 당해 분야의 숙련가를 제공하는, 공개된 본문에 참조로 그리고 당해 분야의 숙련가에 의해 통상적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다.

5.1 유전자 요법 백터

[0059] 일 측면에서, 인간 응고 인자 8 (hF8 또는 hFVIII) 유전자를 운반하는 재조합 아데노-관련 바이러스 (rAAV) 백터는 유전자 요법에서 사용을 위하여 제공된다. rAAV.hFVIII 백터는 간에 대하여 쿨링 (예를 들면, AAVhu.37 또는 AAVrh.10 캡시드를 보유하는 rAAV)를 가질 수 있고 hFVIII 이식유전자는 간-특이적 발현 제어 요소에 의해 제어될 수 있다. 백터는 인간 대상체에서 주입에 적합한 완충액/캐리어로 제형화된다. 완충액/캐리어는 주입 튜우빙에 고착으로부터 rAAV를 방지하지만 생체내 rAAV 결합 활성을 방해하지 않는 성분을 포함할 수 있다.

5.1.1. rAAV.hFVIII 백터

5.1.1.1. hFVIII 서열

[0062] 인간 응고 인자 VIII은 도메인 구조 A1-A2-B-A3-C1-C2를 가진 큰 330-kDa 당단백질로서 생산되고, 여기에서 양

쪽 A 및 C 도메인은, 동일한 도메인 구조를 공유하는, 인자 V (FV)의 A 및 C 도메인에 대략 40% 서열 동일성 및 내부 서열 상동성을 갖는다. 총 서열의 38%를 구성하는, B 도메인은 응혈원 활성에 분배성이다. B 도메인이 결실되고 (BDD) 짧은 14 아미노산 링커 (FVIII SQ)에 의해 대체되는 FVIII은 대체 재조합 FVIII 생성물로서 임상 사용되고, 전장 야생형 FVIII에 대해 mRNA 수준에서 17-배수 증가 그리고 분비된 단백질에서 30% 증가율을 초래하는 것으로 나타났다. 참조, 본 명세서에서 참조로 편입되는, McIntosh 등, Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant, Blood, 121(17):3335-44 (Feb 2013) 및 Ward 등, Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression, Blood, 117(3):798-807 (Jan 2011).

[0063] 일 구현예에서, hFVIII 유전자는, B 도메인이 결실되고 (BDD) 짧은 14 아미노산 링커 (FVIII-BDD-SQ)에 의해 대체되는 FVIII인, 서열 식별 번호: 3에서 보여진 hFVIII 단백질을 인코딩한다. 따라서, 일 구현예에서, hFVIII 이식유전자는, 비제한적으로, 본 명세서에서 참조로 편입되는, 부착된 서열 목록에서 제공되는 서열 식별 번호:1 또는 서열 식별 번호: 2에 의해 제공된 서열의 하나 이상을 포함할 수 있다. 서열 식별 번호: 1은 원상태 인간 FVIII-BDD-SQ에 cDNA를 제공한다. 서열 식별 번호: 2는, (때때로 본 명세서에서 hFVIIIco-SQ 또는 hFVIIIco-BDD-SQ로서 지칭된) 인간에 발현을 위하여 코돈 최적화된, 인간 FVIII-BDD-SQ에 조작된 cDNA를 제공한다. 본 명세서에서 hFVIII 참조가, 일부 구현예에서, hFVIII-BDD-SQ 원상태 또는 코돈 최적화된 서열을 지칭할 수 있다는 것이 이해되어야 한다. 대안적으로 또는 추가로, 웹-기반 또는 상업적으로 입수 가능한 컴퓨터 프로그램, 뿐만 아니라 서비스 기반 회사는, RNA 및/또는 cDNA 양쪽을 포함하는, 핵산 코딩 서열에 아미노산 서열을 역 번역하는데 사용될 수 있다. 참조, 예를 들면, EMBOSS, www.ebi.ac.uk/Tools/st/; Gene Infinity (www.geneinfinity.org/sms-/sms_backtranslation.html); ExPasy (www.expasy.org/tools/)에 의한 backtranseq. 기재된 hFVIII 폴리펩타이드 서열을 인코딩하는 모든 핵산이, (예를 들면, 코돈 최적화에 의해) 원하는 표적 대상체에서 발현을 위하여 최적화된 핵산 서열을 포함하여, 포괄되는 것이 의도된다. 일 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 1의 원상태 hFVIII 코딩 서열과 적어도 95% 동일성을 공유한다. 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 1의 원상태 hFVIII 코딩 서열과 적어도 90, 85, 80, 75, 70, 또는 65% 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 1의 원상태 hFVIII 코딩 서열과 약 77% 동일성을 공유한다. 일 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 2이다. 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 2의 hFVIII 코딩 서열과 적어도 99%, 97%, 95%, 90%, 85%, 80%, 75%, 70%, 또는 65% 동일성을 공유한다. 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 19이다. 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 19의 hFVIII 코딩 서열과 적어도 90, 85, 80, 75, 70, 또는 65% 동일성을 공유한다. 더욱 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 1 또는 서열 식별 번호: 2의 hFVIII 코딩 서열과 적어도 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일성을 공유한다. 더욱 또 다른 구현예에서, hFVIII을 인코딩하는 핵산 서열은 서열 식별 번호: 19의 hFVIII 코딩 서열과 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 또는 99% 동일성을 공유한다. 참조, 코돈 최적화된 변이체를 포함하는, FVIII-SQ의 다양한 변이체의 논의를 위하여 본 명세서에서 참조로 편입되는, Ward 등, Codon optimization of human factor VIII cDNAs leads to high-level expression, Blood, 117(3):798-807 (Jan 2011).

[0064] 코돈-최적화된 코딩 영역은 다양한 상이한 방법에 의해 설계될 수 있다. 이러한 최적화는 온라인 (예를 들면, GeneArt,)으로 이용가능한 방법, 공개된 방법, 또는, 예를 들면, DNA2.0 (Menlo Park, CA)같은 코돈 최적화 서비스를 제공하는 회사를 이용하여 수행될 수 있다. 하나의 코돈 최적화 접근법은, 예를 들면, 참조로 본 명세서에서 편입되는, 국제 특허 공보 번호 WO 2015/012924에서 기재된다. 또한 하기를 참조한다: 예를 들면, 미국 특허 공보 번호 2014/0032186 및 미국 특허 공보 번호 2006/0136184. 적합하게, 생성물용 열린 해독틀 (ORF)의 전체 길이는 변형된다. 그러나, 일부 구현예에서, 단지 ORF의 단편은 변경될 수 있다. 이를 방법 중 하나의 사용에 의해, 임의의 주어진 폴리펩타이드 서열에 빈도를 적용할 수 있고, 폴리펩타이드를 인코딩하는 코돈-최적화된 코딩 영역의 핵산 단편을 생산할 수 있다.

[0065] 수많은 옵션은 본 명세서에서 기재된 바와 같이 설계된 코돈-최적화된 코딩 영역 합성에 또는 코돈에의 실제 변

화 수행에 이용가능하다. 그와 같은 변형 또는 합성은 당해 분야의 숙련가에 잘 알려진 표준 및 일상적인 분자 생물학적 조작을 사용하여 수행될 수 있다. 하나의 접근법에서, 원하는 서열의 길이에 미치는 그리고 길이 80-90 뉴클레오타이드 각각의 일련의 상보적 올리고뉴클레오타이드 쌍은 표준 방법에 의해 합성된다. 이를 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링시, 이들이, 응집성 단부를 함유하는, 80-90 염기 쌍의 이중가닥 단편을 형성하는 정도로 합성되고, 예를 들면, 쌍에서 각각의 올리고뉴클레오타이드는 쌍에서 다른 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 영역을 넘어서 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 또는 초과 염기를 연장시키도록 합성된다. 올리고뉴클레오타이드의 각각의 쌍의 단일가닥 단부는 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 쌍의 단일가닥 단부와 어닐링하도록 설계된다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링하도록 허용되고, 이를 이중-가닥 단편의 대략 5 내지 6개는 그 다음 응집성 단일가닥 단부를 통해 함께 어닐링하도록 허용되고, 그 다음 이들은 함께 결찰되고 표준 박테리아 클로닝 벡터, 예를 들어, Thermo Fisher Scientific Inc.로부터 이용가능한 TOPO® 벡터 속에 클로닝된다. 작제물은 그 다음 표준 방법에 의해 서열분석된다. 함께 결찰된 80 내지 90 염기 쌍 단편, 즉, 약 500 염기 쌍의 단편의 5 내지 6 단편으로 구성되는 몇 개의 이를 작제물은, 전체 원하는 서열의 플라스미드 작제물에서 표시되는 정도로, 제조된다. 이를 플라스미드의 삽입물은 그 다음 적절한 제한 효소로 컷팅되고 함께 결찰되어 최종 작제물을 형성한다. 최종 작제물은 그 다음 표준 박테리아 클로닝 벡터 속에 클로닝되고, 서열분석된다. 추가의 방법은 숙련가에 즉시 분명할 것이다. 또한, 유전자 합성은 상업적으로 쉽게 이용가능하다.

[0066]

5.1.1.2. rAAV 벡터

hFVIII이 간에서 천연적으로 표현되기 때문에, 간에 대하여 굴성을 보여주는 AAV를 사용하는 것이 바람직하다. 일 구현예에서, 캡시드를 공급하는 AAV는 AA VRh.37이다. 또 다른 구현예에서, 캡시드를 공급하는 AAV는 AA VRh.10이다. 그러나, 간 굴성을 가진 임의의 수의 rAAV 벡터는 사용될 수 있다.

[0068]

아래, 실시예에서 기재된 특정 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 rAAVhu.37.TTR.hFVIII로서 지칭된 트랜스티레틴 프로모터의 제어 하에서 hFVIII 이식유전자를 발현시키는 AAVhu.37 벡터이다. 외부 AAV 벡터 성분은 1:1:10의 비로, 3 AAV 바이러스 단백질, VP1, VP2, 및 VP3의 60 카페로 구성되는 혈청형 hu.37, T = 1 20면체 캡시드이다. 캡시드는 단일가닥 DNA rAAV 벡터 계놈을 함유한다.

[0069]

rAAVhu.37.TTR.hFVIII 계놈은 2 AAV 역 말단 반복부 (ITRs)에 의해 측접된 hFVIII 이식유전자를 함유한다. hFVIII 이식유전자는 인핸서, 프로모터, hFVIII 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 (polyA) 신호를 포함한다. 이를 제어 서열은 hFVIII 유전자 서열에 "작동가능하게 연결된"다. 발현 카셋트는 바이러스 벡터의 생산에 사용되는 플라스미드에 조작될 수 있다.

[0070]

ITRs는 벡터 생산 동안 계놈의 복제 및 패키징을 책임지는 유전 인자이고 rAAV를 생성하도록 요구된 유일한 바이러스 시스 요소이다. AAV 바이러스 입자 속에 발현 카셋트를 패키징하도록 요구된 최소 서열은, 캡시드와 동일한 AAV 기원일 수 있는, 또는 (AAV 위형을 생산하기 위해) 상이한 AAV 기원일 수 있는, AAV 5' 및 3' ITRs이다. 일 구현예에서, AAV2로부터 ITR 서열, 또는 이의 결실된 버전 (ITR)은 사용된다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터 ITRs는 선택될 수 있다. ITRs의 공급원이 AAV2로부터이고 AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터인 경우, 수득한 벡터는 일명 위형될 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터용 발현 카셋트는 AAV 5' ITR, hFVIII 코딩 서열 및 임의의 조절 서열, 그리고 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이를 요소의 다른 배치형태는 적합할 수 있다. D-서열 및 말단 분해 부위 (trs)가 결실되는 5' ITR의 단축된 버전, 일명 ITR은 기재되어 있다. 다른 구현예에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITRs는 사용된다. 일 구현예에서, 5' ITR 서열은 서열 식별 번호: 11에서 보여진다. 일 구현예에서, 3' ITR 서열은 서열 식별 번호: 12에서 보여진다.

[0071]

hFVIII 코딩 서열의 발현은 간-특이적 프로모터로부터 유도된다. hFVIII 이식유전자의 크기 때문에, 비교적 작은 크기의 프로모터의 사용이 바람직하다. 본 명세서에서 기재된 실례가 되는 플라스미드 및 벡터는 (또한 본 명세서에서 P3으로서 지칭된) 트랜스티레틴 (TTR) 프로모터, 또는 이의 변형된 버전을 사용한다. TTR 프로모터 서열은 서열 식별 번호: 7에서 보여진다. 대안적으로, 다른 간-특이적 프로모터 예컨대, 서열이 서열 식별 번호: 8에서 보여지는, (또한 본 명세서에서 P1로서 지칭된) 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 또는 이의 단축된 버전, TBG-S1이 사용될 수 있다. 또 다른 적합한 프로모터는, 서열 식별 번호: 9에서 보여진, 알파 1 항-트립신 (A1AT), 또는 (또한 본 명세서에서 P2로서 지칭된) 거기에 변형된 버전이다. 다른 적합한 프로모터는 인간 알부민 (Miyatake 등, J. Virol., 71:5124 32 (1997)), humAlb; 및 B형 간염 바이러스 코어 프로모터, (Sandig 등, Gene Ther., 3:1002 9 (1996)을 포함한다. 참조, 예를 들면, 참조로 편입되는, The Liver Specific Gene Promoter Database, Cold Spring Harbor, rulai.sch1.edu/LSPD. 덜 요구되어도, 사용될 수 있는 다른 프로모터, 예컨대 바이러스 프로모터, 구성적 프로모터, 조절가능 프로모터 [참조, 예를 들면, WO

2011/126808 및 WO 2013/04943], 또는 생리적 단서에 반응성인 프로모터는 본 명세서에서 기재된 벡터에서 이용될 수 있다.

[0072]

일 구현예에서, 발현 제어 서열은 하나 이상의 인핸서를 포함한다. 일 구현예에서 트랜스티레틴 (enTTR) (트랜스티레틴로부터 100 bp 인핸서 서열)은 포함되고, 여기에서 서열은 서열 식별 번호: 5에서 보여진다. 참조, 본 명세서에서 참조로 편입되는, Wu 등, Molecular Therapy, 16(2):280-289, Feb. 2008. 또 다른 구현예에서, 서열 식별 번호: 4에서 보여지는, En34 인핸서 (인간 아포지질단백질 간 조절 영역으로부터 34 bp 코어 인핸서)는 포함된다. 더욱 또 다른 구현예에서, ABPS (α 1-마이크로글로불린/비쿠닌 전구체 [ABP]부터 42 bp까지 100 bp 원위 인핸서의 단축된 버전) 인핸서는 포함된다. 그와 같은 서열은 서열 식별 번호: 6에서 보여진다. 또 다른 구현예에서, 1 초과 인핸서는 존재한다. 그와 같은 조합은 본 명세서에서 기재된 임의의 인핸서의 1 초과 카페, 및/또는 인핸서의 1 초과 유형을 포함할 수 있다. 다양한 구현예에서, 인핸서는 하기 조합 중 하나에서 존재한다:

표 1: 인핸서 조합

조합명	En34	ABPS	EnTTR	순 길이 (bp)
E01	1	0	0	34
E02	0	1	0	42
E03	0	0	1	100
E04	1	1	0	76
E05	0	1	1	142
E06	1	0	1	134
E07	2	0	0	68
E08	0	2	0	84
E09	0	0	2	200
E10	1	1	1	176
E11	2	0	1	168
E12	0	2	1	184
E13	1	2	0	118
E14	2	1	0	110

[0073]

일 구현예에서, 인핸서는 하기 서열에서 조합된다: 5'-EnTTR-ABPS-En34-프로모터-3'. 또 다른 구현예에서, 인핸서는 하기 서열에서 조합된다: 5'-프로모터-EnTTR-ABPS-En34-3'. 일 구현예에서, 발현 제어 서열은 enTTR을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 발현 제어 서열은 ABPS의 2 카페 및 enTTR의 1 카페를 포함한다.

[0074]

프로모터에 더하여, 발현 카셋트 및/또는 벡터는 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 및 효율적인 RNA 처리 신호를 함유할수 있다. 그와 같은 서열은 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (polyA) 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열 (즉, Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원할 때, 인코딩된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 일 구현예에서, 폴리아데닐화 (polyA) 신호는 hFVIII mRNA 전사체의 종결을 매개하도록 포함된다. 본 명세서에서 유용한 polyA 신호는 서열 식별 번호: 10에서 보여진 크기 약 75bp인 인공 polyA (PA75)이다. 다른 적합한 polyA 서열의 예는, 기타 중에서, 예를 들면, 소 성장 호르몬, SV40, 토키 베타 글로빈, 및 TK polyA를 포함한다.

[0075]

일 구현예에서, 조절 서열은 총 rAAV 벡터 게놈이 크기 약 5 내지 약 5.5 킬로베이스인 정도로 선택된다. 또 다른 구현예에서, 조절 서열은 총 rAAV 벡터 게놈이 크기 약 5.1kb이도록 선택된다. 또 다른 구현예에서, 조절 서열은 총 rAAV 벡터 게놈이 크기 약 5.2kb이도록 선택된다. 또 다른 구현예에서, 총 rAAV 벡터 게놈은 크기 5kb 미만이다.

[0076]

일 구현예에서, 벡터 게놈은 서열 식별 번호: 13의 nt 1 내지 nt 5110이다. 일 구현예에서, 벡터 게놈은 서열 식별 번호: 14의 nt 1 내지 nt 5194이다. 일 구현예에서, 벡터 게놈은 서열 식별 번호: 15의 nt 1 내지 nt 5138이다. 또 다른 구현예에서, 벡터 게놈은 서열 식별 번호: 16의 nt 1 내지 nt 5222이다.

[0077]

5.1.2. rAAV.hFVIII 제형

일 구현예에서, rAAV.hFVIII 벡터는 수성 캐리어, 부형체, 희석제 또는 완충액을 포함하는 약제학적 조성물에서 제공된다. 일 구현예에서, 완충액은 PBS이다. 특정 구현예에서, rAAV.hFVIII 제형은 TMN200 (200 mM 염화나트륨, 1 mM 염화마그네슘, 20 mM Tris, pH 8.0)에서 0.001% 플루론산 F-68을 함유하는 수용액에 혼탁된다.

rAAV.hFVIII 벡터의 유효량을 함유하는 혼탁액이다. 그러나, 하기의 하나 이상을 포함하는 것을 포함하는 다양한 적합한 용액은 공지된다: 완충 염수, 계면활성제, 및 생리적으로 양립가능한 염 또는 약 100 mM 염화나트륨 (NaCl) 내지 약 250 mM 염화나트륨에 동등한 이온 강도로 조정된 염의 혼합물, 또는 동등한 이온성 농도로 조정된 생리적으로 양립가능한 염.

[0080]

예를 들어, 본 명세서에서 제공된 바와 같이 혼탁액은 NaCl 및 KCl을 함유할 수 있다. pH는 6.5 내지 8.5, 또는 7 내지 8.5, 또는 7.5 내지 8의 범위일 수 있다. 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합은 폴록사머 중에서, 즉, 폴리옥시에틸렌 (폴리(에틸렌 옥사이드))의 2 친수성 사슬에 의해 측접된 폴리옥시프로필렌 (폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 사슬로 구성된 비이온성 트리블록 코폴리머, SOLUTOL HS 15 (매크로골-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL (폴리옥시 카프릴성 글리세라이드), 폴리옥시 10 올레일 에테르, TWEEN (폴리옥시에틸렌 소르비탄 지방산 에스테르), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜로부터 선택될 수 있다. 일 구현예에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 코폴리머는 문자 "P" (폴록사머용) 이어서 3 숫자로 통상적으로 명명된다: 첫 2 숫자 x 100은 폴리옥시프로필렌 코어의 근사 분자량을 제공하고, 마지막 숫자 x 10은 백분율 폴리옥시에틸렌 함량을 제공한다. 일 구현예에서 폴록사머 188은 선택된다. 계면활성제는 혼탁액의 최대 약 0.0005 % 내지 약 0.001%의 양으로 존재할 수 있다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 180 mM 염화나트륨, 10 mM 인산나트륨, 0.001% 폴록사머 188, pH 7.3을 함유하는 수용액에 혼탁된다.

[0081]

일 구현예에서, 제형은 인간 대상체에서 사용에 적합하고 정맥내로 투여된다. 일 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 볼러스 주사로 전달된다. 일 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 10 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 일 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 90 분 (± 10 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 20 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 30 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 40 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 50 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 15 주변 정맥을 통해 약 60 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 70 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 또 다른 구현예에서, 제형은 주변 정맥을 통해 약 80 분 (± 5 분) 동안 주입으로 전달된다. 그러나, 이러한 시간은 필요에 따라 또는 원하는 대로 조정될 수 있다. 임의의 적합한 방법 또는 경로는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 AAV-함유 조성물을 투여하는데, 그리고 선택적으로, 본 명세서에서 기재된 hFVIII의 AAV-매개된 전달과 함께 다른 활성 약물 또는 요법을 공-투여하는데 사용될 수 있다. 투여의 경로는, 예를 들어, 전신, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안구내, 정맥내, 근육내, 피하, 진피내, 및 투여의 다른 비경구 경로를 포함한다.

[0082]

일 구현예에서, 제형은, 예를 들면, 본 명세서에서 참조로 편입되는, 예를 들면, M. Lock 등, Hum Gene Ther Methods. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14에서 기재된 바와 같이 oqPCR 또는 디지털 액적 PCR (ddPCR)에 의해 측정된 경우, 환자 체중의 킬로그램당 약 1.0×10^{11} 계놈 카페 (GC/kg) 내지 약 1×10^{14} GC/kg, 환자 체중의 킬로그램당 약 5×10^{11} 계놈 카페 (GC/kg) 내지 약 3×10^{13} GC/kg, 또는 약 1×10^{12} 내지 약 1×10^{14} GC/kg을 함유할 수 있다. 일 구현예에서, rAAV.hFVIII 제형은, 예를 들면, M. Lock 등, 상동에서 기재된 바와 같이 oqPCR 또는 디지털 액적 PCR (ddPCR)에 의해 측정된 경우, 적어도 1×10^{13} 계놈 카페 (GC)/mL, 또는 초과를 함유하는 혼탁액이다.

[0083]

비어있는 캡시드가 환자에게 투여되는 AAV.hFVIII의 용량으로부터 제거되는 것을 확보하기 위해, 비어있는 캡시드는, 예를 들면, 본 명세서에서 논의된 방법을 사용하여 벡터 정제 공정 동안 벡터 입자로부터 분리된다. 일 구현예에서, 패키징된 계놈을 함유하는 벡터 입자는, 2016년 12월 9일 출원된, 국제 특허 출원 번호 PCT/US2016/066013 및 2016년 4월 13일 출원된, 미국 특허 출원 번호 62/322,055에서 기재된, 그리고 참조로 본 명세서에서 편입되는, "Scalable Purification Method for AAVrh.10" 명칭으로 하는, 공정을 사용하여 비어 있는 캡시드로부터 정제된다. 간단히, rAAV 생산 세포 배양의 정화된, 농축된 상청액으로부터 계놈-함유 rAAV 벡터 입자를 선택적으로 포착하고 단리시키는 2-단계 정제 반응식은 기재된다. 상기 공정은 rAAV 중간체가 실질적으로 없는 rAAV 벡터 입자를 제공하기 위해 고 염 농도에서 수행된 친화성 포착 방법 이어서 고 pH에서 수행된 음이온교환수지 방법을 이용한다. 유사한 정제 방법은 AAVhu.37 기반 벡터에 사용될 수 있다. 다른 정제 방법은, 예를 들면, 미국 특허 출원 번호 62/266,347, 62/266,357, 62/322,071, 62/266,351, 62/322,083, 62/266,341, 및 62/322,098에서 기재되고, 이들 각각은 본 명세서에서 참조로 편입된다.

[0084]

임의의 종래의 제조 공정이 이용될 수 있는 한편, 본 명세서에서 (그리고 국제 특허 출원 번호

PCT/US2016/066013에서) 기재된 공정은 입자의 50 내지 70%가 벡터 게놈, 즉, 50 내지 70% 전체 입자를 갖는 벡터 제제를 산출한다. 따라서 1.6×10^{12} GC/kg의 예시적인 용량을 위하여, 그리고 총 입자 용량은 2.3×10^{12} 내지 3×10^{12} 입자일 것이다. 또 다른 구현예에서, 제안된 용량은 이분의 일 로그 더 높거나, 또는 5×10^{12} GC/kg이고, 총 입자 용량은 7.6×10^{12} 내지 1.1×10^{13} 입자일 것이다. 일 구현예에서, 제형은 1 이하, 바람직하게는 0.75 미만, 더욱 바람직하게는, 0.5, 바람직하게는 0.3 미만의 "비어있는" 대 "전체"의 비를 갖는 rAAV 스톡을 특징으로 한다.

[0085] 간단히, 일 구현예에서, 하기 단계를 포함하는, AAV 캡시드 중간체로부터 AAV 바이러스 입자의 분리 방법은 제공된다: 재조합 AAV 바이러스 입자 및 AAV 캡시드 중간체를 포함하는 혼합물을 빠른 성능 액체 크로마토그래피 처리시키는 단계, 여기서 AAV 바이러스 입자 및 AAV 중간체는 약 10.0의 pH에서 평형화된 음이온교환수지에 결합되고 약 260 및 약 280에서 자외선 흡광도용 용출물 모니터링 동안 염 구배를 거치게 되고, 여기서 AAV 전체 캡시드는 A260/A280의 비가 변곡점에 도달하는 경우 용출되는 분획으로부터 수집된다.

[0086] 일 구현예에서, 방법은 추가로 하기 단계를 포함한다: (a) 재조합 AAV 바이러스 입자 및 AAV 캡시드 중간체를 포함하는 혼탁액 그리고 20mM 내지 50 mM Bis-Tris 프로판 (BTP) 및 약 10.0의 pH를 포함하는 완충액 A를 혼합하는 단계; (b) (a)의 혼탁액을 강한 음이온교환수지 칼럼에 장입시키는 단계; (c) 약 10.0의 pH를 가진 BTP 및 10mM 내지 40 mM NaCl의 이온 강도를 갖는 염을 포함하는 완충액 1% B로 장입된 음이온교환수지를 세정하는 단계; (d) 증가하는 염 농도 구배를 장입된 및 세정된 음이온교환수지에 인가하는 단계, 여기서 상기 염 구배는 약 10 mM 내지 약 40 mM NaCl의 등가물임; 및 (e) 적어도 70 mM NaCl에 동등한 염 농도에서 수득된 용출물로부터 rAAV 입자를 수득하는 단계, 여기에서 상기 rAAV 입자는 AAV 중간체로부터 적어도 약 90% 정제됨. 일 구현예에서, 이것은 게놈 카페에 의해 결정된다.

[0087] 일 구현예에서, 중간체는 염 농도가 약 50 mM NaCl 초과의 등가물인 경우 음이온교환수지로부터 용출된다. 또한 추가의 구현예에서, 완충액 A는 완충액 B를 형성 또는 제조하기 위해 1M의 최종 농도로 NaCl과 추가로 혼합된다. 더욱 또 다른 구현예에서, 염 구배는 10 mM 내지 약 190 mM NaCl에 동등한 이온 강도를 갖는다. 용출 구배는 1% 완충액 B 내지 약 19% 완충액 B일 수 있다. 선택적으로, 음이온교환수지를 함유하는 용기는 모놀리스 칼럼이고 여기에서 완충액 A, 완충액 B, 및 염 구배는 약 60 칼럼 용적내이다.

[0088] rAAV 입자 (패키징된 게놈)의 스톡 또는 제제는 스톡에서 rAAV 입자가 스톡에서 rAAV 의 적어도 약 75% 내지 약 100%, 적어도 약 80%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 또는 적어도 99%이고 "비어있는 캡시드" 가 스톡 또는 제제에서 rAAV의 약 1% 미만, 약 5% 미만, 약 10% 미만, 약 15% 미만인 경우 AAV 비어있는 캡시드 (및 다른 중간체)가 "실질적으로 없다".

[0089] 추가 구현예에서, rAAV 입자의 평균 수율은 적어도 약 70%이다. 이것은 칼럼 속에 장입된 혼합물에서 역가 (게놈 카페) 그리고 최종 용출에서 양 존재 결정에 의해 계산될 수 있다. 또한, 이들은 q-PCR 분석 및/또는 SDS-PAGE 기술 예컨대 본 명세서에서 기재된 것 또는 당해 분야에서 기재된 것에 기반하여 결정될 수 있다.

[0090] 예를 들어, 비어있는 및 전체 입자 함량을 계산하기 위해, 선택된 샘플 (예를 들면, GC의 # = 입자의 #인 경우 아이오닉사놀 구배-정제된 제제)용 VP3 밴드 용적은 장입된 GC 입자에 대해 플롯팅된다. 수득한 선형 방정식 ($y = mx + c$)는 시험품 피크의 밴드 용적에서 입자의 수를 계산하는데 사용된다. 장입된 20 μ L당 입자 (pt)의 수는 그 다음 50 곱셈되어 입자 (pt)/mL를 제공한다. GC/mL로 나누어 Pt/mL은 입자 대 게놈 카페 (pt/GC)의 비를 제공한다. Pt/mL-GC/mL은 비어있는 pt/mL을 제공한다. pt/mL로 나누어 Pt/mL은 그리고 x 100의 비어있는 pt/mL은 비어있는 입자의 백분율을 제공한다.

[0091] 일반적으로, 패키징된 게놈으로 비어있는 캡시드 및 AAV 벡터 입자의 검정 방법은 당해 분야에서 공지되어 왔다. 참조, 예를 들면, Grimm 등, *Gene Therapy* (1999) 6:1322-1330; Sommer 등, *Molec. Ther.* (2003) 7:122-128. 변성된 캡시드에 대하여 시험하기 위해, 상기 방법은, 3 캡시드 단백질을 분리시킬 수 있는 임의의 젤, 예를 들어, 완충액에서 3-8% 트리스-아세테이트를 함유하는 구배 젤로 구성되는, 처리된 AAV 스톡을 SDS-폴리아크릴아미드 젤 전기영동에 적용시키는 단계, 그 다음 샘플 물질이 분리되는 때까지 상기 젤을 운영하는 단계, 및 나일론 또는 니트로셀룰로스 막, 바람직하게는 나일론에서 상기 젤을 블랏팅하는 단계를 포함한다. 항-AAV 캡시드 항체는 그 다음 변성된 캡시드 단백질에 결합하는 1차 항체, 바람직하게는 항-AAV 캡시드 단클론성 항체, 가장 바람직하게는 B1 항-AAV-2 단클론성 항체로서 사용된다 (Wobus 등, *J. Virol.* (2000) 74:9281-9293). 1차 항체에 결합하는 그리고 1차 항체, 더욱 바람직하게는 그것에 공유결합된 검출 분자를 함유하는 항-IgG 항체, 가장 바람직하게는 홀스래디쉬 폐록시다아제에 공유결합된 양 항-마우스 IgG 항체와 결합 검출용 수

단을 함유하는 것인, 2차 항체는 그 다음 사용된다. 결합 검출 방법, 바람직하게는 방사성 동위원소 방출, 전자기 방사선, 또는 비색계 변화를 검출할 수 있는 검출 방법, 가장 바람직하게는 화학발광검출 키트는 1차와 2차 항체 사이 결합을 세미-정량적으로 결정하는데 사용된다. 예를 들어, SDS-PAGE를 위하여, 칼럼 분획으로부터 샘플은 얻을 수 있고 환원제 (예를 들면, DTT)를 함유하는 SDS-PAGE 장입 완충액에서 가열될 수 있고, 캡시드 단백질은 사전-성형 구배 폴리아실아미드 젤 (예를 들면, Novex)에서 분해되었다. 은 염색은 제조자의 지침에 따라 SilverXpress (Invitrogen, CA)를 사용하여 수행될 수 있다. 일 구현예에서, 칼럼 분획에서 AAV 벡터 게놈 (vg)의 농도는 정량적 실시간 PCR (Q-PCR)로 측정될 수 있다. 샘플은 희석되고 DNase I (또는 또 다른 적합한 뉴클레아제)로 소화되어 외인성 DNA를 제거한다. 뉴클레아제의 불활성화 후, 샘플은 추가로 희석되고 프라이머 사이 DNA 서열에 특이적인 TaqMan™ 플루오로제닉 탐침 및 프라이머를 사용하여 증폭된다. 형광의 정의된 수준을 달성하는데 요구된 사이클의 수 (역치 사이클, Ct)는 각각의 샘플에 대하여 Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection System에서 측정된다. AAV 벡터에서 함유된 것에 동일한 서열을 함유하는 플라스미드 DNA는 Q-PCR 반응에서 표준 곡선을 생성하는데 이용된다. 샘플로부터 수득된 사이클 역치 (Ct) 값은 플라스미드 표준 곡선의 Ct 값으로 이것의 정상화에 의해 벡터 게놈 역가를 결정하는데 사용된다. 디지털 PCR에 기반된 종점 검정은 또한 사용될 수 있다.

[0092] 일 측면에서, 광범위 스펙트럼 세린 프로테아제, 예를 들면, (예컨대 Qiagen으로부터 상업적으로 입수가능한) 프로테이나제 K를 이용하는 최적화된 q-PCR 방법은 본 명세서에서 제공된다. 더 상세하게는, 최적화된 qPCR 게놈 역가 검정은 표준 검정과 유사하고, 단, DNase I 소화 후, 샘플은 프로테이나제 K 완충액으로 희석되고 프로테이나제 K 이어서 열 불활성화로 처리된다. 적합하게 샘플은 샘플 크기와 똑같은 양으로 프로테이나제 K 완충액으로 희석된다. 프로테이나제 K 완충액은 2 배 이상으로 농축될 수 있다. 전형적으로, 프로테이나제 K 처리는 약 0.2 mg/mL이지만, 0.1 mg/mL 내지 약 1 mg/mL 다양할 수 있다. 처리 단계는 약 15 분 동안 약 55 °C에서 일 반적으로 수행되지만, 더 긴 기간 (예를 들면, 약 20 분 내지 약 30 분) 동안 저온 (예를 들면, 약 37 °C 내지 약 50 °C)에서, 또는 더 짧은 기간 (예를 들면, 약 5 내지 10 분) 동안 더 높은 온도 (예를 들면, 최대 약 60 °C)에서 수행될 수 있다. 유사하게, 열 불활성화는 일반적으로 약 15 분 동안 약 95 °C이지만, 온도는 낮아질 수 있고 (예를 들면, 약 70 내지 약 90 °C) 시간은 연장될 수 있다 (예를 들면, 약 20 분 내지 약 30 분). 샘플은 그 다음 (예를 들면, 1000 배) 희석되고 표준 검정에서 기재된 바와 같이 TaqMan 분석을 거친다.

[0093] 추가로, 또는 대안적으로, 액적 디지털 PCR (ddPCR)은 사용될 수 있다. 예를 들어, ddPCR에 의한 단일가닥 및 자기-상보적 AAV 벡터 게놈 역가의 결정 방법은 기재되어 있다. 참조, 예를 들면, M. Lock 등, *Hu Gene Therapy Methods*, *Hum Gene Ther Methods*. 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14.

5.1.3 제조

[0095] rAAV.hFVIII 벡터는 도 13에서 보여진 흐름 선도에서 나타낸 바와 같이 제조될 수 있다. 간단히, 세포 (예를 들면 HEK 293 세포)는 적합한 세포 배양 시스템에서 번식되고 벡터 생성을 위하여 형질감염된다. rAAV.hFVIII 벡터는 그 다음 수확, 농축 및 정제되어 그 다음 다운스트림 공정에서 채워지고 완성되는 벌크 벡터를 제조할 수 있다.

