(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0154633
(43) 공개일자 2024년10월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01) *C07K 14/005* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7032207
(22) 출원일자(국제) 2023년03월06일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년09월26일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/063789
(87) 국제공개번호 WO 2023/172873
국제공개일자 2023년09월14일
(30) 우선권주장
63/317,450 2022년03월07일 미국(US)

(71) 출원인
4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455, 5858 호턴 스트리트
(72) 발명자
프랜시스, 피터
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455, 5858 호턴 스트리트, 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.내
코터맨, 멜리사 A.
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455, 5858 호턴 스트리트, 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.내
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
신관호

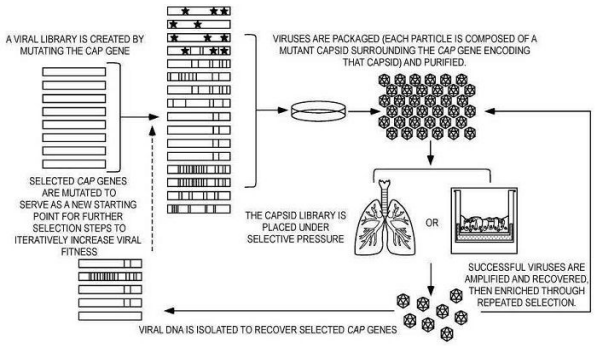
전체 청구항 수 : 총 74 항

(54) 발명의 명칭 **개선된 폐 향성을 갖는 아데노-관련 바이러스 변이체 캡시드 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 개시 내용은 폐 세포에 향성(tropism)을 부여하는 변이체 AAV 캡시드 단백질, 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스 및 이를 포함하는 약학적 조성물, 그리고 폐 질환 치료를 위해 이종성 핵산을 폐 세포에 전달하는 데 있어서 이들의 용도를 제공한다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61P 11/00 (2018.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 2750/14122 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
(72) 발명자
나이, 줄리
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455, 5858 호턴 스트리트, 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.내
크로즈 록산느
미국, 캘리포니아주 94608, 에머리빌, 스위트 455, 5858 호턴 스트리트, 4디 몰레큘러 테라퓨틱스 아이엔씨.내

명 세 서

청구범위

청구항 1

상응하는 모(parental) AAV 캡시드 단백질에 비해 펩타이드 삽입을 포함하는 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질이며,

상기 펩타이드 삽입이 DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15) 및 NSTRHTD (서열 식별 번호: 16)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 2

제 1항에 있어서,

삽입 부위가 캡시드 단백질의 GH-루프 내에 위치하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 3

제 2항에 있어서,

삽입 부위가 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 570과 611 사이 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치의 두 인접 아미노산 사이에 위치하고, 바람직하게는 삽입 부위는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 상응하는 아미노산 사이에 위치하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 4

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서,

펩타이드 삽입이 Y_1Y_2DNTVTRSY_3 Y_1Y_2SNSVQSIY_3 및 Y_1Y_2NSTRHTDY_3으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 Y_1-Y_3 각각은 Ala, Leu, Gly, Ser, Thr 및 Pro로부터 독립적으로 선택되는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 5

제 4항에 있어서,

펩타이드 삽입이 LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43) 및 LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항에 있어서,

삽입 부위가 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 상응하는 아미노산 사이에 위치하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1에 비해 하나 이상의 아미노산 치환 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 하나 이상의 상응하는 치환을 추가로 포함하고, 하나 이상의 아미노산 치환은 선택적으로 Y6F, S16Y, G18E, P30L, R37L, H38Q, V65A, L91I, E99D, R103L, R103C, S109T, V118A, Q120H, E133D, E134Q, P135A, V136G, K137E, T138R, T200I, D213Y, G220R, P250S, D283E, N312K, T344S, E347D, G376A, P399H, G406E, Q428H, P436H, N449D, P451Q, N469D, D472N, T491I, K532E, K544E, R585K, A591D, A593E, D594N, D608N, H641N, K688R, N705S 및 V708I로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 넘버링(numbering)은

서열 식별 번호: 2에 따르는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 8

제 7항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 비해 V708I 아미노산 치환을 포함하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 9

제 1항 내지 제 8항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 10

제 1항 내지 제 9항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 70-72 중 어느 하나에 표시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 11

제 1항 내지 제 10항 중 어느 한 항에 있어서,

AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 70-72 중 어느 하나에 표시된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 12

제 1항 내지 제 11항 중 어느 한 항에 있어서,

캡시드 단백질이 야생형 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 감염성과 비교하여 감염성 rAAV 비리온에 폐 세포의 증가된 감염성을 부여하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 13

제 12항에 있어서,

캡시드 단백질이 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV과 비교하여 감염성 rAAV 비리온에 중화 항체에 의한 중화에 대한 증가된 내성을 부여하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 14

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 따른 변이체 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된(isolated) 핵산.

청구항 15

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 따른 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 감염성 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 16

제 15항에 있어서,

하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 추가로 포함하는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 17

제 16항에 있어서,

유전자 산물이 단백질, 소형 간섭(small interfering) RNA, 마이크로(micro) RNA, 짧은 헤어핀(short hairpin) RNA 또는 안티센스(antisense) RNA인, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 18

제 16항 또는 제 17항에 있어서,

하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결되는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 19

제 18항에 있어서,

발현 제어 서열이 유비쿼터스(ubiquitous) 프로모터를 포함하는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 20

제 18항에 있어서,

발현 제어 서열이 조직 특이적 프로모터를 포함하는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 21

제 16항 내지 제 20항 중 어느 한 항에 있어서,

이종성 핵산이 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 22

제 15항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

청구항 23

제 15항 내지 제 21항 중 어느 한 항에 따른 rAAV와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 24

이종성 핵산을 폐 세포에 전달하는 방법이며,

(i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)로 구성된 그룹으로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하는 변이체 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV 비리온과 폐 세포를 접촉시키는 단계를 포함하며, 바람직하게는 상기 rAAV 비리온이 폐, 기관지내(endobronchial), 비강내, 기관내 및/또는 기관지내(intrabronchial)로 포유류 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 25

제 24항에 있어서,

펩타이드 삽입이 Y_1Y_2HDITKNIY_3, Y_1Y_2NQDYTKTY_3, Y_1Y_2DNTVTRSY_3, Y_1Y_2SNSVQSIY_3, Y_1Y_2NSTRHTDY_3 및 Y_1Y_2TNRTSPDY_3으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 Y_1-Y_3 각각은 Ala, Leu, Gly, Ser, Thr 및 Pro로부터 독립적으로 선택되는, 방법.

청구항 26

제 25항에 있어서,

펩타이드 삽입이 LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 방법.

청구항 27

제 24항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서,

삽입 부위가 캡시드 단백질의 GH-루프 내에, 바람직하게는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 570과 611 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치 사이에 위치하며, 바람직하게는 삽입 부위가 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 587과 588에 상응하는 아미노산 사이 또는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 588과 589 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 상응하는 아미노산 사이에 위치하며, 더욱 바람직하게는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 상응하는 아미노산 사이에 위치하는, 방법.

청구항 28

제 24항 내지 제 26항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1에 비해 하나 이상의 아미노산 치환 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 하나 이상의 상응하는 치환을 추가로 포함하고, 하나 이상의 아미노산 치환은 선택적으로 Y6F, S16Y, G18E, P30L, R37L, H38Q, V65A, L91I, E99D, R103L, R103C, S109T, V118A, Q120H, E133D, E134Q, P135A, V136G, K137E, T138R, T200I, D213Y, G220R, P250S, D283E, N312K, T344S, E347D, G376A, P399H, G406E, Q428H, P436H, N449D, P451Q, N469D, D472N, T491I, K532E, K544E, R585K, A591D, A593E, D594N, D608N, H641N, K688R, N705S 및 V708I로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 넘버링(numbering)은 서열 식별 번호: 2에 따르는, 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 비해 V708I 아미노산 치환을 포함하는, 방법.

청구항 30

제 24항 내지 제 29항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한, 방법.

청구항 31

제 24항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 70-72 중 어느 하나에 표시된 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한, 방법.

청구항 32

제 24항 내지 제 30항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 70-72 중 어느 하나에 표시된 아미노산 서열을 포함하거나 또는 이로 구성되는, 방법.

청구항 33

제 24항 내지 제 32항 중 어느 한 항에 있어서,

폐 세포가 상부 기도 상피 세포, 폐포 상피 세포, 1차, 2차 또는 3차 기관지 상피 세포, 기관 상피 세포, 섬모 기도 상피 세포, 폐포 상피 1형(AECI) 또는 2형(AECII) 세포, 평활근 세포 또는 내피 세포인, 방법.

청구항 34

폐 질환을 치료하는 방법이며, (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)로 구성된 그룹으로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하는 변이체 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 치료적 유효량의 rAAV 비리온 또는 상기 비리온 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 35

제 34항에 있어서,

폐 질환이 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease)(COPD), 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)(IPF), 낭포성 섬유증, 폐 동맥 고혈압, 폐 고혈압, 폐암(1차, 2차 및 전이성), 표면 활성제 결핍, 바이러스 및/또는 박테리아 감염, 급성 기관지염, 폐렴(바이러스, 박테리아 및 진균 폐렴 포함), 호흡기 감염(인두염, 크룹(croup), 아스페르길루스(aspergillus), 코시디오이코시스(coccidiomycosis), 한타바이러스(hantavirus) 폐 증후군 및 히스토플라스마(histoplasmosis) 포함), 화학 및 과민성 폐렴, 결핵 및 기타 항산균 감염(항산균 아비움(mycobacterium avium) 포함, 이에 국한되지 않음), 사르코이드증(sarcoidosis), 호흡기 세포융합 바이러스, 폐 부종, 급성 호흡 곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome)(ARDS), 폐진증(흑색 폐 질환, 석면증 및 규폐증 포함), 간질성 폐질환(육아종 및 자가면역 질환 포함), 폐색전증, 흉막 삼출액, 흉막염, 중피종, 기흉, 급성 기관지염, 세기관지염(폐쇄성 세기관지염 포함), 유아 돌연사 증후군, 수면 무호흡증, 기관지확장증, 기관지폐이형성증, 암호성 기질화 폐렴, 전자담배 또는 베이핑 사용과 관련된 폐 손상(E-cigarette or vaping use associated lung injury)(EVALI), 중동호흡기증후군(Middle Eastern Respiratory Syndrome)(MERS), 원발성 섬모 운동 이상증, 중증 급성 호흡기 증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome)(SARS), 알파-1-안티트립신(antitrypsin) 결핍증, 천식, 간질성 폐질환 및 COVID-19(코로나바이러스 감염증 2019)로부터 선택되는, 방법.