[0096] 본 명세서에서 기재된 유전자 요법 벡터의 제조 방법은 당해 분야에서 잘 알려진 방법 예컨대 유전자 요법 벡터의 생산, 벡터의 생성, 및 벡터의 정제에 사용된 플라스미드 DNA의 생성을 포함한다. 일부 구현예에서, 유전자 요법 벡터는 AAV 벡터이고 생성된 플라스미드는 관심 유전자 및 AAV 게놈을 인코딩하는 AAV 시스-플라스미드, AAV rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 트랜스-플라스미드, 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드이다. 벡터 생성 공정은 방법 단계 예컨대 세포 배양의 개시, 세포의 통과, 세포의 씨딩, 플라스미드 DNA로 세포의 형질감염, 무 혈청 배지로 형질감염후 배지 교환, 및 벡터-함유 세포 및 배양 배지의 수확을 포함할 수 있다. 수확된 벡터-함유 세포 및 배양 배지는 본 명세서에서 조 세포 수확으로서 지칭된다.

[0097] 조 세포 수확은 그 후에 방법 단계 예컨대 벡터 수확의 농축, 벡터 수확의 정용여과, 벡터 수확의 마이크로유동화, 벡터 수확의 뉴클레아제 소화, 마이크로유동화된 중간체의 여과, 크로마토그래피에 의한 정제, 초원심분리에 의한 정제, 접선 유동 여과에 의한 완충액 교환, 및 제형 및 여과를 거쳐서 벌크 벡터를 제조할 수 있다.

[0098] 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 서열 식별 번호: 13에서 보여진 것이다. 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 서열 식별 번호: 14에서 보여진 것이다. 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 서열 식별 번호: 15에서 보여진 것이다. 일 구현예에서, 생산 플라스미드는 서열 식별 번호: 16에서 보여진 것이다.

[0099] 특정 구현예에서, 유전자 요법 벡터의 제조에 사용된 방법은 아래, 부문 8에서 기재된다.

5.2 환자 모집단

[0100] 중증 또는 중간 정도 혈우병 A (HemA) 환자는 몇 개의 이유로 선택된 연구 모집단이다. 중증 혈우병 A 환자는 정상 인자 VIII (FVIII) 활성의 1% 미만을 갖는 따라서 그것의 출혈 체질을 제어하기 위해 FVIII의 빈번한 주입을 요구하는 것으로서 정의된다. 이것은 정상 생활에서 운반에 관하여 상당한 부하를 나타내고 또한, FVIII의 혈액 수준은, 최적이 아닌, 공지된 피크 및 골 패턴을 경험하게 한다. 중증 환자에서 FVIII 혈액 수준이 1% 미만이라는 사실은 rAAV.hVIII이 투여된 후 FVIII 혈액 수준에서 심지어 낮은 내지 보통의 증가를 신뢰할 수 있게 측정하는 것을 가능하게 한다. 최근 임상시험은 이러한 접근법의 유효성을 실증하였다. 중간 정도 HemA 환자는 혈액에서 FVIII 수준의 1% 내지 최대 5%를 갖는 것으로서 정의된다.

[0101] 치료용 후보인 환자는 바람직하게는, 중간 정도/중증 또는 중증 혈우병 A로 진단된, ≥ 18 세 연령의 성인 남성이다. 일 구현예에서, 환자는 정상의 기준선 FVIII 활성 $\leq 2\%$ 또는 FVIII 활성 $\leq 2\%$ 의 문서로 기록된 이력을 갖는다. 일부 구현예에서, < 18 세 연령의 환자는 치료될 수 있다. 치료용 후보는 FVIII로 주문식 치료를 요구하는 해마다 적어도 3 출혈 에피소드를 갖는 대상체를 포함한다. 치료용 다른 후보는 FVIII의 예방적 레지멘으로 치료되는 대상체를 포함한다. 대상체가 치료에 적절한지를 입증하는 다른 기준은 FVIII에 적어도 100 일 노출 이력; 외인성 FVIII에 억제제 (중화 항체)의 문서로 기록된 이력 없음; 외인성 FVIII에 공지된 알러지성 반응 또는 rAAV.FVIII 벡터 조성물의 임의의 성분 없음을 포함한다.

[0102] 치료에 앞서, 혈우병 A 환자는 hFVIII 유전자 (예를 들어, AAVhu.37 또는 AAVrh.10)을 전달하는데 사용된 AAV 혈청형에 대한 NAb에 대하여 평가될 수 있다. 그와 같은 NAb는 형질도입 효율을 방해할 수 있고 치료제 효능을 감소시킬 수 있다. 기준선 혈청 NAb 역가 $\leq 1:5$ 를 갖는 혈우병 A 환자는 rAAV.hFVIII 유전자 요법 프로토콜로 치료를 위한 양호한 후보이다.

[0103] 대상체는 그것의 관리 의사의 재량에서 유전자 요법 치료와 동시에 그리고 치료에 앞서 그것의 관리 기준 치료 (들) (예를 들면, 재조합 FVIII 요법)을 계속하도록 허용될 수 있다. 대안으로, 의사는 유전자 요법 치료 투여에 앞서 관리 기준 요법을 면추는 것 그리고, 선택적으로, 유전자 요법의 투여 후 공-요법으로서 관리 기준 치료를 재개하는 것을 선호할 수 있다.

[0104] 유전자 요법 레지멘의 바람직한 종점은 기준선부터 유전자 요법의 투여 후 최대 52 주까지 정상의 3%로 FVIII 활성에서 증가이다. 일 구현예에서, 환자는, 부속 치료의 사용과 조합으로 및/또는 단독으로, rAAV.hFVIII로 치료 후 원하는 순환 FVIII 수준 (예를 들면, 5% 또는 초과)를 달성한다. 또 다른 구현예에서, 환자는, 부속 치료의 사용과 조합으로 및/또는 단독으로, rAAV.hFVIII로 치료 후 10%, 15%, 20% 또는 초과의 순환 FVIII 수준을 달성한다. 또 다른 구현예에서, 환자는, 부속 치료의 사용과 조합으로 및/또는 단독으로, rAAV.hFVIII로 치료 후 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 95%, 95% 또는 초과의 순환 FVIII 수준을 달성한다.

[0105] 그럼에도 불구하고, 하기 특징의 하나 이상을 갖는 환자는 그것의 관리 의사의 재량에서 치료로부터 배제될 수 있다:

[0106] 1. 상당한 간 질환의 이력 (즉, 관문 고혈압).

[0107] 2. 상당한 간 염증 또는 간경변.

[0108] 3. 활동 B형 간염 바이러스 (HBV) 또는 C형 간염 바이러스 (HCV) 감염의 증거.

[0109] 4. 인간 면역결핍 바이러스 (HIV) 감염 및 임의의 하기의 이력: CD4+ 세포수 < 350 세포/ mm^3 , 0 일째에 앞서 6 개월 내에 항레트로바이러스 요법 레지멘에서 변화, 또는 PCR에 의해 측정된 바와 같이, 2 별개의 경우에서, 혈장 바이러스 장입 > 200 카피/ ml .

[0110] 5. 항-AAVhu.37 (또는 항-AAVrh10, 적절한 경우) 중화 항체 역가 $> 1:5$ 또는 $\geq 1:10$.

[0111] 6. 또 다른 유전자 요법 연구에서 (현행 또는 이전의) 참여.

[0112] 7. 스크리닝 전 3 개월 내에 또 다른 조사적인 의약 연구에서 참여.

[0113] 다른 구현예에서, 관리 의사은 이들 물리적 특징 (병력)의 하나 이상의 존재가 본 명세서에서 제공된 바와 같이 치료를 배제할 수 없다는 것을 결정할 수 있다.

5.3. 투약 & 투여의 경로

- [0116] 일 구현예에서, rAAV.hFVIII 벡터는 환자당 단일 용량으로서 전달된다. 또 다른 구현예에서, rAAV.hFVIII 벡터는 환자당 다중 용량으로서 전달된다. 추가 구현예에서, rAAV.hFVIII 벡터는 환자당 2 용량으로서 전달된다. 일 구현예에서, 대상체는 (본 명세서에서 실시예에서 기재된 전임상 연구에 의해 결정된 바와 같이) 최소 효과적인 용량 (MED)로 전달된다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, MED는 정상 인자 VIII 활성의 5%를 달성하도록 요구된 rAAV.hFVIII 용량을 지칭한다.
- [0117] 종래와 같이, 벡터 역가는 벡터 제제의 DNA 함량을 기준으로 결정된다. 일 구현예에서, 실시예에서 기재된 바와 같이 정량적 PCR 또는 최적화된 정량적 PCR은 rAAV.hFVIII 벡터 제제의 DNA 함량을 결정하는데 사용된다. 일 구현예에서, 실시예에서 기재된 바와 같이 디지털 액적 PCR은 rAAV.hFVIII 벡터 제제의 DNA 함량을 결정하는데 사용된다. 일 구현예에서, 투약량은, 종점을 포괄하는, 약 1×10^{11} 개놈 카피 (GC)/kg 체중 내지 약 1×10^{13} GC/kg이다. 일 구현예에서, 투약량은 5×10^{11} GC/kg이다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 5×10^{12} GC/kg이다. 특정 구현예에서, 환자에게 투여된 rAAV.hFVIII의 용량은 적어도 5×10^{11} GC/kg, 1×10^{12} GC/kg, 1.5×10^{12} GC/kg, 2.0×10^{12} GC/kg, 2.5×10^{12} GC/kg, 3.0×10^{12} GC/kg, 3.5×10^{12} GC/kg, 4.0×10^{12} GC/kg, 4.5×10^{12} GC/kg, 5.0×10^{12} GC/kg, 5.5×10^{12} GC/kg, 6.0×10^{12} GC/kg, 6.5×10^{12} GC/kg, 7.0×10^{12} GC/kg, 또는 7.5×10^{12} GC/kg이다. 또한, 복제-불량성 바이러스 조성물은 약 1.0×10^9 GC 내지 약 1.0×10^{15} GC의 범위인 복제-불량성 바이러스의 양을 함유하도록 투약량 단위로 제형화될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "투약량"은 치료의 과정에서 대상체에 전달된 총 투약량, 또는 단일 (다중의) 투여에서 전달된 양을 지칭할 수 있다.
- [0118] 또 다른 구현예에서, 조성물은 나중 일자에 재투여된다. 선택적으로, 1 초과 재투여는 허용된다. 그와 같은 재투여는 본 명세서에서 기재된 바와 같이 상이한 바이러스 벡터 또는 동일한 유형의 벡터와 함께일 수 있다. 일 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 6 개월 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 1 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 2 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 3 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 4 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 5 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 6 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 7 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 8 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 9 년 재투여된다. 또 다른 구현예에서, 벡터는 제1 투여후 약 10 년 또는 초과 재투여된다.
- [0119] 일 구현예에서, 투약량은 정상의 1%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 일 구현예에서, 투약량은 정상의 2%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 일 구현예에서, 투약량은 정상의 3%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 4%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 5%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95% 또는 초과로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다.
- [0120] 일부 구현예에서, rAAV.hFVIII은 혈우병 A의 치료용 하나 이상의 요법, 예컨대 재조합 FVIII의 투여와 조합으로 투여된다.
- [0121] **5.4. 임상 목적 측정**
- [0122] 치료의 효능의 측정은 혈장 인자 VIII 수준 및 인자 VIII 활성에 의해 결정된 바와 같이 이식유전자 발현 및 활성에 의해 측정될 수 있다. 효능의 추가 평가는 자발적인 출혈 애피소드의 대체 인자 VIII 요건 및 빈도의 임상 평가에 의해 결정될 수 있다. 그와 같은 평가는 생성물의 투여 후 4 주 동안 1주 2회, 6 주째 내지 12 주째 매주, 첫해의 나머지에 걸쳐 매월 그리고 5 년의 총 기간 동안 6 개월 간격에서 수행될 수 있다.
- [0123] 투여 후 유전자 요법 벡터의 안전성은 유해 사례의 수, 물리적 시험에서 언급된 변화, 및/또는 벡터 투여 이후 최대 약 52 주 다중 시점에서 평가된 임상 실험실 파라미터에 의해 평가될 수 있다. 생리적 효과가 초기, 예를 들면, 약 1 주 지나서 관측될 수 있어도, 일 구현예에서, 정상 상태 수준 발현 수준은 약 12 주만큼 도달된다. 하기 평가는 생성물의 투여 후 4 주 동안 1주 2회, 6 주째 내지 12 주째 매주, 첫해의 나머지에 걸쳐 매월 그리고 5 년의 총 기간 동안 6 개월 간격에서 수행될 수 있다. 그와 같은 평가는 하기를 포함한다:
- [0124] a. 물리적 시험

- [0125] b. ECG
- [0126] c. 생화학적 평가: 혈청 전해질, BUN, 크레아티닌, 칼슘, 포스페이트, 총 단백질, 알부민, LDH, CPK, AST, ALT, 알칼리성 포스파타제, 빌리루빈
- [0127] d. 혈액 평가: CBC 및 차별적인, 응고 프로파일
- [0128] e. 요검사
- [0129] f. 면역학적 평가:
- [0130] g. hu.37 캡시드에 대한 (또는 rh.10 캡시드, 적절한 경우) 및 인자 VIII에 대한 혈청학적 반응
- [0131] h. hu.37 캡시드 (또는 rh.10 캡시드, 적절한 경우) 및 인자 VIII 항원에 대한 T 세포 반응
- [0132] i. 벡터 DNA의 평가; 혈장, 소변 및 타액에서 qPCR 측정.
- [0133] rAAV.hFVIII 투여로 달성된 hFVIII 증가는, 혈우병 A를 갖지 않는 환자의 hFVIII 수준, 즉, 약 100%의 소위 정상 hFVIII 수준에 비교된, 약 12 주에, 또는 다른 원하는 시점에 hFVIII에서 정의된 퍼센트 변화로서 평가될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 변화는 환자의 기준선 hFVIII 수준에 비교된다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 정상의 3%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 원하는 효능은 정상의 4%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 정상의 5%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 정상의 6%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 정상의 7%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 일 구현예에서, 원하는 효능은 정상의 8%로 환자에서 인자 VIII 수준에서의 증가이다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 10%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 15%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 또 다른 구현예에서, 투약량은 정상의 20%로 환자에서 인자 VIII 수준을 증가시키는데 충분하다. 일 구현예에서, 응고 패널은 FVIII 활성을 추론하기 위해 표준 시험의 일부로서 수행된다.
- [0134] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, rAAV.hFVIII 벡터는 본 명세서에서 환자가 이를 임상 종점의 적어도 하나를 달성하기 위해 FVIII의 충분한 수준을 발현시키는 경우 환자 불량성 FVIII를 활성 FVIII로 "기능적으로 대체한다" 또는 "기능적으로 보충한다". 비-혈우병 환자에서 정상 야생형 임상 종점 수준의 약 1% 내지 100% 미만만큼 낮게 달성하는 hFVIII의 발현 수준은 기능적 대체를 제공할 수 있다.
- [0135] 일 구현예에서, 발현은 투약후 약 8 시간 내지 약 24 시간만큼 일찍 관측될 수 있다. 상기 기재된 하나 이상의 원하는 임상 효과는 투약후 몇일 내지 몇주 내에 관측될 수 있다.
- [0136] 장기간 (최대 260 주) 안전성 및 효능은 rAAV.hFVIII 투여후 평가될 수 있다.
- [0137] 일 측면에서, 인간 환자에 hFVIII 유전자 생성물의 전달용 레지멘은 제공된다. 상기 레지멘은 (a) 본 명세서에서 기재된 바와 같이 발현 카셋트를 포함하는 제1 rAAV.hFVIII 벡터의 전달; 및 (b) 본 명세서에서 기재된 바와 같이 발현 카셋트를 포함하는 제2 rAAV.hFVIII 벡터의 전달을 포함하고, 여기서 제1 재조합 AAV 벡터 또는 제2 AAV 벡터는 AAV3B 캡시드를 갖는다. AAV3B의 서열은 서열 식별 번호: 20 및 수탁 번호 AAB95452.1에서 보여진다. 일 구현예에서, 제1 또는 제2 AAV 벡터의 다른 것은 rh.10 캡시드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 제1 또는 제2 AAV 벡터의 다른 것은 AAIVhu.37 캡시드를 갖는다. 그와 같은 레지멘은, 본 명세서에서 참조로 편입되는, 국제 특허 출원 번호 PCT/US16/42472에서 기재된다.
- [0138] 본 명세서에서 기재된 바이러스 벡터는 필요로 하는 대상체 (예를 들면, 인간 환자)에게 hFVIII 전달을 위한 약제의 제조, 대상체에 기능적 hFVIII의 공급, 및/또는 혈우병 A 질환 치료에 사용될 수 있다.
- [0139] 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 rAAV.hFIII 벡터는 혈우병 A 치료에서 사용을 위하여 제공된다. 일 구현예에서, 각종 용량은 혈우병 A 치료에서 사용을 위하여 제공된다. 또 다른 측면에서, 본 명세서에서 기재된 바와 같이 rAAV.hFIII 벡터는 혈우병 A 치료용 약제의 제조를 위하여 제공된다.
- [0140] 일 구현예에서, rAAV.hFVIII 벡터의 제2 투여가 주어진다. 일 구현예에서, 제2 투여의 rAAV.hFVIII 벡터는 제1 투약량으로 제공된 것과 동일한 AAV 캡시드를 갖는다. 일 구현예에서, 제2 투여의 rAAV.hFVIII 벡터는 AAIVrh.10 캡시드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, 제2 투여의 rAAV.hFVIII 벡터는 제1 용량의 벡터와 상이한 AAV 캡시드를 갖는다. 일 구현예에서, 제2 투여의 rAAV.hFVIII 벡터는 간에 대하여 굴성을 갖는다. 일 구현예에서, 제2 투여

의 rAAV.hFVIII 벡터는 AAV3B 캡시드를 갖는다.

[0141] 추가 측면에서, 본 발명은 환자의 간세포 표적화를 포함한다.

[0142] 일 측면에서, 제1 rAAV 및 제2 rAAV의 전달은 적어도 약 1 개월, 적어도 약 3 개월, 또는 약 1 년 내지 약 10 년만큼 일시적으로 분리된다.

[0143] 하기 실시예는 단지 실례가 되고 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다.

실시예

6. 실시예 1: 전임상 시험

6.1 hFVIII 벡터

[0147] 인간 인자 FIX (hFIX)와 달리, hFVIII용 cDNA는 훨씬 더 크고 표준 AAV 개놈 속에 이러한 이식유전자를 맞춤화하기 위해 실시되도록 조정이 필요하다. B 도메인 결실된 (BDD) hFVIII 이식유전자가 1457 아미노산임에 따라 그리고 전사를 위하여 다른 필요한 요소의 봉입체와 함께, AAV 벡터는 여전히 그것의 팩킹 수용력의 한계이다. 따라서, 이식유전자 발현 제어 요소를 포함하는, 다른 요소의 크기를 감소시키기 위해 조치가 취해져야 했다.

[0148] 요소의 크기를 유지하면서 간에 hFVIII의 발현을 제한하기 위해 가능한한 작은 몇 개의 강한 간-특이적 프로모터는, 42 인핸서/프로모터 조합을 생성하기 위해, 최대 3 간-특이적 인핸서 서열의 조합으로, 단축 및 조합되었다. 이식유전자의 hFVIII 활성 및 면역원성은 AAV 벡터의 투여 이후 FVIII KO 마우스에서 평가되었다.

6.1.1 전-임상 시험용 AAV 벡터 생산

[0150] 42 플라스미드는 인핸서/프로모터 조합 중 하나를 함유하여 생성되었다. 14 인핸서 조합은 3 인핸서 서열; En34 (인간 아포지질단백질 간 조절 영역으로부터 34 bp 코어 인핸서), ABPS (α1-마이크로글로불린/비쿠닌 전구체 [ABP]부터 42 bp까지 100 bp 원위 인핸서의 단축된 버전), 및 EnTTR (트랜스티레틴으로부터 100 bp 인핸서 서열)을 사용하여 생성되었다. 인핸서 조합의 수는 총 ITR-ITR 크기 때문에 그리고 하기 서열: 5'-EnTTR-ABPS-En34-프로모터-3'. 표 1에서 인핸서의 조합에 의해 제한되었다. 각각의 14 인핸서 조합은 3 프로모터; TBG-S1 (P1, 간-특이적 티록신 결합 글로불린 또는 TBG 프로모터의 단축된 버전), A1AT (P2, 변형된 SERINA1 [α1-항트립신] 프로모터), 및 TTR (P3, 트랜스티레틴 프로모터) 중 하나의 업스트림 삽입되었다. 수득한 작제물은 B 도메인이 결실되고 짧은 14 아미노산 링커, hFVIIIco-SQ (서열 식별 번호: 2)에 의해 대체되는 인간 인자 VIII 단백질의 코돈-최적화된 버전을 발현시키도록 설계되었다.

[0151] 모든 AAV 벡터는, 본 명세서에서 참조로 편입되는, Gao G, Lu Y, Calcedo R, 등 *Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates*. *Mol Ther.* 2006;13(1):77-87에서 기재된 바와 같이 생산되었다. 간단히, 42 인핸서/프로모터 조합 중 하나로부터 hFVIII를 발현시키는 플라스미드는 AAVrh10 바이러스 캡시드로 패키징되었다. E06.TTR로부터 hFVIII를 발현시키는 플라스미드는 AAV8, AAV9, AAVhu37, 및 AAVrh64R1 바이러스 캡시드에서 또한 패키징되었다.

6.1.2 벡터의 SDS-PAGE 분석

[0153] 연구에서 사용된 AAVrh10 인핸서/프로모터 조합 벡터 로트는, 본 명세서에서 참조로 편입되는, Lock M, Alvira M, Vandenberghe LH, 등. *Rapid, simple, and versatile manufacturing of recombinant adeno-associated viral vectors at scale*. *Hum Gene Ther.* 2010;21(10):1259-1271에서 기재된 바와 같이 나트륨 도데실 세페이트-폴리아크릴아미드 젤 전기영동 (SDS-PAGE)에 의해 순도 평가를 거쳤다. 간단히, 5×10^9 GC를 함유하는 변성된 및 감소된 벡터 샘플은 SDS-PAGE를 위하여 장입되었다. 단백질은 고착 이후 SYPRO 루비 엘룩 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 의해 염색되었고, 시각화되었고, 그 다음 Syngene 이미지형성 분석 시스템 및 GeneTool 소프트웨어 (Syngene, Frederick, MD)를 사용하여 정량화되었다. 캡시드 (총 단백질에 대해 지시된 VP1, VP2, 및 VP3 단백질)의 퍼센트 순도는 계산되었다. 42 벡터의 백분율 순도는, 90%의 평균 순도 (데이터 도시되지 않음)로, 29% (AAVrh10.E12.P3) 내지 100% 범위이었다.

6.1.3 마우스

[0155] FVIII KO 마우스의 교배 쌍은 The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA)로부터 수득되었고 콜로니는 특정 무병원체 조건 하에서 하우징된 University of Pennsylvania's Translation Research Laboratories에서 유지되었다. 모든 동물 절차 및 프로토콜은 펜실베니아 대학교의 실험 동물 운영 위원회 (IACUC)에 의해 승인되었다.

6-12 주령에서 숫컷 FVIII KO는 꼬리 정맥 속에 마우스당 백터의 10^{10} GC로 IV 주사되었다. 백터는 포스페이트 완충 식염수 (PBS)에서 희석되었고 100 μ l의 백터 희석액은 주사되었다. 혈장은 시트르산나트륨 수집관 속에 안 와후 채혈에 의해 격주로 수집되었다.

[0156] 6.1.4 hFVIII 활성의 결정

hFVIII 활성은 제조자의 프로토콜 (DiaPharma, OH, USA)에 따라 COATEST SP4 키트에 의해 혈장에서 측정되었다. 주사후 2 주째에, 마우스는 0.12 - 2.12 IU/ml의 hFVIII 활성에서 거대한 범위를 보여주었다 (도 5).

[0158] 5 작제물은 나머지; E03.TTR, E05.A1AT, E05.TTR, E06.TTR, 및 E12.A1AT에 대해 상당히 증가된 활성 수준을 실증하였다 (도 5A). 2 주째에 보여진 hFVIII 활성 수준에서 변화는 이식유전자에 항체의 생성에 앞섰다 (도 5B). 따라서, 활성 수준에서 작제물-의존적 유의차가 있었다.

[0159] 6.1.5 마우스 혈장에서 항-hFVIII IgG의 검출

마우스 혈장에서 hFVIII에 대한 IgG 항체는 ELISA에 의해 측정되었고, 모든 시약은 달리 언급되지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)제이었다. ELISA 플레이트는 0.1 M 카보네이트 완충액 (pH 9.6)내 1 μ g/ml BDD-hFVIII-SQ (Xyntha, Wyeth Pharmaceuticals Inc., Dallas, TX, USA)로 코팅되었고 4°C에서 밤새 인큐베이션되었다. 웰들은 PBS내 0.05% Tween 20으로 5회 세정되었고 실온에서 1시간 동안 PBS에서 5% 탈지유 (Bio Rad, Hercules, CA, USA)로 차단되었다. 차단 완충액의 제거 이후, 5% 탈지유에서 희석된 혈장 샘플은 플레이트에 첨가되었고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 미접촉 마우스로부터 혈장 샘플은 대조군으로서 사용되었다. 플레이트는 그 다음 5회 세정되었고 HRP-접합된 항-마우스 IgG는 탈지유에서 1:1000 희석으로 첨가되었다. 90 분 동안 실온에서 인큐베이션 이후, 플레이트는 8회 세정되었고 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)는 검출을 위하여 첨가되었다. 반응은 2N 황산을 사용하여 실온에서 5 분후 중단되었고 플레이트는 BioTek μ Quant 플레이트 리더 (Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 판독되었다.

[0161] FVIII KO 마우스는 백터 투여후 4 주째에 hFVIII에 대한 항체 생성을 보여주었고 8 주째까지 대부분의 42 백터 그룹에서 마우스는 hFVIII 활성 수준에서 상응하는 감소와 검출가능한 항-hFVIII IgG 수준을 가졌다 (도 6). 역사에 의해 정량화된 hFVIII 활성 및 항체 생성의 시간 경과는 도 7 및 8, 각각에서 나타난다. 작제물 E05.A1AT, E10.A1AT, 및 E06 인핸서 조합을 가진 모든 프로모터로 주사된 마우스의 50% 초과는 8 주까지 이식유전자에 항체를 가졌다. 그러나, 이식유전자에 항체는 모든 그룹에서 보여지지 않았다. 42 백터 그룹 중 6 (E11.TTR, E13.TBG-S1, E13.A1AT, 및 E01을 사용하는 모든 작제물)에 대하여, hFVIII 항체는 8 주째에 검출되지 않았고 (도 6) 2 그룹은 12 주 연구의 지속기간 내내 검출가능한 항체 (E01.A1AT 및 E11.TTR)를 갖지 않았다. hFVIII에 항체의 생성을 위한 사례 분석까지 시간은 또한 수행되었다. 발현을 위하여 E01.A1AT, E11.TTR, E01.TBG-S1, E11.A1AT, 및 E13.TBG-S1을 사용하는 백터로 주사된 마우스는 항체 발현에 가장 긴 시간을 가졌고, 반면에 E06.TTR, E06.A1AT, E05.A1AT, E09.TBG-S1, 및 E14.TTR를 함유하는 작제물은 항체 발현에 가장 짧은 시간을 가졌다.

[0162] 6.1.6 통계적인 분석

[0163] 2 주째에 혈장에서 hFVIII 활성에 따라 유사한 치료 그룹을 확인하기 위해, 데이터는 서로 상이한 그룹 평균 활성 수준을 확인하는 터키 사후 검증으로 단일 고정된 인자 ANOVA 모델을 사용하여 분석되었다. 사례 분석까지 시간은 hFVIII에 대한 항체의 생성을 위하여 수행되었다.

[0164] 6.1.9 여러가지의 AAV 캡시드에 의한 활성 및 면역원성의 비교

[0165] 그 다음 활성 수준에서 차이는 결정되었고 사용된 AAV 캡시드에 의한 면역원성에 잠재적인 기여는 확인되었다. 이러한 연구를 위하여 이전의 연구로부터 가장 면역원성 계娄은 선택되었다 - E06.TTR. 흥미롭게도, 이러한 작제물은 2 주째에 다수의 다른 작제물보다 상당히 더 높은 발현을 생산하였지만 다음 주에서 항체는 주사된 마우스의 80%에서 hFVIII 이식유전자에 대해 생성되었다.

[0166] 간-특이적 TTR 프로모터와 E06 인핸서 조합을 사용하는 동일한 백터 계娄은 5 AAV 캡시드; AAVrh10, AAV8, AAV9, AAVhu37 및 AAVrh64R1 중 하나로 패키징되었다. 재차, FVIII KO 마우스는 마우스당 10^{10} GC의 용량으로 IV 주사되었고 혈장 hFVIII 활성 수준 및 항-hFVIII IgG 역가는 12 주 연구 내내 이어졌다. 이식유전자의 발현 및 면역원성에서 극명한 차이는 유전자 전달에 사용된 AAV 백터에 기반하여 보여졌다 (도 9). 백터 투여후 2 주

째에, 혈장에서 hFVIII 활성은 AAVrh64R1 투여 이후 0.51 IU/ml부터 AAVrh10로 1.26 IU/ml까지 다양하였다 (도 9A). 연구의 과정 동안, 몇몇 마우스는 AAV8 또는 AAV9 벡터로 투여된 마우스의 20%부터 AAVrh10을 받았던 마우스의 63%까지 다양한 항-hFVIII 항체를 생성하였다 (도 9B). 따라서, 심지어 고도로 면역원성 인핸서 및 프로모터 조합으로, 이식유전자에 면역 반응은 유전자 전달에 사용된 AAV 캡시드에 기반하여 다양할 수 있다.

[0167] 6.1.10 논의

[0168] HLP 프로모터가 발현에 사용된 FVIII KO 마우스에서 이전의 연구는 연구의 지속기간 내내 이식유전자에 항체를 검출시키지 않았다. HLP 프로모터 서열은 E01.A1AT 인핸서/프로모터 조합의 것에 유사하고, 여기에서 이러한 AAVrh10 벡터로 투여된 마우스는 12 주 연구의 지속기간 내내 검출가능한 항체를 갖지 않았다. 불행하게도, FVIII KO 마우스에서 이러한 벡터로부터 활성은 벡터 투여후 2 주째에 혈장에서 검출가능한 단지 0.189 IU/ml 및 6 주째에 0.303 IU/ml의 피크 수준으로 상대적으로 낮았다.

[0169] 흥미롭게도, 동일한 이식유전자 카셋트의 유전자 전달에 사용된 AAV 캡시드는 hFVIII에 대한 면역원성 및 피크 hFVIII 활성 양쪽에 상당히 영향을 미쳤다. 항-hFVIII 항체의 생성에서 캡시드의 효과를 연구하기 위해, 가장 면역원성 이식유전자 카셋트는 사용되었다 (E06.TTR). 연구된 5 벡터 캡시드는 2 그룹으로 분할될 수 있었고; 항-hFVIII 항체 (AAV8 및 AAV9)를 생성하였던 마우스의 ≤20%인 것 그리고 체액성 면역 반응 (AAVrh10, AAVhu37, 및 AAVrh64R1)을 발생하였던 마우스의 > 20%인 것. AAV8 캡시드와 관련된 hFVIII 이식유전자에 대한 내성은 아마 이러한 캡시드의 IV 전달이 간의 관용성 성질의 문맥에서 이식유전자-특이적 조절 T 세포를 활성화 시킬 수 있다는 것을 입증하는 이전의 연구 때문에 놀랍지 않다. 또한, 우리는 혈우병 B 마우스에서 AAV8의 IM 주사 이후 검출가능한 FIX 억제제가 없었다는 것을 이전에 보여주었다. 따라서, 심지어 고도로 면역원성 인핸서 및 프로모터 조합으로, 이식유전자에 면역 반응은 유전자 전달에 사용된 AAV 캡시드에 기반하여 다양할 수 있다.

[0170] 5 상이한 AAV 캡시드의 투여 이후 혈장에서 hFVIII 활성 수준은 또한 벡터 투여후 2 주째에 AAVrh64R1로 0.51 IU/ml부터 AAVrh10으로 1.26 IU/ml까지 상당히 다양하였다. AAVrh10 벡터로부터 발현은 AAV8에 비교하여 상당히 상승되었고 마우스의 63%에서 항-hFVIII 항체의 생성과 일치되었다. 이러한 캡시드 비교 연구는 고도로 면역원성 이식유전자 카셋트를 사용하여 수행되었고 유사하게 혈우병 A 환자의 ~30%가 재조합 단백질에 항체를 생성하는 인간에서 보여진 것을 모델링하지 않는다. 따라서, AAVrh10 벡터의 투여 이후 생산된 더 높은 발현 수준은 벡터의 더 낮은 용량이 출혈 사례의 발병률에서 상당한 개선 그리고 재조합 hFVIII 단백질로 보충에 요구될 임상 상황에 더욱 유익할 수 있다.

[0171] 이 연구의 결과로부터, E03.TTR (도 1; 서열 식별 번호: 13), E03.A1AT (도 3; 서열 식별 번호: 15), E12.TTR (도 2; 서열 식별 번호: 14) 및 E12.A1AT (도 4; 서열 식별 번호: 16) 작제물은 추가 시험을 위하여 선택되었다.

[0172] 6.2 투약량 연구

[0173] 6.2.1 근사 MED에서 정보제공하기 위한 FVIII KO 마우스에서 연구

[0174] C57BL/6 및 129 배경에서 FVIII KO 마우스는 AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75의 4 벡터 용량 중 하나의 꼬리 정맥 주사를 받는다. 그와 같은 벡터 용량은 5×10^{10} GC/kg, 5×10^{11} GC/kg, 5×10^{12} GC/kg, 및 5×10^{13} GC/kg이다. 대조군 물품 단독 (비히클 완충액)을 받는 동물의 집단은 비히클 대조군으로서 포함된다. 벡터 투여후, 동물은 일반적인 관찰로 매일 모니터링된다. 혈액은 hFVIII 활성 수준을 포착하기 위해 적절한 시점에 동물로부터 수집된다. 서브셋 A에서 동물은 투약후 60 일째에 희생되고, 서브셋 B에서 동물은 투약후 28 일째에 희생되고, 서브셋 C에서 동물은 투약후 3 일째에 희생된다. 혈액은 또한 혈청 화학 패널 및 혈액학용 검시에서 수집된다. 희생된 동물은 부검될 것이고; 기관, 예컨대 우측 서혜 텁프절, 우측 고환, 췌장, 심이지장, 결장, 뇌, 우측 장딴지 근육, 위, 우측 신장, 우측 폐, 비장, 심장, 간 및 총 병변은 있다면 체내분포 및 조직병리 시험을 위하여 수확된다. 총 세포 DNA 및 RNA는 벡터의 최고 용량을 받았던 마우스 그리고 대조군 물품을 받았던 것에 대하여 추출된다. qPCR 및 RT-qPCR 검정은 기관에서 벡터 계놈 카피 및 전사체 수준, 각각을 측정하기 위해 추출된 DNA/RNA에서 수행된다. 시험품의 효능은 COATEST 검정으로 혈장에서 hFVIII 단백질 활성 수준에 의해 결정된다. 또한, 항-hFVIII 항체는 항-hFVIII IgG ELISA 검정에 의해 모니터링되고 응고의 외적인 경로는 프로트롬빈 시간 (PT) 검정에 의해 평가된다.

[0175] 6.3 비-인간 영장류에서 연구

[0176] 6.3.1 NHP에서 발현 연구

[0177] 이러한 비-GLP 연구의 일차 목표는 NHP에서 잠재적인 백터 관련된 독성 및 체내분포를 평가하는 것이다.

[0178] 숫컷 레수스 및 사이노몰구스 마카크는 이 연구에 사용되었다. 혈우병 A가 X-연결된 유전적 장애이기 때문에 숫컷 동물만이 연구에 사용되었다. 모든 마카크는 이전에 기재된 바와 같이 결정된 연구의 시작에서 <1:5의 NAb 역가를 가졌다 (CALCEDO 등 (2009) Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis*, 199, 381-90). 백터 투여에 앞서, 마카크는 캐타민 (10-15 mg/kg) 및 텍스메데토미딘 (0.05-0.10 mg/kg) 주사된 IM의 혼합물로 마취되었다. 마카크는 복제 정맥을 통해 백터로 IV 투여되었다. 혈액 샘플은 연구의 개시에 앞서 그리고 대퇴부 정맥의 정맥천자를 통해 연구 동안 격주로 실시되었다. 혈액 샘플에서 모든 임상 병리학 시험은, 전혈구 계산치 및 차별적인, 완전한 임상 화학, 및 응고 패널을 포함하는, Antech Diagnostics (Irvine, CA)에 의해 수행되었다.

[0179] NHPs에서 hFVIII의 발현용 파일럿 연구는 수행되었다. 2 레수스 마카크 및 2 사이노몰구스 마카크는 ABP2.TGB-S1 인핸서/프로모터 조합, 각각으로부터 hFVIII를 발현시키는 AAVrh10 (도 10A) 및 AAVhu37 (도 10B) 백터의 3×10^{12} GC/kg으로 IV 투여되었다. 고 피크 발현은 모든 동물에서 그러나 6-8 주까지 보여졌다. AAVrh10으로 주사된 마카크에서 hFVIII에 대한 체액성 면역 반응은 보여졌다. 항-hFVIII 항체의 발생은, 백터 투여후 12 주에서 발생하는, AAVhu37을 받았던 1 동물에서 지연되었고, 다른 동물에 대하여 연구의 과정 내내 발생하지 않았다. AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA7을 받았던 마카크는 주사후 35 개월 동안 이어졌다 (도 22 내지 24).

[0180] FVIII KO 마우스 연구 및 이러한 작은 파일럿 레수스 마카크 연구에 기반하여, 최초 42 인핸서/프로모터 조합 중 2개는, 발현용의 2개의 상이한 분기군 E 캡시드를 사용하는, 사이노몰구스 마카크에서 추가 평가를 위하여 선택되었다.

[0181] 6.3.2 NHP에서 추가 연구

[0182] 후속적으로 20 숫컷 사이노몰구스 마카크는 4 백터; AAVrh10.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, AAVrh10.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75, AAVhu37.E03.TTR.hFVIIIco-SQ.PA75, 및 AAVhu37.E12.A1AT.hFVIIIco-SQ.PA75 ($n = 5$ 마카크 / 백터) 중 하나로 투약되었다. 백터는 (중간 qPCR 역가에 기반된) 1.2×10^{13} GC/kg의 용량으로 IV 투여되었다. 하나의 캡시드 플러스 인핸서/프로모터 조합으로, 정상 FVIII 수준의 37%의 피크 발현은 백터 투여후 2 주째에 보여졌고, 그 다음 정상의 20%에서 안정되었다 (도 11). hFVIII에 대한 항체가 8 주째 까지 다수의 마카크에서 검출된 한편, 항체는 백터 투여후 30 주째에 2 동물에서 검출불가능한 채 남아있었다 (도 12). 아래 논의된 방법. 항체의 생성을 위하여 사례 분석까지 시간을 사용함으로써, AAVrh10과 AAVhu37 사이 유의차가 있었다는 것이 결정되었다 (도 14).

[0183] 6.3.3 NHP 혈장에서 hFVIII 발현의 결정

[0184] hFVIII 발현은 ELISA에 의해 측정되었고, 여기에서 모든 시약은 달리 언급되지 않는 한 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터이었다. ELISA 플레이트는 0.1 M 카보네이트 완충액 (pH 9.6)에서 1:500 희석으로 항-hFVIII IgG (Green Mountain Antibodies, VT, USA)로 코팅되었고 4°C에서 밤새 인큐베이션되었다. 웰들은 PBS에서 0.1% Tween 20으로 4회 세정되었고 실온에서 1시간 동안 PBS에서 5% 탈지유 (Bio Rad, Hercules, CA, USA)로 차단되었다. 차단 완충액의 제거 이후, 5% 탈지유에서 희석된 혈장 샘플은 플레이트에 첨가되었고 실온에서 1시간 동안 인큐베이션되었다. 플레이트는 그 다음 4회 세정되었고 항-hFVIII IgG (ThermoFisher Scientific, MA, USA)는 탈지유에서 1:1000 희석으로 첨가되었다. 실온에서 1시간 동안 인큐베이션 이후 플레이트는 4회 세정되었고 HRP-접합된 항-양 IgG는 탈지유에서 1:1000 희석으로 첨가되었다. 90 분 동안 실온에서 인큐베이션 이후, 플레이트는 5회 세정되었고 3,3',5,5'-테트라메틸벤지딘 (TMB)는 검출을 위하여 첨가되었다. 반응은 2N 황산을 사용하여 실온에서 5 분후 중단되었고 플레이트는 BioTek μQuant 플레이트 리더 (Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 판독되었다. 도 11.

[0185] AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75의 단일 정맥내 주사 이후 사이노몰구스 마카크 (35 개월)에서 인간 FVIII의 장기간 안정한 발현의 결과는 도 22에서 나타난다. 결과는 35 개월에서 검시까지 안정한 발현을 보여준다. 간 효소 시험의 결과는 도 23에서 나타난다. 결과는, 간 생검후 일시적 상승을 제외하고, 정상 범위 이내인 간 효소 수준을 보여준다. AAVhu.37 캡시드에 대한 중화 항체 (Nab) 반응은 도 24에서 나타난다.

[0186] 단일 세포 기술은, $3E12$ GC/kg으로 AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75의 정맥내 투여를 받았던, 상기 논의된, NHP M11269의 간세포에서 AAV 백터 DNA 및 RNA를 검출하는데 사용되었다. 단일 세포 간세포는 AAV 게놈의 존재 및

발현에 대하여 평가되었다. 벡터 후 150 주, 간세포는 콜라겐분해효소/프로테아제의 혼합물로 관류시킴으로써 간 쇄기로부터 단리되었다. 단일 세포는 96 웰 플레이트의 개별 웰로 분류되었다. 하나의 96 웰 플레이트로부터 세포는 인간 FVIII에 대해 탐침을 사용하는 디지털 PCR에 의해 정량화된 세포에서 전체의 계놈 증폭된 (WGA) 및 AAV 계놈이었다. 제2 96 웰 플레이트는 FVIII 발현 평가를 위하여 전체의-전사체 증폭되었다 (WTA).

[0187] 결과는 아래 표 3에서 보여준다. AAV 계놈은 평가된 단일 세포의 ~25%에서 검출될 수 있다. RNA 발현은 DNA를 차지한 세포의 ~4% 또는 20%에서 단지 검출되었다. RNA 발현 세포는 저 및 고로서 2 유형으로 계층화될 수 있다. 실질적인 수의 세포가 벡터를 차지하지만 이식유전자를 발현시키는데 실패한 이유가 불확실하다. 이들 결과는 CMC 코어에 의해 수행된 원 위치 하이브리드화 연구에 의해 확증되지 않았다 (데이터 도시되지 않음).

표 3: 퍼센트 DNA 및 RNA 양성 단일 세포

단일 세포 (w152)	샘플	양성/총	퍼센트 양성
	DNA	23/96	24%
	RNA	4/96	4%
	RNA/DNA 양성 세포	4/23	17%

간 균등액	샘플	w42 생검	w152 부검
	DNA (GC/세포)	10	7.6 +/- 1.1
	hFVIII RNA (카피 ug RNA)	4.4 +/- 1.1 E4	6.4 +/- 0.7E4

6.3.4 NHP 혈장에서 항-hFVIII IgG의 검출

[0189] NHP 혈장에서 hFVIII에 대한 IgG 항체는 이전에 기재된 바와 같이 ELISA에 의해 측정되었고, 단, HRP-접합된 항-hNHP IgG는 검출을 위하여 탈지유에서 1:2000 희석으로 첨가되었다 (도 12).

6.3.5 NHP 혈장에서 베데스다 역가의 검출

[0190] 인간 FVIII에 대한 억제 항체는 Nijmegen 변형된 베데스다 검정 (Giles 등, 1998)에 의해 측정되었다. 하나의 베데스다 유닛은 50%만큼 정상 인간 혈장의 응고 활성의 억제를 나타낸다.

6.3.6 간 생검

[0191] 각각의 그룹으로부터 2 NHPs는 미니-개복술로 수행된 벡터 투여후 5 주째에 간 생검을 받았다. 동물의 선택은 4 주째에 혈장에서 hFVIII 발현에 기반되었다. 선택된 제1 동물은 중앙 hFVIII 수준을 가진 동물이었고, 선택된 제2 동물은 평균 수준에 (가장 가까운 것이 중앙이라면) 가장 가까운 또는 제2 가장 가까운 hFVIII 수준을 가진 동물이었다. 간 조직의 샘플은 조직병리, 벡터 체내분포, 및 이식유전자 mRNA 분석을 위하여 처리되었다. 간 생검후 3 일째에, 혈액은 전혈구 계산치 및 차별적인, 완전한 임상 화학, 및 응고 페널을 위하여 처리되었다.

6.3.7 면역억제 프로토콜

[0192] 면역억제 레지멘은 hFVIII 발현을 검출하는 능력이 벡터 투여 이후 hFVIII (베데스다 유닛 >1)에 대한 검출가능한 항체의 존재 하에서 상실된 동물에서 요구되는 바와 같이 개시되었다. 면역억제 레지멘은 이전에 기재된 바와 같이 리툭시맙 ($250 \text{ mg}/\text{m}^2$, 4 매주 간격으로 IV, 총 4 주입) 및 사이클로포스파마이드 ($300 \text{ mg}/\text{m}^2$, 느린 정맥내 주입 매 15 일, 총 8 용량 4 개월 동안)으로 수행되었다 (Mcintosh 등. (2013) Therapeutic levels of FVIII following a single peripheral vein administration of rAAV vector encoding a novel human factor VIII variant. Blood, 121, 3335-44.).

6.3.8 벡터 체내분포

[0193] C57BL/6J 마우스로부터 조직 샘플 (서혜 림프절, 요추 림프절, 근육 [우측 비복근], 우측 고환, 췌장, 우측 신장, 비장, 우측 폐, 심장, 및 간)은 검시의 시간에 스냅 냉동되었고, DNA는 QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 추출되었다. 추출된 DNA에서 벡터 계놈 카피 (GC)의 검출 및 정량화 그리고 추

출된 RNA에서 상대 hFVIII 전사체 발현은 이전에 기재된 바와 같이 실시간 PCR로 수행되었다. 간단히, 벡터 GCs 및 RNA는 벡터의 hFVIII 이식유전자 서열에 대해 설계된 프라이머/탐침을 사용하여 정량화되었다. 간으로부터 GC의 정량화는 각각의 마우스 (n=3/그룹)으로부터 하나의 간 샘플에서 수행되었다. RNA 상대 전사체 발현은 18S 발현으로 정규화된 각각의 샘플의 △△CT를 사용하여 결정되었다.

[0199] 벡터 체내분포는 AAVrh10 인핸서/프로모터 벡터의 18의 서브셋에 대하여 평가되었다. hFVIIIco IV를 발현시키는 AAVrh10 벡터는 6 내지 8 주령 C57BL/6J 야생형 마우스에 마우스당 10^{11} GC의 용량으로 투여되었다. 마우스는 벡터 투여후 14 일째에 부검되었고 근육 (우측 비복근), 우측 고환, 췌장, 우측 신장, 비장, 우측 폐, 심장, 및 간은 수집되었다. DNA 및 RNA는 추출되었고 벡터 GCs 및 RNA 전사체 수준, 각각은 벡터의 hFVIII 이식유전자 서열에 대해 설계된 프라이머/탐침을 사용하여 정량화되었다. 벡터 투여된 그룹에 걸쳐 간 벡터 GC (도 20A) 또는 RNA 전사체 수준 (도 20B)에서 유의차는 없었고, 대조군 (PBS) 투여된 그룹에서 검출가능한 GC 또는 RNA는 없었다. 그러나, 인핸서 서열 (도 20B)와 무관하게, 발현용 A1AT 프로모터를 사용하였던 벡터용 간에서 더 높은 RNA 전사체 수준에 대한 추세가 있었다. 수집된 다른 조직에 대하여, hFVIII RNA 전사체 수준은 간에서 보다 평균적으로 1000-배 더 낮았지만 높은 간의 발현은 E01.TBG-S1, E02.A1AT, E09.A1AT, 및 E09.TTR의 투여 이후 C57BL/6J 마우스내 근육 및 심장에서 보여졌다 (도 21).

6.4. 벡터의 시험

[0201] 혈청형 동일성, 비어있는 입자 함량 및 이식유전자 생성물 동일성을 포함하는 특성규명 검정은 수행된다. 모든 검정의 설명은 아래 나타난다.

6.4.1 계놈 카피 (GC) 역가

[0203] 최적화된 정량적 PCR (oqPCR) 검정은 동족 플라스미드 표준과 비교에 의해 계놈 카피 역가를 결정하는데 사용된다. oqPCR 검정은 DNase I 및 프로테이나제 K로 순차적인 소화를 사용하고, 이어서 qPCR 분석하여 캡시드화된 벡터 계놈 카피를 측정한다. DNA 검출은 이 동일한 영역에 형광 태그된 탐침 하이브리드화와 조합으로 PA75 polyA 영역을 표적하는 서열 특정 프라이머를 사용하여 달성된다. 플라스미드 DNA 표준 곡선에 비교는 임의의 사후-PCR 샘플 조작의 필요성 없이 역가 결정을 허용한다. (배경 및 DNA 오염용) 수많은 표준, 검증 샘플 및 대조군은 검정에 도입되었다. 이러한 검정은 감수성, 검출의 한계, 자격의 범위 그리고 검정내 및 검정간 정확성을 포함하는 검정 파라미터 확립 및 정의에 의해 자격화되었다. 내부 AAVrh.10 참조 로트는 확립되었고 자격 연구를 수행하는데 사용되었다.

6.4.2 벡터 캡시드 동일성: VP3의 AAV 캡시드 질량 분광분석법

[0205] 벡터의 AAV2/hu.37 또는 AAV2/rh.10 혈청형의 확인은 질량 분광분석법 (MS)에 의한 VP3 캡시드 단백질의 웨타이드의 분석에 기반된 검정에 의해 달성된다. 상기 방법은 SDS-PAGE 젤로부터 절개된 VP3 단백질의 다중-효소 소화 (트립신, 키모트립신 및 엔도프로테이나제 Glu-C) 이어서 캡시드 단백질을 서열분석하기 위해 Q-Exactive Orbitrap 질량 분광분석기에서 UPLC-MS/MS의 특성규명을 포함한다. 특정 오염물질 단백질의 확인 및 질량 스펙트럼으로부터 웨타이드 서열 유도를 허용하는 텐덤 질량 분광분석법 (MS) 방법은 개발되었다.

6.4.3 비어있는 대 전체 입자 비

[0207] 벡터 입자 프로파일은 분석적 초원심분리 (AUC)를 이용하고 있다 분석적 초원심분리기에서 측정된 바와 같이 침강 속도는 거대분자 구조 불균질성, 회합 또는 응집의 상태 및 확인에서 차이에 대한 정보 수집용 탁월한 방법이다. 샘플은 세포 속에 장입되었고 Beckman Coulter Proteomelab XL-I 분석적 초원심분리기에서 12000 RPM으로 침전되었다. 굴절률 스캔은 3.3 시간 동안 매 2 분 기록되었다. 데이터는 c(s) 모델 (Sedfit 프로그램)에 의해 분석되고 계산된 침강 계수는 정규화된 c(s) 값에 대해 플로팅된다. 모노머성 벡터를 대표하는 주요 피크는 판측될 수 있다. 주요 모노머성 피크보다 더 느리게 이동하는 피크의 외관은 비어있는/잘못조립된 입자를 나타낸다. 비어있는 입자 피크의 침강 계수는 비어있는 AAV8 입자 제제를 이용하여 확립된다. 주요 모노머성 피크 및 선행 피크의 직접 정량화는 비어있는 대 전체 입자 비의 결정을 허용한다.

6.4.4 감염성 역가

[0209] 감염성 유닛 (IU) 검정은 RC32 세포 (rep2 발현 HeLa 세포)에서 벡터의 생산적인 흡수 및 복제를 결정하는데 사용된다. 간단히, 96 웰 플레이트에서 RC32 세포는 rAAV의 각각의 희석액에서 12 복제물로 Ad5의 균일한 희석 및 벡터의 연속 희석에 의해 공-감염된다. 감염후 72 시간에 세포는 용해되고, qPCR 수행되어 투입에 대해 rAAV 벡터 증폭을 검출한다. 종점 희석 TCID₅₀ 계산 (스피어만-카르버)는 IU/ml로서 표현된 복제 역가를 결정하기 위해

수행된다. "감염성" 값이 세포와 접촉하는 입자, 수용체 결합, 내재화, 핵에 수송 및 게놈 복제에 의존적이기 때문에, 이들은 검정 기하학 그리고 사용된 세포주에서 결합후 경로 및 적절한 수용체의 존재에 의해 영향받는다. AAV 벡터 도입에 중요한 수용체 및 결합후 경로는 불멸화된 세포주에서 일반적으로 유지되고 따라서 감염성 검정 역가는 존재하는 "감염성" 입자의 수의 절대적인 측정치가 아니다. 그러나, (GC/IU 비로서 기재된) 캡시드화된 GC 대 "감염성 유닛"의 비는 로트부터 로트까지 생성물 일관성의 측정치로서 사용될 수 있다.

[0210] 7. 실시예 2: 인간 대상체 치료용 프로토콜

본 실시예는 응고 인자 8 (FVIII) 유전자에서 돌연변이로 인해 유전자적으로 확인된 X-연결된 혈우병 A를 가진 환자에 대하여 유전자 요법 치료에 관한 것이다. 이 실시예에서, 유전자 요법 벡터, AAVhu.37.hFVIII, hFVIII를 발현시키는 복제 결핍된 아데노-관련 바이러스 벡터 hu.37 (AAVhu.37)은 혈우병 A를 가진 환자에게 투여된다. 치료의 효능은 이식유전자 발현용 대리로서 FVIII 수준을 사용하여 평가될 수 있다. 1차 효능 평가는, 그 후에 적어도 1년 동안 이어진 효과가 지속되면서, 약 12주 처리후에서 FVIII 수준을 포함한다. 이식유전자 발현의 장기간 안전성 및 지속성은 간 생검 샘플에서 처리후 측정될 수 있다.

[0211] 7.1. 유전자 요법 벡터 - AAV.hFVIII

[0212] 7.1.1. AAVhu.37.hFVIII

AAVhu.37.hFVIII 벡터는 AAV 벡터 활성 성분 및 제형 완충액으로 구성된다. 외부 AAV 벡터 성분은, 1:1:10의 예상된 비로, 3 AAV 바이러스 단백질, VP1, VP2, 및 VP3의 60 카페로 구성되는 혈청형 hu.37, T = 1 20면체 캡시드이다. 상기 캡시드는 단일가닥 DNA 재조합 AAV (rAAV) 벡터 게놈을 함유한다 (도 1-도 4).

게놈은 2 AAV 역 말단 반복부 (ITRs)에 의해 측접된 인간 인자 VIII (FVIII) 이식유전자를 함유한다. 인핸서, 프로모터, 인간 인자 VIII (hFVIII) 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 (polyA) 신호는 B 도메인 결실된, 코돈 최적화된 인간 FVIII 이식유전자를 포함한다. ITRs는 벡터 생산 동안 게놈의 복제 및 패키징을 책임지는 유전 인자이고 rAAV를 생성하도록 요구된 유일한 바이러스 시스 요소이다. 일 구현예에서, 인간 FVIII 코딩 서열의 발현은 트랜스티레틴 프로모터 (서열 식별 번호: 7)로부터 유도된다. 또 다른 구현예에서, 인간 FVIII 코딩 서열의 발현은 변형된 A1AT 프로모터 (서열 식별 번호: 9)로부터 유도된다. 작제물은 프로모터 활성을 자극시키기 위해 적어도 하나의 인핸서 요소를 포함한다. 일 구현예에서, enTTR 인핸서 (서열 식별 번호: 5)는 포함된다. 또 다른 구현예에서, ABP-S 인핸서 (서열 식별 번호: 6)의 2 카페는 enTTR 인핸서 (서열 식별 번호: 5)의 1 카페를 진행시킨다. 약 75 nt (서열 식별 번호: 10)의 합성 polyA 신호는 인간 FVIII mRNA 전사체의 종결을 매개하기 위해 포함된다.

벡터는 제형 완충액에서 AAVhu.37.hFVIII 벡터의 혼탁액으로서 공급된다. 일 구현예에서, 제형 완충액은 TMN200 (200 mM 염화나트륨, 1 mM 염화마그네슘, 20 mM Tris, pH 8.0)에서 0.001% 플루론산 F-68이다.

벡터 제조의 세부사항 및 벡터의 특성규명은 아래 부문에서 기재된다.

[0213] 7.1.2. AAVrh.10.hFVIII

AAVrh.10.hFVIII 벡터는 AAV 벡터 활성 성분 및 제형 완충액으로 구성된다. 외부 AAV 벡터 성분은, 1:1:10의 예상된 비로, 3 AAV 바이러스 단백질, VP1, VP2, 및 VP3의 60 카페로 구성되는 혈청형 rh.10, T = 1 20면체 캡시드이다. 상기 캡시드는 단일가닥 DNA 재조합 AAV (rAAV) 벡터 게놈을 함유한다 (도 1-도 4).

게놈은 2 AAV 역 말단 반복부 (ITRs)에 의해 측접된 인간 인자 VIII (FVIII) 이식유전자를 함유한다. 인핸서, 프로모터, 인간 인자 VIII (hFVIII) 코딩 서열, 및 폴리아데닐화 (polyA) 신호는 B 도메인 결실된, 코돈 최적화된 인간 FVIII 이식유전자를 포함한다. ITRs는 벡터 생산 동안 게놈의 복제 및 패키징을 책임지는 유전 인자이고 rAAV를 생성하도록 요구된 유일한 바이러스 시스 요소이다. 일 구현예에서, 인간 FVIII 코딩 서열의 발현은 트랜스티레틴 프로모터 (서열 식별 번호: 7)로부터 유도된다. 또 다른 구현예에서, 인간 FVIII 코딩 서열의 발현은 변형된 A1AT 프로모터 (서열 식별 번호: 9)로부터 유도된다. 작제물은 프로모터 활성을 자극시키기 위해 적어도 하나의 인핸서를 포함한다. 일 구현예에서, enTTR 인핸서 (서열 식별 번호: 5)는 포함된다. 또 다른 구현예에서, ABP-S 인핸서 (서열 식별 번호: 6)의 2 카페는 enTTR 인핸서 (서열 식별 번호: 5)의 1 카페를 진행시킨다. 약 75 nt (서열 식별 번호: 10)의 합성 polyA 신호는 인간 FVIII mRNA 전사체의 종결을 매개하기 위해 포함된다.

벡터는 제형 완충액에서 AAVrh.10.hFVIII 벡터의 혼탁액으로서 공급된다. 일 구현예에서, 제형 완충액은 TMN200

(200 mM 염화나트륨, 1 mM 염화마그네슘, 20 mM Tris, pH 8.0)에서 0.001% 플루론산 F-68이다.

7.2. 환자 모집단

[0222] 중증 혈우병 A 환자는 몇 개의 이유로 선택된 연구 모집단이다. 중증 혈우병 A 환자는 정상 인자 VIII (FVIII) 활성의 1% 미만을 갖는 따라서 그것의 출혈 체질을 제어하기 위해 FVIII의 빈번한 주입을 요구하는 것으로서 정의된다. 이것은 정상 생활에서 운반에 관하여 상당한 부하를 나타내고 또한, FVIII의 혈액 수준은, 최적이 아닌, 공지된 피크 및 골 패턴을 경험하게 한다. 중증 환자에서 FVIII 혈액 수준이 1% 미만이라는 사실은 AAV.hVIII이 투여된 후 FVIII 혈액 수준에서 심지어 낮은 내지 보통의 증가를 신뢰할 수 있게 측정하는 것을 가능하게 한다. 최근 임상시험은 이러한 접근법의 유효성을 실증하였다.

[0224] 치료용 후보인 환자는 바람직하게는, 중간 정도/중증 또는 중증 혈우병 A로 진단된, ≥18세 연령의 성인 남성이다. 일 구현예에서, 환자는 정상의 기준선 FVIII 활성 ≤2% 또는 FVIII 활성 ≤2%의 문서로 기록된 이력을 갖는다. 일부 구현예에서, <18 세 연령의 환자는 치료될 수 있다. 치료용 후보는 FVIII로 주문식 치료를 요구하는 해마다 적어도 3 출혈 에피소드를 갖는 대상체를 포함한다. 치료용 다른 후보는 FVIII의 예방적 레지멘으로 치료되는 대상체를 포함한다. 대상체가 치료에 적절한지를 입증하는 다른 기준은 FVIII에 적어도 100 일 노출 이력; 외인성 FVIII에 억제제 (중화 항체)의 문서로 기록된 이력 없음; 외인성 FIX에 공지된 알러지성 반응 또는 AAV.FVIII의 임의의 성분 없음을 포함한다.

[0225] 치료받는 환자는 (선택된 벡터에 적절한 경우) 기준선 혈청 AAVhu.37 또는 AAVrh.10 중화 항체 (Nab) 역가 ≤ 1:5를 가질 수 있다.

[0226] 대상체는 그것의 관리 의사의 재량에서 유전자 요법 치료와 동시에 그리고 치료에 앞서 그것의 관리 기준 치료(들) (예를 들면, 대체 FVIII)을 계속하도록 허용될 수 있다. 대안으로, 의사의 유전자 요법 치료 투여에 앞서 관리 기준 요법을 멈추는 것 그리고, 선택적으로, 유전자 요법의 투여 후 공-요법으로서 관리 기준 치료를 재개하는 것을 선호할 수 있다.

7.3. 투약 & 투여의 경로

[0228] 환자는 주입으로 주변 정맥을 통해 투여된 AAVrh.10.hFVIII 또는 AAVhu.37.hFVIII의 단일 용량을 받는다. 환자에게 투여된 AAVrh.10.hFVIII 또는 AAVhu.37.hFVIII의 용량은 약 5×10^{11} GC/kg 또는 1.6×10^{12} GC/kg 또는 5×10^{12} GC/kg 또는 1×10^{13} GC/kg이다. 비어있는 캡시드가 환자에게 투여되는 AAVrh.10.hFVIII 또는 AAVhu.37.hFVIII의 용량으로부터 제거되는 것을 확보하기 위해, 비어있는 캡시드는, 상기에 논의된 바와 같이, 벡터 정제 공정 동안 염화세슘 구배 초원심분리에 의해 또는 이온 교환 크로마토그래피에 의해 벡터 입자로부터 분리된다.

7.4. 임상 목적 측정

[0230] 1차 평가는 투여된 생성물의 안전성에 대한 것이다. 하기 평가는 생성물의 투여 후 4 주 동안 1주 2회, 6 주째 내지 12 주째 매주, 첫해의 나머지에 걸쳐 매월 그리고 5 년의 총 기간 동안 6 개월 간격에서 수행된다.

[0231] a. 물리적 시험

[0232] b. ECG

[0233] c. 생화학적 평가: 혈청 전해질, BUN, 크레아티닌, 칼슘, 포스페이트, 총 단백질, 알부민, LDH, CPK, AST, ALT, 알칼리성 포스파타제, 빌리루빈

[0234] d. 혈액 평가: CBC 및 차별적인, 응고 프로파일

[0235] e. 요검사

[0236] f. 면역학적 평가:

[0237] g. hu.37 또는 rh.10 캡시드에 대한 및 인자 VIII에 대한 혈청학적 반응

[0238] h. hu.37 또는 rh.10 캡시드 및 인자 VIII 항원에 대한 T 세포 반응

[0239] i. 벡터 DNA의 평가; 혈장, 소변 및 타액에서 qPCR 측정

[0240] 2차 평가는 하기에 의해 결정된 바와 같이 이식유전자 발현 및 활성의 측정에 기반된다:

[0241] a. 혈장 인자 VIII 수준 및 인자 VIII 활성

[0242] b. 자발적인 출혈 에피소드의 빈도 및 대체 인자 VIII 요건의 임상 평가

[0243] 8. 실시예 3: AAV.hFVIII의 제조

[0244] 8.1. AAV.hFVIII를 생산하는데 사용된 플라스미드

[0245] AAVrh.10.hFVIII은 하기로 인간 HEK 293 MCB 세포의 3 플라스미드 DNA 형질감염에 의해 생산된다:

[0246] (i) 부문 8.2.1.1-8.2.1.4에서 기재된 바와 같이 벡터 플라스미드

[0247] (ii) 부문 8.2.2.1에서 기재된 AAV rep2 및 cap rh10 야생형 유전자를 함유하는 AAV 헬퍼 플라스미드 일명 pAAV2.rh10.KanR 및

[0248] (iii) 부문 8.2.3에서 기재된 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드 일명 pAdDeltaF6(Kan)

[0249] AAvh.37.hFVIII은 하기로 인간 HEK 293 MCB 세포의 3 플라스미드 DNA 형질감염에 의해 생산된다:

[0250] (i) 부문 8.2.1.1-8.2.1.4에서 기재된 바와 같이 벡터 플라스미드

[0251] (ii) 부문 8.2.2.2에서 기재된 AAV rep2 및 cap hu.37 야생형 유전자를 함유하는 AAV 헬퍼 플라스미드 일명 pAAV2.hu.37.KanR 및

[0252] (iii) 부문 8.2.3에서 기재된 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드 일명 pAdDeltaF6(Kan)

[0253] 8.2.1 시스 플라스미드 (벡터 계놈 발현 작제물):

[0254] 8.2.1.1 인간 FVIII 발현 카셋트를 함유하는 pAAV.E03.p3.hF8co-SQ.PA75 (도 1). 이러한 시스 플라스미드는 rAAV 벡터 계놈을 인코딩한다. 인간 FVIII-SQco cDNA의 발현은 enTTR 인핸서와 TTR 프로모터로부터 유도된다. 발현 카셋트용 polyA 신호는 약 75nt의 인공 polyA 서열이다.

[0255] 서열 요소의 설명

[0256] 1. 역 말단 반복부 (ITR): AAV ITRs는 양쪽 단부에서 동일하지만, 반대편 배향으로 발견되는 서열이다. AAV 및 아데노바이러스 (ad) 헬퍼 기능이 트랜스로 제공되는 경우, AAV2 (유전자은행 # NC001401) ITR 서열은 벡터 DNA 복제의 기원 및 벡터 계놈용 패키징 신호 양쪽으로서 기능한다. 이와 같이, ITR 서열은 벡터 계놈 복제 및 패키징에 요구된 유일한 시스 작용 서열을 나타낸다. 예시된 벡터에서 사용된 5' ITR 서열은 서열 식별 번호: 11에서 나타난다. 예시된 벡터에서 사용된 3' ITR 서열은 서열 식별 번호: 12에서 나타난다.

[0257] 2. TTR 프로모터: 트랜스티레틴 프로모터 (서열 식별 번호: 7)은 및 고-수준, 간 특정 hFVIII 유전자 발현을 구동시키는데 사용된다.

[0258] 3. TTR 인핸서 (enTTR): 트랜스티레틴으로부터 100 bp 인핸서 서열 (서열 식별 번호: 5)는 FVIII의 발현을 증가시키기 위해 벡터 발현 카셋트에서 존재한다.

[0259] 4. 인간 응고 인자 VIII (FVIII) cDNA (서열 식별 번호: 1은 원상태 서열을 보여주고; 서열 식별 번호: 2는 코돈 최적화된 서열을 보여준다). 인간 응고 인자 8 (FVIII) cDNA는 혈액 응고의 형성에 필수적인 응고 인자를 인코딩한다. hFVIII은 B 도메인이, 본 명세서에서 기재된 바와 같이, 짧은 "SQ" 서열로 대체된 B-도메인 결실된 서열이다. hFVIII cDNA는 인간에서 발현을 위하여 코돈 최적화된다.

[0260] 5. 인공 폴리아데닐화 신호: (서열 식별 번호: 10) 75bp 인공 폴리아데닐화 신호는 hFVIII mRNA의 효율적인 폴리아데닐화를 위하여 시스 서열을 제공한다. 이 요소는 전사 종결용 신호, 발생기 전사체의 3' 말단에서 특정 절단 사례 이어서 폴리아데닐 꼬리의 첨가로서 기능한다.

[0261] 8.2.1.2 인간 FVIII 발현 카셋트를 함유하는 pAAV.E12.p3.hF8co-SQ.PA75 (도 2). 이러한 시스 플라스미드는 rAAV 벡터 계놈을 인코딩한다. 인간 FVIII-SQco cDNA의 발현은 ABPS 및 enTTR 인핸서와 TTR 프로모터로부터 유도된다. 발현 카셋트용 polyA 신호는 약 75nt의 인공 polyA 서열이다.