청구항 36

제 35항에 있어서,

폐 질환이 만성 폐쇄성 폐 질환(COPD)인, 방법.

청구항 37

제 36항에 있어서,

이종성 핵산이 알파-1-안티트립신(alpha-1-antitrypsin), 알파-1-안티키모트립신(alpha-1-antichymotrypsin), 알파-1-마크로글로불린(alpha-1-macroglobulin), 매트릭스 메탈로프로티네이스 1(matrix metalloproteinase 1)(MMP1), 매트릭스 메탈로프로티네이스 12(matrix metalloproteinase 12)(MMP12), 미세소체 에폭사이드 가수분해효소(microsomal epoxide hydrolase), CYP1A1, 글루타치온 S-트랜스퍼라제(Glutathione S-transferase), 헴 산화효소-1(heme oxygenase-1, TGF-베타-1, TNF-알파, IL-1 복합체, IL-8, IL-13, 인간 백혈구 항원(HLA-B7 및 Bw16), 비타민 D 결합 단백질 및/또는 베타-2-아드레날린 수용체 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 38

제 35항에 있어서,

폐 질환이 IPF인, 방법.

청구항 39

제 38항에 있어서,

이종성 핵산이 SFTPA1(계면활성제 A1) 및 카베올린(Caveolin)-1 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 40

제 35항에 있어서,

폐 질환이 알파-1-안티트립신 결핍인, 방법.

청구항 41

제 40항에 있어서,

이종성 핵산이 알파-1-안티트립신 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, 방법.

청구항 42

제 35항에 있어서,

폐 질환이 낭포성 섬유증인, 방법.

청구항 43

제 42항에 있어서,

이종성 핵산이 서열 식별 번호: 30 또는 서열 식별 번호: 31로부터 선택된 뉴클레오타이드 서열이나 이와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함하는, 방법.

청구항 44

제 34항 내지 제 43항 중 어느 한 항에 있어서,

rAAV 또는 약학적 조성물이 흡입에 의해 대상체에게 투여되는, 방법.

청구항 45

제 44항에 있어서,

rAAV 또는 약학적 조성물이 rAAV를 포함하는 에어로졸 현탁액의 흡입에 의해대상체에게 투여되며, 바람직하게는 상기 에어로졸 현탁액은 액체 분무기에 의해 생성되는, 방법.

청구항 46

(i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)로 구성된 그룹으로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하는 변이체 캡시드 단백질 및 (ii) CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분 및 SERPINA1 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분으로부터 선택된 유전자를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 감염성 rAAV.

청구항 47

제 46항에 있어서,

뉴클레오타이드 서열이 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하며, 유비쿼터스(ubiquitous) 프로모터에 작동 가능하게 연결된, 감염성 rAAV.

청구항 48

제 47항에 있어서,

뉴클레오타이드 서열이 서열 식별 번호: 102 또는 서열 식별 번호: 103, 또는 서열 식별 번호: 102 또는 서열 식별 번호: 103과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95% 또는 적어도 99% 동일한 서열로부터 선택되는, 감염성 rAAV.

청구항 49

제 46항에 있어서,

뉴클레오타이드 서열이 알파-1-안티트립신을 인코딩하고 유비퀴터스 프로모터에 작동 가능하게 연결되는, 감염성 rAAV.

청구항 50

제 46항 내지 제 49항 중 어느 한 항에 따른 rAAV와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 51

제 1항 내지 제 13항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV와 비교하여 감염성 rAAV 비리온에 중화 항체에 의한 중화에 대한 증가된 내성, 바람직하게 적어도 1.5배 증가된 내성을 부여하고, 바람직하게는 모 AAV 캡시드 단백질은 혈청형 2의 캡시드 단백질인, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 52

상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 펩타이드 삽입을 포함하는 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질이며,

상기 펩타이드 삽입은 QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 53

제 52항에 있어서,

펩타이드 삽입은 Y_1Y_2DNTVTRSY$_3$ Y_1Y_2SNSVQSIY$_3$ 및 Y_1Y_2NSTRHTDY$_3$으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하고, Y_1-Y$_3$ 각각은 Ala, Leu, Gly, Ser, Thr 및 Pro로부터 독립적으로 선택되는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 54

제 52항 또는 제 53항에 있어서,

삽입 부위가 캡시드 단백질의 GH-루프 내, 바람직하게는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 570과 611 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치 사이, 더 바람직하게는 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 588과 589 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 상응하는 아미노산 사이에 위치하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 55

제 52항 내지 제 54항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1에 비해 하나 이상의 아미노산 치환 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 하나 이상의 상응하는 치환을 추가로 포함하고, 하나 이상의 아미노산 치환은 선택적으로 Y6F, S16Y, G18E, P30L, R37L, H38Q, V65A, L91I, E99D, R103L, R103C, S109T, V118A, Q120H, E133D, E134Q, P135A, V136G, K137E, T138R, T200I, D213Y, G220R, P250S, D283E, N312K, T344S, E347D, G376A, P399H, G406E, Q428H, P436H, N449D, P451Q, N469D, D472N, T491I, K532E, K544E, R585K, A591D, A593E, D594N, D608N, H641N, K688R, N705S 및 V708I로 구성된 그룹으로부터 선택되며, 넘버링(numbering)은 서열 식별 번호: 2에 따르는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 56

제 54항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 AAV2(서열 식별 번호: 2)의 VP1 또는 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 내의 상응하는 위치에 비해 V708I 아미노산 치환을 포함하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 57

제 52항 내지 제 56항 중 어느 한 항에 있어서,

변이체 AAV 캡시드 단백질이 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 동일한, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 58

제 52항 내지 제 57항 중 어느 한 항에 있어서,

캡시드 단백질이 야생형 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 감염성과 비교하여 감염성 rAAV 비리온에 폐 세포의 증가된 감염성을 부여하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 59

제 58항에 있어서,

캡시드 단백질이 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV과 비교하여감염성 rAAV 비리온에 중화 항체에 의한 중화에 대한 증가된 내성을 부여하는, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 60

제 52항 내지 제 59항 중 어느 한 항에 따른 변이체 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산.

청구항 61

제 52항 내지 제 59항 중 어느 한 항에 따른 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 감염성 재조합 AAV(rAAV) 비리온.

청구항 62

제 61항에 있어서,

하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 추가로 포함하는, rAAV 비리온.

청구항 63

제 62항에 있어서,

유전자 산물이 단백질, 소형 간섭 RNA, 마이크로 RNA, 짧은 헤어핀 RNA 또는 안티센스 RNA인, rAAV 비리온.

청구항 64

제 62항 또는 제 63항에 있어서,

하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열이 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된, rAAV 비리온.

청구항 65

제 64항에 있어서,

발현 제어 서열이 유비퀴터스 프로모터를 포함하는, rAAV 비리온.

청구항 66

제 64항에 있어서,

발현 제어 서열이 조직 특이적 프로모터를 포함하는, rAAV 비리온.

청구항 67

제 62항 내지 제 66항 중 어느 한 항에 있어서,

이종성 핵산이 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는, rAAV 비리온.

청구항 68

제 61항 내지 제 67항 중 어느 한 항에 따른 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

청구항 69

제 62항 내지 제 67항 중 어느 한 항에 따른 rAAV와 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물.

청구항 70

제 62항 내지 제 67항 중 어느 한 항에 따른 rAAV를 폐 세포에 접촉시키는 단계를 포함하는 이종성 핵산을 폐 세포에 전달하는 방법이며, 바람직하게는 rAAV 비리온이 폐, 기관지내(endobronchial), 비강내, 기관내 및/또는 기관지내(intrabronchial)로 포유류 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 71

제 70항에 있어서,

폐 세포가 상부 기도 상피 세포, 폐포 상피 세포, 1차, 2차 또는 3차 기관지 상피 세포, 기관 상피 세포, 섬모 기도 상피 세포, 폐포 상피 1형(AECI) 또는 2형(AECII) 세포, 평활근 세포 또는 내피 세포인, 방법.

청구항 72

치료적 유효량의 제 69항에 따른 약학적 조성물을 필요로하는 대상체에 투여하여 폐 질환을 치료하는 방법.

청구항 73

제 72항에 있어서,

상기 약학적 조성물이 흡입에 의해 대상체에 투여되는, 방법.

청구항 74

제 73항에 있어서,

상기 약학적 조성물이 rAAV를 포함하는 에어로졸 현탁액의 흡입에 의해 대상체에 투여되고, 바람직하게는 상기 에어로졸 현탁액이 액체 분무기에 의해 생성되는, 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 3월 7일에 출원된 미국 가특허출원 일련번호 63/317,450호의 우선권을 주장하며, 이의 전체 개시 내용은 본원에 참조로 포함된다.

[0003] **EFS-WEB을 통한 서열 목록 제출**

[0004] 약 144,000Byte의 파일 크기로 2023년 3월 3일경에 생성된 "090400-5019-WO-Sequence-Listing"이라는 제목의 컴퓨터 판독 가능 XML 파일에는 이 출원에 대한 서열 목록이 포함되어 있으며, 그 전체가 참조로 본원에 포함된다.

배 경 기 술

[0005] **발명의 배경**

[0006] 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus)(AAV)를 기반으로 하는 유전자 전달 벡터는 전임상 질병 모델 및 최근에 여러 질병 표적에 대한 인간 임상 시험 모두에서 가능성을 입증했다. AAV를 기반으로 하는 벡터는 야생형 AAV가 비병원성이며 알려진 질병과의 병인학적 연관성이 없기 때문에 매우 안전하다. 또한 AAV는 간, 근육, 폐, 망막 및 뇌를 포함한 수많은 조직에서 고효율 유전자 전달 및 지속적인 이식유전자 발현에 대한 성능을 제공한다.

[0007] AAV는 2개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame), rep 및 cap을 함유하는 단일 가닥(stranded) DNA 바이러스이다. 첫 번째 유전자는 게놈 복제에 필요한 4개의 단백질(Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40)을 인코드하고, 두 번째 유전자는, 조립되어 바이러스 캡시드를 형성하는 3개의 구조 단백질(VP1-3)을 발현한다. 이름에서 알 수 있듯이, AAV는 활성 복제를 위해 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스와 같은 헬퍼(helper) 바이러스의 존재에 의존한다. 헬퍼의 부재 하에 게놈이 에피솜으로 유지되거나 숙주 염색체에 통합되는 잠복 상태를 설정한다. 여러 상동 영장류 AAV 혈청형 및 수많은 비인간 영장류 혈청형이 확인되었다. AAV2는 유전자 전달 비히클(vehicle)로서 가장 잘 특징지어진다.

[0008] AAV는 점점 더 많은 임상 시험에서 유망한 결과를 얻었다(Bainbridge et al., 2008; Carpentier et al., 2012; Gaudet et al., 2010; MacLaren et al., 2014; A. M. Maguire et al., 2009; A. Maguire & Simonelli, 2008; Nathwani et al., 2011, 2014; Stroes et al., 2008). 그러나 AAV의 유용성을 제한할 수 있는, 예를 들어 항-캡시드 면역 반응, 특정 조직의 제한된 형질도입, 특정 세포 유형에 대한 표적 전달 불가능 및 비교적 낮은 패키징 용량과 같은 유전자 전달 장애가 있다. 많은 경우, 합리적 설계에 AAV를 개선할 수 있는 능력을 효과적으로 부여할 수 있는 기계론적(mechanistic) 지식이 부족하다. 대안으로, 유도 진화(directed evolution)는 특정 생물의학적 요구를 충족하는 새로운 AAV 변이체를 생산하는 전략으로 등장했다. 유도 진화 전략은 유전적 다양화 및 선택 과정을 활용하여 생물 분자의 기능을 점진적으로 개선하는 유익한 돌연변이를 축적할 수 있다. 이 과정에서 야생형 AAV *cap* 유전자는 여러 가지 다른 접근 방식을 사용하여 다양화되어 바이러스 입자 라이브러리를 생성하기 위해 패키징되는 대규모 유전자 라이브러리를 만든 다음, 유전자 전달 장벽을 극복할 수 있는 새로운 변이체를 단리(isolate)하기 위해 선택적 압력이 가해진다.

[0009] 이전에, 개념 증명(proof-of-concept) 응용 프로그램은 AAV 유도 진화를 사용하여 *시험관 내(in vitro)* 인간 폐 상피 또는 *생체 내(in vivo)* 돼지 폐에 유전자 전달을 위한 최적화된 AAV 변이체를 생산할 수 있음을 보여주었다. 이러한 초기 연구는 폐 상피 형질도입을 위해 최적화된 AAV 변이체가 선택된 모델의 맥락에서 평가될 때 CF에 대한 상당히 개선된 유전자 요법 치료를 선도할 수 있음을 보여준다. 그러나 이러한 벡터의 평가는 돼지와 인간 폐 상피 사이의 종 차이를 보여주었고, 이는 돼지 폐 상피 형질도입을 위해 진화된 벡터에 의한 인간 폐 상피의 제한된 형질도입을 초래한다.

[0010] 폐 질환 치료를 위해 인간 폐 상피와 같은 인간 폐 세포에 전달이 개선된 새로운 AAV 변이체의 개발에 대한 필

요성이 이 기술 분야에 존재한다.

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0011] **발명의 요약**

[0012] 본원에 모(parental) AAV 캡시드 단백질에 비해 아미노산 서열에 하나 이상의 변형이 있는 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 AAV 비리온에 존재할 때, 변형되지 않은 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 감염성과 비교하여 하나 이상의 유형의 폐 세포의 증가된 감염성을 부여한다. 또한 본원에 기술된 바와 같은 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 AAV 비리온 및 이의 약학적 조성물, 변이체 rAAV 캡시드 단백질 및 비리온을 만드는 방법, 및 이러한 rAAV 캡시드 단백질 및 비리온을 연구 및 임상에서,예를 들어 폐 질환 및 질병의 치료를 위해 폐의 하나 이상의 세포에 핵산 서열의 전달에서 사용하는 방법이 제공된다.

[0013] 본 개시 내용의 일부 측면에서, 변이체 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질이 제공되며, 이러한 변이체 AAV 캡시드 단백질은 모 AAV 캡시드에 비해 아미노산 서열에서 하나 이상의 변형을 가지며, 이는 AAV 비리온에 존재할 때, 아미노산 서열 변형을 포함하지 않는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 바이러스에 의한 폐 세포의 감염성과 비교하여 하나 이상의 유형의 폐 세포(예를 들어, 기도 상피 세포, 이에 국한되지 않지만 폐포 상피 세포, 기관지(1차, 2차 또는 3차) 상피 세포 또는 기관 상피 세포, 섬모 기도 상피 세포, 폐포 상피 1형(AECI) 또는 2형(AECII) 세포, 평활근 또는 내피 세포를 포함)의 증가된 감염성을 부여한다.

[0014] 본 개시 내용의 일부 측면에서, 재조합 AAV(rAAV) 비리온이 제공되며, 이러한 rAAV 비리온은 본원에 기술된 바와 같은 변이체 캡시드 단백질을 포함하고, 여기서 rAAV 비리온은 상응하는 변형되지 않은 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 감염성에 비해 하나 이상의 유형의 폐 세포의 증가된 감염성을 보인다. 일부 실시 양태에서, rAAV 비리온은 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 비해 모든 폐 세포의 증가된 감염성을 보인다. 다른 실시 양태에서, rAAV 비리온은 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 비해 폐의 특정 세포 유형의 증가된 감염성을 보이지만 다른 세포 유형에는 그렇지 않다. 다시 말해, rAAV 비리온은 폐의 특정 세포 유형에 우선적으로 증가된 감염성을 보이지만 다른 세포 유형에는 그렇지 않다. 예를 들어, rAAV는 하나 이상의 폐 상부 기도 세포에 대해 우선적으로 증가된 감염성을 보이지만 모든 세포 유형에 대해 증가된 감염성을 보이지 않는다. 일부 측면에서, 본원에 기술된 바와 같은 변이체 캡시드 단백질은 이러한 rAAV 비리온에 인간 AAV 중화 항체에 대한 증가된 내성(resistance)을 부여한다.

[0015] 일부 실시 양태에서, rAAV 비리온은 이종성 핵산을 포함한다. 이러한 일부 실시 양태에서, 이종성 핵산은 폴리펩타이드를 인코딩하는 RNA를 인코딩한다. 이러한 다른 실시 양태에서, 이종성 핵산 서열은 폴리펩타이드를 인코딩하지 않는 RNA 예를 들어, 이종성 핵산 서열 RNA 간섭제, 뉴클레아제를 위한 가이드 RNA 등을 인코딩한다. 일부 실시 양태에서, 이종성 핵산은 폴리펩타이드를 인코딩하는 뉴클레오타이드와 간섭 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다.

[0016] 또한 본원에 대상체 감염성 rAAV 비리온과 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일부 실시 양태에서, 약학적 조성물은 에어로졸 전달에 적합한 액체/현탁액으로 제형화된다. 관련 실시 양태에서, 약학적 조성물은 대상체가 흡입하는 rAAV 비리온을 포함하는 호흡성 입자의 에어로졸 현탁액으로 투여된다. 호흡성 입자는 액체 또는 고체일 수 있다. rAAV 비리온을 포함하는 액체 입자의 에어로졸은 압력 구동 에어로졸 분무기 또는 초음파 분무기와 같은 적합한 수단에 의해 생성될 수 있다. rAAV 비리온을 포함하는 고체 입자의 에어로졸은 임의의 고체 입자 에어로졸 생성기로 생성될 수 있다.

[0017] 또한, 표적 세포를 rAAV 비리온과 접촉시킴으로써 표적 세포(예를 들어, 폐 세포)에 이종성 핵산을 전달하는 방법에서의 본원에서 기술된 바와 같은 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온의 용도가 제공된다. 일부 실시 양태에서, 표적 세포는 생체 내 예를 들어, 폐 질환에 대한 치료가 필요한 개체(individual)의 폐에 존재한다. 다른 실시 양태에서, 표적 세포는 시험관 내에 존재한다.

[0018] 또한, 본원에 기술된 바와 같은 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV 비리온의 유효량 또는 이 rAAV 비리온의 유효량을 포함하는 약학적 조성물을 폐 질환 치료가 필요한 대상체에게 투여하여 폐 질환을 치료하는 방법이 제공된다.

[0019] 또한, 본원에서 기술된 바와 같은 변이체 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하는 단리된(isolated) 핵산 및 단리된 핵산을 포함하는 숙주 세포가 제공된다. 또 다른 실시 양태에서, 단리된 핵산 및/또는 단리된 숙주 세포는 rAAV를 포함한다.

[0020] 일부 측면에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 캡시드 단백질의 GH-루프, 바람직하게는 GH-루프의 표면-노출(surface-exposed) 영역에, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 약 5개 아미노산 내지 약 20개 아미노산("이종성 펩타이드" 또는 "펩타이드 삽입")의 삽입을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 AAV 비리온에 존재할 때, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 망막 세포의 감염성과 비교하여 망막 세포의 증가된 감염성을 부여한다. 일부 실시 양태에서, 펩타이드는 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다:

[0021] HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67).

[0022] 일부 측면에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 캡시드 단백질의 GH-루프에 펩타이드 삽입을 포함하고, 추가로 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 AAV 비리온에 존재할 때, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 감염성과 비교하여 폐 세포의 증가된 감염성을 부여한다. 일부 바람직한 측면에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 다음으로 구성된 그룹으로부터 선택된 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 또한 AAV2의 VP1에 비해 V708I 치환을 추가로 포함한다:

[0023] HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별

번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67).