[0262] 서열 요소의 설명

[0263] 1. 역 말단 반복부 (ITR): 8.2.1.1에서와 동일

[0264] 2. TTR 프로모터: 8.2.1.1에서와 동일

- [0265] 3. 인핸서: 트랜스티레틴 (enTTR) (서열 식별 번호: 5)로부터 100 bp 인핸서 서열의 2 카페로 α1-마이크로글로울린/비쿠닌 전구체 [ABP]부터 42 bp (서열 식별 번호: 6)까지 100 bp 원위 인핸서의 단축된 버전은 FVIII의 발현을 증가시키기 위해 백터 베이스 카셋트에서 존재한다.
- [0266] 4. 인간 응고 인자 VIII (FVIII) cDNA: 8.2.1.1에서와 동일
- [0267] 5. 인공 폴리아데닐화 신호: 8.2.1.1에서와 동일
- [0268] 8.2.1.3 인간 FVIII 발현 카셋트를 함유하는 pAAV.E03.p2.hF8co-SQ.PA75 (도 3). 이러한 시스 플라스미드는 rAAV 백터 게놈을 인코딩한다. 인간 FVIII-SQco cDNA의 발현은 enTTR 인핸서와 변형된 A1AT 프로모터로부터 유도된다. 발현 카셋트용 polyA 신호는 약 75nt의 인공 polyA 서열이다.
- [0269] **서열 요소의 설명**
- [0270] 1. 역 말단 반복부 (ITR): 8.2.1.1에서와 동일
- [0271] 2. A1AT 프로모터: 변형된 SERINA1 [α1-항트립신] 프로모터 (서열 식별 번호: 9)는 및 고-수준, 간 특정 hFVIII 유전자 발현을 구동시키는데 사용된다.
- [0272] 3. TTR 인핸서 (enTTR): 트랜스티레틴으로부터 100 bp 인핸서 서열은 FVIII의 발현을 증가시키기 위해 백터 베이스 카셋트에서 존재한다.
- [0273] 4. 인간 응고 인자 VIII (FVIII) cDNA: 8.2.1.1에서와 동일
- [0274] 5. 인공 폴리아데닐화 신호: 8.2.1.1에서와 동일
- [0275] 8.2.1.4 인간 FVIII 발현 카셋트를 함유하는 pAAV.E12.p2.hF8co-SQ.PA75 (도 4). 이러한 시스 플라스미드는 rAAV 백터 게놈을 인코딩한다. 인간 FVIII-SQco cDNA의 발현은 ABPS 및 enTTR 인핸서와 TTR 프로모터로부터 유도된다. 발현 카셋트용 polyA 신호는 약 75nt의 인공 polyA 서열이다.
- [0276] **서열 요소의 설명**
- [0277] 1. 역 말단 반복부 (ITR): 8.2.1.1에서와 동일
- [0278] 2. A1AT 프로모터: 8.2.1.3에서와 동일
- [0279] 3. 인핸서: 8.2.1.1에서와 동일
- [0280] 4. 인간 응고 인자 VIII (FVIII) cDNA: 8.2.1.1에서와 동일
- [0281] 5. 인공 폴리아데닐화 신호: 8.2.1.1에서와 동일
- [0282] **8.2.2 헬퍼 플라스미드**
- [0283] **8.2.2.1 AAVrh10 헬퍼 플라스미드 pAAV2.rh10.KanR**
- [0284] 이러한 AAVrh10 헬퍼 플라스미드 (8,036 bp)는 혈청형 rh10으로부터 4 야생형 AAV2 rep 단백질 및 3 야생형 AAV VP 캡시드 단백질을 인코딩한다. 신규한 AAV 서열은 붉은털원숭이의 간 조직 DNA로부터 수득되었고 AAV 혈청형 rh10으로 지정되었다. 키메라성 패키징 작제물을 창출하기 위해, AAV2 cap 유전자는 플라스미드 p5E18로부터 제거되었고 플라스미드 p5E18VD2/rh10을 제공하기 위해 영장류 간 DNA로부터 증폭된 AAVrh10 cap 유전자의 PCR 단편으로 대체되었다. rep 발현을 정상적으로 구동시키는 AAV p5 프로모터가 rep의 5' 말단부터 rh10 cap 유전자의 3' 말단까지 이러한 작제물에서 움직인다는 것을 주목한다. 이러한 배열은 고 역가 백터 생산을 지지하는 능력을 증가시키기 위해 그리고 rep의 발현을 하향-조절하기 위해 프로모터와 rep 유전자 (즉, 플라스미드 골격) 사이 스페이서를 도입하는데 사용한다. p5E18에서 플라스미드 골격은 pBluescript KS제이다. 플라스미드의 모든 성분 파트는 직접 서열분석에 의해 확인되었다. 마지막으로 암피실린 저항 유전자는 pAAV2/rh10 (Kan)을 제공하기 위해 카나마이신 저항 유전자에 의해 대체되었다.
- [0285] **8.2.2.2 AAVhu.37 헬퍼 플라스미드 pAAV2.hu.37.KanR**
- [0286] 이러한 AAVhu.37 헬퍼 플라스미드 (8,036 bp)는 혈청형 hu.37로부터 4 야생형 AAV2 rep 단백질 및 3 야생형 AAV VP 캡시드 단백질을 인코딩한다. pAAV2.rh10.KanR 플라스미드의 개략도는 아래 도시된다. 키메라성 패키징 작제물을 창출하기 위해, AAV2 cap 유전자는 플라스미드 p5E18로부터 제거되었고 플라스미드 p5E18VD2/hu.37을 제공하기 위해 영장류 간 DNA로부터 증폭된 AAVhu.37 cap 유전자의 PCR 단편으로 대체되었다. p5E18에서 플라스미드

미드 골격은 pBluescript KS제이었다. 플라스미드의 성분 파트는 직접 서열분석에 의해 확인되었다. 마지막으로 암피실린 저항 유전자는 pAAV2/hu.37 (Kan)을 제공하기 위해 카나마이신 저항 유전자에 의해 대체되었다.

[0287] 8.2.3 pAdDeltaF6(Kan) 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드

플라스미드 pAd델타F6(Kan)은 크기 15,774 bp이다. 플라스미드는 AAV 복제, 즉 E2A, E4, 및 VA RNA에 중요한 아데노바이러스 게놈의 영역을 함유하지만 (아데노바이러스 E1 기능은 293 세포에 의해 제공된다), 다른 아데노바이러스 복제 또는 구조적 유전자를 함유하지 않는다. 플라스미드는 복제에 중요한 시스 요소 예컨대 아데노바이러스 역 말단 반복부를 함유하지 않고 따라서, 감염성 아데노바이러스는 생성되는 것으로 기대된다. Ad5 (pBHG10, pBR322 기반 플라스미드)의 E1, E3 결실된 분자 클론으로부터 유래되었다. 결실은 불필요한 아데노바이러스 유전자의 발현을 제거하기 위해 그리고 32 kb부터 ~12 kb까지 아데노바이러스 DNA의 양을 감소시키기 위해 Ad5 DNA에서 도입되었다. 마지막으로 암피실린 저항 유전자는 pAd△F6(kan)을 제공하기 위해 카나마이신 저항 유전자에 의해 대체되었다. 이들 3 아데노바이러스 유전자의 동일성은 플라스미드 DNA 제조를 위하여 Aldevron Inc.에 보내진 플라스미드 공급원 스톡에서 Qiagen Genomic Services에 의해 수행된 DNA 플라스미드 서열분석에 의해 확인되었다. DNA 분석은 3 아데노바이러스 유형 5 유전자 영역 (유전자은행 수탁 번호 AF369965)와 100% 상동성을 드러냈다.

[0289] 8.2.4 박테리아 주세포 은행 (MCB)

DTX101의 제조를 뒷받침하는데 사용되는 3 DNA 생산 플라스미드용 박테리아 MCBs는 Aldevron Inc.에 의해 생산되었다. 세포 은행은 선택된 배양물의 팽창으로부터 작성되었고 광범위한 시험은 Aldevron SOPs에 따른 그리고 CBER 권고에 따라 각각의 박테리아 MCB의 자격으로 수행되었다. 박테리아 MCB 생성의 세부사항에 관한 정보 그리고 각각의 3 플라스미드에 대한 시험은 수행 및 기록된다.

[0291] 8.2.5 플라스미드 DNA 제조

생산 공정에서 사용된 모든 플라스미드는 cGMP 제조의 가장 두드러진 피쳐를 이용하는 기반시설 및 그것의 GMP-TM 품질 시스템; 이력관리, 문서 관리, 및 물질 분리 하에서 Aldevron Inc.에 의해 생산되었다. 플라스미드 DNA 생성의 세부사항에 관한 정보 및 각각의 플라스미드에 대한 시험은 수행 및 기록된다.

[0293] 8.2.6 인간 배아 신장 (HEK) 293 주세포 은행 (MCB)

HEK 293 세포는 프랭크 그래엄 및 동료에 의해 전단된 아데노바이러스 유형 5 DNA로 HEK 세포를 형질전환시킴으로써 본래 생성되었다. 세포는 고-역가 rAAV 생산에 요구된 E1a 및 E1b 유전자 생성물을 발현시킨다. HEK293 세포는 부착성이고 DNA 플라스미드 형질감염시 rAAV의 고-역가를 산출하는 고도로 형질전환성이다.

[0295] 8.3 재조합 AAV 백터 제조

[0296] 8.3.1 제조 공정의 설명

1. 세포 씨딩: 자격이 있는 인간 배아 신장 293 세포주는 생산 공정에 사용된다. 세포는, 10% 감마 조사된 우태혈청 (FBS)로 보충된, 둘베코 변형 이글 배지 (DMEM)으로 구성된 배지에서 배양된다. 세포는 정착 의존적이고 세포 분해는 TrypLE Select, 비-동물 세포 해리 시약을 사용하여 달성된다. 세포는 5% (+/- 0.5%) CO₂ 분위기에서 37°C (+/- 1°C)로 유지된다.

2. 일시적 형질감염: 3 일의 성장 (DMEM 배지 + 10% FBS) 이후, Hyperstack 세포 배양 배지는 신선한, 무혈청 DMEM 배지로 대체되고 최적화된 PEI 침전 방법을 사용하여 3 생산 플라스미드로 형질감염된다.

충분한 DNA 플라스미드 형질감염 복합체는 (BDS 로트당) 20 Corning 36-층 HyperStacks를 형질감염시키기 위해 BSC에서 제조된다. 3.0 mg의 pDTX.hFIX.101 백터 플라스미드, 60 mg의 pAdDeltaF6(Kan), 30 mg의 pAAV2.rh10.KanR AAV 헬퍼 플라스미드 및 GMP 등급 PEI (PEIPro, PolyPlus Transfection SA)함유하는 초기에 DNA/PEI 혼합물을 제조된다. 양호하게 혼합 후, 용액은 실온에서 25 분 동안 놓이게 하고, 그 다음 무혈청 배지에 첨가되어 반응을 퀸칭시키고 그 다음 Corning 36-층 Hyperstacks에 첨가된다. 형질감염 혼합물을 Hyperstack의 모든 36 층 사이에 동등하게 되고 세포는 5 일 동안 5% (+/- 0.5%) CO₂ 분위기에서 37°C (+/- 2°C)로 인큐베이션된다.

3. 세포 배지 수확: 형질감염된 세포 및 배지는 유닛 밖으로 배지를 무균처리로 유출시킴으로써 일회용 생물공정 백을 사용하여 각각의 Hypertack으로부터 수확된다. 배지의 수확 이후, ~ 80 리터 용적은 (벤조나제용 공-인

자) 2 mM의 최종 농도로 MgCl₂로 보충되고 벤조나제 뉴클레아제 (Cat#: 1.016797.0001, Merck Group)은 25 유닛/mL의 최종 농도로 첨가된다. (일회용 생물공정 백에서) 생성물은 인큐베이터에서 2-3 시간 동안 37°C로 인큐베이션되어 형질감염 절차의 결과로서 수화물에서 존재하는 잔존 세포 및 플라스미드 DNA의 효소 소화에 충분한 시간을 제공한다. 이러한 단계는 최종 벡터 DP에서 잔존 DNA의 양을 최소화하기 위해 수행된다. 인큐베이션 기간후, NaCl은 500 mM의 최종 농도로 첨가되어 여과 및 다운스트림 접선 유동 여과 동안 생성물의 회수를 돋는다.

[0301] 4. 정화: 세포 및 세포 잔해는 연동 펌프에 의해 유도되는 멸균된, 폐쇄된 튜우빙 및 백 세트로서 직렬식으로 연결된 심층 필터 캡슐 (1.2 μm/0.22 μm)를 사용하여 생성물로부터 제거된다. 배지는 Sartorius Sartoguard PES 캡슐 필터 (1.2 μm /0.22 μm) (Sartorius Stedim Biotech Inc.)를 통해 통과된다.

[0302] 5. 대규모 접선 유동 여과: 정화된 생성물의 용적 감소 (10-20 배)는 Spectrum Labs에 의해 생산된 구입 멸균된, 폐쇄된 생물공정 튜우빙, 백 및 막 세트를 사용하는 접선 유동 여과 (TFF)를 사용하여 달성된다.

8.4 제2 벡터로 재투여

[0304] 8.4.1 AAV3B 또는 AAV5의 재투여

[0305] 이전에 AAVrh10 또는 AAV8 벡터로 치료된 레수스 마카크에서 AAV3B 또는 AAV5를 사용하는 벡터 재투여의 효율은 평가되었다. 표 4에서 나타낸 바와 같이 벡터는 벡터가 HEK293 세포에서 삼중 형질감염 이후 상정액으로부터 회수되었고 아이오닉사놀 구배에서 정제되었던 이전에 기재된 바와 같이 생산되었다. 벡터 역가는 디지털 PCR 방법에 의해 결정되었다.

[0306] 24 숫컷 레수스 마카크 (3-5 년령)은 기존의 NAb의 상태에 기반하여 8 그룹 (n=3/그룹; 표 1)으로 연구에 등록되었다. 마카크는 표 4에서 나타낸 바와 같이 AAV 벡터와 함께, 1.0 x10¹³ GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE로 0 주사되었다. 12 주째에, 마카크는 표 4에서 나타낸 바와 같이 AAV 벡터와 함께, 1.0 x10¹³ GC/kg AAV.TBG.hCG.WPRE로 제2 주사를 받았다. 간 생검은 2 주째 및 14 주째에 수행되었고, 검시는 26 주째에 수행되었다.

[0307] 표 4: 접단 및 벡터 요약

집단	동물 ID	제1 주사	제2 주사
G1A	RA0931	PBS	AAV3B.TBG.rhAFP
	RA1388		
	RQ9745		
G1B	RA0923	PBS	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1275		
	RQ9383		
G2A	RA0985	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9638		
	RQ9746		
G2B	RA0992	AAVrh10.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1322		
	RA1417		
G3A	RA1234	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV3B.TBG.rhAFP
	RQ9737		
	RQ9751		
G3B	RA1339	AAV8.TBG.rhCG.WPRE	AAV5.TBG.rhAFP
	RA1390		
	RQ9805		
G4	RA0548	AAV3B.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA0658		
	RQ9840		
G5	RA0968	AAV5.TBG.rhCG.WPRE	N/A
	RA1208		
	RA1239		

[0308]

[0309] 혈청에서 이식유전자 (rhCG - 레수스 용모성 성선자극호르몬 b 서브유닛; rhAFP - 레수스 알파 태아단백)의 발현 수준은 효소-연결된 면역흡착 검정 (ELISA)에 의해 측정되었다. 간에서 벡터 DNA 카피를 측정하기 위해, QPCR 검정은 간 생검 및 검시 동안 수집된 간 샘플로부터 추출된 총 세포 DNA에서 수행되었다. AAV NAb 검정은 이전에 기재된 바와 같이 수행되었다. 간 부문은 이미지형성용 항-CG 항체로 염색되었다.

[0310] 도 15는 AAVrh10, AAV8, AAV3B 및 AAV5 벡터 (제1 벡터 주사)에 의한 rhCG 발현 수준의 비교를 보여준다. 도 16A-16D는 상이한 시점에서 간내 rhCG 벡터 DNA 카피를 보여준다. 도 17A-17B는 rhAFP를 발현시키는 AAV3B (도 17A) 또는 AAV5 (도 17B) 벡터로 재투여 (제2 벡터 주사)후 rhAFP 수준을 보여준다. 도 18A 및 도 18B는 간에서 rhAFP 벡터 계놈 카피를 보여준다. 도 19는 마카크에서 차별적인 AAV Nab 반응을 보여준다.

[0311] 미접촉 동물에서, 분기균 E 벡터 (AAVrh10 & AAV8)은 문맥주위 유전자의 최고 수준이 최저를 갖는 AAV5 벡터로 전달하고; 문맥주위 구역은 진입 혈관 공급에 최근접하고, 가장 산소화된 혈액을 받고, 대사 과정을 위하여 간의 중요한 영역이라는 것을 실증하였다. AAVrh10 및 AAV5는 AAV8 및 AAV3B보다 중화 항체 (NAb)의 더 높은 수준을 유발시켰다. 이식유전자 발현에서 상당한 동물-대-동물 변화는 혈청검사음성 동물에서 AAV3B로 언급되었다. 시험된 단시간 프레임 내에, AAVrh10으로부터 유발된 NAb는 혈청학적으로 구별되는 AAV3B 혈청형으로 억제된 후 속적인 생체내 형질도입을 갖는 것처럼 보이고; AAV8에 사전 노출은 AAV3B 형질도입을 방해하지 않았다.

[0312] 본 명세서, 뿐만 아니라 미국 특허 출원 번호 62/323,336, 62/331,807, 및 62/428,866에서 인용된 모든 공보는 본 명세서에서 참조로 편입된다. 유사하게, 본 명세서에서 참조되는 그리고 첨부된 서열 목록, 및 서열 목록 자체에서 나타나는 서열 식별 번호는 참조로 편입된다. 본 발명이 특정 구현예와 관련하여 기재된 한편, 변형이 본 발명의 사상으로부터 이탈 없이 실시될 수 있다는 것이 인정될 것이다. 그와 같은 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 해당하도록 의도된다.

[0313] (서열 목록 자유 텍스트)

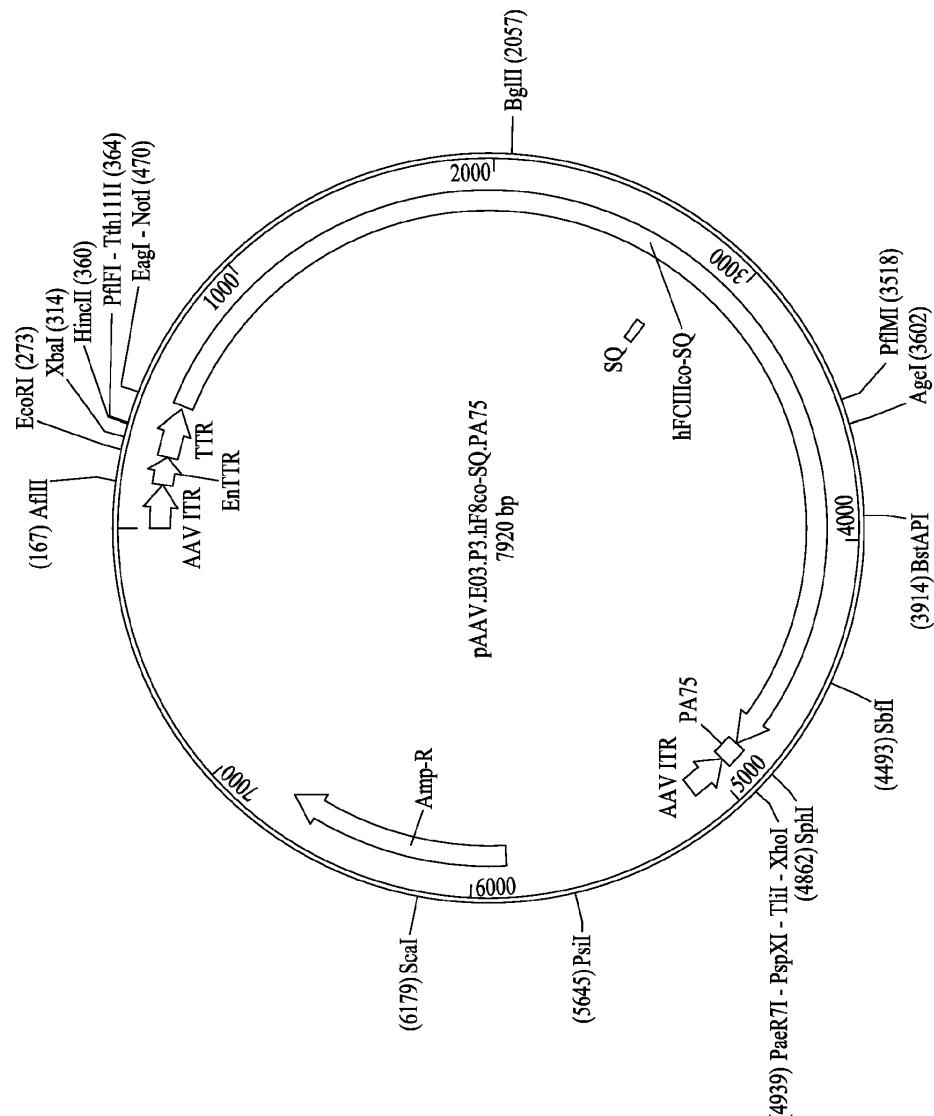
[0314] 하기 정보는 숫자 식별자 <223> 하에서 자유 텍스트를 함유하는 서열에 제공된다.

서열번호: (자유 텍스트 함유)	<223>하에서 자유 텍스트
4	<223> 작제된 서열
5	<223> 작제된 서열
6	<223> 작제된 서열
7	<223> 작제된 서열
8	<223> 작제된 서열
9	<223> 작제된 서열
10	<223> 작제된 서열
11	<223> 작제된 서열
12	<223> 작제된 서열
13	<223> 작제된 서열
14	<223> 작제된 서열
15	<223> 작제된 서열
16	<223> 작제된 서열
17	<223> AAVhu.37 캡시드
18	<223> AAVrh.10 캡시드
19	<223> 작제된 서열
20	<223> AAV3B 캡시드

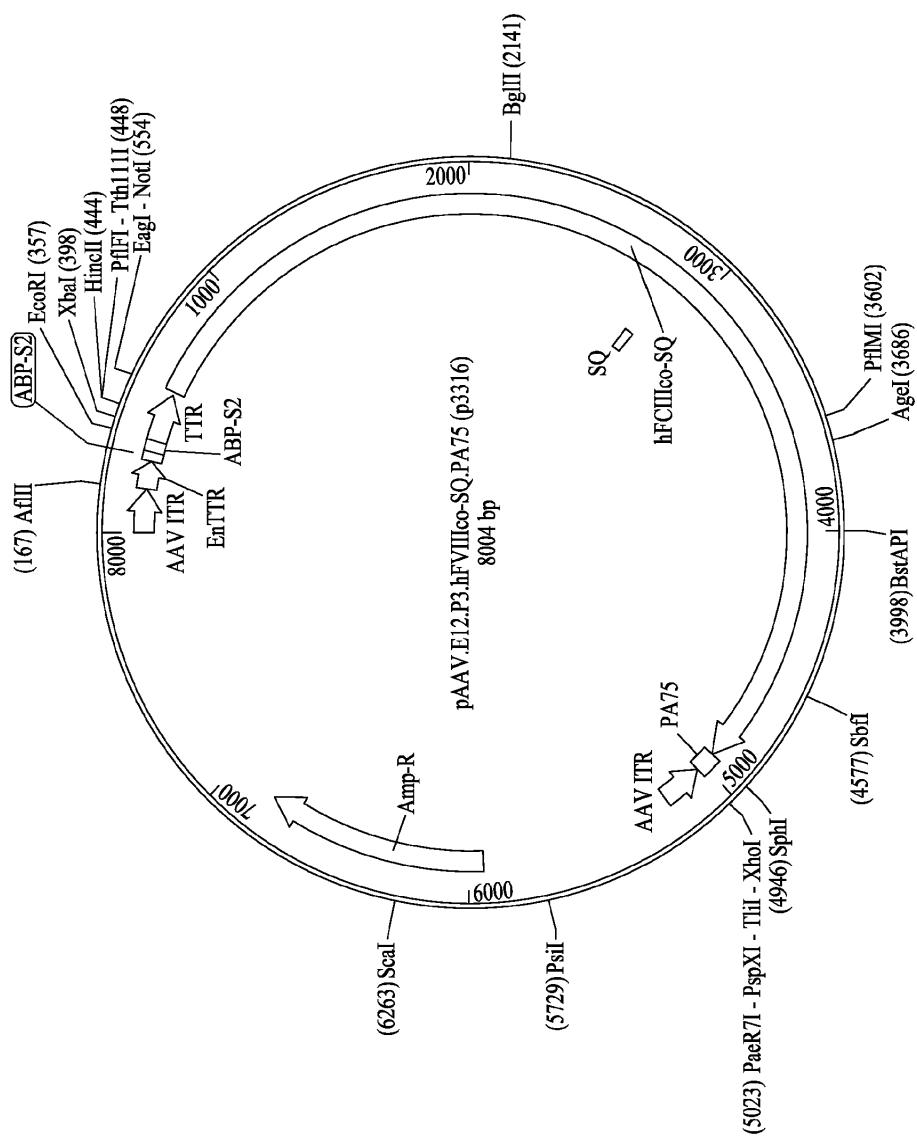
[0315]