[0024] 또한, 본원에 본원에서 개시된 바와 같은 변이체 AAV 캡시드를 포함하는 rAAV의 제조 및/또는 전달 방법이 개시된다. 또한, 본원에 본원에서 개시된 바와 같은 변이체 AAV 캡시드를 포함하는 rAAV를 포함하고 본원에 기술된 방법에 사용하기 위한 키트를 제공한다.

[0025] 다른 실시 양태에서, 앞선 문단의 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온은 앞선 또는 이후에 개시된 실시 양태 중 하나를 통합할 수 있다. 실제로, 명확성을 위해 개별 실시 양태의 맥락에서 기술된 본 발명의 특정 특징이 단일 실시 양태에서 조합하여 제공될 수도 있다는 것을 알 수 있다. 반대로, 간결성을 위해 단일 실시 양태의 맥락에서 기술된 본 발명의 다양한 특징이 개별적으로 또는 임의의 적절한 하위 조합으로 제공될 수도 있다. 본 발명에 속하는 실시 양태의 모든 조합은 본 발명에 의해 구체적으로 포괄되며, 각각의 조합이 개별적으로 그리고 명시적으로 개시된 것처럼 본원에 개시된다. 또한, 다양한 실시 양태 및 그 요소의 모든 하위 조합도 본 발명에 의해 구체적으로 포괄되며, 각각의 하위 조합이 개별적으로 그리고 명시적으로 본원에 개시된 것처럼 본원에 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0026] **도 1**은 개선된 기도 형질도입을 부여하는 변이체 AAV 캡시드를 식별하는 데 사용되는 유도 진화 과정을 도시한다.

도 2는 모델 시스템 결정 트리의 개략적 표현이다. 결정은 NHP 전달의 두 번째 및 세 번째 라운드 이후 수행된 시퀀싱 분석을 기반으로 한다.

도 3A-B 도 3a는 캡시드 라이브러리의 추정 유전적 다양성을 도시하며, 총 다양성은 10억 개 이상 변이체를 갖는다. 도 3b는 캡시드 라이브러리의 생산성을 도시하며, 모두 *생체 내(in vivo)* 치료 벡터 진화 과정을 위한 재료를 생산하기에 충분한 수준으로 제조되었다. 투여된 바이러스 게놈(viral genome)(vg)은 표적 용량을 나타내며, 전달 장치 및 투여 경로와 관련된 손실을 고려하지 않는다.

도 4는 선택 과정의 라운드 1-3을 위해 캡시드 라이브러리를 투여받은 NHP의 기관 및 1차, 2차 및 3차 기관지에 존재하는 바이러스 게놈의 ddPCR 정량화를 도시한다.

도 5는 라운드 3의 시퀀싱 분석 내의 "히트(hits)" 빈도를 도시한다. 시퀀싱 분석은 각 영역의 시퀀싱된 집단 내의 총 빈도를 기반으로 했다. 왼쪽 패널(기관 및 1차 기관지) 빈도는 다음과 같다: (i) 점 돌연변이 #1 = 13%; (ii) 펩타이드 삽입 #1 = 11%; (iii) 펩타이드 삽입 #2 = 4%; (iv) 펩타이드 삽입 #3 = 6%; (v) AAV2 점 돌연변이 = 11%; (vi) AAV2 펩타이드 삽입 = 40%; (vii) 키메라 = 7%; (viii) 기타 = 8%. 오른쪽 패널(2차 및 3차 기관지) 빈도는 다음과 같다: (i) 점 돌연변이체 #1 = 9%; (ii) 펩타이드 삽입 #1 = 3%; (iii) 펩타이드 삽입 #2 = 10%; (iv) 펩타이드 삽입 #3 = 3%; (v) 펩타이드 삽입 #4 = 7%; (vi) AAV2 점 돌연변이 = 9%; (vii) AAV2 펩타이드 삽입 = 54%; (viii) 기타 = 5%.

도 6A-B는 선택의 라운드 4(도 6a) 및 라운드 5(도 6b)에 대해 인간 IVIG의 부재 및 존재 하에 투여된 캡시드 라이브러리의 인간 상부 기도 ALI 배양물에 존재하는 바이러스 게놈의 ddPCR 정량화를 설명합니다.

도 7은 라운드 5의 시퀀싱 분석 내의 "히트" 빈도를 나타낸다. 시퀀싱 분석은 IVIG의 존재 및 부재 하에 선택에 대한 시퀀싱된 개체군 내의 총 빈도를 기반으로 했다. 왼쪽 패널(시험관 내(in vitro) 라운드 5A-IVIG) 빈도는 다음과 같다: (i) 점 돌연변이 #1 = 10%: (ii) 펩타이드 삽입 #1 = 17%; (iii) 펩타이드 삽입 #2 = 8%; (iv) 펩타이드 삽입 #3 = 1%; (v) 펩타이드 삽입 #4 = 4%; (vi) 펩타이드 삽입 #5 = 9%; (vi) 펩타이드 삽입 #6 = 15%; (vii) AAV2 펩타이드 삽입 = 35%; (viii) 기타 = 1%. 오른쪽 패널(시험관 내 라운드 5B +IVIG) 빈도는 다음과 같다. (i) 점 돌연변이 #1 = 6.7%: (ii) 펩타이드 삽입 #1 = 11.5%; (iii) 펩타이드 삽입 #2 = 9.6%; (iv) 펩타이드 삽입 #3 = 2.9%; (v) 펩타이드 삽입 #4 = 1.9%; (vi) 펩타이드 삽입 #5 = 16.3%; (vi) 펩타이드 삽입 #6 = 10.6%; (vii) AAV2 펩타이드 삽입 = 40.4%.

도 8A-C 형광 현미경을 사용하여 리포터 EGFP 발현으로 측정한 폐 상부 기도 상피 ALI 배양물에서의 AAV 캡시드 형질도입 효율. 도 8a-b는 AAV2, AAV5 및 AAV101과 비교한 6가지 새로운 변이체의 인간(도 8a) 및 NHP(도 8b) 정단(apical) 형질도입을 보여준다. 도 8c는 AAV2, AAV5 및 AAV101과 비교한 6가지 새로운 변이체의 인간 기저 형질도입을 보여준다. 아데노-관련 바이러스(Adeno-associated virus)(AAV), 공기-액체 계면(air-liquid interface)(ALI), 비형질도입(non-transduced)(NT), 감염 다중도(multiplicity of infection)(MOI).

도 9A-C 면역세포화학(도 9a, 9b) 및 ddPCR(도 9c)에 의한 AAV2 및 AAV101과 비교한 상위 신규 캡시드의 2차 분석. 형광 현미경을 사용하여 리포터 EGFP 발현으로 측정한 폐 상부 기도 상피 ALI 배양물에서의 AAV 캡시드 형질도입 효율(도 9a). 현미경 사진 픽셀 강도의 정량화(도 9b). 형질도입 후 전사본 정량화(도 9c). 아데노-관련 바이러스(AAV), 공기-액체 계면(ALI), 비형질도입(NT), 감염 다중도(MOI), 평균 형광 강도(mean fluorescent intensity)(MFI), 하우스키퍼(housekeeper)(HK). 에러 바(Error bars) = 표준 편차. 조건당 n=3.

도 10A-B는 점액의 존재 또는 부재 하에 CAG 프로모터에 작동 가능하게 연결된 EGFP 리포터 유전자를 포함하는 핵산을 보유하는 특정된 AAV 캡시드로 형질도입한 후 인간 기도 상피 세포 배양물에서 EGFP 발현을 도시한다. 배양물은 공기-액체 계면에서 ≥ 30일 동안 배양되었다; 감염 후 시간은 7일; - 점액, 점액 없음; + 점액, 점액 있음; 정단 형질도입; 감염 다중도(MOI) 25,000.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 정의

[0028] 명세서 및 청구항에서 사용되는 단수형 "하나, 한(a)", "하나,한(an)" 및 "이, 그(the)"는 문맥상 명확히 달리 지시되지 않는 한 복수형 참조를 포함한다. 예를 들어, 용어 "세포"는 이의 혼합물을 포함한 복수의 세포를 포함한다.

[0029] 본원에 사용되는 용어 "포함하는(comprising)"은 조성물 및 방법이 언급된 요소를 포함하지만 다른 요소를 제외하지 않는다는 것을 의미하도록 의도된다. 조성물 및 방법을 정의하는 데 사용될 때 "본질적으로 구성된(consisting essentially of)"은 의도된 용도에 대한 조합에 필수적인 의미를 갖는 다른 요소를 제외하는 것을 의미한다. 예를 들어, 본원에서 정의된 요소로 본질적으로 구성된 조성물은 단리 및 정제 방법 및 인산 완충 식염수, 방부제 등과 같은 약학적으로 허용 가능한 담체로부터 미량 오염 물질을 제외하지 않는다. "구성되는(consisting of)"은 본원에 개시된 조성물을 투여하기 위한 다른 성분의 미량 요소 및 실질적인 방법 단계 이상을 제외하는 것을 의미한다. 이러한 전환 용어 각각에 의해 정의된 측면은 본 개시의 범위 내에 있다.

[0030] 아데노-관련 바이러스는 비-외피(non-enveloped), 20면체 캡시드 내에 4.7kb 단일 가닥 DNA 게놈으로 구성된 비병원성 파보바이러스이다. 게놈은 복제 및 패키징 신호의 바이러스 기원으로 기능하는 ITR(inverted terminal repeat)(역 말단 반복부)이 측면에 있는 3개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame)(ORF)을 함유한다. rep ORF는 바이러스 복제, 전사 조절, 부위 특이적 통합 및 비리온 조립에서 역할을 하는 4개의 비구조 단백질을 인코딩한다. cap ORF는 60-mer 바이러스 캡시드를 형성하기 위해 조립되는 3개의 구조 단백질(VP1-3)을 인코딩한다. 마지막으로, cap 유전자 내에서 대체 리딩 프레임으로 존재하는 ORF는 AAV 캡시드 단백질을 핵소체에 국한시키고 캡시드 조립 과정에서 기능하는 바이러스 단백질인 어셈블리 활성화 단백질(assembly-activating protein)(AAP)을 생성한다.

[0031] 자연적으로 발생하는("야생형(wild-type)") 혈청형이 여러 개 있으며 AAV의 알려진 변이체는 100개가 넘으며, 각각은 아미노산 서열이 다르며, 특히 캡시드 단백질의 고가변 영역 내에서 다르고, 따라서 그들의 유전자 전달 특성도 다르다. AAV는 인간 질병과 관련이 없으므로 재조합 AAV는 임상 적용에 매력적이다.

[0032] 본원에 개시 내용의 목적을 위해, 용어 "AAV"는 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus)의 약어로, 제한 없이 바이러스 자체 및 이의 파생물을 포함한다. 달리 표시되지 않는 한, 이 용어는 모든 하위 유형 또는 혈청형과 복제-가능(replication-competent) 및 재조합 형태를 모두 나타낸다. 용어 "AAV"는 제한 없이 AAV 유형 1(AAV-1 또는 AAV1), AAV 유형 2(AAV-2 또는 AAV2), AAV 유형 3A(AAV-3A 또는 AAV3A), AAV 유형 3B(AAV-3B 또는 AAV3B), AAV 유형 4(AAV-4 또는 AAV4), AAV 유형 5(AAV-5 또는 AAV5), AAV 유형 6(AAV-6 또는 AAV6), AAV 유형 7(AAV-7 또는 AAV7), AAV 유형 8(AAV-8 또는 AAV8), AAV 유형 9(AAV-9 또는 AAV9), AAV 유형 10(AAV-10 또는 AAV10 또는 AAVrh10), 조류(avian) AAV, 소(bovine) AAV, 개(canine) AAV, 염소(caprine) AAV, 말(equine) AAV, 영장류(primate) AAV, 비영장류(non-primate) AAV 및 양(ovine) AAV가 포함한다. "영장류 AAV"는 영장류를 감염시키는 AAV를 의미하고, "비영장류 AAV"는 비영장류 포유류를 감염시키는 AAV를 의미하며, "소 AAV"는 소 포유류 등을 감염시키는 AAV를 의미한다.

[0033] AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열뿐만 아니라 천연 말단 반복부(native terminal repeat)(TR), Rep 단백질 및 캡시드 서브유닛의 서열은 당업계에 공지되어 있다. 이러한 서열은 문헌이나 GenBank와 같은 공공 데이터베이스에서 찾을 수 있다. 예를 들어, GenBank 수탁번호 NC_002077.1 (AAV1), AF063497.1 (AAV1), NC_001401.2 (AAV2), AF043303.1 (AAV2), J01901.1 (AAV2), U48704.1 (AAV3A), NC_001729.1 (AAV3A), AF028705.1 (AAV3B),

NC_001829.1 (AAV4), U89790.1 (AAV4), NC_006152.1 (AAV5), AF085716.1 (AAV-5), AF028704.1 (AAV6), NC_006260.1 (AAV7), AF513851.1 (AAV7), AF513852.1 (AAV8) NC_006261.1 (AAV-8), AY530579.1 (AAV9), AAT46337 (AAV10) 및 AA088208 (AAVrh10)를 참조; 그 개시 내용은 AAV 핵산 및 아미노산 서열을 교시하기 위해 본원에 참고로 포함된다. 예를 들어 Srivistava et al. (1983) J. Virology 45:555; Chiorini et al. (1998) J. Virology 71:6823; Chiorini et al. (1999) J. Virology 73: 1309; Bantel-Schaal et al. (1999) J. Virology 73:939; Xiao et al. (1999) J. Virology 73:3994; Muramatsu et al. (1996) Virology 221:208; Shade et. al. (1986) J. Virol. 58;921; Gao et al. (2002) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 99: 11854; Moris et al. (2004) Virology 33:375-383; international patent publications WO 00/28061, WO 99/61601, WO 98/11244; 및 U.S. Pat. No. 6,156,303을 참조.

[0034] AAV 혈청형과 관련된 자연적으로 존재하는 cap(캡시드) 단백질의 서열은 당해 기술 분야에 알려져 있으며, 본원에 AAV1 (서열 식별 번호: 1), AAV2 (서열 식별 번호: 2), AAV3A (서열 식별 번호: 3), AAV3B (서열 식별 번호: 4), AAV4 (서열 식별 번호: 5), AAV5 (서열 식별 번호: 6), AAV6 (서열 식별 번호: 7), AAV7 (서열 식별 번호: 8), AAV8 (서열 식별 번호: 9), AAV9 (서열 식별 번호: 10) 및 AAV10 (서열 식별 번호: 11)로 개시된 것들을 포함한다. 용어 "변이체 AAV 캡시드 단백질" 또는 "AAV 변이체"는 예를 들어, 본원에 서열 식별 번호: 1-11에 표시된 것과 같은 자연적으로 존재하는 또는 "야생형" AAV 캡시드 단백질 서열과 비교해 적어도 하나의 변형 또는 치환(삭제, 삽입, 점 돌연변이 등 포함)을 포함하는 아미노산 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질을 지칭한다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 야생형 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 약 80% 이상의 동일성을 가질 수 있으며, 예를 들어, 야생형 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 85% 이상의 동일성, 90% 이상의 동일성 또는 95% 이상의 동일성을 가질 수 있으며, 예를 들어, 야생형 캡시드 단백질과 98% 또는 99%의 동일성을 가질 수 있다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 야생형 캡시드 단백질이 아닐 수 있다.

[0035] 본원에 개시 내용의 목적을 위해 "AAV 비리온(virion)" 또는 "AAV 비리온 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질과 캡시드화된(encapsidated) AAV 폴리뉴클레오타이드로 구성된 바이러스 입자를 지칭한다.

[0036] 본원에 개시 내용의 목적을 위해, 용어 "rAAV"는 재조합 아데노-관련 바이러스(recombinant adeno-associated virus)를 지칭하는 약어이다. 폴리뉴클레오타이드에 적용되는 "재조합"은 폴리뉴클레오타이드가 클로닝, 제한 또는 연결(ligation) 단계의 다양한 조합과 자연에서 발견되는 폴리뉴클레오타이드와 다른 구조를 생성하는 기타 절차의 산물이라는 것을 의미한다. 재조합 바이러스는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자이다. 이 용어에는 각각 원래 폴리뉴클레오타이드 구조의 복제본과 원래 바이러스 구조의 자손이 포함된다.

[0037] 용어 "rAAV 벡터"는 rAAV 비리온(rAAV 비리온 입자)(예를 들어, 감염성 rAAV 비리온)을 포함하며, 이는 정의에 따라 rAAV 폴리뉴클레오타이드를 포함하고; 또한 rAAV를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드(예를 들어, rAAV를 인코딩하는 단일 가닥 폴리뉴클레오타이드(single stranded polynucleotide encoding rAAV)(ss-rAAV); rAAV를 인코딩하는 이중 가닥 폴리뉴클레오타이드(double stranded polynucleotide encoding rAAV)(ds-rAAV), 예를 들어, rAAV를 인코딩하는 플라스미드 등)도 포함한다.

[0038] AAV 비리온이 이종성 폴리뉴클레오타이드(즉, 야생형 AAV 게놈이 아닌 폴리뉴클레오타이드, 예를 들어 표적 세포에 전달되는 이식유전자, 표적 세포에 전달되는 RNAi 작용제 또는 CRISPR 작용제 등)를 포함하는 경우, 이는 일반적으로 "재조합 AAV(rAAV) 비리온" 또는 "rAAV 비리온 입자"라고 한다. 일반적으로 이종성 폴리뉴클레오타이드는 적어도 하나, 일반적으로 두 개의 AAV 역 말단 반복부 서열(ITRs)에 의해 플랭킹(flank)된다.

[0039] 용어 "패키징(packaging)"은 AAV 입자의 조립 및 캡시드화를 초래하는 일련의 세포 내 사건을 지칭한다. AAV "rep" 및 "cap" 유전자는 아데노-관련 바이러스의 복제 및 캡시드화 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. AAV rep 및 cap은 본원에서 AAV "패키징 유전자"로 지칭된다.

[0040] 용어 AAV에 대한 "헬퍼(helper) 바이러스"는 AAV(예를 들어, 야생형 AAV)가 포유류 세포에 의해 복제되고 패키징될 수 있도록 하는 바이러스를 지칭한다. 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 및 백시니아와 같은 폭스바이러스를 포함하여 다양한 AAV에 대한 헬퍼 바이러스가 해당 기술 분야에 알려져 있다. 아데노바이러스는 하위 그룹 C의 아데노바이러스 유형 5가 가장 일반적으로 사용되지만 다양한 서브그룹을 포함한다. 인간, 비-인간 포유류 및 조류 기원의 수많은 아데노바이러스가 알려져 있으며 ATCC와 같은 수탁소에서 구할 수 있다. 헤르페스 계열(family)의 바이러스에는, 예를 들어 단순 헤르페스 바이러스(herpes simplex virus)(HSV) 및 엡스타인-바 바이러스(Epstein-Barr viruse)(EBV)뿐만아니라 거대세포바이러스(cytomegaloviruse)(CMV) 및 의사광견병 바이러스(pseudorabies viruse)(PRV)가 포함되며; 이는 또한 ATCC와 같은 수탁소에서 구할 수 있다.

[0041] 용어 "헬퍼 바이러스 기능(들)"은 AAV 복제 및 패키징(본원에 기술된 복제 및 패키징에 대한 다른 요건과 함께)을 허용하는 헬퍼 바이러스 게놈에 인코딩된 기능(들)을 지칭한다. 본원에 기술된 바와 같이, "헬퍼 바이러스 기능"은 헬퍼 바이러스를 제공하거나, 예를 들어, 필수 기능(들)을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 트랜스로(in trans) 생산자 세포에 제공하는 것을 포함하는 다양한 방식으로 제공될 수 있다. 예를 들어, 하나 이상의 아데노바이러스 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 플라스미드 또는 다른 발현 벡터는 rAAV 벡터와 함께 생산자 세포로 형질감염된다.