도면

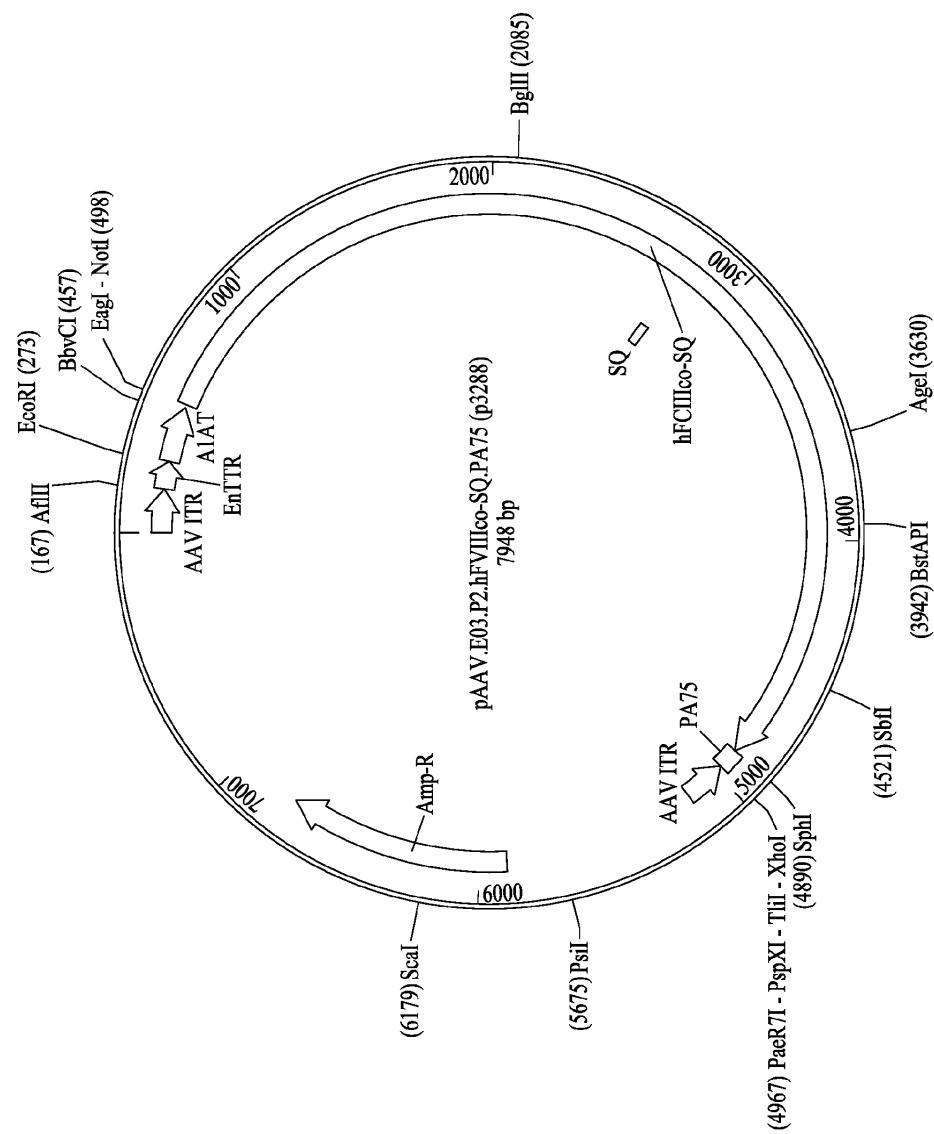
도면 1



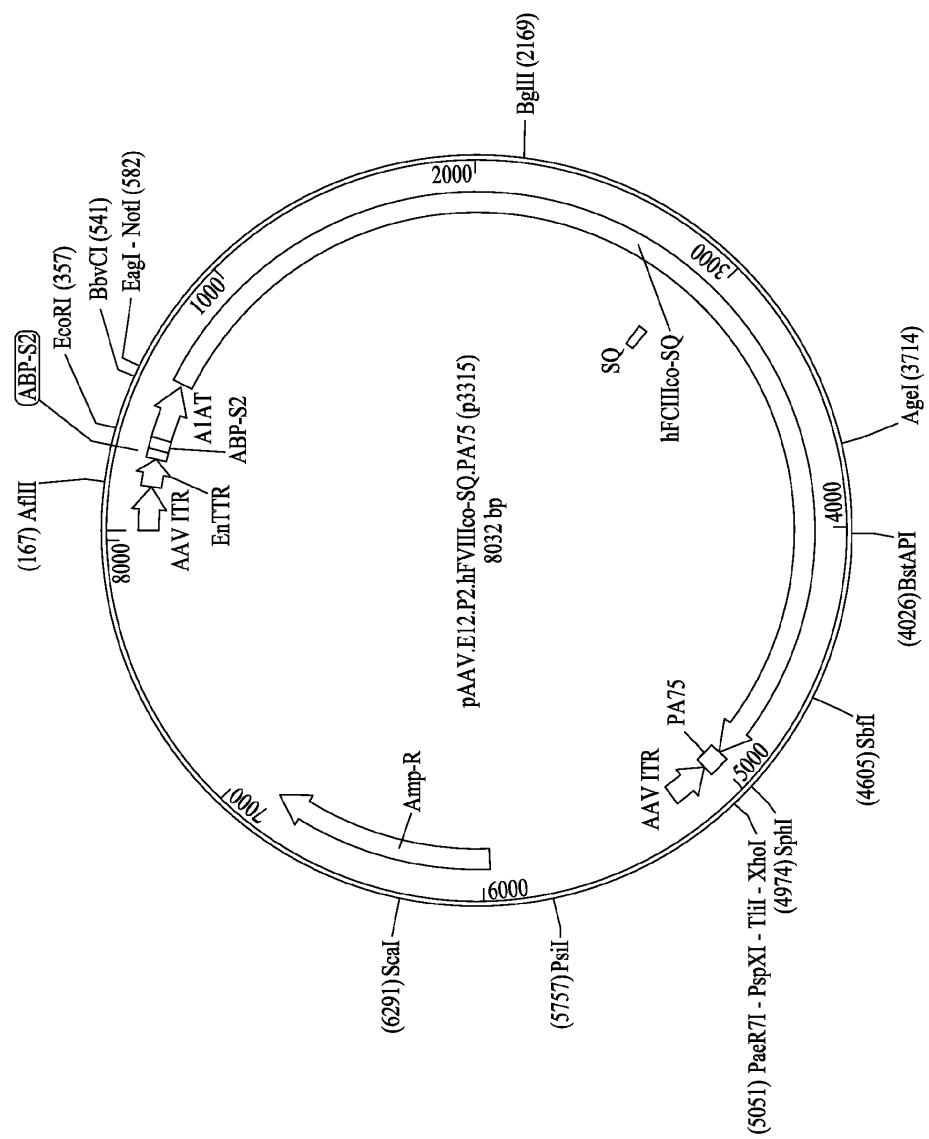
도면2



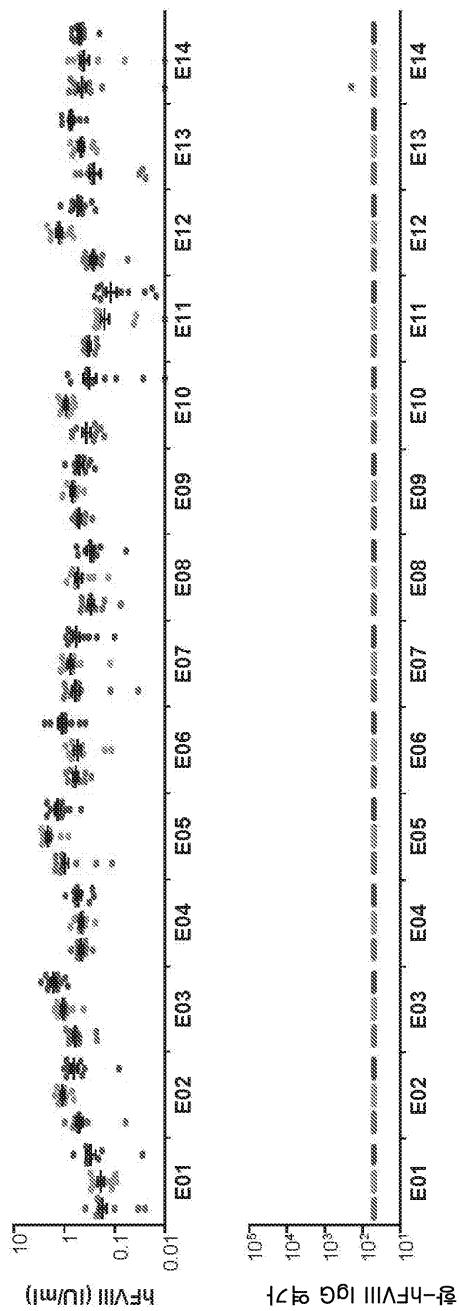
도면3



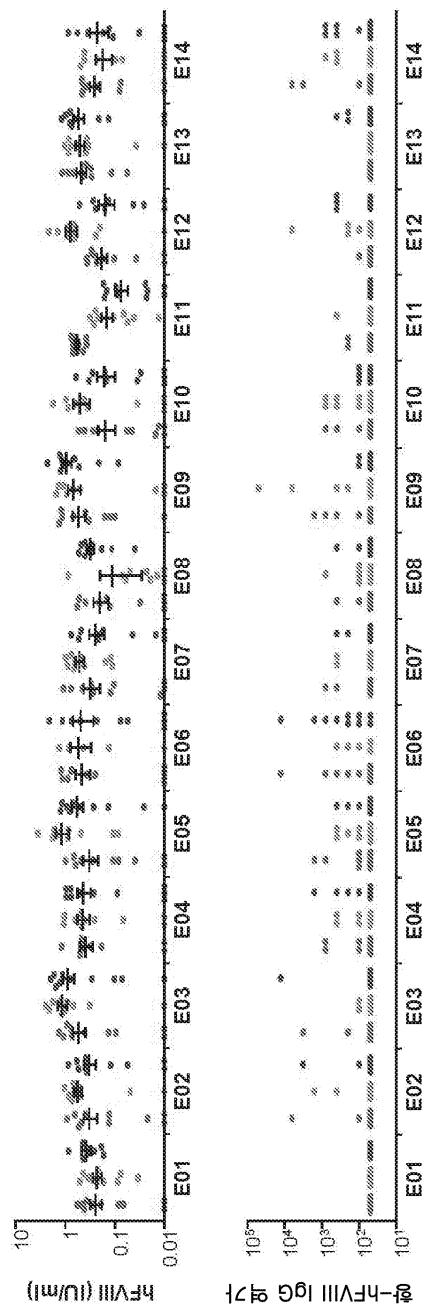
도면4



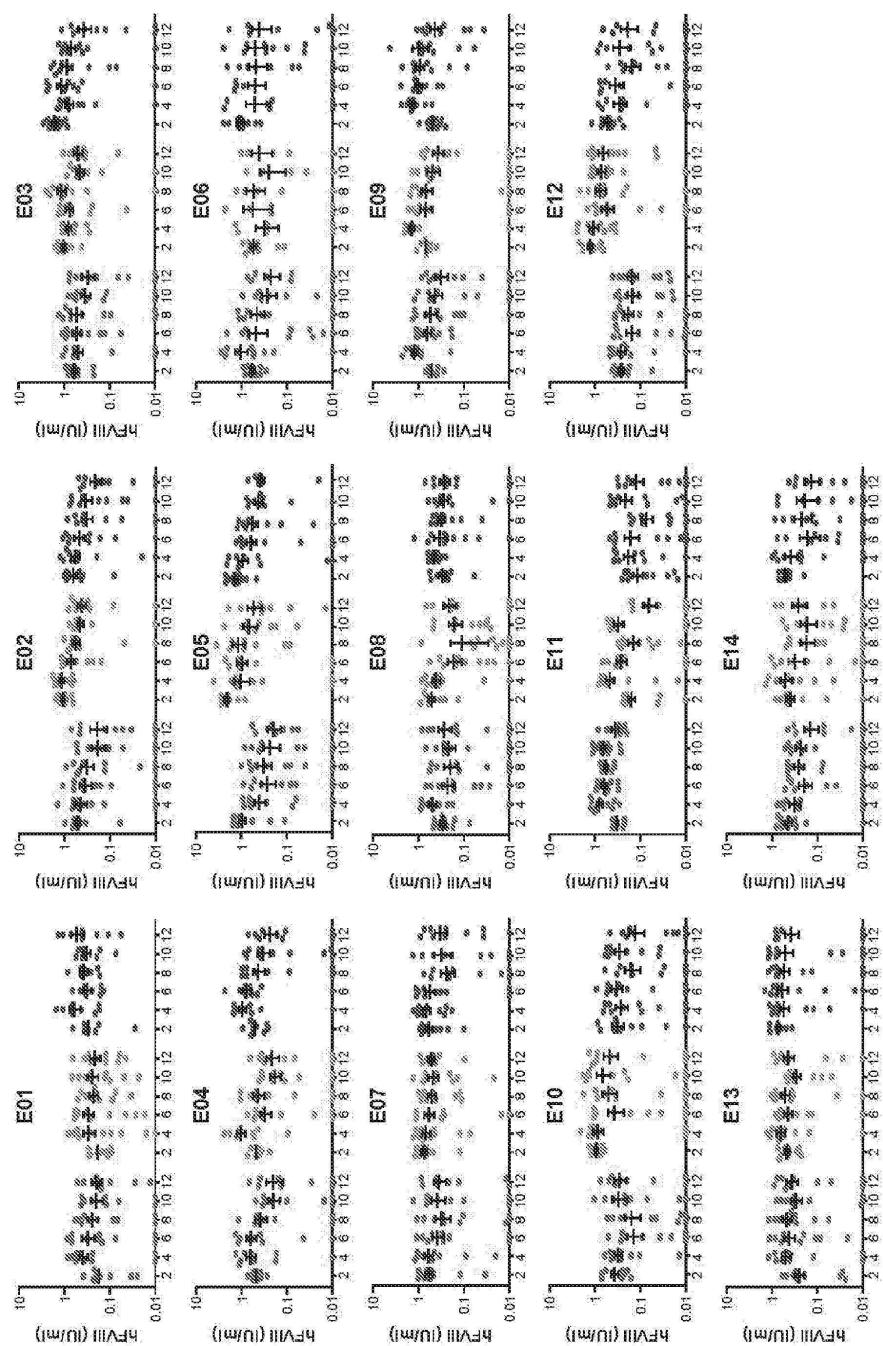
도면5



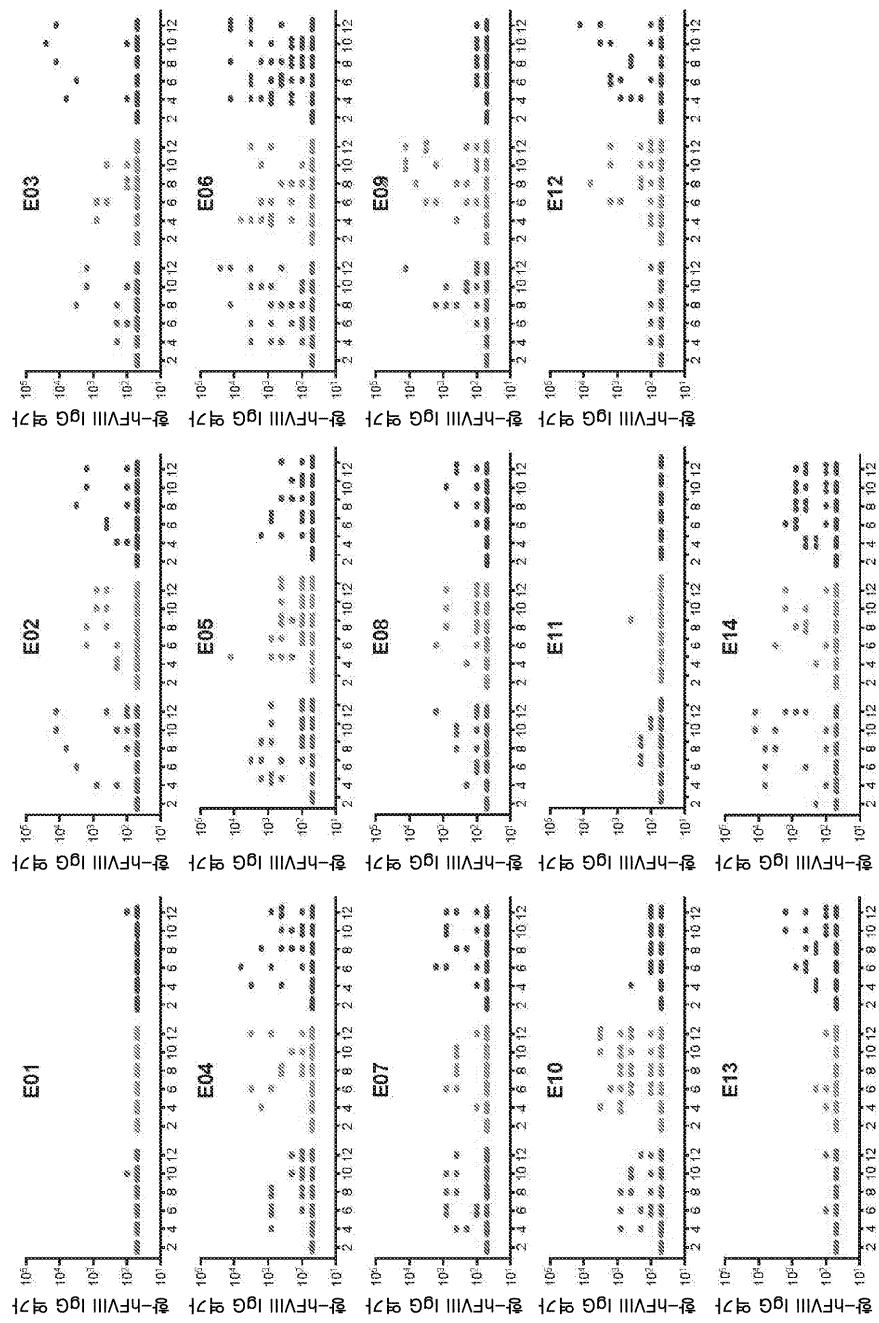
도면6



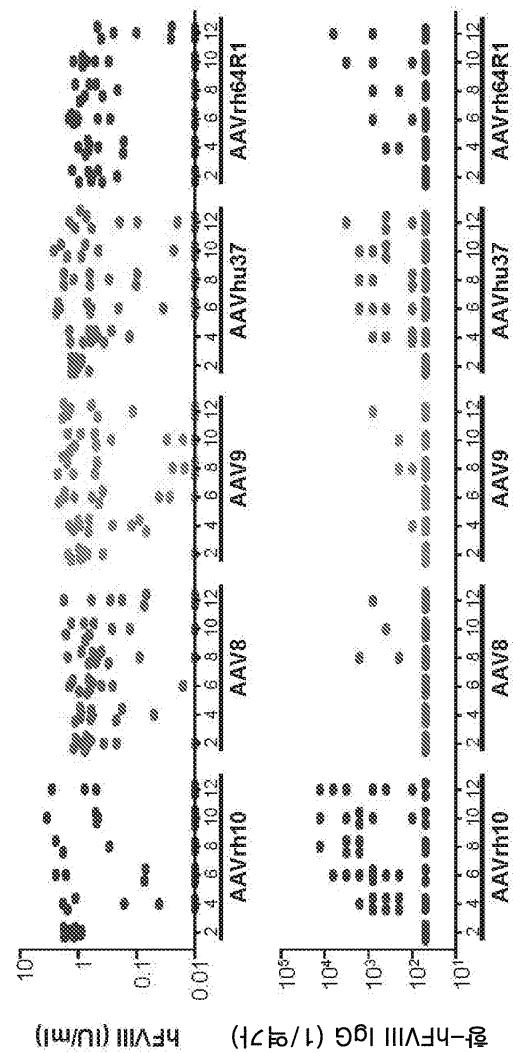
도면7



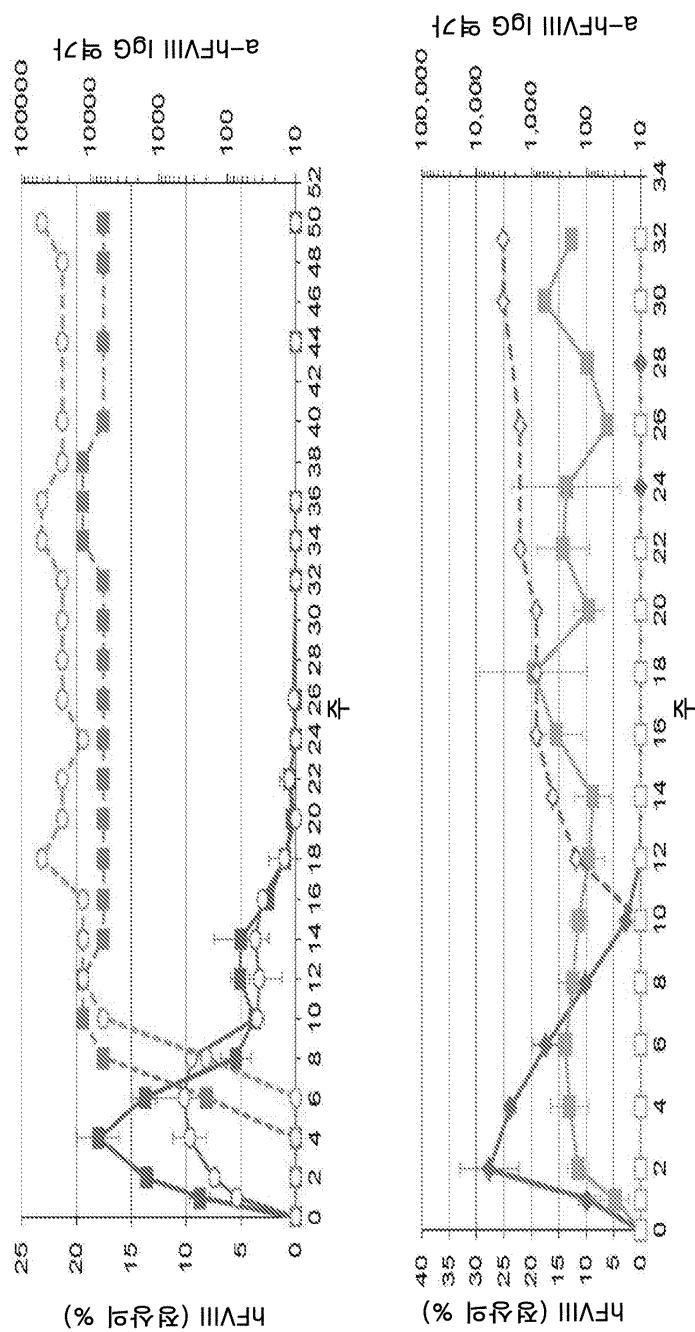
도면8



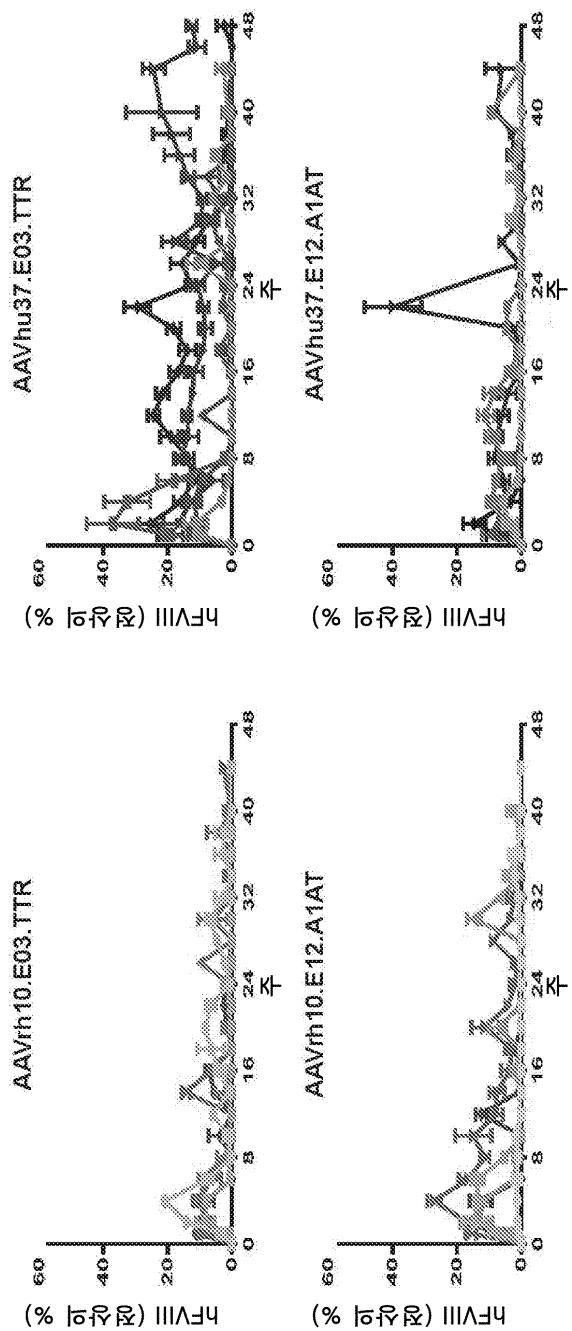
도면9



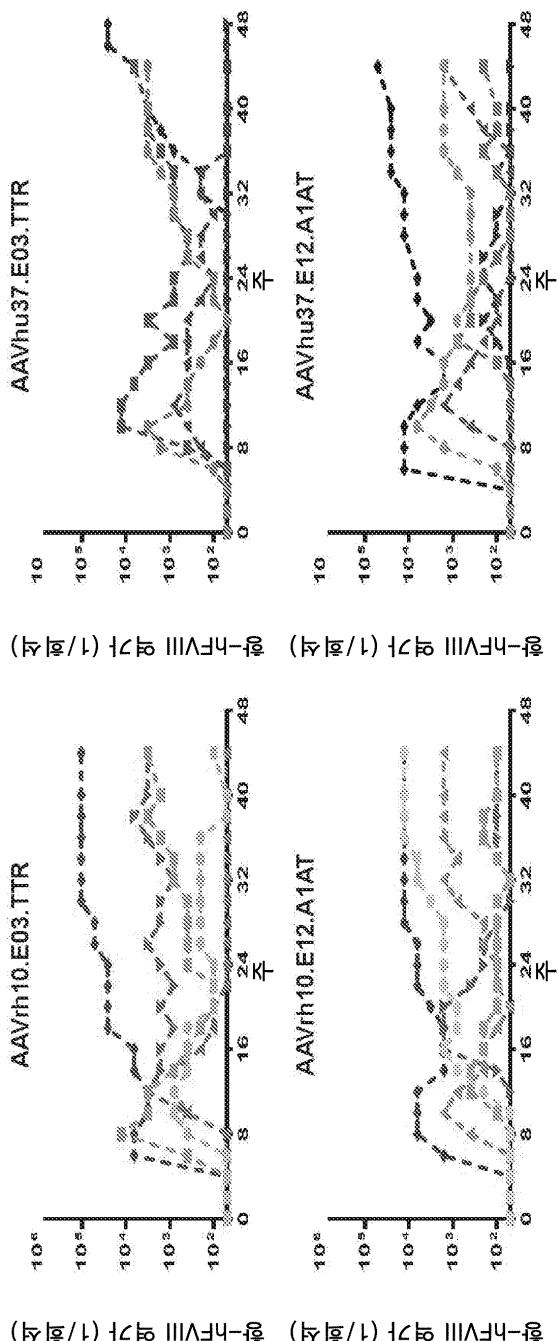
도면10



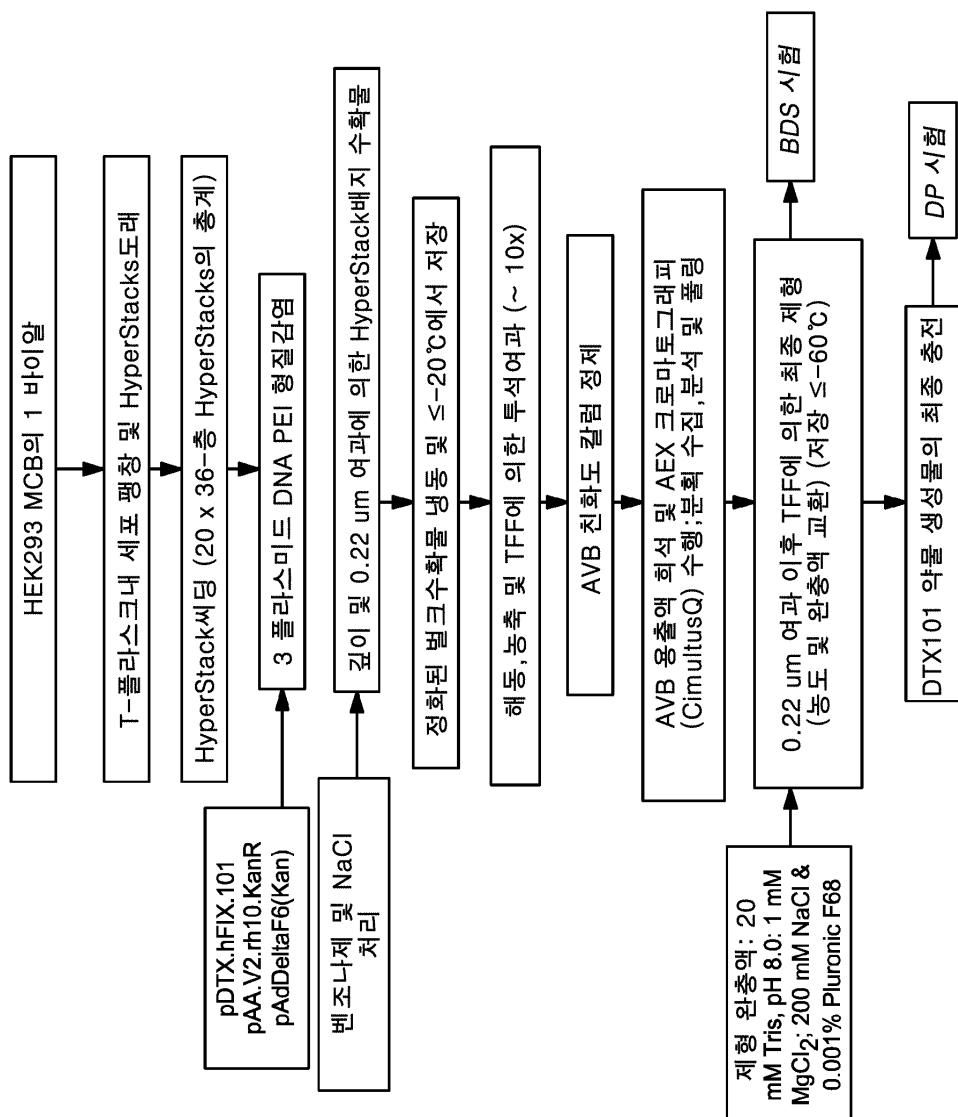
도면11



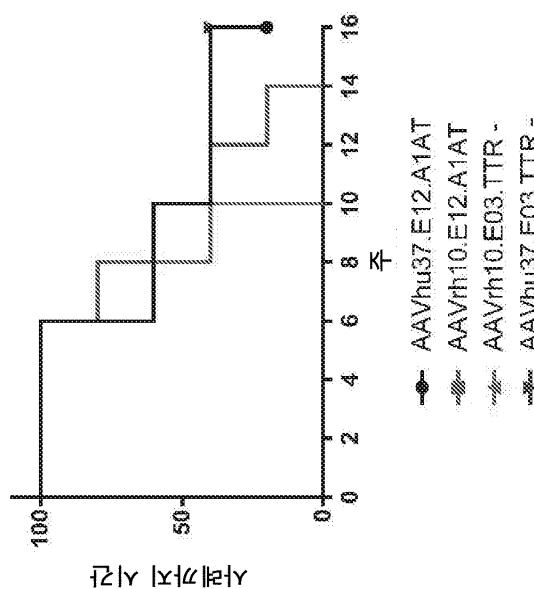
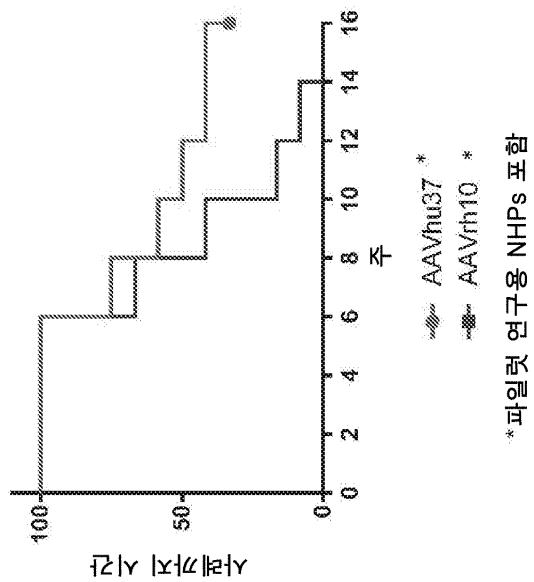
도면12