[0042] 용어 "감염성" 바이러스 또는 바이러스 입자는 반응력 있게(competently) 조립된 바이러스 캡시드를 포함하고 바이러스 종이 향성(tropic)인 세포 내로 폴리뉴클레오타이드 성분을 전달할 수 있는 것이다. 이 용어가 반드시 바이러스의 복제 능력을 의미하는 것은 아니다. 감염성 바이러스 입자를 계수하기 위한 분석은 본 개시 내용 및 당업계의 다른 곳에서 설명된다. 바이러스 감염성은 전체 바이러스 입자에 대한 감염성 바이러스 입자의 비율로 표현될 수 있다. 총 바이러스 입자에 대한 감염성 바이러스 입자의 비율을 결정하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, Grainger et al, (2005) Mol, Ther. 11: S337 (describing a TCID50 infectious titer assay); and Zolotukhin et al. (1999) Gene Ther. 6:973. 또한 실시예를 참조.

[0043] 본원에 사용된 용어 "향성(tropism)"은 바이러스(예를 들어, AAV)에 의한 특정 숙주 종의 세포 또는 숙주 종 내의 특정 세포 유형의 우선적 표적화를 지칭한다. 예를 들어, 심장, 폐, 간 및 근육의 세포를 감염시킬 수 있는 바이러스는 폐 및 근육 세포만 감염시킬 수 있는 바이러스에 비해 더 넓은(즉, 증가된) 향성을 갖는다. 향성은 또한 숙주의 특정 유형의 세포 표면 분자에 대한 바이러스의 의존성을 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 바이러스는 표면 글리코사미노글리칸(glycosaminoglycan)으로 세포만 감염시킬 수 있는 반면, 다른 바이러스는 시알산(sialic acid)으로 세포만 감염시킬 수 있다(이러한 의존성은 바이러스 감염에 대한 잠재적 숙주 세포로서 특정 부류의 분자가 결여된 다양한 세포주를 사용하여 테스트할 수 있음). 어떤 경우에는 바이러스의 향성이 바이러스의 상대적 선호도를 나타낸다. 예를 들어, 첫 번째 바이러스는 모든 세포 유형을 감염시킬 수 있지만 표면 글리코사미노글리칸으로 이러한 세포를 감염시키는 데 훨씬 더 성공적이다. 두 번째 바이러스가 동일한 특성을 선호하는 경우도(예를 들어, 두 번째 바이러스도 표면 글리코사미노글리칸으로 해당 세포를 감염시키는 데 또한 더 성공적임), 절대 형질도입 효율은 비슷하지 않을지라도, 두 번째 바이러스는 첫 번째 바이러스와 유사한(또는 동일한) 향성을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 예를 들어, 두 번째 바이러스는 테스트된 모든 주어진 세포 유형을 감염시키는 데 첫 번째 바이러스보다 더 효율적일 수 있지만 상대적 선호도가 유사(또는 동일)하면 두 번째 바이러스는 여전히 첫 번째 바이러스와 유사한(또는 동일한) 향성을 갖는 것으로 간주될 수 있다. 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 비리온의 향성은 자연 발생 비리온에 비해 변경되지 않는다. 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 비리온의 향성은 자연 발생 비리온에 비해 확장(즉, 확대)된다. 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 비리온의 향성은 자연 발생 비리온에 비해 감소된다.

[0044] 용어 "복제-가능(competent)" 바이러스(예를 들어, 복제-가능 AAV)는 감염성이고 또한 감염된 세포에서 복제될 수 있는 표현형적으로(phenotypically) 야생형 바이러스(즉, 헬퍼 바이러스 또는 헬퍼 바이러스 기능의 존재하)를 지칭한다. AAV의 경우 복제 능력은 일반적으로 기능적 AAV 패키징 유전자의 존재를 필요로 한다. 일반적으로, 본원에 기술된 rAAV 벡터는 하나 이상의 AAV 패키징 유전자의 결여로 인해 포유류 세포(특히 인간 세포에서)에서 복제-불능이다. 전형적으로, 이러한 rAAV 벡터는 AAV 패키징 유전자와 유입되는 rAAV 벡터 간의 재조합에 의해 복제 가능 AAV가 생성될 가능성을 최소화하기 위해 임의의 AAV 패키징 유전자 서열이 결여되어 있다. 많은 실시 양태에서, 본원에 기술된 rAAV 벡터 제제(preparation)는 복제 가능 AAV(replication competent AAV)(rcAAV, 또한 RCA로도 지칭됨)를 거의 또는 전혀 함유하지 않는 제제이다(예를 들어, 10^2 rAAV 입자당 약 1 rcAAV 미만, 10^4 rAAV입자당 약 1 rcAAV 미만, 10 rAAV 입자당 약 1 rcAAV 미만, 10^{12} rAAV 입자당 약 1 rcAAV 미만, 또는 rcAAV 없음).

[0045] 용어 "폴리뉴클레오타이드"는 데옥시리보뉴클레오타이드(deoxyribonucleotide) 또는 리보뉴클레오타이드(ribonucleotide), 또는 이의 유사체(analog)를 포함하는 임의의 길이의 뉴클레오타이드의 중합체 형태를 지칭한다. 폴리뉴클레오타이드는 메틸화된 뉴클레오타이드 및 뉴클레오타이드 유사체와 같은 변형된 뉴클레오타이드를 포함할 수 있고, 비뉴클레오타이드 성분에 의해 중단될 수 있다. 존재하는 경우, 뉴클레오타이드 구조에 대한 변형은 중합체의 조립 전 또는 후에 부여될 수 있다. 본원에 사용된 용어 폴리뉴클레오타이드는 이중 가닥 및 단일 가닥 분자를 상호교환적으로 지칭한다. 달리 명시되거나 요구되지 않는 한, 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 본원의 임의의 실시 양태는 이중 가닥 형태 및 이중 가닥 형태를 구성하는 것으로 공지되거나 예측되는 2

개의 상보적 단일 가닥 형태 각각을 포함한다.

[0046] 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 다른 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드에 대해 특정 백분율 "서열 동일성"을 가지며, 이는 정렬될 때 두 서열을 비교할 때 염기 또는 아미노산의 백분율이 동일함을 의미한다. 서열 유사성은 다양한 방식으로 결정될 수 있다. 서열 동일성을 결정하기 위해, 월드 와이드 웹(ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)에서 이용 가능한 BLAST를 포함하는 컴퓨터 프로그램 및 방법을 사용하여 서열을 정렬할 수 있다. 또 다른 정렬 알고리즘은 Oxford Molecular Group, Inc.의 전액 출자 자회사인 Madison, Wis., USA의 Genetics Computing Group(GCG) 패키지로 이용 가능한 PASTA이다. 정렬을 위한 다른 기술은 Methods in Enzymology, vol. 266: Computer Methods for Macromolecular Sequence Analysis (1996), ed. Doolittle, Academic Press, Inc., a division of Harcourt Brace & Co., San Diego, Calif., USA에 기술되어 있다. 특히 흥미로운 것은 서열의 간격을 허용하는 정렬 프로그램이다. Smith-Waterman은 서열 정렬의 간격을 허용하는 알고리즘 유형 중 하나이다. Meth. Mol. Biol. 70: 173-187 (1997)를 참조. 또한 Needleman 및 Wunsch 정렬 방법을 사용하는 GAP 프로그램을 사용하여 서열을 정렬할 수 있다. J. Mol. Biol. 48: 443-453 (1970)을 참조.

[0047] 용어 "유전자"는 세포에서 몇 종류의 기능을 수행하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 예를 들어, 유전자는 유전자 산물을 인코딩할 수 있는 오픈 리딩 프레임을 포함할 수 있다. 유전자 산물의 한 예는 단백질이며, 이는 유전자로부터 전사되고 번역된다. 유전자 산물의 또 다른 예는 RNA, 예를 들어, 기능성 RNA 산물, 예를 들어, 앱타머(aptamer), 간섭 RNA, 리보솜 RNA(rRNA), 전달 RNA(tRNA), 비코딩 RNA(non-coding RNA)(ncRNA), 뉴클레아제를 위한 가이드 RNA 등이며, 이는 전사되지만 번역되지 않는다.

[0048] 용어 "유전자 발현 산물" 또는 "유전자 산물"은 상기 정의된 바와 같은 특정 유전자의 발현으로부터 생성된 분자이다. 유전자 발현 산물은, 예를 들어 폴리펩타이드, 앱타머, 간섭 RNA, 메신저 RNA(mRNA), rRNA, tRNA, 비코딩 RNA(ncRNA) 등을 포함한다.