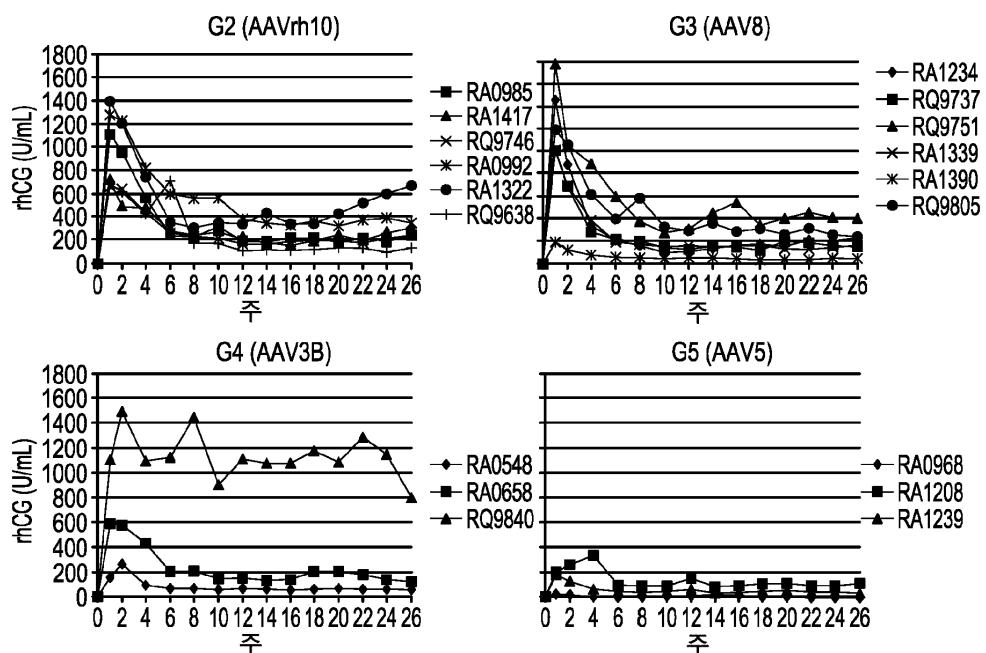
도면13



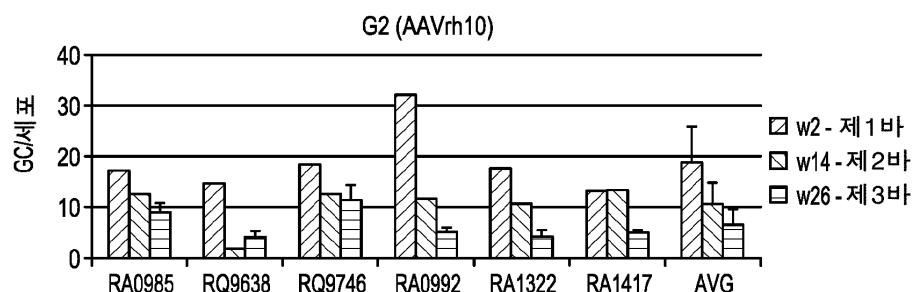
도면 14



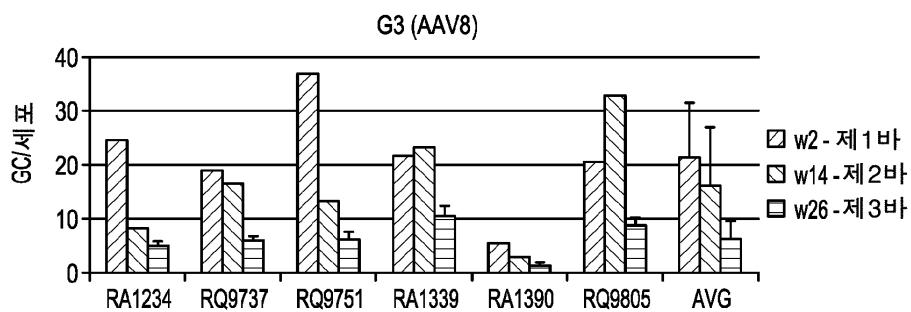
도면15



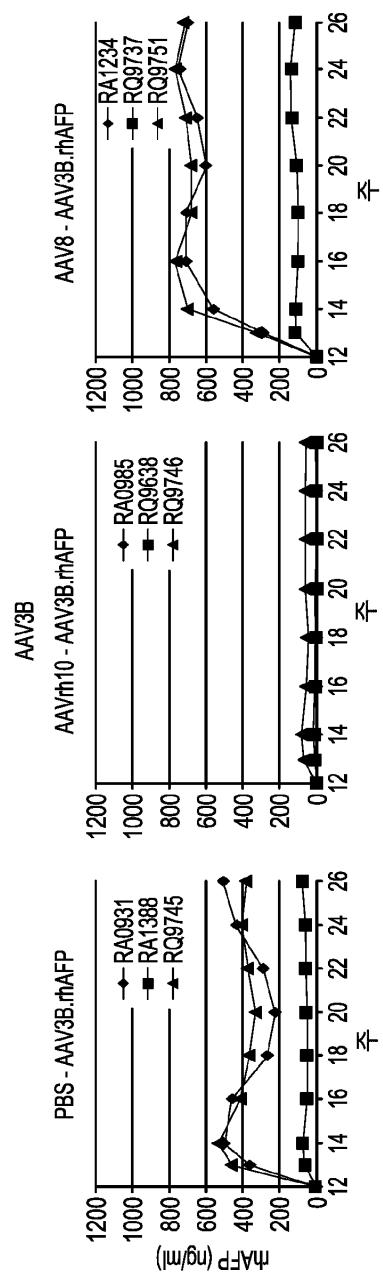
도면16a



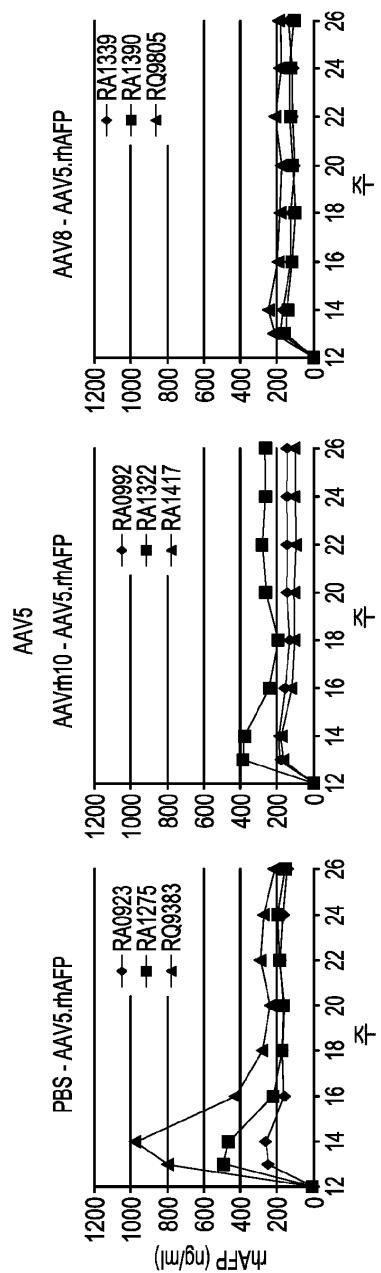
도면16b



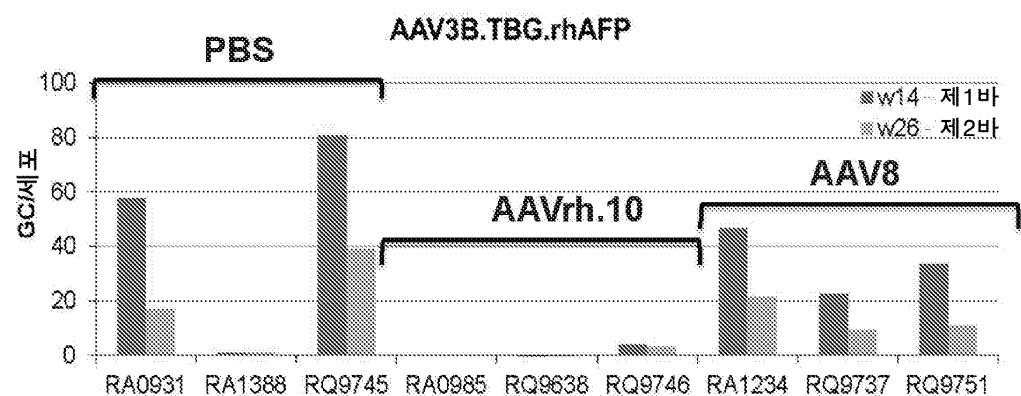
도면 17a



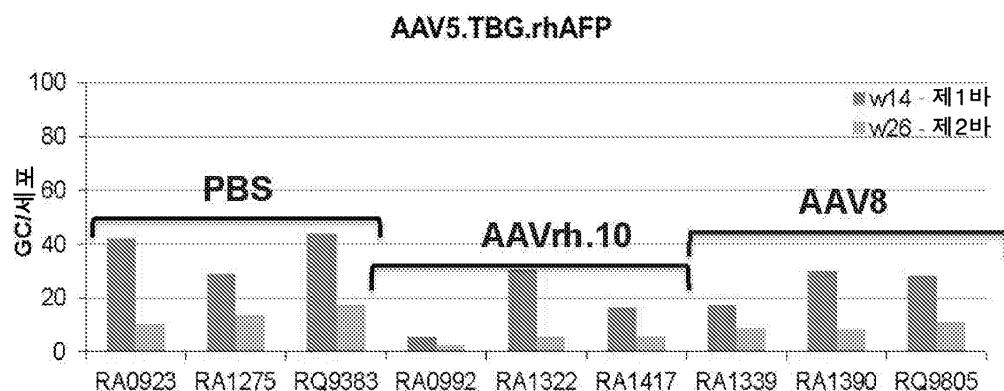
도면17b



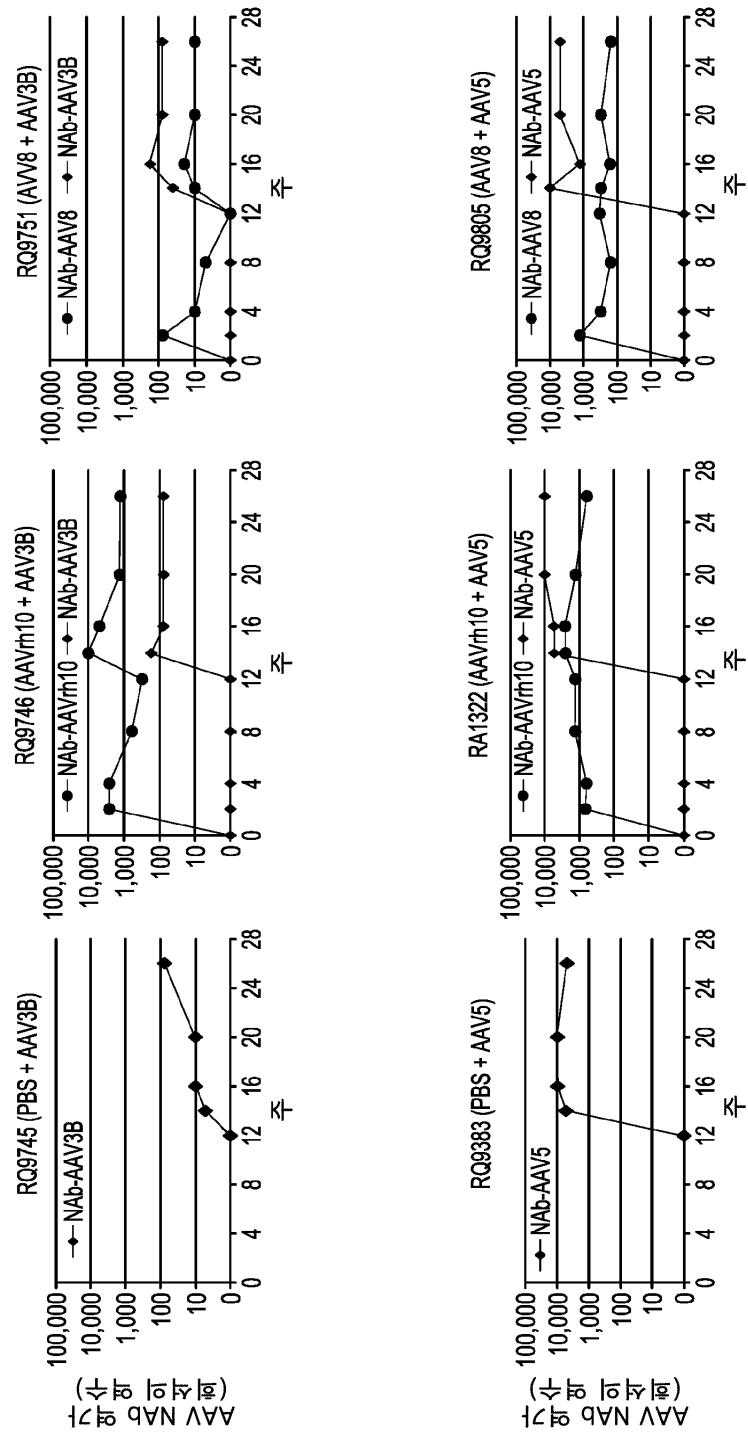
도면18a



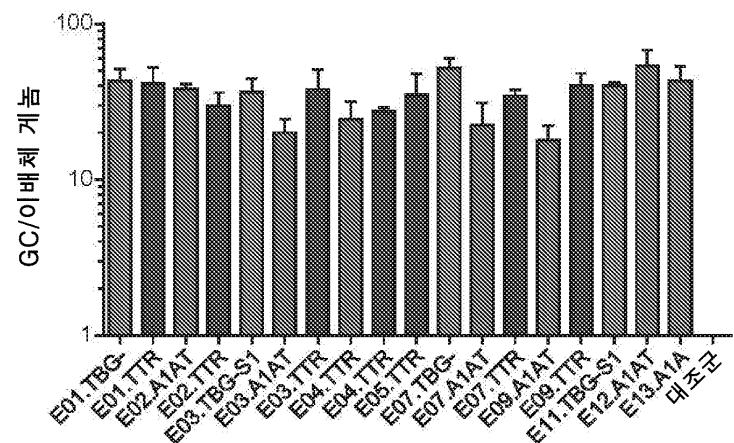
도면18b



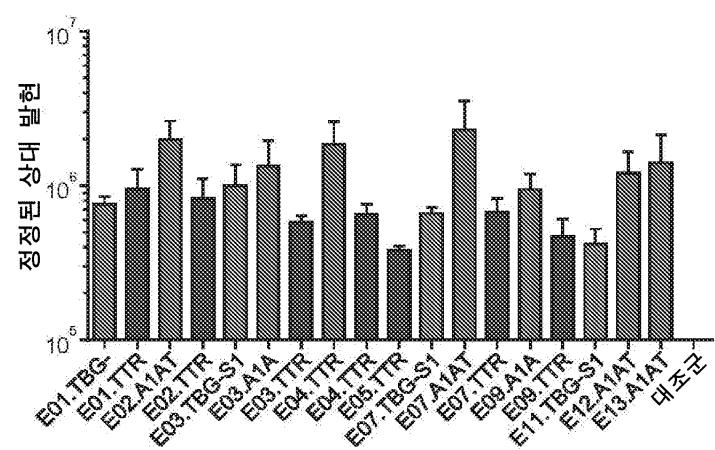
도면19



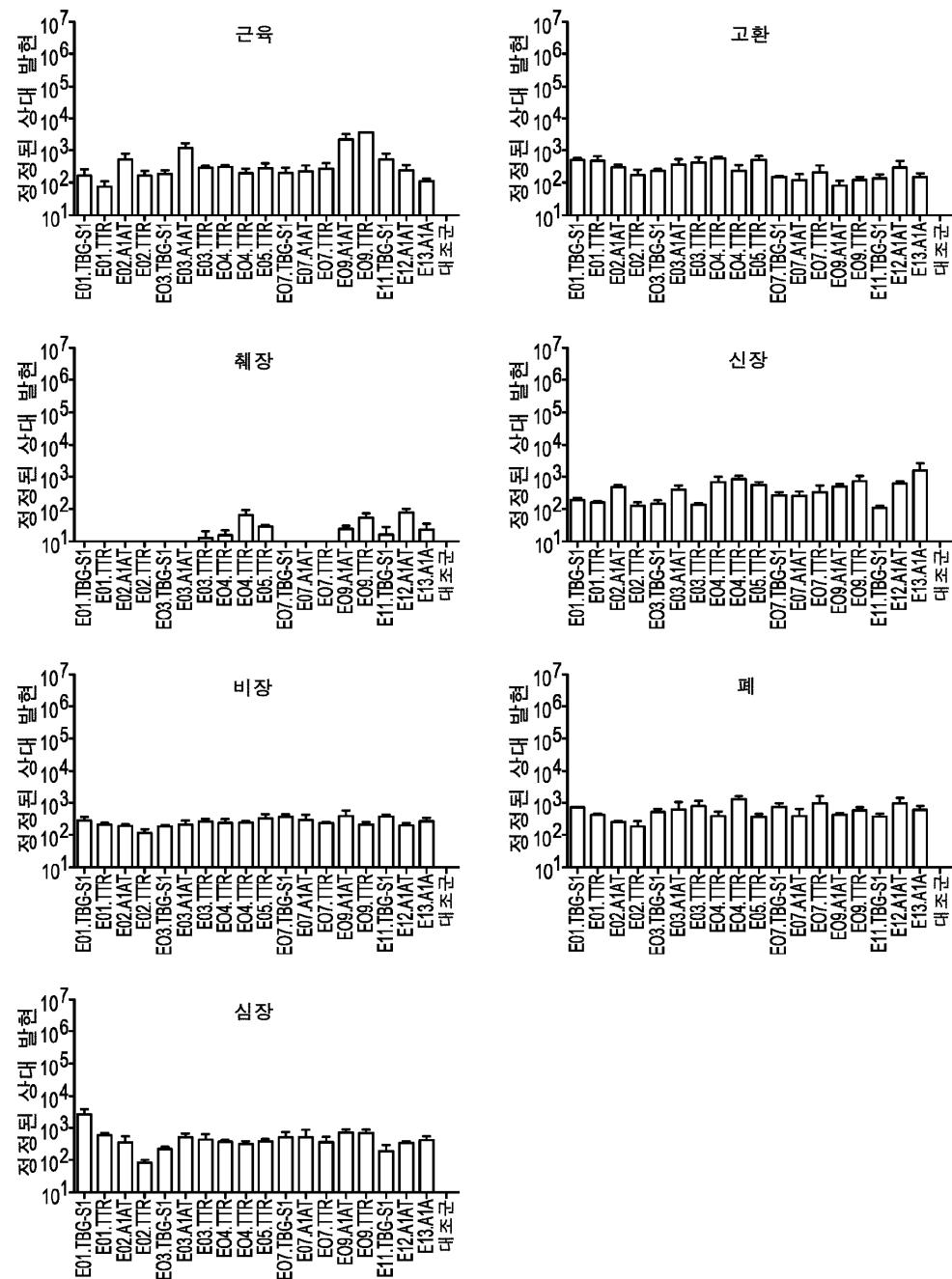
도면20a



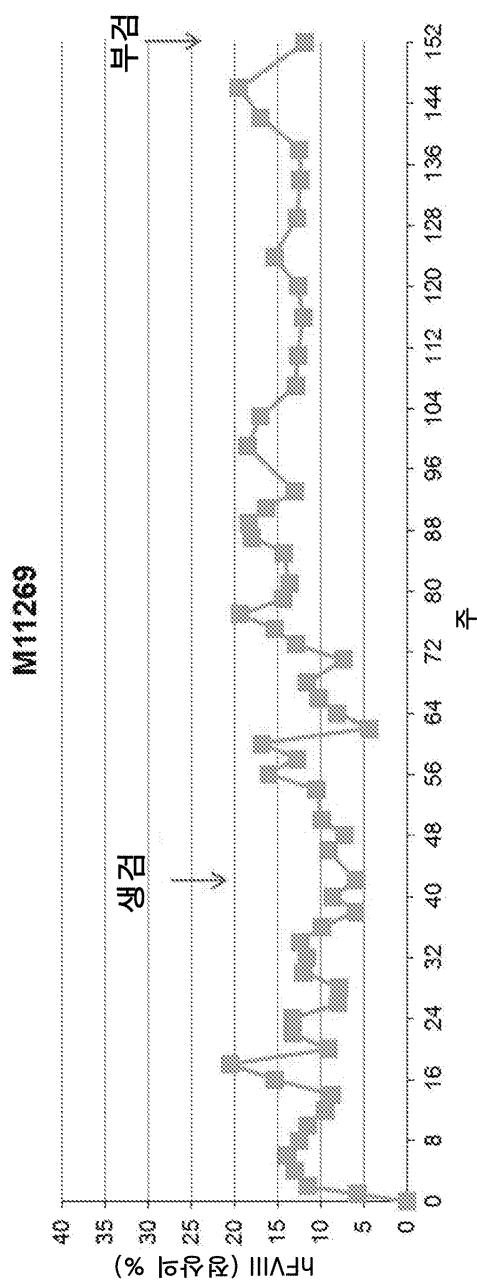
도면20b



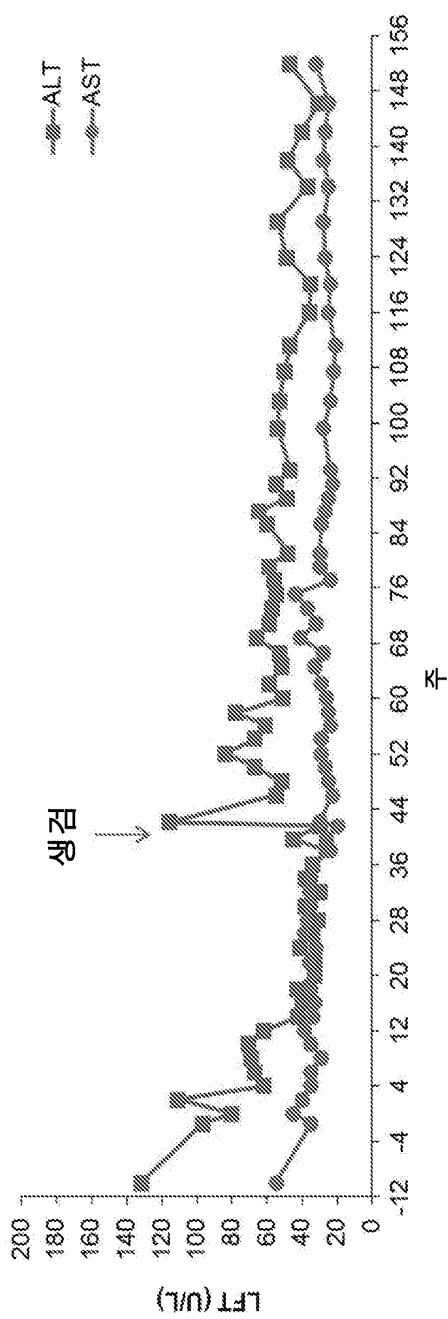
도면21



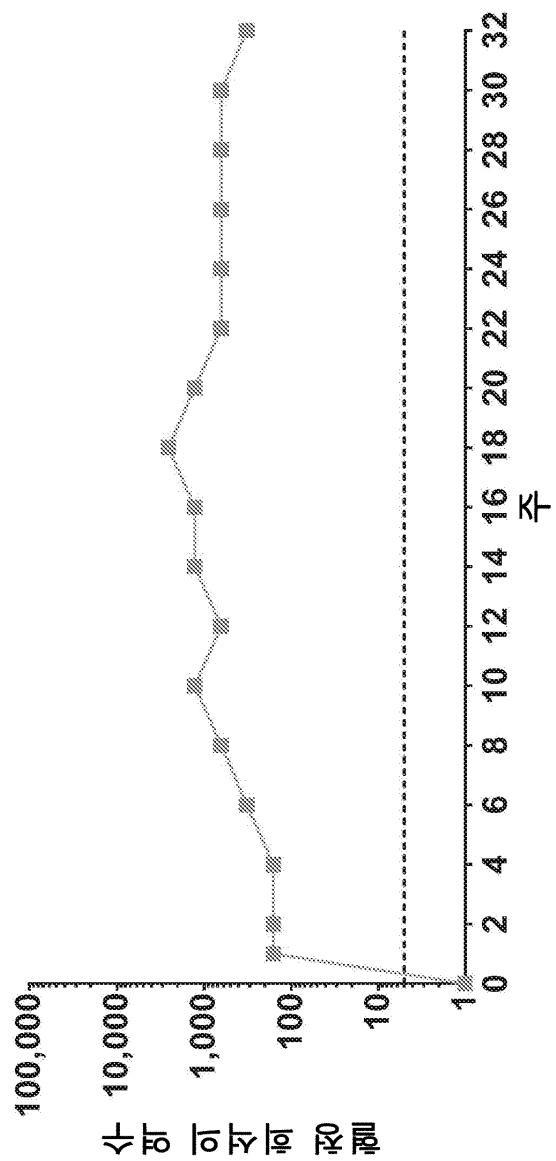
도면22

AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

도면23

AAVhu37.TBG-S1.hFVIII-SQ.PA75 (3x10¹² GC/kg)

도면24



도면25a

퍼센트 동일성 메트릭스- Clustal2.1에 의해 창작됨

1: hFVIIIco 100.00 77.24 (서열 식별 번호: 2)
2: hFVIII 77.24 100.00 (서열 식별 번호: 1)

도면 25b

(계속)

도면 25c

(계속)

도면 25d

(계속)

도면25e

(계속)

서열목록

- <110> The Trustees of the University of Pennsylvania
<120> GENE THERAPY FOR TREATING HEMOPHILIA A
<130> UPN-16-7798PCT
<150> US 62/323,336
<151> 2016-04-15
<150> US 62/331,807
<151> 2016-05-04
<150> US 62/428,866

<151> 2016-12-01

<160> 20

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 4371

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

atgcaaatag agctctccac ctgcttctt ctgtgcctt tgcgattctg cttagtgcc 60

accagaagat actacctggg tgcagtggaa ctgtcatggg actataatgca aagtgtatctc 120

ggtgagctgc ctgtggacgc aagatttctt cctagagtgc caaaatctt tccattcaac 180

acctcagtcg tgtacaaaaa gactctgttt gtagaattca cggatcacct tttcaacatc 240

gctaagccaa gccaccctg gatgggtctg ctaggtccta ccatccaggc tgaggttat 300

gatacagtgg tcattacact taagaacatg gcttccatc ctgtcagtct tcatgctgtt 360

ggtgtatcct actggaaagc ttctgaggga gctgaatatg atgatcagac cagtc当地 420

gagaaagaag atgataaagt ctccctggt ggaagccata catatgtctg gcaggctcg 480

aaagagaatg gtccaatggc ctctgaccca ctgtgcctt cctactcata tctttctcat 540

gtggacctgg taaaagactt gaattcaggg ctcattggag ccctactagt atgttagagaa 600

gggagctgg ccaagaaaaa gacacagacc ttgcacaaat ttatactact ttttgcgtta 660

tttgcgttgg gaaaaagttt gcactcagaa acaaagaact cttgtatgc ggtataggat 720

gctgcacatcg ctccggcctg gcctaaatg cacacagtca atggttatgt aaacaggct 780

ctgccaggctc tgattggatg ccacaggaaa tcagtcattt ggcattgtat tggaatggc 840

accactcctg aagtgcactc aatattcctc gaaggtcaca cattttgtt gaggaaccat 900

cgccaggcgt cttggaaat ctgcacata actttcctt ctgtcaaacc actttgtatg 960

gaccttggac agtttctact gttttgtcat atctttccc accaacatga tggcatggaa 1020

gcttatgtca aagtagacag ctgtccagag gaaccccaac tacgaatgaa aaataatgaa 1080

gaagcggaaag actatgatga tgcattttact gattctgaaa tggatgtggt caggtttat 1140

gatgacaact ctcccttcatt tatccaaatt cgctcagttt ccaagaagca tcctaaaact 1200

tgggtacatt acattgctgc tgaagaggag gactgggact atgctccctt agtccctcgcc 1260

cccgatgaca gaagtataa aagtcaatat ttgaacaatg gccctcagcg gattggtagg 1320

aagtacaaaaa aagtccgatt tatggcatac acagatgaaa ctttaagac tcgtgaagct 1380

attcagcatg aatcaggaat cttgggacct ttactttatg ggaaagttgg agacacactg	1440
ttgattataat ttaagaatca agcaagcaga ccatataaca tctaccctca cggaatcact	1500
gatgtccgtc ctttgttattc aaggagatta ccaaaaggtg taaaacattt gaaggatttt	1560
ccaatctgc caggagaaat attcaaataat aaatggacag tgactgtaga agatggcca	1620
actaaatcag atcctcggtg cctgaccgc tattactcta gttcgtaa tatggagaga	1680
gatctagctt caggactcat tggccctctc ctcatctgt acaaagaatc tgttagatcaa	1740
agaggaaacc agataatgtc agacaagagg aatgtcatcc tgtttctgt atttgatgag	1800
aaccgaagct ggtacctcac agagaatata caacgcttc tcccaatcc agctggagtg	1860
cagcttggagg atccagagtt ccaagccccc aacatcatgc acagcatcaa tggctatgtt	1920
tttgatagtt tgcagttgtc agtttgttgc catgagggtgg catactggta cattctaagc	1980
attggagcac agactgactt ctttctgtc ttcttctgt gatataccctt caaacacaaa	2040
atggctatg aagacacact caccctattc ccattctcag gagaaactgt cttcatgtcg	2100
atggaaaacc caggctatg gattctgggg tgccacaact cagacttgc gaacagaggc	2160
atgaccgcct tactgaaggt ttcttagttgt gacaagaaca ctgggtgatta ttacgaggac	2220
agttatgaag atattcagc atacttgctg agtaaaaaca atgccattga accaagaagc	2280
ttctcccaga atccaccagt cttgaaacgc catcaacggg aaataactcg tactacttt	2340
cagtcagatc aagaggaaat tgactatgt gataccatat cagttgaaat gaagaaggaa	2400
gattttgaca ttatgtatg ggtgaaaat cagagcccc gcagcttca aaagaaaaca	2460
cgacactatt ttattgctgc agtggagagg ctctggatt atggatgag tagctcccc	2520
catgttctaa gaaacagggc tcagagtggc agtgccttc agtcaagaa agtttttc	2580
caggaatttta ctgatggctc cttaactcag cccttataacc gtggagaact aaatgaacat	2640
ttgggactcc tggggccata tataagagca gaagttgaag ataatacat ggtacttcc	2700
agaaatcagg cctctcggtcc ctattccttc tattctagcc ttatcttta tgaggaagat	2760
cagaggcaag ggcgcagaacc tagaaaaaaac ttgtcaagc ctaatgaaac caaaacttac	2820
ttttggaaag tcaacatca tatggcaccc actaaagatg agtttgcactg caaagcctgg	2880
gttttattct ctgatgttga cttggaaaaa gatgtgcact caggcctgtat tggaccctt	2940
ctggctgtcc acactaacac actgaaccct gctcatggc gacaagtgc agtacaggaa	3000
tttgctctgt ttccaccat ctgtatgatg accaaaagct ggtacttcac tgaaaatatg	3060
gaaagaaaact gcagggtcc ctgcaatatac cagatggaaat atcccacttt taaagagaat	3120
tatcgcttcc atgcaatcaa tggctacata atggatacac tacctggctt agtaatggct	3180
caggatcaaa ggattcgatg gtatctgctc agcatggca gcaatggaaa catccattct	3240

attcattca gtggacatgt gttcactgta cgaaaaaaag aggagtataa aatggcactg	3300
tacaatctt atccaggtgt tttttagaca gtggaaatgt taccatccaa agctggatt	3360
tggcggtgg aatgccttat tggcgagcat ctacatgctg ggatgagcac acttttctg	3420
gtgtacagca ataagtgtca gactccctg ggaatggctt ctggacacat tagagat	3480
cagattacag cttcaggaca atatggacag tggcccaa agctggccag acttcattat	3540
tccggatcaa tcaatgcctg gagcaccaag gagcccttt ctggatcaa ggtggatctg	3600
ttggcacca tgattattca cggcatcaag acccagggtg cccgtcagaa gtttccagc	3660
ctctacatct ctcatgtat agtcttgatg ggaagaagtgcagacttat	3720
cgagggaaatt ccactggaac cttaatggtc ttcttggca atgtggattc atctggata	3780
aaacacaata ttttaaccc tccaattatt gctcgataca tccgttgca cccaaactcat	3840
tatagcattc gcagcactt tcgcatggag ttgatggct gtgattaaa tagtgcagc	3900
atgccattgg gaatggagag taaagcaata tcagatgcac agattactgc ttcatcctac	3960
tttaccaata tggggccac ctggctcct tcaaaagctc gacttcacct ccaagggagg	4020
agtaatgcct ggagacctca ggtgaataat ccaaagagt gggtgcagg ggacttcag	4080
aagacaatga aagtccacagg agtaactact cagggagtaa aatctctgt taccagcatg	4140
tatgtgaagg agttcctcat ctccagcagt caagatggcc atcagttggac tctttttt	4200
cagaatggca aagtaaagggt tttcaggga aatcaagact cttcacacc tgtggtaac	4260
tctctagacc caccgttact gactcgctac cttcgaattc acccccagag ttgggtgcac	4320
cagattgccc tgaggatgga gtttctggc tgcgaggcac aggacctcta c	4371
<210> 2	
<211> 4374	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> constructed sequence	
<400> 2	
atgcagatcg agctgagcac ctgtttttc ctgtgcctgc tgccgttctg ctttccccc	60
acccggcggt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg	120
ggagagctgc cagtggatgc ccgttccca ccacgggtgc caaagagctt cccattcaac	180
accagcgtgg tgtacaagaa gaccctgttc gtggagttca ccgtcacct gttcaacatc	240
gccaaaggcac gcccaccctg gatggactg ctgggaccaa ccatccagcc cgagggttac	300
gataccgtgg tggatcaccct gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacgcccgtg	360

ggagtgagct actggaaggc cagcgaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg	420
gagaaggagg atgataaggt gttcccgagga ggaaggccaca cctacgtgt gcaggtgctg	480
aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac	540
gtggatctgg tgaaggatct gaacagcggc ctgatcggag ccctgcgtgt gtgcgggag	600
ggaaggctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcatcctgt gttcgccgtg	660
ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcgg accaagaaca gcctgatgca ggatcggat	720
gccggccagcg cccggccctg gccaaagatg cacaccgtga acggatacgt gaaccggagc	780
ctgcccaggac ttagtggatg ccaccggaa agcgtgtact ggcacgtat cgaaatggaa	840
accaccccg agggtgcactc tatcttcctg gaggacaca ctttcgtgt gcggaaaccac	900
cggcaggccca gcctggagat cagccaaatc accttcctga ccggccagac cctgctgtat	960
gatctggac agttctgtgt gttctgccc atcagcagcc accagcacga tggaaatggag	1020
gcctacgtga aggtggatag ctgcccagag gagccacagc tgcggatgaa gaacaacgag	1080
gaggccgagg attacgtatgatgatctgacc gatacgagata tggatgtgt gcgggttcgtat	1140
gatgataaca gccaaagctt catccagatc cggagctgg ccaagaagca cccaaagacc	1200
tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gattgggatt acgccccact ggtgctggcc	1260
cctgtatgtatc ggagctacaa gagccagttac ctgaacaacg gaccacagcg gatcgacgg	1320
aagtacaaaa aagtgcgtt catggctac accgatgaga cttcaagac ccgggaggcc	1380
atccagcactc agagcggaaat cctggacca ctgctgtacg gagaggtgg agataccctg	1440
ctgtatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccataacaaca tctaccacca cgaaatcacc	1500
gatgtgcggc cactgtacag ccggcggctg ccaaaggag tgaaggcacct gaaggatttc	1560
ccaaatcctgc caggagatcttcaagtac aagtggacag tgacagtgg ggtatggacca	1620
accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgtgaa catggagaga	1680
gacctggcct ctggactgtatc tggaccactg ctgtatgtatc acaaggagtc tggatcg	1740
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tttctctgt gtttcatgag	1800
aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaaccc agccggagtg	1860
cagctggagg atccagatgtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cgatgtacgt	1920
ttcgatagcc tgcaatgtgag cgtgtgcctg cacgagggtgg cttattggta tatcctgagc	1980
atcgagccc agaccgatattt cctgagctgt ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2040
atgggtgtacg aggataccctt gaccctgttc ccatttcggag gagagaccgt gttcatgagc	2100
atggagaacc caggactgtg gatcctggta tgccacaact ctgatttcgaa acacagagga	2160
atgactgccc tgctgaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatatactgaggat	2220

agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gccagaaggc	2280
ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2340
cagtcgtatc aggaggagat tgattatgtat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2400
gattttgata tctatgtatga ggatgagaac cagagccaa gaagcttcca gaagaagacc	2460
agacactact tcatacgctgc agtggagaga ctgtgggatt atggatgag cagcagccaa	2520
cacgtgctga gaaacagagc ccagagcggc tctgtgccac agttcaagaa ggtgggtttc	2580
caggagtta ccgatggaag cttcacccag ccactgtacc gggagagct gaacgagcac	2640
ctgggactgc tgggaccata catccggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgaccc	2700
cggaaccagg ccagccggcc atacagctc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	2760
cagccgcagg gagccgagcc acggaagaac ttctgtgaagc caaacgagac caagaccc	2820
ttcttggagg tgcagcacca catggccca accaaggatg agttcgattt caaggcctgg	2880
gcctacttca gcgtgttgc tctggagaag gatgtgcaca gggactgtat cggaccactg	2940
ctgggtgtcc acaccaacac cctgaaccca gcccacggc ggcagggtgac cgtgcaggag	3000
ttcccccgtt tcttaccat cttcgatgatg accaagagct ggtacttcac cgagaacatg	3060
gagcggact gcccggcccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacctt caaggagaac	3120
taccggttcc acgcatcaa cggatacatc atggataccc tgccaggact ggtgtatggcc	3180
caggatcagc ggatccggtg gtacctgctg agcatggaa gcaacgagaa catccacagc	3240
atccacttca gggacacgt gttcacccgt cgaaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3300
tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaagcaa gcccggaaatc	3360
tggccgggtgg agtgcctgat cggagagcac ctgcacgccc gaatgagcac cctttccctg	3420
gtgtacagca acaagtgcac gacccactg ggaatggcca gggacacat cgggatttc	3480
cagatcaccg ccagccggaca gtacggacag tggcccaaa agctggcccg gctgcactac	3540
agcggaaagca tcaacgcctg gaggaccaag gagccattca gctggatcaa agtggatctg	3600
ctggcccaaa tgatcatcca cggaaatcaag acccaggagg cccggcagaa gttcagcagc	3660
ctgtacatca gccaggatcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtgc gcaaccc	3720
cggggaaaca gcacccggaaac cctgtgggtt ttcttcggaa acgtggatag cagccggaaatc	3780
aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccatacata tccggctgca cccaaaccc	3840
tacagcatca gaagcaccct gcggatggag ctgtggatgtatctgaa cagctgtcc	3900
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgcc agatcaccgc cagcagctac	3960

ttcaccaaca tggcgccac ctggagccca agcaaggccc ggctgcacct gcagggacgg 4020

agcaacgcct ggccggccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggatttccag 4080

aagaccatga aggtgaccgg agtgaccacc cagggagtga agagcctgct gactagcatg 4140

tatgtgaagg agttcctgat cagcagcagc caggatggac accagtgac cctttttc 4200

cagaacggaa aggtgaaggt gttccaggaa aaccaggata gttcacccc agtggtaac 4260

agcctggatc caccactgct gacccgatac ctgcggatcc acccacagag ctgggtgcac 4320

cagatcgccc tgagaatgga ggtgctggaa tgcgaggccc aggatctgta ctga 4374

<210> 3

<211> 1457

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Gln Ile Glu Leu Ser Thr Cys Phe Phe Leu Cys Leu Leu Arg Phe

1 5 10 15

Cys Phe Ser Ala Thr Arg Arg Tyr Tyr Leu Gly Ala Val Glu Leu Ser

20 25 30

Trp Asp Tyr Met Gln Ser Asp Leu Gly Glu Leu Pro Val Asp Ala Arg

35 40 45

Phe Pro Pro Arg Val Pro Lys Ser Phe Pro Phe Asn Thr Ser Val Val

50 55 60

Tyr Lys Lys Thr Leu Phe Val Glu Phe Thr Asp His Leu Phe Asn Ile

65 70 75 80

Ala Lys Pro Arg Pro Pro Trp Met Gly Leu Leu Gly Pro Thr Ile Gln

85 90 95

Ala Glu Val Tyr Asp Thr Val Val Ile Thr Leu Lys Asn Met Ala Ser

100 105 110

His Pro Val Ser Leu His Ala Val Gly Val Ser Tyr Trp Lys Ala Ser

115 120 125

Glu Gly Ala Glu Tyr Asp Asp Gln Thr Ser Gln Arg Glu Lys Glu Asp

130 135 140

Asp Lys Val Phe Pro Gly Gly Ser His Thr Tyr Val Trp Gln Val Leu

145	150	155	160
Lys Glu Asn Gly Pro Met Ala Ser Asp Pro Leu Cys Leu Thr Tyr Ser			
165	170	175	
Tyr Leu Ser His Val Asp Leu Val Lys Asp Leu Asn Ser Gly Leu Ile			
180	185	190	
Gly Ala Leu Leu Val Cys Arg Glu Gly Ser Leu Ala Lys Glu Lys Thr			
195	200	205	
Gln Thr Leu His Lys Phe Ile Leu Leu Phe Ala Val Phe Asp Glu Gly			
210	215	220	
Lys Ser Trp His Ser Glu Thr Lys Asn Ser Leu Met Gln Asp Arg Asp			
225	230	235	240
Ala Ala Ser Ala Arg Ala Trp Pro Lys Met His Thr Val Asn Gly Tyr			
245	250	255	
Val Asn Arg Ser Leu Pro Gly Leu Ile Gly Cys His Arg Lys Ser Val			
260	265	270	
Tyr Trp His Val Ile Gly Met Gly Thr Thr Pro Glu Val His Ser Ile			
275	280	285	
Phe Leu Glu Gly His Thr Phe Leu Val Arg Asn His Arg Gln Ala Ser			
290	295	300	
Leu Glu Ile Ser Pro Ile Thr Phe Leu Thr Ala Gln Thr Leu Leu Met			
305	310	315	320
Asp Leu Gly Gln Phe Leu Leu Phe Cys His Ile Ser Ser His Gln His			
325	330	335	
Asp Gly Met Glu Ala Tyr Val Lys Val Asp Ser Cys Pro Glu Glu Pro			
340	345	350	
Gln Leu Arg Met Lys Asn Asn Glu Glu Ala Glu Asp Tyr Asp Asp Asp			
355	360	365	
Leu Thr Asp Ser Glu Met Asp Val Val Arg Phe Asp Asp Asn Ser			
370	375	380	
Pro Ser Phe Ile Gln Ile Arg Ser Val Ala Lys Lys His Pro Lys Thr			
385	390	395	400
Trp Val His Tyr Ile Ala Ala Glu Glu Asp Trp Asp Tyr Ala Pro			

405	410	415
Leu Val Leu Ala Pro Asp Asp Arg Ser Tyr Lys Ser Gln Tyr Leu Asn		
420	425	430
Asn Gly Pro Gln Arg Ile Gly Arg Lys Tyr Lys Lys Val Arg Phe Met		
435	440	445
Ala Tyr Thr Asp Glu Thr Phe Lys Thr Arg Glu Ala Ile Gln His Glu		
450	455	460
Ser Gly Ile Leu Gly Pro Leu Leu Tyr Gly Glu Val Gly Asp Thr Leu		
465	470	475
Leu Ile Ile Phe Lys Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Asn Ile Tyr Pro		
485	490	495
His Gly Ile Thr Asp Val Arg Pro Leu Tyr Ser Arg Arg Leu Pro Lys		
500	505	510
Gly Val Lys His Leu Lys Asp Phe Pro Ile Leu Pro Gly Glu Ile Phe		
515	520	525
Lys Tyr Lys Trp Thr Val Thr Val Glu Asp Gly Pro Thr Lys Ser Asp		
530	535	540
Pro Arg Cys Leu Thr Arg Tyr Tyr Ser Ser Phe Val Asn Met Glu Arg		
545	550	555
560		
Asp Leu Ala Ser Gly Leu Ile Gly Pro Leu Leu Ile Cys Tyr Lys Glu		
565	570	575
Ser Val Asp Gln Arg Gly Asn Gln Ile Met Ser Asp Lys Arg Asn Val		
580	585	590
Ile Leu Phe Ser Val Phe Asp Glu Asn Arg Ser Trp Tyr Leu Thr Glu		
595	600	605
Asn Ile Gln Arg Phe Leu Pro Asn Pro Ala Gly Val Gln Leu Glu Asp		
610	615	620
Pro Glu Phe Gln Ala Ser Asn Ile Met His Ser Ile Asn Gly Tyr Val		
625	630	635
640		
Phe Asp Ser Leu Gln Leu Ser Val Cys Leu His Glu Val Ala Tyr Trp		
645	650	655

Tyr Ile Leu Ser Ile Gly Ala Gln Thr Asp Phe Leu Ser Val Phe Phe
 660 665 670
 Ser Gly Tyr Thr Phe Lys His Lys Met Val Tyr Glu Asp Thr Leu Thr
 675 680 685
 Leu Phe Pro Phe Ser Gly Glu Thr Val Phe Met Ser Met Glu Asn Pro
 690 695 700
 Gly Leu Trp Ile Leu Gly Cys His Asn Ser Asp Phe Arg Asn Arg Gly

 705 710 715 720
 Met Thr Ala Leu Leu Lys Val Ser Ser Cys Asp Lys Asn Thr Gly Asp
 725 730 735
 Tyr Tyr Glu Asp Ser Tyr Glu Asp Ile Ser Ala Tyr Leu Leu Ser Lys
 740 745 750
 Asn Asn Ala Ile Glu Pro Arg Ser Phe Ser Gln Asn Pro Pro Val Leu
 755 760 765
 Lys Arg His Gln Arg Glu Ile Thr Arg Thr Thr Leu Gln Ser Asp Gln
 770 775 780

 Glu Glu Ile Asp Tyr Asp Asp Thr Ile Ser Val Glu Met Lys Lys Glu
 785 790 795 800
 Asp Phe Asp Ile Tyr Asp Glu Asp Glu Asn Gln Ser Pro Arg Ser Phe
 805 810 815
 Gln Lys Lys Thr Arg His Tyr Phe Ile Ala Ala Val Glu Arg Leu Trp
 820 825 830
 Asp Tyr Gly Met Ser Ser Ser Pro His Val Leu Arg Asn Arg Ala Gln
 835 840 845
 Ser Gly Ser Val Pro Gln Phe Lys Lys Val Val Phe Gln Glu Phe Thr

 850 855 860
 Asp Gly Ser Phe Thr Gln Pro Leu Tyr Arg Gly Glu Leu Asn Glu His
 865 870 875 880
 Leu Gly Leu Leu Gly Pro Tyr Ile Arg Ala Glu Val Glu Asn Asn Ile
 885 890 895
 Met Val Thr Phe Arg Asn Gln Ala Ser Arg Pro Tyr Ser Phe Tyr Ser
 900 905 910

Ser Leu Ile Ser Tyr Glu Glu Asp Gln Arg Gln Gly Ala Glu Pro Arg

915 920 925

Lys Asn Phe Val Lys Pro Asn Glu Thr Lys Thr Tyr Phe Trp Lys Val

930 935 940

Gln His His Met Ala Pro Thr Lys Asp Glu Phe Asp Cys Lys Ala Trp

945 950 955 960

Ala Tyr Phe Ser Asp Val Asp Leu Glu Lys Asp Val His Ser Gly Leu

965 970 975

Ile Gly Pro Leu Leu Val Cys His Thr Asn Thr Leu Asn Pro Ala His

980 985 990

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

995 1000 1005

Asp Glu Thr Lys Ser Trp Tyr Phe Thr Glu Asn Met Glu Arg Asn Cys

1010 1015 1020

Arg Ala Pro Cys Asn Ile Gln Met Glu Asp Pro Thr Phe Lys Glu Asn

1025 1030 1035 1040

Tyr Arg Phe His Ala Ile Asn Gly Tyr Ile Met Asp Thr Leu Pro Gly

1045 1050 1055

Leu Val Met Ala Gln Asp Gln Arg Ile Arg Trp Tyr Leu Leu Ser Met

1060 1065 1070

Gly Ser Asn Glu Asn Ile His Ser Ile His Phe Ser Gly His Val Phe

1075 1080 1085

Thr Val Arg Lys Lys Glu Glu Tyr Lys Met Ala Leu Tyr Asn Leu Tyr

1090 1095 1100

Pro Gly Val Phe Glu Thr Val Glu Met Leu Pro Ser Lys Ala Gly Ile

1105 1110 1115 1120

Trp Arg Val Glu Cys Leu Ile Gly Glu His Leu His Ala Gly Met Ser

1125 1130 1135

Thr Leu Phe Leu Val Tyr Ser Asn Lys Cys Gln Thr Pro Leu Gly Met

1140 1145 1150

Ala Ser Gly His Ile Arg Asp Phe Gln Ile Thr Ala Ser Gly Gln Tyr

1155	1160	1165
Gly Gln Trp Ala Pro Lys Leu Ala Arg Leu His Tyr Ser Gly Ser Ile		
1170	1175	1180
Asn Ala Trp Ser Thr Lys Glu Pro Phe Ser Trp Ile Lys Val Asp Leu		
1185	1190	1195
Leu Ala Pro Met Ile Ile His Gly Ile Lys Thr Gln Gly Ala Arg Gln		
1205	1210	1215
Lys Phe Ser Ser Leu Tyr Ile Ser Gln Phe Ile Ile Met Tyr Ser Leu		
1220	1225	1230
Asp Gly Lys Lys Trp Gln Thr Tyr Arg Gly Asn Ser Thr Gly Thr Leu		
1235	1240	1245
Met Val Phe Phe Gly Asn Val Asp Ser Ser Gly Ile Lys His Asn Ile		
1250	1255	1260
Phe Asn Pro Pro Ile Ile Ala Arg Tyr Ile Arg Leu His Pro Thr His		
1265	1270	1275
Tyr Ser Ile Arg Ser Thr Leu Arg Met Glu Leu Met Gly Cys Asp Leu		
1285	1290	1295
Asn Ser Cys Ser Met Pro Leu Gly Met Glu Ser Lys Ala Ile Ser Asp		
1300	1305	1310
Ala Gln Ile Thr Ala Ser Ser Tyr Phe Thr Asn Met Phe Ala Thr Trp		
1315	1320	1325
Ser Pro Ser Lys Ala Arg Leu His Leu Gln Gly Arg Ser Asn Ala Trp		
1330	1335	1340
Arg Pro Gln Val Asn Asn Pro Lys Glu Trp Leu Gln Val Asp Phe Gln		
1345	1350	1355
Lys Thr Met Lys Val Thr Gly Val Thr Thr Gln Gly Val Lys Ser Leu		
1365	1370	1375
Leu Thr Ser Met Tyr Val Lys Glu Phe Leu Ile Ser Ser Ser Gln Asp		
1380	1385	1390
Gly His Gln Trp Thr Leu Phe Phe Gln Asn Gly Lys Val Lys Val Phe		
1395	1400	1405
Gln Gly Asn Gln Asp Ser Phe Thr Pro Val Val Asn Ser Leu Asp Pro		