[0049] 용어 "siRNA 작용제"("작은 간섭" 또는 "짧은 간섭 RNA"(또는 siRNA))는 관심 유전자("표적 유전자")를 표적으로 하는 뉴클레오타이드의 RNA 이중체(duplex)이다. "RNA 이중체"는 RNA 분자의 두 영역 사이의 상보적 쌍(pairing)으로 불리는 구조를 지칭하며, 이중 가닥 RNA(dsRNA)의 영역을 형성한다. siRNA는 siRNA의 이중체 부분의 뉴클레오타이드 서열이 표적화된 유전자의 뉴클레오타이드 서열에 상보적이라는 점에서 유전자에 "표적화"된다. 일부 실시 양태에서, siRNA의 이중체의 길이는 30개 뉴클레오타이드 미만이다. 일부 실시 양태에서, 이중체는 길이가 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 뉴클레오타이드일 수 있다. 일부 실시 양태에서, 이중체의 길이는 19-25개 뉴클레오타이드 길이이다. 일부 실시 양태에서, 'siRNA-매개 유전자 표적화'은 DNA-유도 RNA 간섭(DNA-directed RNA interference)(ddRNAI)을 사용하여 달성되는데, 이는 동물 세포의 내인성 RNA 간섭(RNAi) 경로를 활성화하기 위해 DNA 구조를 활용하는 유전자 침묵(gene-silencing) 기술이다. 이러한 DNA 구조는 자가 상보적 이중 가닥 RNA, 일반적으로 짧은 헤어핀 RNA(short-hairpin RNA)(shRNA)를 발현하도록 설계되어, 일단 처리되면 표적 유전자 또는 유전자들의 침묵을 초래한다. 내인성 mRNA 또는 바이러스 RNA를 포함한 모든 RNA는 원하는 mRNA 표적에 상보적인 이중 가닥 RNA를 발현하도록 구조를 설계하여 침묵시킬 수 있다. 따라서 siRNA 작용제의 RNA 이중체 부분은 shRNA라고 하는 짧은 헤어핀 구조의 일부가 될 수 있다. 이중체 부분 외에도 헤어핀 구조는 이중체를 형성하는 두 서열 사이에 위치한 루프 부분을 함유할 수 있다. 루프의 길이는 다를 수 있다. 일부 실시 양태에서 루프는 길이가 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 또는 13개 뉴클레오타이드이다. 헤어핀 구조는 또한 3' 또는 5' 돌출부(overhang) 부분을 함유할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 돌출부는 길이가 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개 뉴클레오타이드의 3' 또는 5' 돌출부이다. 일반적으로 표적 유전자의 발현 산물(예를 들어, mRNA, 폴리펩타이드 등)의 수준은 5' 비번역(untranslated)(UT) 영역, ORF, 또는 3' UT 영역을 포함하는 표적 유전자 전사체의 적어도 19-25개 뉴클레오타이드 길이 분절(예를 들어, 2021개 뉴클레오타이드 서열)에 상보적인 특정 이중 가닥 뉴클레오타이드 서열을 함유하는 siRNA 작용제(예를 들어, siRNA, shRNA 등)에 의해 감소된다. 일부 실시 양태에서, 짧은 간섭 RNA는 길이가 약 19-25nt이다. 예를 들어, siRNA 기술에 대한 설명은 PCT applications WO0144895, WO99/32619, WO01/75164, WO01/92513, WO01/29058, WO01/89304, WO02/16620 및 WO02/29858; 및 U.S. Patent Publication No. 20040023390을 참조. siRNA 및/또는 shRNA는 핵산 서열에 의해 인코딩될 수 있고, 핵산 서열은 또한 프로모터를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 폴리아데닐화 신호는 합성 최소 폴리아데닐화 신호이다.

[0050] 용어 "안티센스(antisense) RNA"는 유전자 발현 산물에 상보적인 RNA이다. 예를 들어, 특정 mRNA를 표적으로 하는 안티센스 RNA는 mRNA에 상보적인 RNA 기반 작용제(또는 변형된 RNA일 수 있음)이며, 여기서 mRNA에 대한 안티센스 RNA의 혼성화(hybridization)는 mRNA의 발현을 변경한다(예를 들어, RNA의 안정성 변경, RNA 번역 변경

등). "안티센스 RNA"에는 또한 안티센스 RNA를 인코딩하는 핵산이 포함된다.

[0051] "CRISPR/Cas9 작용제"와 관련하여, 용어 "CRISPR"은 침입하는 핵산의 침묵을 가이드하기 위해 CRISPR RNA(crRNA)를 사용하여 박테리아와 고세균에 바이러스와 플라스미드에 대한 적응 면역을 제공하도록 진화한 클러스터링된 규칙적으로 간격을 둔 짧은 팔린드롬 반복(Clustered regular interspaced short palindromic repeats)/CRISPR 관련(Cas) 시스템을 포함한다. Cas9 단백질(또는 이의 기능적 등가물 및/또는 변이체, 즉 Cas9-유사 단백질)은 단백질과 crRNA 및 tracrRNA(가이드 RNA라고도 함)라는 2개의 자연적으로 발생하거나 합성된 RNA 분자와의 결합에 따라 달라지는 DNA 엔도뉴클레아제 활동을 자연적으로 포함한다. 어떤 경우에는 두 분자가 공유 결합되어 단일 분자(단일 가이드 RNA(single guide RNA)("sgRNA")라고도 함)를 형성한다. 따라서 Cas9 또는 Cas9-유사 단백질은 DNA-표적화 RNA(이 용어는 두 분자 가이드 RNA 구성과 단일 분자 가이드 RNA 구성을 모두를 포함)와 결합하고, 이는 Cas9 또는 Cas9 유사-단백질을 활성화하고 단백질을 표적 핵산 서열로 가이드한다.

[0052] Cas9 또는 Cas9-유사 단백질이 천연 효소 기능을 유지하는 경우, 표적 DNA를 절단하여 이중 가닥 파손을 생성하여 게놈 변경(즉, 편집: 삭제, 삽입(기증자 폴리뉴클레오타이드가 존재하는 경우), 대체 등)을 야기시키고, 이에 의해 유전자 발현을 변경한다. Cas9의 일부 변이체(변이체는 Cas9-유사라는 용어에 포함)가 변경되어 DNA 절단 활성이 감소한다(어떤 경우에는 표적 DNA의 두 가닥 대신 단일 가닥을 절단하지만 다른 경우에는 경우에, 그들은 DNA 절단 활성이 전혀 없는 것으로 심각하게 감소되었다). DNA-절단 활성이 감소된 Cas9-유사 단백질(DNA 절단-활성이 없더라도)은 여전히 RNA 중합효소 활성을 차단하기 위해 표적 DNA로 가이드될 수 있다. 그 대신에, Cas9 또는 Cas9-유사 단백질은 VP64 전사 활성화 도메인을 Cas9 단백질에 융합시키고 융합 단백질을 MS2-P65-HSF1 헬퍼 단백질과 테트라루프 및 스템루프에서 MS2 RNA 앱타머를 포함하는 단일 가이드 RNA와 공동 전달하여 전사를 활성화하는 세포 내 시너지적 활성화 매개체(Synergistic Activation Mediator)(Cas9-SAM) 복합체를 형성함으로써 변형될 수 있다. 따라서 효소적으로 불활성인 Cas9-유사 단백질은 표적 DNA의 전사를 차단하거나 활성화하기 위해 DNA- 표적화 RNA에 의해 표적 DNA의 특정 위치로 표적화될 수 있다. 본원에서 사용되는 용어 "CRISPR′ Cas9 작용제"는 상기에 기술된 바와 같이 또는 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 CRISPR/Cas9의 모든 형태를 포함한다.

[0053] CRISPR 작용제에 대한 자세한 정보는 예를 들어, (a) Jinek et. al., Science. 2012 Aug. 17; 337(6096):816-21: "A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity"; (b) Qi et al., Cell. 2013 Feb. 28; 152(5): 1173-83: "Repurposing CRISPR. as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression" 및 (c) U.S. patent application Ser. No. 13/842,859 및 PCT application number PCT/US13/32589에서 찾을 수 있으며; 이들 모두는 그 전체가 참고로 본원에 포함된다. 따라서, 본원에 사용된 용어 "CRISPR 작용제"는 Cas9-기반 시스템에서 사용될 수 있는, 자연 발생 및/또는 합성 서열을 포함하는 임의의 작용제(또는 이러한 작용제를 인코딩하는 핵산)(예를 들어, Cas9 또는 Cas9-유사 단백질; DNA-표적화 RNA의 임의의 성분, 예를 들어 crRNA-유사 RNA, tracrRNA-유사 RNA, 단일 가이드 RNA 등; 기증자 폴리뉴클레오타이드 등)를 포함한다.

[0054] "징크 핑거 뉴클레아제(Zinc-finger nucleases)"(ZFN)로서, 징크 핑거 뉴클레아제(ZFN)는 징크 핑거 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합시켜 생성된 인공 DNA 엔도뉴클레아제를 의미한다. ZFN은 원하는 DNA 서열을 표적으로 하도록 조작될 수 있으며 이것은 징크-핑거 뉴클레아제가 고유한 표적 서열을 절단할 수 있게 한다. 세포 내로 도입될 때, ZFN은 이중 가닥 파손을 유도함으로써 세포의 표적 DNA(예를 들어, 세포의 게놈)를 편집하는 데 사용될 수 있다. ZFN의 사용에 대한 추가 정보는 예를 들어, Asuri et al., Mol Ther. 2012 February; 20(2):329-38; Bibikova et al. Science. 2003 May 2;300(5620):764; Wood et al. Science. 2011 Jul. 15; 333(6040):307; Ochiai et al. Genes Cells. 2010 August; 15(8):875-85; Takasu et. al., Insect Biochem Mol 2010 October; 40(10):759-65; Ekker et al, Zebrafish 2008 Summer;5(2): 121-3; Young et al, Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Apr. 26; 108(17):7052-7; Goldberg et al, Cell. 2010 Mar. 5; 140(5):678-91; Geurts et al, Science. 2009 Jul. 24; 325(5939):433; Flisikowska et al, PLoS One. 2011;6(6):e21045. doi: 10.1371/journal.pone.0021045. Epub 2011 Jun. 13; Flauschild et al, Proc Nati Acad Sci U S A. 2011 Jul. 19; 108(29): 12013-7; 및 Yu et al, Cell Res. 2011 November; 21(11): 1638-40를 참조; 이들 모두는 ZFN과 관련된 그들의 교시를 위해 참조로 본원에 포함된다. 용어 "ZFN 작용제"는 징크 핑거 뉴클레아제 및/또는 징크 핑거 뉴클레아제를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0055] 용어 "전사 활성제-유사 이펙터 뉴클레아제(Transcription activator-like effector nuclease)" 또는 "TALEN" 작용제는 TAL(전사 활성제-유사) 이펙터 DNA 결합 도메인을 DNA 절단 도메인에 융합하여 생성된 인공 DNA 엔도

뉴클레아제인 전사 활성제-유사 이펙터 뉴클레아제(TALEN)를 지칭한다. TALENS는 실질적으로 임의의 원하는 DNA 서열에 결합하도록 신속하게 조작될 수 있으며, 세포에 도입될 때 TALEN은 이중 가닥 파손을 유도하여 세포(예를 들어, 세포의 게놈)에서 표적 DNA를 편집하는 데 사용할 수 있다. TALEN 사용에 대한 추가 정보는 예를 들어, Hockemeyer et al. Nat Biotechnol. 2011 Jul. 7; 29(8):731-4; Wood et al. Science. 2011 Jul. 15; 333(6040):307; Tesson et al. Nat Biotechnol, 2011 Aug. 5; 29(8):695-6; 및 Huang et. al., Nat Biotechnol. 2011 Aug. 5;29(8):699-700를 참조; 이들 모두는 TALEN과 관련된 그들의 교시를 위해 참고로 본원에 포함된다. 용어 "TALEN 작용제"는 TALEN 및/또는 TALEN을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 폴리뉴클레오타이드를 포함한다.