1410	1415	1420	
Pro Leu Leu Thr Arg Tyr Leu Arg Ile His Pro Gln Ser Trp Val His			
1425	1430	1435	1440
Gln Ile Ala Leu Arg Met Glu Val Leu Gly Cys Glu Ala Gln Asp Leu			
1445	1450	1455	
Tyr			

<210>	4	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	constructed sequence	
<400>	4	
tgtttgctgc ttgcaatgtt tgcccatttt aggg		34
<210>	5	
<211>	100	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	constructed sequence	
<400>	5	
ctacacctgtc atcgccggc ccctgttcaa acatgtccta atactctgtc tctgcaaggg		60
tcatcagtag tttccatct tactcaacat cctccagtg		100
<210>	6	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	constructed sequence	
<400>	6	
aggttaattt ttaaactgtt tgctctgggtt aataatctca gg		42
<210>	7	
<211>	190	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	

<220><223> constructed sequence

<400> 7

atttcataga acgaatgttc cgatgctcta atctctctag acaaggttca tatttgtatg 60

ggttacttat tctctcttg ttgactaagt caataatcag aatcagcagg tttgcagtca 120

gattggcagg gataaggcgc ctagctcagg agaagtgagt ataaaagccc caggctggga 180

gcagccatca 190

<210> 8

<211> 176

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 8

actcaaagtt caaaccttat catttttgc ttgttcctc ttggccttgg ttttgtacat 60

cagcttgaa aataccatcc cagggttaat gctgggtta atttataact aagagtgctc 120

tagtttgca atacaggaca tgctataaaa atggaaagat gttgcttct gagaga 176

<210> 9

<211> 218

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 9

tggacacagg acgctgtggt ttctgagcca gggggcgaact cagatcccag ccagtggact 60

tagccccgtt tagctcctcc gataactggg gtgaccttgg ttaatattca ccagcagcct 120

cccccggtc ccctctggat ccactgctta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct 180

cagcttcagg caccaccact gacctggac agtgaata 218

<210> 10

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 10

aataaaagtct gagtggcgg cagcctgtgt gtgcctgggt tctctctgtc ccggaatgtg 60

caaacaatgg	aggtg	75						
<210>	11							
<211>	168							
<212>	DNA							
<213>	Artificial Sequence							
<220><223> constructed sequence								
<400>	11							
ctgcgcgctc	gctcgctcac	tgaggccgcc	cgggcaaagc	ccgggcgtcg	ggcgaccttt	60		
ggtcgcccg	cctcagttag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtggccaa	ctccatcact	120		
aggggttcct			tgttagtaat	gattaaccg	ccatgtact	tatctact	168	
<210>	12							
<211>	164							
<212>	DNA							
<213>	Artificial Sequence							
<220><223> constructed sequence								
<400>	12							
gataagtgc	atggcgggtt	aatcattaac	tacaaggaac	ccctagtgat	ggagttggcc	60		
actccctctc	tgcgcgctcg	ctcgctact	gaggccggc	gaccaaaggt	cgcggacgc	120		
ccggcgttgc	ccggccggc	ctcagttagc	gagcgagcgc	gcag		164		
<210>	13							
<211>	7920							
<212>	DNA							
<213>	Artificial Sequence							
<220><223> constructed sequence								
<400>	13							
ctgcgcgctc	gctcgctcac	tgaggccgcc	cgggcaaagc	ccgggcgtcg	ggcgaccttt	60		
ggtcgcccg	cctcagttag	cgagcgagcg	cgcagagagg	gagtggccaa	ctccatcact	120		
aggggttcct	tgttagtaat	gattaaccg	ccatgtact	tatctactta	agctacactcg	180		
tgatgcggc	gcccgttcc	aaacatgtcc	taatactctg	tctctgcaag	ggtcatcagt	240		
agtttccat	cttactcaac	atcctccag	tggaattcat	ttcatagaac	aatgttccg	300		
atgccttaat	ctctctagac	aaggttcata	tttgtatgg	ttacttattc	tctctttgtt	360		
gactaagtca			ataatcagaa	ttagcagggtt	tgcagtcaga	ttggcaggga	taagcagcct	420

agctcaggag aagttagtat aaaagccca ggctgggagc agccatcagc ggccgccacc	480
atgcagatcg agctgagcac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcgttctg cttccgccc	540
acccggcggt actacctggg agccgtggag ctgagctggg attacatgca gagcgatctg	600
ggagagctgc cagtgatgc ccgttccca ccacgggtgc caaagagctt cccatcaac	660
accagcgtgg tgtacaagaa gaccctgttc gtggagttca ccatcacact gttcaacatc	720
gccaagccac gcccaccctg gatggactg ctgggaccaa ccatccaggc cgaggtgtac	780
gataccgtgg tgcgttccct gaagaacatg gcctctcatc ctgtgtccct gcacgcccgtg	840
ggagtgagct actggaaggc cagcgaggga gccgagtacg atgatcagac cagccagcgg	900
gagaaggagg atgataaggt gttcccgagga ggaagccaca cctacgtgt gcaggtgtcg	960
aaggagaacg gaccaatggc cagcgatcca ctgtgcctga cctacagcta cctgagccac	1020
gtggatctgg tgaaggatct gaacagcggc ctgatcggag ccctgtgtt gtgcgggag	1080
ggaagcctgg ccaaggagaa gacccagacc ctgcacaagt tcacccctgt gttcgccgtg	1140
ttcgatgagg gaaagagctg gcacagcggag accaagaaca gcctgatgca ggatcggat	1200
gccgccagcg cccggccctg gccaaagatg cacacgtga acggatacgt gaaccggagc	1260
ctgccaggac tgcgttccctt ccacggaaag agcgtgtact ggcacgtgtat cgaaatggga	1320
accaccccg aggtgcactc tatccctgt gaggacaca ctttctgtt gcggaaaccac	1380
cggcaggcca gcctggagat cagccaaatc accttcctga ccgtccagac cctgtgtat	1440
gatctggac agttccctgtt gttctgtccat atcagcagcc accagcacga tggatggag	1500
gcctacgtga aggtggatag ctgcccagag gagccacagc tggatgttga gaacaacag	1560
gaggccgagg attacatgtt gatctgacc gatagcggaa tggatgtgtt gcggttccat	1620
gatgataaca gccaaagctt catccagatc cggagcgtgg ccaagaagca cccaaagacc	1680
tgggtgcact acatcgccgc cgaggaggag gattggatt acgcccact ggtgtggcc	1740
cctgtatgtc ggactacaa gagccagatc ctgaaacaacg gaccacagcg gatcgacgg	1800
aagtacaaa aagtgcgtt catggctac accgatgaga cttcaagac ccggaggccc	1860
atccacgcacg agagcggaaat cttggacca ctgtgtacg gagaggtggg agataccctg	1920
ctgatcatct tcaagaacca ggccagccgg ccataacaaca tctaccacca cgaaatcacc	1980
gatgtgcggc cactgtacag ccggcggctg ccaaaggag tgaagcaccctt gaaggatttc	2040
ccaatcctgc caggagat cttcaagttt aagtggacag tgacagtggaa ggtggacca	2100
accaagtctg atccaagatg cctgaccaga tactacagca gctttgttcatggagaga	2160
gacctggct ctggactgtatc tggaccactg ctgatctgtt acaaggatc tgtggatcat	2220
agaggaaacc agatcatgtc tgataagaga aatgtgatcc tttctctgtt gttgtatgag	2280

aacagaagct ggtacctgac agagaacatc cagagattcc tgccaaaccc agccggagtg	2340
cagctggagg atccagagtt ccaggccagc aacatcatgc acagcatcaa cgatcacgtg	2400
ttcgatagcc tgcagctgag cgtgtgcctg cacgaggtgg cctattggta tatcctgagc	2460
atcgagcccc agaccgattt cctgagcgtg ttcttcagcg gatacacctt caagcacaag	2520
atgggtgtacg aggataccct gaccctgttc ccatttcgg gagagaccgt gttcatgagc	2580
atggagaacc caggactgtg gatcctggta tgccacaact ctgatttcag aaacagagga	2640
atgactgccc tgcgtaaagt gtccagctgt gataagaaca ctggagatatactgaggat	2700
agctatgagg atatctctgc ctacctgctg agcaagaaca atgccattga gccaagaagc	2760
ttcagccaga acccaccagt gctgaagaga caccagagag agatcaccag aaccaccctg	2820
cagtctgtatc aggaggagat tgattatgtat gataccatct ctgtggagat gaagaaggag	2880
gattttgata tctatgtatc ggatgagaac cagagccaa gaagcttcca gaagaagacc	2940
agacactact tcatcgctgc agtggagaga ctgtggatt atggaaatgtatc cagcagccca	3000
cacgtgtga gaaacagagc ccagagcggta tctgtgccac agtcaagaa ggtgggttc	3060
caggagttca ccgatgaaatc cttcacccag ccactgtacc gggagagct gaacgagcac	3120
ctgggactgc tgggaccata catccggcc gaggtggagg ataacatcat ggtgacccatc	3180
cggaaccagg ccagccggcc atacagcttc tacagcagcc tgatcagcta cgaggaggat	3240
cagccgcagg gagccgagcc acggaagaac ttctgtgaagc caaacgagac caagacctac	3300
ttctggaagg tgcagcacca catggccca accaaggatg agttcgattt caaggcctgg	3360
gcctacttca gcgatgtgga tctggagaag gatgtgcaca gggactgtatc cgaccactg	3420
ctgggtgtgcc acaccaacac cctgaacccca gcccacggac ggcaggtgac cgtgcaggag	3480
ttcgcctgt ttttaccat ttctcgatgatc accaaggatg ggtacttcatc cgagaacatg	3540
gagccgaact gcccggccccc ttgcaacatc cagatggagg atccaacccatc caaggagaac	3600
taccggttcc acgccatcaa cggatacatc atggataccctt tgccaggact ggtgatggcc	3660
caggatcagc ggatccgggtg gtacctgctg agcatggaa gcaacgagac catccacagc	3720
atccacttca gggacacgt gttcacccgtg cggaagaagg aggagtacaa gatggccctg	3780
tacaacctgt acccaggagt gttcgagacc gtggagatgc tgccaaagccaa ggccggaaatc	3840
tggccgggtgg agtgcctgtatc cggagagcac ctgcaccccg gaatgagcac cctgttccatc	3900
gtgtacagca acaagtgcacccactg ggaatggccaa gggacacat cccggatttc	3960
cagatcaccg ccagccggaca gtacggacag tggcccaaa agtggcccg gctgcactac	4020
agcggaaagca tcaacgcctg gagccatca gctggatcaa agtggatctg	4080

ctggccccaa tgcgtatcca cggaaatcaag acccaggagg cccggcagaa gttcagcagc 4140

ctgtacatca gccagttcat catcatgtac agcctggatg gaaagaagtgc gagacctac 4200
cggggaaaca gcaccggAAC cctgtatggtg ttcttcggaa acgtggatag cagcggatc 4260
aagcacaaca tcttcaaccc accaatcatc gcccatacata tccggctgca cccaaacccac 4320
tacagcatca gaagcaccct gcggatggag ctgtatggat gtatctgaa cagctgctcc 4380
atgccactgg gaatggagag caaggccatc agcgatgccc agatcaccgc cagcagctac 4440
ttcaccaaca tggtcggccac ctggagccca agcaaggccc ggctgcaccc gcagggacgg 4500
agcaacgcct ggcggccaca ggtgaataac ccaaaggagt ggctgcaggt ggattccag 4560

aagaccatga aggtgaccgg agtggaccacc cagggagtga agagcctgct gactagcatg 4620
tatgtgaagg agttcctgtat cagcagcagc cagggatggac accagtggac cctgttctc 4680
cagaacggaa aggtgaagggt gttccaggaa aaccaggata gttcacccccc agtggtaac 4740
agcctggatc caccactgtat gacccatacata ctggatggatcc acccacagag ctgggtgcac 4800
cagatcgccc tgagaatggat ggtgctggaa tgccaggccc agatctgtat ctgtatgagca 4860
tgcaataaaat tctgagtggg cggcagccctg tttgtgcctg gtttctctt gtccggaaat 4920
tgcaaaacaa tggaggatgtat cgatagata agtagcatgg cgggttaatc attaactaca 4980

aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgatcg cgctcgctcg ctactgagg 5040
ccgggcgacc aaaggtcgcc cggcccccgg gctttggcccg ggcggcctca gtgagcgagc 5100
gagcgcgcag ccttaattaa cttatcacat tggccgtcgat ttacaacgt cgtgactggg 5160
aaaaccctgg cgttacccaa cttatcgcc ttgcagcaca tcccccttc gccagctggc 5220
gtaatagcga agaggcccgc accgtatcgcc cttcccaaca gttgcgcagc ctgaatggcg 5280
aatgggacgc gcccgttagc ggcgcattaa ggcggcggg tttgggtttt acgcgcagcg 5340
tgaccgctac acttgcgcagc gcccatacgcc cggctccctt cgtttcttc cttcccttc 5400

tcggccacgtt cggccggctt ccccgtaag ctctaaatcg ggggcctccct ttagggttcc 5460
gattttagtgc ttacggcac ctcgacccca aaaaacttga ttaggggtat gttcacgtat 5520
gtggggccatc gcccgtatag acgggttttc gccccttgc gttggagtcc acgttctta 5580
atagtggtact ctgttccaa actggaaacaa cactcaaccc tatctcggtc tattttttt 5640
atttataagg gattttgcgg atttcggccat tttggtaaa aatgagctg attaaca 5700
aatttacgc gaattttac aaaaatattaa cgcttacaat ttaggtggca ctttcgggg 5760
aatatgtgcgc ggaaccccta tttgtttatt tttctaaata cattcaaaata tttatccgt 5820

catgagacaa taaccctgat aaatgcttca ataatattga aaaaggaaga gtatgat	5880
tcaacattc cggtcgccc ttattccctt ttttgcggca ttttgccttc ctgttttgc	5940
tcaccaggaa acgctggta aagtaaaaga tgctgaagat cagttgggtg cacgagtgg	6000
ttacatcgaa ctggatctca acagcggtaa gatccitgag agtttcgccc ccgaagaacg	6060
ttttccaaatg atgagcactt ttaaagttct gctatgtggc gcggtattat cccgtattga	6120
cgccgggcaa gagcaactcg gtcgcccgt acactattct cagaatgact tggtgagta	6180
ctcaccagtc acagaaaagc atcttacgga tggcatgaca gtaagagaat tatgcagtgc	6240
tgccataacc atgagtgata acactgcggc caacttactt ctgacaacga tcggaggacc	6300
gaaggagcta accgctttt tgcacaacat gggggatcat gtaactcgcc ttgatcggt	6360
ggaaccggag ctgaatgaag ccataccaaa cgacgagcgt gacaccacga tgcctgtac	6420
aatgcaaca acgttgcga aactattaa tggcgaacta cttactctag cttccggca	6480
acaattaata gactggatgg aggccgataa agttgcagga ccacttctgc gctcgccct	6540
tccggctggc tggatttttctgat tggagccgtt gaggcggtt ctcgcgtat	6600
cattgcagca ctggggccag atggtaaagcc ctccgtatc gtagttatct acacgacggg	6660
gagtcaggca actatggatg aacgaaatag acagatcgct gagataggtg cctcactgat	6720
taagcattgg taactgtcag accaagtttta ctcataata ctttagattt attttaaact	6780
tcattttaa tttaaaagga tctaggtaa gatcctttt gataatctca tgaccaaaat	6840
cccttaacgt gagtttcgt tccactgagc gtcaaaaaa gtagaaaaa tcaaaaggatc	6900
ttcttgatgat ccttttttc tgcgcgtat ctgctgtt gaaacaaaaa aaccaccgt	6960
accagcggtg gtttggggc cggatcaaga gctaccact cttttccga aggttaactgg	7020
cttcagcaga ggcagatac caaatactgt tcttcttagt tagccgtatg taggccacca	7080
cttcaagaac tctgttagcac cgcctacata cctcgctctg ctaatcctgt taccagtggc	7140
tgctgccagt ggcgataagt cgtgtttac cgggttggac tcaagacgt agttaccgga	7200
taaggcgcag cggtcgggtt gaaacggggg ttctgtcaca cagccagct tggagcgaac	7260
gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcca cgcttccga	7320
agggagaaag gcccggacggat atccggtaag cggcagggtc ggaacaggag agcgcacgag	7380
ggagcttcca gggggaaacg cctggatctt ttatagtctt gtcgggttcc gccacctctg	7440
acttgagcgt cgattttgt gatgctcgatc agggggccgg agcctatgga aaaacgcccag	7500
caacgcggcc ttttacggt tcctggcctt ttgctggcctt tttgctcaca tgttttcc	7560
tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgc tttgagttagt gatcaccgc	7620
tgcgcgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg aagagcgccc	7680

aatacgaaa ccgcctctcc ccgcgcgtt gccgattcat taatgcagct ggcacgcacag	7740
gtttccgcac tggaaagcgg gcagtgagcg caacgcatt aatgtgagtt agctcactca	7800
ttaggcaccc caggcttac actttatgt tccggctcgat atgttgtgtg gaattgtgag	7860
cggataacaa tticacacag gaaacagcta tgaccatgtat acgcccagat ttaattaaagg	7920
	7920
<210> 14	
<211> 8004	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> constructed sequence	
<400> 14	
ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaaagc cggggcgctcg ggcgaccc	60
ggtcgccccgg cctcagttag cgagcgagcg cgcaagaggag gatggccaa ctccatca	120
aggggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgtact tatctactta agtacactcg	180
tgtatcgcccg gccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
agtttccat ctactcaac atcctccag tgaggttaat ttttaactg tttgtctgg	300
ttaataatct caggaggta attttaaac tgtttgcctt gtttaataat ctcaggaaat	360
tcatttcata gaacaaatgt tccgatgctc taatctctt agacaaggaa catatttga	420
tgggttactt attctctttt tggactaa gtcaataatc agaatcagca gtttgcagt	480
caagttggca gggataagca gcctagctca ggagaaggta gtataaaagc cccaggctgg	540
gagcagccat cagcgccgc caccatgcag atcgagctga gcacctgctt cttcctgtgc	600
ctgctgcgtt tctgtttctc cgccacccgg cggtactacc tggagccgt ggagctgagc	660
tgggattaca tgcagagcga tctggagag ctggcagttt atgcccgtt cccaccacgg	720
gtgccaaaga gcttcccattt caacaccaggc gtgggttaca agaagaccct gttcgtggag	780
ttcacccatc acctgttcaa catcgccaa ccacggccac cctggatggg actgtggaa	840
ccaaccatcc agggcgaggt gtacgatacc gtgggtatca ccctgaagaa catggctct	900
catcctgtgtt ccctgcacgc cgtgggagtg agctactggaa agggccagcga gggagccgag	960
tacgtatgtc agaccagcca gcgggagaag gaggatgata aggtgttccc aggaggaagc	1020
cacacccatcg tggcgttgcgtt gctgaaggag aacggaccaa tggccagcga tccactgtgc	1080
ctgacacctaca gctacactgag ccacgtggat ctggtaagg atctgaacag cggactgtac	1140
ggagccctgc tggcgttgcgtt ggaggagaag ctggccagg agaagaccca gaccctgcac	1200

aagttcatcc tgctgttcgc cgtgttcgtat gagggaaaga gctggcacag cgagaccaag	1260
aacagcctga tgcaggatcg ggatgccgc acgcgccgg cctggccaaa gatgcacacc	1320
gtgaacggat acgtgaaccg gagcctgcca ggactgatcg gatgccaccg gaagagcgtg	1380
tactggcacg tcatcgaaat gggaaaccacc ccagaggatgc actctatctt cctggaggaa	1440
cacaccctttc tggtgcgaa ccaccggcag gccagcctgg agatcagccc aatcaccc	1500
ctgaccgccc agaccctgct gatggatctg ggacagttcc tgctgttctg ccatatcagc	1560
agccaccaggc acgatgaaat ggaggcctac gtgaagggtgg atagctgccc agaggagcca	1620
cagctgcgga tgaagaacaa cgaggaggcc gaggattacg atgatgatct gaccgatagc	1680
gagatggatg tggtgcggtt cgatgatgat aacagccaa gcttcatcca gatccggagc	1740
gtggccaaga agcacccaaa gacctgggtg cactacatcg ccggcgagga ggaggattgg	1800
gattacgccc cactggtgct ggccctgtat gatcgagact acaagagcca gtacactgaac	1860
aacggaccac acggatcg acggaagtac aaaaaagtgc ggatcatggc ctacaccat	1920
gagacccctca agacccggga ggccttcac cacgagagcg gaatccctggg accactgctg	1980
tacggagagg tgggagatac cctgctgatc atcttcaaga accaggccag ccggccatac	2040
aacatctacc cacacggaaat caccgatgtg cggccactgt acagccggcg gctgccaag	2100
ggagtgaagc acctgaagga tttccaaatc ctgcccaggag agatcttcaa gtacaagtgg	2160
acagtgacag tggaggatgg accaaccaag tctgatccaa gatgcctgac cagatactac	2220
agcagctttg tgaacatgga gagagacctg gcctctggac tgattggacc actgctgatc	2280
tgctacaagg agtctgtgga tcagagagga aaccagatca tgtctgataa gagaaatgtg	2340
atccctttct ctgtgtttga tgagaacaga agctggtacc tgacagagaa catccagaga	2400
ttccctgccaa acccagccgg agtgcagctg gaggatccag agttccaggc cagcaacatc	2460
atgcacagca tcaacggata cgtgttcgtat agcctgcagc tgagcgtgtg cctgcacag	2520
gtggcctatt ggtatatcct gagcatcgga gcccagacccg atttccctgag cgtttttc	2580
agcgatataca ccttcaagca caagatggtg tacgaggata ccctgaccct gttcccatc	2640
tccggagaga ccgtgttcat gagcatggag aaccaggac tggatggatctt gggatgccac	2700
aactctgatt tcagaaacag aggaatgact gcccgtgtga aagtgtccag ctgtgataag	2760
aacactggag attactatga ggatagctat gaggatatct ctgcctaccc gctgagcaag	2820
aacaatgcca ttgagccaag aagcttcagc cagaacccac cagtgcgtaa gagacaccag	2880
agagagatca ccagaaccac cctgcagtct gatcaggagg agattgatta tggatgatacc	2940
atctctgtgg agatgaagaa ggaggattt gatctatcg atgaggatga gaaccagac	3000
ccaagaagct tccagaagaa gaccagacac tacttcatcg ctgcagtgg gagactgtgg	3060

gattatggaa tgagcagcag cccacacgtg ctgagaaaca gagcccagag cgatctgt	3120
ccacagttca agaagggtggt gttccaggag ttccacgatg gaagcttcac ccagccactg	3180
taccggggag agctgaacga gcacctggga ctgctggac catacatcg ggccgaggtg	3240
gaggataaca tcatggtgc cttccggAAC caggccagcc ggccatacag cttctacagc	3300
agcctgatca gctacgagga ggatcagcgg caggagccg agccacggaa gaacttcgt	3360
aagccaaacg agaccaagac ctacttctgg aaggtgcagc accacatggc cccaaacaa	3420
gatgagttcg attgcaaggc ctgggcctac ttccacgatg tggatctgga gaaggatgt	3480
cacagccggac tgatcgacc actgctggtg tgccacacca acaccctgaa cccagccac	3540
ggacggcagg tgaccgtgca ggagttcgcc ctgtttca ccatcttcga tgagaccaag	3600
agctggtaact tcaccgagaa catggagcgg aactgcccgg ccccttgcAA catccagatg	3660
gaggatccaa cttcaagga gaactaccgg ttccacgcca tcaacggata catcatggat	3720
accctgcccAG gactggtgat ggcccaggat cagcggatcc ggtggtaacct gctgagcatg	3780
ggaagcaacg agaacatcca cagcatccac ttccacggac acgtgttcac cgtgcggaa	3840
aaggaggagt acaagatggc cctgtacaac ctgtacccag gagtgttcga gaccgtggag	3900
atgctgccaA gcaaggccgg aatctggcgg gtggagtgcc tgatcgaga gcacctgcac	3960
gccggaatga gcaccctgtt cctgggtgtac agcaacaagt gccagacccc actggaaatg	4020
gccagccggac acatccggga ttccagatc accgcccAG gacagtacgg acagtggcc	4080
ccaaagctgg cccggctgca ctacagcggA agcatcaacg cctggaggcac caaggagcca	4140
ttcagctgga tcaaagtggA tctgctggcc ccaatgtca tccacggaat caagacccag	4200
ggagccggc agaagttcag cagcctgtac atcagccagt tcatcatcat gtacagcctg	4260
gatggaaaga agtggcagac ctacccggaa aacagcacgg gaaccctgtat ggtttttc	4320
ggaaacgtgg atagcagcgg aatcaagcac aacatttca acccaccaat catgccccga	4380
tacatccggc tgacccaaac ccactacagc atcagaagca ccctggat ggagctgtatg	4440
ggatgtgatc tgaacagctg ctccatgcca ctggaaatgg agagcaaggc catcagegat	4500
gcccagatca ccggcagcag ctacttccacc aacatgttcg ccacctggag cccaaagcaag	4560
gccccggctgc acctgcaggc acggagcaac gcctggcggc cacaggtgaa taacccaaag	4620
gagtggtgc aggtggattt ccagaagacc atgaagggtga ccggaggatgac cacccaggaa	4680
gtgaagagcc tgctgacttag catgtatgt aaggagttcc tgatcagcag cagccaggat	4740
ggacaccagt ggaccctgtt cttccagaac ggaaagggtga aggtgttcca gggaaaccag	4800

gatagcttca ccccagtgtt gaacagccctg gatccaccac tgctgaccgg atacctgcgg 4860

atccacccac agagctgggt gcaccagatc gccctgagaa tggaggtgct gggatgcgag 4920
gcccaggatc tgtactgtatc agcatgaaatc aaagtcttagt tggcgccag cctgtgtgt 4980
cctgggttct ctctgtcccg gaatgtgcaa acaatggagg tgctcgagta gataagttagc 5040
atggcggtt aatcattaaac tacaaggaac ccctagtgtatc ggagttggcc actcccttc 5100
tgcgcgctcg ctgcgtactt gaggccggc gaccaaggt cgcccgacgc ccggcgttg 5160
cccgccgcgc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagccttaat ttaacctaattt tcactggccg 5220
tcgttttaca acgtcggtac tggaaaacc ctggcgttac ccaacttaat cgccttgcag 5280

cacatcccc tttcgccagc tggcgtaata gcaagaggc ccgcacccat cgcccttccc 5340
aacagtttgcg cagcctgaat ggcgaatggg acgcgccttgc tagcggcgca ttaagcgccg 5400
cgggtgttgtt ggttacgcgc agcgtgaccc ctacacttgc cagcgccttaat gcgcggcgtc 5460
cttgcgtttt ctcccttcc tttctcgccat cgttcggccgg ctttccctgtt caagcttaat 5520
atcgccccctt cccttaggg ttccgattta gtgtttacgc gcacctcgac cccaaaaaac 5580
ttgatttaggg ttagtggtaa cgttagtgggc catgcgccttgc atagacggttt ttcgcctt 5640
tgacgttggaa gtccacgttc tttaatagtg gactttgtt ccaaacttggaa acaacactca 5700

accctatctc ggtctattct tttgattttt aagggattttt gccgatttcg gcctatttgtt 5760
taaaaaatgtt gctgatttaa caaaaattta acgcgaattt taacaaaata ttaacgctta 5820
caattttaggtt ggcacttttgc gggaaatgtt gcgcggaaacc cctattttgtt tattttctta 5880
aatacattca aatatgtatc cgctcatgag acaataaccc tgataaatgc ttcaataata 5940
ttgaaaaagg aagagtatgtt gtagtggtaa cttccgtgtc gcccattttc cctttttgtt 6000
ggcattttgtt cttccctgtttt ttgctcaccc agaaacgcgtt gtgaaagttt aagatgctta 6060
agatcagttt ggtgcacggag tgggttacat cgaactggat ctcaacacgcg gtaagatctt 6120

tgagagttttt cggcccgaaag aacgttttcc aatgtatgttgc actttttaaag ttctgtatgtt 6180
tggcgccgtt ttatccgtt ttgacgcccgg gcaagagcaa ctgcgtcgcc gcataacacta 6240
ttctcagaat gacttgggtt agtactcacc agtcacagaa aagcatcttta cggatggcat 6300
gacagtaaga gaattatgtca gtgcgtccat aaccatgttgc gataacactg cggccaaactt 6360
acttctgaca acgatcggtt gacccaaaggatc gctaaaccgtt tttttgcaca acatggggatc 6420
tcatgttaact cgccttgcgtt gttggaaacc ggagctgttgc gaaagccatac caaacgcacgtt 6480
cgctgacacc acgatgccttgc tagcaatggc aacaacgttgc gcaactat taactggccgtt 6540

actacttact ctagcttccc ggcaacaatt aatagactgg atggaggcgg ataaagttgc	6600
aggaccacctt ctgcgcgtcg cccttccggc tggctggttt attgctgata aatctggagc	6660
cggtagcgt gggctcgcg gtatcattgc agcactgggg ccagatggta agccctcccg	6720
tatcgttagtt atctacacga cggggagtca ggcaactatg gatgaacgaa atagacagat	6780
cgctgagata ggtgcctcac tgattaagca ttggtaactg tcagaccaag tttactcata	6840
tatacttttag attgatttaa aacttcattt ttaatttaaa aggatctagg tgaagatcct	6900
ttttgataat ctcatgacca aaatccctta acgtgagttt tcgttccact gagcgtcaga	6960

ccccgtagaa aagatcaaag gatttcttg agatccttt tttctgcgca taatctgctg	7020
cttgcaaaaca aaaaaaccac cgctaccagc ggtggttgt ttgccggatc aagagctacc	7080
aactctttt ccgaaggtaa ctgggttcag cagagcgcag ataccaaata ctgttcttct	7140
agtgttagccg tagttaggcc accacttcaa gaactctgta gcaccgccta cataacctgc	7200
tctgctaatac ctgttaccag tggctgctgc cagtggcgat aagtctgtc ttaccgggtt	7260
ggactcaaga cgatagttac cggataaggc gcagcggctcg ggctgaacgg ggggttcgtg	7320
cacacagcccc agcttgagac gaacgaccta caccgaactg agatacctac agcgtgagct	7380

atgagaaaagc	gccacgttc	ccgaagggag	aaaggcggac	aggtatccgg	taagcggcag	7440
ggtcggaaca	ggagagcgc	cgagggagct	tccaggggaa	aacgccttgt	atcttata	7500
tccgtcg	tttcgcacc	tctgacttga	gcgtcgattt	ttgtgtatgt	cgtcaggggg	7560
gcggagcc	tggaaaaacg	ccagcaacgc	ggccttttta	cgttcc	tcgtcg	7620
gcctttgt	cacatgttct	ttcctcggtt	atcccctgtat	tctgtggata	accgtattac	7680
cgcctt	tgagctgata	ccgctcgccg	cagccgaacg	accgagcgc	gcgagtca	7740
gagcggaggaa	gcgaaagagc	gcccatacg	caaaccgcct	ctccccgcgc	gttggccgat	7800

tcattaatgc agctggcacg acagggttcc cgactggaaa gcgggcagtg agcgcaacgc	7860
aattaatgtg agttagctca ctcattaggc accccaggct ttacacttta tgcttccggc	7920
tcgtatgtg tgtggaattg tgagcggata acaatttcac acaggaaaca gctatgacca	7980
tgattacgcc agathtaatt aagg	8004

<210> 15

<211> 7948

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 15

ctgcgcgctc gctcgctcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggccacctt	60
ggtcgccccgg cctcagttag cgagcgagcg cgccagagagg gagtgccaa ctccatca	120
aggggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgtact tatctactta agtacacctg	180
tgatcgcccg gcccctgttc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag ggtcatcagt	240
agttttccat cttaactcaac atcctccag tggaattctg gacacaggac gctgtggtt	300
ctgagccagg gggcgactca gatcccagcc agtggactta gcccctgtt gtcctccga	360
taactgggtt gaccttggtt aatattcacc agcagcctcc cccgttgccc ctctggatcc	420
actgcttaaa tacggacgag gacaggccc tgtctctca gcttcaggca ccaccactga	480
cctgggacag tgaatagcg cgccacat gcagatcgag ctgagcacct gcttcttc	540
gtgcctgctg cggttctgct tctccgccac cccgggtac tacctggag ccgtggagct	600
gagctggat tacatgcaga gcatctggg agagctgcca gtggatgccc gtttccacc	660
acgggtgcca aagagcttcc cattcaacac cagcgtggt tacaagaaga ccctgttc	720
ggagttcacc gatcacctgt tcaacatcgc caagccacgg ccaccctgga tggactgct	780
gggaccaacc atccaggccg aggtgtacga taccgtggt atcaccctga agaacatggc	840
ctctcatcct gtgtccctgc acgcccgtggg agtgagctac tggaaggcca gcgagggagc	900
cgagtagat gatcagacca gccagcggga gaaggaggat gataaggtgt tcccaggagg	960
aagccacacc tacgtgtggc aggtgctgaa ggagaacgga ccaatggcca gcatccact	1020
gtgcctgacc tacagctacc tgagccacgt ggatctggt aaggatctga acagcggact	1080
gatcggagcc ctgctgggt gccgggaggg aagcctggcc aaggagaaga cccagaccct	1140
gcacaagtcc atcctgctgt tcgcccgtt cgatgaggaa aagagctggc acagcggagac	1200
caagaacagc ctgatgcagg atcggatgc cgccagcggcc cggccctggc caaagatgca	1260
caccgtgaac ggatacgtga accggacccct gccaggactg atcggatgcc accggaagag	1320
cgtgtactgg cacgtgatcg gaatggaaac cacccagag gtgcactcta tcttcgttga	1380
gggacacacc ttcttgtgc ggaaccacccg gcaggccagc ctggagatca gcccaatcac	1440
cttcctgacc gcccagaccc tgctgatggta tctggacag ttctgtgt tctgccat	1500
cagcagccac cagcacatg gaatggaggc ctacgtgaag gtggatagct gcccagagga	1560
gccacagctg cggatgaaga acaacgagga ggccgaggat tacatgtatg atctgaccga	1620
tagcgagatg gatgtgggtgc gggtcgatga tgataacagc ccaagcttca tccagatccg	1680
gagcgtggcc aagaagcacc caaagacctg ggtgcactac atcgccggcc aggaggagga	1740

ttgggattac gccccactgg tgctggccc tcatgtatcg agctacaaga gccagttac	1800
gaacaacgga ccacagcgga tcggacggaa gtacaaaaaa gtgcggttca tggctacac	1860
cgtatgagacc ttcaagaccc gggaggccat ccagcacgag agcggaatcc tggaccac	1920
gctgtacgga gagggtggag ataccctgt gatcatctc aagaaccagg ccagccggcc	1980
atacaacatc taccacacg gaatcaccga tgtgcggcca ctgtacagcc ggcggctgcc	2040
aaaggagtg aagcacctga aggattccc aatcctgcca ggagagatct tcaagtacaa	2100
gtggacagtg acagtggagg atggaccaac caagtctgtat ccaagatgcc tgaccagata	2160
ctacagcgc tttgtgaaca tggagagaga cctggctct ggactgattt gaccactgt	2220
gatctgtac aaggagtctg tggatcagag agggaaaccag atcatgtctg ataagagaaa	2280
tgtgatcctg ttctctgtgt ttgtatgagaa cagaagctgg tacctgacag agaacatcca	2340
gagattcctg ccaaaccagg ccggagtgtca gctggaggat ccagagttcc aggccagcaa	2400
catcatgcac agcatcaacg gatacgtgtt cgatagcctg cagctgacgc tgtgcctgca	2460
cgaggtggcc tattggtata tcctgagcat cggagccag accgattttc tgagcgtgtt	2520
cttcagcgga tacacccatca agcacaagat ggtgtacgag gataccctga ccctgttccc	2580
attctccgga gagaccgtgt tcatgagcat ggagaaccca ggactgtgga tcctggatg	2640
ccacaactct gatttcagaa acagaggaat gactgcctg ctgaaagtgt ccagctgtga	2700
taagaacact ggagattact atgaggatag ctatgaggat atctctgcct acctgctgag	2760
caagaacaat gccattgagc caagaagctt cagccagaac ccaccagtgc tgaagagaca	2820
ccagagagag ataccagaa ccaccctgca gtctgatcag gaggagattt attatgtiga	2880
taccatctct gtggagatga agaaggagga ttttgatatac tatgtatgagg atgagaacca	2940
gagcccaaga agttccaga agaagaccag acactacttc atcgctgcag tggagagact	3000
gtgggattat ggaatgagca gcagccacaca cgtgctgaga aacagagccccc agagcggatc	3060
tgtgccacag ttcaagaagg tgggtttcca ggagtttaccat gatggaaatct tcacccagcc	3120
actgtaccgg ggagagctga acgagcacct gggactgctg ggaccatata tccggccga	3180
ggtggaggat aacatcatgg tgaccccttccg gaaccaggcc agccggccat acagcttcta	3240
cagcagcctg atcagctacg aggaggatca gcggcaggaa gcccggccac ggaagaactt	3300
cgtgaagcca aacgagacca agacctactt ctggaaatgt cagcaccaca tggcccaac	3360
caaggatgag ttctgatttca aggcctggc ctacttcagc gatgtggatc tggagaagga	3420
tgtgcacagc ggactgatcg gaccactgt ggtgtgcac accaacaccc tgaacccagg	3480
ccacggacgg caggtgaccc tgcaggatgtt cgccctgttc ttccatct tcgatgagac	3540
caagagctgg tacttcaccc agaacatggc gcggaaatgc cggccccc t gcaacatcca	3600

gatggaggat ccaaccccca aggagaacta ccgggtccac gccatcaacg gatacatcat	3660
ggataccctg ccaggactgg tggatggccca ggtatcagcgg atccgggtgt acctgtcgat	3720
catggaaagc aacgagaaca tccacagcat ccacttcgcgg ggcacacgtgt tcaccgtgcg	3780
gaagaaggag gagtacaaga tggccctgtac caacctgtac ccaggagtgt tcgagaccgt	3840
ggagatgctg ccaagcaagg ccggaaatctg gcgggtggag tgcctgtatcg gagagcacct	3900
gcaccccgaa atgagcaccc tggatccgtgt gtacagcaac aagtgcaga ccccaactggg	3960
aatggccagc ggacacatcc gggatttcca gatcaccgcg acggacagt acggacagt	4020
ggccccaag ctggcccgcc tgcactacag cgaaagcatac aacgcctggaa gcaccaagga	4080
gcatttcagc tggatcaaag tggatctgct ggcccaatgt atcatccacg gaatcaagac	4140
ccagggagcc cggcagaagt tcagcagcct gtacatcagc cagttcatca tcatgtacag	4200
cctggatgga aagaagtggc agaccatccg gggaaacagc accggaaccc tggatgggtt	4260
cttcggaaac gtggatagca gcggaaatcaa gcacaacatc ttcaacccac caatcatcgc	4320
ccgatacatc cggctgcacc caaccacta cagcatcaga agcaccctgc ggatggagct	4380
gatggatgt gatctgaaca gctgtccat gccactggaa atggagagca aggccatcag	4440
cgtatcccgat atcaccgcca gcagctactt cacaacatg ttgcacccact ggagcccaag	4500
caaggcccg ctgcacctgc agggacggag caacgcctgg cggccacagg tgaataaccc	4560
aaaggagtttgg ctgcagggtgg atttccagaa gaccatgaag gtgaccggag tgaccaccca	4620
gggagtgaaag agcctgtgtc ctagcatgtc tgtgaaggag ttccgtatca gcagcagccaa	4680
ggatggacac cagtggaccc tggatccca gaacggaaag gtgaagggtgt tccaggaaa	4740
ccaggatagc ttccacccag tggtaacag cctggatcca ccactgtatcg cccgataacct	4800
gcggatccac ccacagagct ggggtgcacca gatcgcctg agaatggagg tgctggatgt	4860
cgaggcccgat gatctgtact gatggacatg caataaagtc tgagtggcg gcagcgtgt	4920
tgtgcctgg ttctctctgt cccggaaatgt gcaaaataatg gaggtgtctcg agtagataag	4980
tagcatggcg ggttaatcat taactacaag gaaccccttag tggatggatgt ggccactccc	5040
tctctgcgct ctcgctcgct cactggggcc gggcgaccaa aggtcgcccg acgcccggcc	5100
tttggccggg cggcctcagt gagcgacgca ggcgcgcaccc ttaattaaacc taattcactg	5160
ggcgctgtt tacaacgtcg tgactggaa aaccctggcg ttacccaaact taatcgccct	5220
gcagcacatc ccccttcgc cagctggcgta aatagcgaag aggccgcac cgatcgccct	5280
tcccaacagt tgcgacgtt gaaatggcgaa tggacgcgc cctgtacggc cgcattaaac	5340
gcggcggtgt tggatggatgt ggcgcacgtg accgtacac ttgcgcgc cctagcgccc	5400
gctcccttcg ctttcttccc ttcccttcgc gccacgttgc cggcgttcc cggcgttcc	5460

ctaaatcggg ggctccctt agggttccga tttagtgctt tacggcacct cgaccccaa	5520
aaacttgatt agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac gttttcgc	5580
ccttgacgt tggagtccac gttcttaat agtggactct tggatccaaac tggaacaaca	5640
ctcaacccta tctcggtcta ttctttgat ttataaggga tttgcccgtt ttcggctat	5700
tggtaaaaaa atgagctgat ttaacaaaaa tttaacgcga attttaacaa aatattaacg	5760
cttacaattt aggtggcact ttccgggaa atgtgcgcgg aaccctatt tggatcttt	5820
tctaaataca ttcaaatatg tatccgctca tgagacaata accctgataa atgcttaat	5880
aatattgaaa aaggaagagt atgagtttc aacattccg tgcgcctt attcccttt	5940
ttgcggcatt ttgccttcct gttttgctc acccagaaac gctggtaaaa gtaaaagatg	6000
ctgaagatca gttgggtca cgagtgggtt acatcgact ggatctcaac agcggtaaga	6060
tccttgagag ttccggcccc gaagaacgtt ttccatgtat gggactttt aaagttctgc	6120
tatgtggcgc ggtattatcc cgtatttgac ccggcaaga gcaactcggt cgccgcatac	6180
actattctca gaatgacttg gttgagttact caccagtac agaaaagcat ctacggatg	6240
gcatgacagt aagagaatta tgcagtgtg ccataaccat ggtgataac actgcggcca	6300
acttacttct gacaacgatc ggaggaccga aggagctaactcgccctt cacaacatgg	6360
gggatcatgt aactcgccctt gatcggtggg aaccggagct gaatgaagcc ataccaaacg	6420
acgagcgtga caccacgatg cctgttagca tggcaacaac gttgcgc当地 ctatataactg	6480
gcgaactact tactctagct tcccgcaac aattataga ctggatggag gggataag	6540
ttcgaggacc acttctgcgc tcggcccttc cggctggctg gttattgtct gataaatctg	6600
gagccggta gctgggtct cgggtatca ttgcagact gggccagat ggtgataac	6660
cccgatctgt agttatctac acgacgggaa gtcaggcaac tatggatgaa cggaaatagac	6720
agatcgctga gataggtgcc tcactgatta agcattggta actgtcagac caagttact	6780
catatataact ttagattgtat taaaacttc attttaatt taaaaggatc taggtgaaga	6840
tccttttga taatctcatg accaaaatcc cttaacgtga gttttcggttc cactgagcgt	6900
cagacccgtt agaaaagatc aaaggatctt ctggatcc tttttctg cgcgtatct	6960
gctgcttgca aacaaaaaaa ccaccgtac cagcgggtgtt ttgttgcgc gatcaagagc	7020
taccaactct tttccgaag gtaactggct tcagcagagc gcagatacca aatactgttc	7080
ttcttagtcta gccgtgttta ggccaccact tcaagaactc tgcgttgcgc cctacatacc	7140
tcgctctgtt aatctgttta ccagtggctg ctggcgttcc cgataagtcg tgcgttaccg	7200

ggttggactc aagacgatag ttacccgata aggccgcacg gtcgggctga acgggggtt	7260
cgtgcacaca gcccacatg gagcgaacga cctacaccga actgagatac ctacagcgtg	7320
agctatgaga aagcgccacg cttcccgaaag ggagaaaggc ggacaggtat ccggtaagcg	7380
gcagggctgg aacaggagag cgcacgagg agctccagg gggaaacgcc tggatcttt	7440
atagtcgtt cgggttcgc cacctctgac ttgagcgtcg attttgtga tgctcgtcag	7500
ggggcggag cctatggaaa aacgccagca acgcggcctt ttacggttc ctggccttt	7560
gctggcctt tgctcacatg ttcttcctg cgttatcccc tgattctgtg gataaccgta	7620

ttaccgcctt tgagtggact gataccgctc gccgcagccg aacgaccgag cgccagcgagt	7680
cagtggcga ggaagcgaa gagcgccaa tacgcaaac gcctctcccc gcgcgttggc	7740
cgattcatta atgcagctgg cacgacaggt ttcccgactg gaaagcggc agtgagcga	7800
acgcaattaa tgtggatgg tagtggatggc aggcacccca ggcttacac tttatgttc	7860
cggtcgat gttgtgtgaa attgtggcg gataacaatt tcacacagga aacagctatg	7920
accatgatta cggcagattt aattaagg	7948

<210> 16

<211> 8032

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 16

ctgcgcgtc gtcgctcac tgaggccgcc cggcaaacgc cggggctcg ggcgacctt	60
ggtcgcggg cctcagttag cgagcgacgc cgacagaggag gatggccaa ctccatcact	120
agggttcct ttagttaat gattaacccg ccatgtact tatctactta agtacactcg	180
tgatcgcccg gcccgttcc aaacatgtcc taatactctg tctctgcaag gtcgtcatcgt	240
agtttccat ctactcaac atcctccag tgaggtaat tttaaactg tttgtctgg	300
ttaataatct caggaggta attttaaac tgttgtct ggttaataat ctcaggaaat	360

tctggacaca ggacgctgtg gtttctgagc cagggggcga ctcagatccc agccagtgg	420
cttagccct gtttgcctt ccgataactg ggggtgaccc ttgttaatatt caccagcgc	480
ctccccgtt gcccgttcc atccactgtct taaatacgga cgaggacagg gcccgtctc	540
ctcagcttca ggcaccacca ctgacctggg acagtgaata gcccggcca ccatgcagat	600
cgagctgagc acctgttct tcctgtgcct gctgcccgtc tggttctccg ccacccggcg	660
gtactacgtt cggccgtgg agctgagctg ggattacatg cagagcgtc tgggagagct	720

gccagtggat gcccgttcc caccacgggt gccaaagagc ttcccattca acaccagcgt	780
ggtgtacaag aagaccctgt tcgtggagtt caccgatcac ctgttcaaca tcgccaagcc	840
acggccaccc tggatggac tgctggacc aaccatccag gccgagggtgt acgataccgt	900
ggtgatcacc ctgaagaaca tggctctca tcctgtgtcc ctgcacgccc tggagtgag	960
ctactggaa gccagcgagg gagccgagta cgatgatcag accagccagc gggagaagga	1020
ggtatgataag gtgttccag gaggaagcca cacctacgtg tggcaggtgc tgaaggagaa	1080
cggaccaatg gccagcgatc cactgtgcct gacctacagc tacctgagcc acgtggatct	1140
ggtgaaggat ctgaacagcg gactgatcgg agccctgctg gtgtgcggg agggaaagcct	1200
ggccaaggag aagaccaga ccctgcacaa gttcatcctg ctgttgcgg tggtcgatga	1260
gggaaagagc tggcacagcg agaccaagaa cagcctgatg caggatcggt atgcccggcag	1320
cgcggggcc tggccaaaga tgcacaccgt gaacggatac gtgaaccgga gcctgccagg	1380
actgatcggta tgccaccgga agagcgtgtt ctggcacgtg atcggatgg gaaccacccc	1440
agaggtgcac tctatcttcc tggagggaca caccttctg gtgcggaaacc accggcaggc	1500
cagcctggag atcagccaa tcaccttctt gaccggccag accctgtga tggatctggg	1560
acagttcctg ctgttctgcc atatcagcag ccaccagcac gatggaatgg aggctacgt	1620
gaaggtggat agctgcccag aggagccaca gctgcggatg aagaacaacg aggaggccga	1680
ggattacgtatgatctga ccgatagcga gatggatgtg gtgcgggtcg atgatgataa	1740
cagcccaagc ttcatccaga tccggagcgt ggccaagaag cacccaaaga cctgggtgca	1800
ctacatcgcc gccgaggagg aggattggta ttacgcccac ctgggtctgg cccctgtatg	1860
tcggagctac aagagccagt acctgaacaa cggaccacag cggatcgac ggaagtacaa	1920
aaaagtgcgg ttcatggctt acaccgatga gaccttcaag acccgggagg ccattccagca	1980
cgagagcgga atcctggac cactgtgtt cggagagggtt ggagataaccc tgctgtatcat	2040
cttcaagaac cagggccagcc ggccatacaa catctacccaa cacggaatca ccgtgtgcgt	2100
gccactgtac agccggccgc tgccaaaggg agtgaagcac ctgaaggatt tcccaatcct	2160
gccaggagag atcttcaagt acaagtggac agtgcacatgt gaggatggac caaccaagtc	2220
tgtatccaaga tgcctgacca gatactacag cagctttgtt aacatggaga gagacctggc	2280
ctctggactg attggaccac tgctgtatctt ctacaaggat tctgtggatc agagaggaaa	2340
ccagatcatg tctgataaga gaaatgttat cctgttctt gtgtttgtatc agaacaagaag	2400
ctggtaacctg acagagaaca tccagagatt cctgccaaac ccagccggag tgcaatgtt	2460

ggatccagag ttccaggcca gcaacatcat gcacagcatc aacggatacg tgttcgatag	2520
cctgcagctg agcgtgtgcc tgcacgaggt ggcctattgg tatatcctga gcatcgaggc	2580
ccagaccgat ttccctgagcg tggatcattcg cgatcacacc ttcaagcaca agatgggt	2640
cgaggatacc ctgaccctgt tcccatttc cggagagacc gtgttcatga gcatggagaa	2700
cccaggactg tggatcctgg gatgccacaa ctctgatttc agaaacagag gaatgactgc	2760
cctgctgaaa gtgtccagct gtgataagaa cactggagat tactatgagg atagctatga	2820
ggatatctct gcctacactgc tgagcaagaa caatgccatt gagccaagaa gcttcagcca	2880
gaacccacca gtgctgaaga gacaccagag agagatcacc agaaccaccc tgca	2940
tcaggaggag atgattatg atgataccat ctctgtggag atgaagaagg aggat	3000
ttatgtatgat gaggatgaga accagagccc aagaagcttc cagaagaaga ccagacacta	3060
cttcatcgct gcagtggaga gactgtggga ttatggatg agcagcagcc cacacgtgct	3120
gagaaacaga gcccagagcg gatctgtgcc acagtcaag aagggtgtgt tccaggagtt	3180
caccgatgga agttcaccc agccactgta cccgggagag ctgaacgagc acctggact	3240
gctgggacca tacatccggg ccgaggtgga ggataacatc atggtgaccc tccggaa	3300
ggccageccgg ccatacagct tctacagcag cctgatcagc tacgaggagg atcagcggca	3360
gggagccgag ccacggaaga acttcgtgaa gccaaacgag accaagacct acttctggaa	3420
ggtgtcagcac cacatggccc caaccaagga tgagttcgat tgcaaggcct gggctactt	3480
cagcgatgtg gatctggaga aggtgtgca cagcggactg atcggaccac tgctgggt	3540
ccacaccaac accctgaacc cagcccacgg acggcaggtg accgtgcagg agttcgccct	3600
gttcttcacc atttcgatg agaccaagag ctggacttcc accgagaaca tggagcggaa	3660
ctgcccggcc ctttgcaca tccagatgga ggatccaacc ttcaaggaga actaccggtt	3720
ccacgccatc aacggataca tcatggatac cctgccagga ctgggtatgg cccaggatca	3780
gcggatccgg tggatcactgc tggatggg aagcaacgag aacatccaca gcatccactt	3840
cagcggacac gtgttcaccc tgccggaa ggaggagat aagatggccc tgtacaacct	3900
gtacccagga gtgttcgaga ccgtggagat gctgccaagc aaggccggaa tctggcgggt	3960
ggagtgctg atcggagagc acctgcacgc cgaaatgagc accctgttcc tggtgtacag	4020
caacaagtgc cagacccac tggaaatggc cagcggacac atccggatt tccagatcac	4080
cggccagcggc cagtacggac agtgggcccc aaagctggcc cggctgcact acagcggaa	4140
catcaacgcc tggagcacca aggagccatt cagctggatc aaagtggatc tgctggcccc	4200
aatgatcatc cacggaatca agacccaggg agccggcag aagttcagca gcctgtacat	4260
cagccagttc atcatcatgt acagcctggta tggaaagaag tggcagaccc accggggaaa	4320

cagcacccgga accctgatgg tttcttcgg aaacgtggat agcagcggaa tcaagcacaa	4380
catttcaac ccaccaatca tcgcccata catccggctg cacccaaccc actacagcat	4440
cagaagcacc ctgcggatgg agctgatggg atgtgatctg aacagctgct ccatgccact	4500
gggaatggag agcaaggcca tcagcgtgc ccagatcacc gccagcagct acttcaccaa	4560
catttcgcc acctggagcc caagcaaggc ccggctgcac ctgcaggac ggagcaacgc	4620
ctggcggcca caggtgaata acccaaagga gtggctgcag gtggatttcc agaagaccat	4680
gaagggtgacc ggagtgacca cccagggagt gaagagcctg ctgactagca tgtatgtcaa	4740
ggagttccctg atcagcagca gccaggatgg acaccagttgg accctgttct tccagaacgg	4800
aaaggtaag gtgtccagg gaaaccagga tagctcacc ccagtggta acagcctgaa	4860
tccaccactg ctgaccctg acctgcggat ccacccacag agctgggtgc accagatcg	4920
cctgagaatg gaggtgctgg gatgcgaggc ccaggatctg tactgatgag catgcaataa	4980
agtctgatgg ggcggcagcc tgtgtgtgcc tgggtctct ctgtccggaa atgtcaaac	5040
aatggaggtg ctgcagtaga taagtagcat ggcgggtaa tcattaacta caaggaaccc	5100
ctagtgtatgg agttggccac tccctctcg cgcgcctcg ctgcactga ggccggcga	5160
ccaaaggctcg cccgacgccc gggcttgcc cggcggcct cagtgagcga gcgagcgcgc	5220
agcctaattt aacctaattt actggccgtc gtttacaac gtcgtgactg ggaaaacctt	5280
ggcgttaccc aacttaatcg cttgcagca catccccctt tgcgcagctg gcgtaatagc	5340
gaagaggccc gcaccgatcg ccctcccaa cagttgcga gcctgaatgg cgaatggac	5400
gcccctgtta gcccgcatt aagcgcggcg ggtgtgggg ttacgcgcag cgtgaccgct	5460
acacttgcctt gccccttagc gcccgcctt ttcgccttct tcccttcctt tctgcgcacg	5520
ttcgcggctt tccccgtca agctctaaat cgggggctcc ctttagggtt ccgattttagt	5580
gcttacggc acctcgaccc caaaaaactt gattagggtt atggttcactg tagtggcca	5640
tgcgcctgtt agacggttt tgcgcctt acgttggagt ccacgttctt taatagtgg	5700
ctctgttcc aaactgaaac aacactcaac cctatctgg tctattctt tgatttataa	5760
gggattttgc cgattcgcc ctattggta aaaaatggc tgatttaaca aaaatttac	5820
gcgaattttt aaaaaatatt aacgcttaca atttaggtgg cactttcg ggaaatgtgc	5880
gcggaaaccc tatttttttta tttttctaaa tacattcaaa tatgtatccg ctcatgagac	5940
aataaccctg ataaatgctt caataatatt gaaaaaggaa gagttatgagt attcaacatt	6000
tccgtgtcgc ctttattccc tttttgcgg cattttgcct tctgtttt gtcacccag	6060
aaacgctggt gaaaatggaaa gatgttgcgg atcagttggg tgcacggatg ggatcatcg	6120
aactggatct caacagcggt aagatccttgc agatgttgc cccgaagaa cgtttccaa	6180

tgtatgacac tttaaagtt ctgctatgtg gcgcggatt atccgttatt gacgccggc	6240
aagagcaact cggtcgccgc atacactatt ctcagaatga ctgggttag tactcaccag	6300
tcacagaaaa gcatcttacg gatggcatga cagtaagaga attatgcagt gctgccataa	6360
ccatgagtga taacactgctg gcacacttac ttctgacaac gatcgaggac ccgaaggagc	6420
taaccgttt ttgcacaac atggggatc atgtactcg cttgtatcg tggaaaccgg	6480
agctgaatga agccatacca aacgacgagc gtgacaccac gatgcctgt acaatggca	6540
caacgttgcg caaactatta actggcgaac tacttactt agcttccgg caacaattaa	6600
tagactggat ggaggcggat aaagtgcag gaccacttct gcgcctggcc cttccggctg	6660
gctggttat tgctgataaa tctggagccg gtgagcgtgg gtctcgccgt atcattgcag	6720
cactggggcc agatggtaag ccctccgtt tcgttagttt ctacacgacg gggagtcagg	6780
caactatgga tgaacgaaat agacagatcg ctgagatagg tgcctcactg attaagcatt	6840
gttaactgtc agaccaagtt tactcatata tacttttagat tgataaaa cttcatttt	6900
aatttaaaag gatcttagtg aagatcctt ttgataatct catgaccaaa atcccttaac	6960
gtgagtttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttctttag	7020
atccttttt tctgcgcgtt atctgctgtc tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg	7080
tggtttgtt gccggatcaa gagctaccaa ctctttcc gaaggttaact ggcttcagca	7140
gagcgcagat accaaatact gttcttcgt tgtagccgtt gttagccac cactcaaga	7200
actctgttagc accgcctaca tacctcgctc tgctaatcct gttaccagt gctgcgtcca	7260
gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc	7320
agcggtcggg ctgaacgggg gttcgtgca cacagccag cttggagcga acgacctaca	7380
ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaagcgc cacgctccc gaaggagaa	7440
aggcggacag gatccgtt acggcaggg tcggacagg agagcgcacg agggagcttc	7500
cagggggaaa cgcctggat ctttatagtc ctgtcggtt tcggcaccc tgacttgagc	7560
gtcgatttt gtatgtctcg ttagggggc ggagccatgt gaaaaacgac agcaacgcgg	7620
ccttttacg gttctggcc ttttgcgttca catgttctt cctgcgttat	7680
ccctgttacg tggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctgcgtcca	7740
gccgaacgac cgagcgcagc gagtcgtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca	7800
aaccgcctt ccccgccgt tggccgattt attaatgcag ctggcacgac aggttcccg	7860
actgaaagc gggcagttagc cgcaacgcaaa ttaatgttag ttagctact cattaggcac	7920

cccaggctt acatttatg cttccggctc gtagtttg tgaaattgtg agcggataac 7980
 aattcacac agaaacagc tatgaccatg attacgccag attaattaa gg 8032
 <210> 17
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Unknown
 <220><223> AAVhu.37 capsid
 <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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
 100 105 110
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro
 115 120 125
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Arg
 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
 180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr

385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr

405 410 415

Thr Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Gln Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Ala Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485 490 495

Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Thr Asn Thr Gly

580 585 590

Pro Ile Val Gly Asn Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe

660 665 670

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

675 680 685

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

690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735
Asn Leu		

<210>	18
<211>	738
<212>	PRT
<213>	Unknown

<220><223> AAVrh.10 capsid		
<400> 18		
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser		
1	5	10
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro		
20	25	30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro		
35	40	45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro		
50	55	60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp		
65	70	75
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala		
85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly		
100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		

145	150	155	160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln			
165	170	175	
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro			
180	185	190	
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly			
195	200	205	
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser			
210	215	220	
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val			
225	230	235	240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His			
245	250	255	
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp			
260	265	270	
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn			
275	280	285	
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn			
290	295	300	
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn			
305	310	315	320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala			
325	330	335	
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln			
340	345	350	
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe			
355	360	365	
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn			
370	375	380	
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr			
385	390	395	400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr			

405 410 415

Gln Phe Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser

420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445

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

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580 585 590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 665 670
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 680 685
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 695 700
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp
 705 710 715 720
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
 725 730 735
 Asn Leu

<210> 19

<211> 4371

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> constructed sequence

<400> 19

atgcagatcg agctgtctac ctgcttcttc ctgtgcctgc tgcggtctg cttcagcgcc	60
accagacggt actatctggg cgccgtggaa ctgagctggg actacatgca gagcgacctg	120
ggcgagctgc ccgtggacgc cagattccct ccaagagtgc ccaagagctt ccccttcaac	180

acctccgtgg tgtacaagaa aaccctgttc gtggaattca ccgaccacct gttcaatatc	240
gccaagccca gaccccccctg gatgggcctg ctgggaccta caattcaggc cgagggtgtac	300
gacaccgtcg tcatcaccct gaagaacatg gccagccacc ccgtgtctct gcacccgtg	360
ggaggtgtcct actggaaggc ctctgagggc gccgagtagc acgtcagac cagccagcgc	420
gagaaagagg acgacaaggt gttccctggc ggcagccaca cctacgtgt gcaggtgtcg	480
aaagaaaacg gccccatggc ctccgaccct ctgtgcctga catacagcta cctgagccac	540
gtggacacctg tgaaggacct gaacagcggc ctgatcggag ccctgctcgt gtgtagagag	600

ggcagcctgg ccaaagagaa aaccctgaccc ctgcacaagt tcatccgtc gttcccgctg	660
ttcgacgagg gcaagagctg gcacagcggag acaaagaaca gcctgatgca ggaccggac	720
gccgcctctg ctagagcctg gcccataatg cacaccgtga acggctacgt gaacagaagc	780
ctgcccggac tgatcggctg ccaccggaag tctgtgtact ggcacgtgat cggcatggc	840

accacccctg aggtgcacag catcttctg gaaggacaca ctttctgt gcggaccac	900
cggcaggcca gcctggaaat cagccctatc accttctga ccgcccagac actgtgtatc	960
gacctggcc agttctgtt gttctgccac atcagctccc accagcacga cggcatggaa	1020
gcctacgtga aggtggacag ctgccccagc gaaccccagc tgccgtgaa gaacaacgag	1080
gaagccgagg actacgacga cgacctgacc gacagcgaga tggacgttgt gcgttcgac	1140
gacgataaca gcccagctt catccagatc agaagcgtgg ccaagaagca ccccaagacc	1200
tgggtgcact atatcgccgc cgaggaagag gactgggatt acgcccctt ggtgtggcc	1260
cccgacgaca gaagctacaa gagccagtttac ctgaacaacg gccccagcg gatcgccgg	1320
aagtataaga aagtgcgtt catggcctac accgacgaga cattcaagac cagagaggcc	1380
atccagcactc agagcggcat cctggccct ctgctgtatg gcgaagtgg cgacaccctg	1440
ctgatcatct tcaagaacca ggccagcaga ccctacaaca tctaccctca cggcatcacc	1500
gacgtgcggc ccctgtactc tagaaggctg cccaaaggcg taaaacacccgtt gaaggacttc	1560
cccatctgc cggcgagat cttcaagtac aagtggaccg tgaccgtgga agatggcccc	1620
accaagagcg accccagatg cctgacacgg tactatagca gttcgtgaa catggaacgg	1680
gacctggcct ccggcctgat tggccactg ctgatctgtt acaaagaaag cgtggaccag	1740
cgggcaacc agatcatgag cgacaagcgg aacgtgtatcc tttagcgt gttcgatgag	1800
aaccggctt ggtatctgac cgagaatatc cagcggttcc tgcccaaccc tgccggcgtg	1860
cagctggaaat ccctgagtt ccaggcctcc aacatcatgc actccatcaa tggctatgt	1920
ttcgacagcc tgcagctgatc cgtgtgcctg cacgagggtgg cttactggta catcctgagc	1980
atcggggccc agaccgactt cctgtccgtt ttcttctccg gctacacccctt caagcacaag	2040
atgggtgtacg aggataccctt gaccctgttc cccttagcg gcaaaccgtt gttcatgagc	2100
atggaaaacc ccggcctgtt gatcctgggc tgccacaaca gcaacttccg gaacagaggc	2160
atgaccgccc tgcgtggaaatgtt gtcggacttgc gacaagaaca ccggcacta ctacgaggac	2220
agctatgagg acatcagcgc ctacctgttcc agcaagaaca acggcatcga gcccagaagc	2280
ttcagccaga acccccccgt gctgaagcgg caccagagag agatcacccg gaccaccctg	2340
cagttccgacc aggaagagat cgattacgac gacaccatca gcgtggaaat gaagaaagaa	2400
gatttcgaca tctacgacga ggacgagaac cagcccccc ggtccttca gaaaaagacc	2460
ccggactact tcattggcgc tggaaatgtt gtcggacttgc acggcatgag cagcggccct	2520
cacgtgttgc gaaacagggc ccagagcggc agcgtgccttcc agttcaagaa agtgggtttc	2580
caggaattca cagacggcag ctccatccatc cctctgttacc gcccggagctt gaaacgagcac	2640

ctgggactgc tggccctta tatcagagcc gaagtggaag ataacatcat ggtcaccc	2700
cggaatcagg cctccggcc ctacagcttc tacagctcc ttagttagctc cgaaggagac	2760
cagagacagg gcgtgagcc ccggagaac ttctgtgaagc ccaacgagac taagacctac	2820
tttttggagg tgcagcacca catggccctt acaaaggacg agttcgactg caaggcctgg	2880
gcctacttctt ccgtacgttgc cctggaaaag gacgtgactt ctgggtgtat cggccctgt	2940
ctcggtgtgcc acaccaacac cctgaatccc gcccacggca gacaggtgac agtgcaggaa	3000
ttcgcctgt ttttaccat cttcgaccaa acaaagatgt ggtacttcac cgaaaacatg	3060
gaaagaaaact gcccggctcc ctgcaacatc cagatggaag atcccacccaa caaagagaac	3120
taccggttcc acgccccaa cggctacatc atggacacac tgccggcct cgtgtggct	3180
caggatcagc ggttccgggtt gttatctgtt tccatggctt ccaacgagaa catccacagc	3240
atccacttca gcccggcacgt gtttaccgtt cggaaaaaaag aagagtacaa aatggccctg	3300
tacaacctgtt accctgggtt gtttccggaca gtggaaatgc tgcccgacaa ggccggcatc	3360
tggccgggtgg agtgtctgtt cggcgagcac ctgcacgtt ggttggacactt ctgtttctg	3420
gtgtacagca acaagtgcca gacacctgtt ggcacatggctt ctggccacat ccggacttt	3480
cagatcacag ccacccggcca gtacggccag tggccccc aactggccag actgcactac	3540
agcggcagca tcaacgcctg gtccacccaa gagccctta gctggatcaa ggtggacctg	3600
ctggctccca tggatcatcca cggaaatcaag acccaggcgcc ccaacgagaa gtttccggc	3660
ctgtacatca gcccggcacat catcatgttac agcctggacg gcaagaatgtt gcagaccc	3720
ccggccataa gacccggcac cctgtatgggtt ttcttccggca acgtggactt cagccggatt	3780
aagcacaaca ttttcaaccc ccccatcattt gcccggtaca tccggctgca ccccccac	3840
tacagcatcc ggtccaccctt gagaatggaa ctgtatgggtt ggcacatggaa ctccgttcc	3900
atggccctgg ggttggaaag caaggccatc tccgacggcc agatcaccgc ctccagctac	3960
ttcaccaaca ttttccggcac ctggccccc tccaaaggccc ggctgcaccc gcaggccaga	4020
agcaatgtttt ggaggccctca ggttggacaaac cccaaagatgtt ggctgcaccc ggacttccag	4080
aaaaccatga aagtggccgg cgttggccacc caggccgttga agtctctgtt gacccatgtt	4140
tacgtgaaag attttccgtt ctccggccacc caggacggcc accagttggac cctgttttcc	4200
cagaacggca aagtggaaatgtt tggccggccacc ctttccggccacc cgttggatgtt	4260
agccgttggacc ctccactgtt gaccagatac ctggccatcc accctcagag ttgggttgcac	4320
cagattgttgc tggccatggaa agtggctggaa tggccggccacc aggacccgttac	4371

<210> 20

<211> 736

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> AAV3B capsid

<400> 20

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 Val Pro Gln Pro

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly 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 Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Arg

130 135 140

Pro Val Asp Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Val Gly

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser
 210 215 220
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser 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 Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr
 260 265 270

Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His
 275 280 285
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp
 290 295 300
 Gly Phe Arg Pro Lys Lys Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val
 305 310 315 320
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu
 325 330 335
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr
 340 345 350

Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp
 355 360 365
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser
 370 375 380
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser
 385 390 395 400
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Thr Phe Glu
 405 410 415

Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg
 420 425 430
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr
 435 440 445
 Gln Gly Thr Thr Ser Gly Thr Thr Asn Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser
 450 455 460

Gln Ala Gly Pro Gln Ser Met Ser Leu Gln Ala Arg Asn Trp Leu Pro
 465 470 475 480
 Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Thr Ala Asn Asp Asn
 485 490 495
 Asn Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Ser Lys Tyr His Leu Asn
 500 505 510
 Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
 515 520 525
 Asp Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Asn Leu Ile Phe Gly
 530 535 540
 Lys Glu Gly Thr Thr Ala Ser Asn Ala Glu Leu Asp Asn Val Met Ile
 545 550 555 560

 Thr Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln
 565 570 575
 Tyr Gly Thr Val Ala Asn Asn Leu Gln Ser Ser Asn Thr Ala Pro Thr
 580 585 590
 Thr Arg Thr Val Asn Asp Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605
 Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu
 625 630 635 640

 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Met Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asn Pro Pro Thr Thr Phe Ser Pro Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr
 660 665 670
 Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
 675 680 685
 Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
 690 695 700

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