[0056] 용어 "제어 요소" 또는 "제어 서열"은 폴리뉴클레오타이드의 복제, 중복, 전사, 스플라이싱(splicing), 번역 또는 분해를 포함하는 폴리뉴클레오타이드의 기능적 조절에 기여하는 분자의 상호작용에 관여하는 뉴클레오타이드 서열이다. 조절은 과정의 빈도, 속도 또는 특이성에 영향을 미칠 수 있으며, 본질적으로 향상되거나 억제될 수 있다. 당업계에 공지된 제어 요소는 예를 들어, 프로모터 및 인핸서와 같은 전사 조절 서열을 포함한다. 프로모터는 특정 조건 하에서 RNA 폴리머라제에 결합하고 일반적으로 프로모터의 하류(downstream)(3' 방향)에 위치한 코딩 영역의 전사를 개시할 수 있는 DNA 영역이다. 프로모터는 편재적으로 작용할 수 있다. 즉, 많은 세포 유형에서 활성일 수 있다(예를 들어, CAG 또는 CMV 프로모터); 또는 조직 또는 세포 특이적일 수 있다.

[0057] 용어 "작동적으로(operatively) 연결된" 또는 "작동 가능하게(operably) 연결된"은 유전 요소의 병치(juxtaposition)를 지칭하며, 여기서 요소는 예상된 방식으로 작동하도록 허용하는 관계에 있다. 예를 들어, 프로모터가 코딩 서열의 전사 개시를 돕는 경우 프로모터는 코딩 영역에 작동 가능하게 연결된다. 이 기능적 관계가 유지되는 한 프로모터와 코딩 영역 사이에 개재 잔기(intervening residue)가 있을 수 있다.

[0058] 용어 "발현 벡터"는 관심 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레타이드 영역을 포함하는 벡터를 포함하며, 의도된 표적 세포에서 단백질의 발현을 수행하는 데 사용된다. 발현 벡터는 또한 표적에서 단백질의 발현을 용이하게 하기 위해 인코딩 영역에 작동 가능하게 연결된 제어 요소를 포함한다. 제어 요소와 유전자 또는 발현을 위해 작동 가능하게 연결된 유전자들의 조합은 종종 "발현 카세트"라고 하며, 이들 중 다수는 당업계에 알려져 있고 이용 가능하거나 당업계에서 이용 가능한 구성요소로부터 쉽게 구성될 수 있다.

[0059] 용어 "이종성"은 비교되는 개체의 나머지 부분과 유전형으로 구별되는 개체에서 유래됨을 의미한다. 예를 들어, 유전 공학 기술에 의해 다른 종에서 유래된 플라스미드 또는 벡터에 도입된 폴리뉴클레오타이드는 이종성 폴리뉴클레오타이드이다. 천연 코딩 서열로부터 제거되고 자연적으로 발견되지 않은 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터는 이종성 프로모터이다. 따라서 예를 들어, 이종성 유전자 산물을 인코딩하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV는 자연 발생 야생형 AAV에 정상적으로 포함되지 않는 핵산을 포함하는 rAAV이고, 인코딩된 이종성 유전자 산물은 자연 발생 야생형 AAV에 의해 정상적으로 인코딩되지 않는 유전자 산물이다.

[0060] 용어 "유전적 변경" 및 "유전적 변형"(및 이의 문법적(grammatical) 변이체)은 유전 요소(예를 들어, 폴리뉴클레오타이드)가 유사 분열 또는 감수 분열에 의한 것이 아닌 세포 내로 도입되는 과정을 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 요소는 세포에 대해 이종성일 수 있거나, 세포에 이미 존재하는 요소의 추가 카피 또는 개선된 버전일 수 있다. 유전적 변경은 예를 들어, 전기천공, 인산칼슘 침전 또는 폴리뉴클레오타이드-리포솜 복합체와의 접촉과 같은 당업계에 공지된 임의의 과정을 통해 재조합 플라스미드 또는 기타 폴리뉴클레오타이드로 세포를 형질감염시킴으로써 수행될 수 있다. 유전적 변경은 또한 예를 들어, DNA 또는 RNA 바이러스 또는 바이러스 벡터를 사용한 형질도입 또는 감염에 의해 수행될 수 있다. 일반적으로 유전 요소는 세포의 염색체 또는 미니-염색체에 도입된다. 그러나 세포 및 그 자손의 표현형 및/또는 유전자형을 변경하는 모든 변경은 이 용어에 포함된다.

[0061] 세포 변형과 관련하여, 외인성 DNA(예를 들어, 재조합 바이러스를 통해)에 의해 "유전자적으로 변형(genetically modified)" 또는 "형질전환" 또는 "형질감염" 또는 "형질도입"이라는 용어는 이러한 DNA가 세포 내부로 도입된 경우를 지칭한다. 외인성 DNA의 존재는 영구적이거나 일시적인 유전적 변화를 초래한다. 형질전환 DNA는 세포의 게놈에 통합(공유 결합)될 수도 있고 그렇지 않을 수도 있다. "클론"은 단일 세포 또는 공통 조상에서 유사 분열을 통해 유래된 세포 개체군이다. "세포주"는 여러 세대에 걸쳐 시험관 내에서 안정적으로 성장할 수 있는 일차(primary) 세포의 클론이다.

[0062] 본원에 사용된 세포는 유전자 서열이 시험관 내에서 세포를 장기간 배양하는 동안 및/또는 생체 내에서 장기간 동안 기능을 수행하는 데 사용 가능한 경우 유전자 서열로 "안정적으로" 변경, 형질도입, 유전자적으로 변형 또는 형질전환되었다고 한다. 일반적으로 이러한 세포는 변경된 세포의 자손에게도 유전될 수 있는 유전자 변경이

도입된다는 점에서 "유전적으로" 변경(유전자적으로 변경)된다.

[0063] 용어 "폴리펩타이드", "펩타이드" 및 "단백질"은 임의의 길이의 아미노산의 중합체를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 용어는 또한 변형된 아미노산 중합체; 예를 들어, 이황화 결합 형성, 글리코실화, 지질화, 인산화 또는 표지(labeling) 성분과의 접합을 포함한다. 유전자 산물을 포유류 대상체에게 전달하는 맥락에서 논의될 때, 항-혈관신생 폴리펩타이드, 신경보호 폴리펩타이드 등과 같은 폴리펩타이드 및 이를 위한 조성물은, 각각의 온전한 폴리펩타이드, 또는 이의 임의의 단편 또는 유전적으로 조작된 유도체를 지칭하고, 이는 온전한 단백질의 원하는 생화학적 기능을 유지한다. 유사하게, 항-혈관신생 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산, 신경보호 폴리펩타이드를 인코딩하는 핵산, 및 포유류 대상체에게 유전자 산물을 전달하는 데 사용하기 위한 기타 그러한 핵산에 대한 언급(이는 수용자 세포로 전달되는 "이식유전자"로 지칭될 수 있음)은 온전한 폴리펩타이드를 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 또는 원하는 생화학적 기능을 갖는 임의의 단편 또는 유전적으로 조작된 유도체를 포함한다.

[0064] 본원에 사용된 "단리된(isolated)" 플라스미드, 핵산, 벡터, 바이러스, 비리온, 숙주 세포, 단백질 또는 기타 물질은 이 물질 또는 이와 유사한 물질이 자연적으로 발생하거나 처음에 제조된 경우에도 존재할 수 있는 다른 성분 중 적어도 일부가 결여된 물질의 제제를 지칭한다. 따라서 예를 들어, 단리된 물질은 정제 기술을 사용하여 소스 혼합물에서 농축하여 제조할 수 있다. 농축(enrichment)은 용액의 부피당 중량과 같은 절대 기준으로 측정하거나 소스 혼합물에 존재하는 두 번째 잠재적 간섭 물질과 관련하여 측정할 수 있다. 본 개시 내용의 실시예의 증가하는 농축은 점점 더 단리된다. 단리된 플라스미드, 핵산, 벡터, 바이러스, 숙주 세포, 또는 다른 물질은 일부 실시 양태에서, 예를 들어, 약 80% 내지 약 90% 순도, 적어도 약 90% 순도, 적어도 약 95% 순도, 적어도 약 98% 순도, 또는 적어도 약 99% 순도로 정제된다.

[0065] 본원에 사용된 용어 "치료", "치료하는" 등은 원하는 약리학적 및/또는 생리학적 효과를 얻는 것을 의미한다. 효과는 질병 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 점에서 예방적일 수 있고/있거나 질병 및/또는 질병에 기인하는 부작용에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료적일 수 있다. 본원에 사용된 "치료"는 포유동물, 특히 인간의 질병의 모든 치료를 포함하며, (a) 질병에 걸리기 쉽거나 질병에 걸릴 위험이 있지만 아직 질병에 걸린 것으로 진단되지 않은 대상체에서 질병(및/또는 질병으로 인한 증상)이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질병(및/또는 질병으로 인한 증상)을 억제하는 것, 즉 질병의 발달을 저지하는 것; 및 (c) 질병(및/또는 질병으로 인한 증상)의 완화, 즉 질병(및/또는 질병으로 인한 증상)의 퇴행을 유발, 즉, 질병 및/또는 질병의 하나 이상의 증상을 개선하는 것을 포함한다. 예를 들어, 주제 조성물 및 방법은 폐 질환의 치료에 관한 것일 수 있다.

[0066] 용어 "개체(individual)", "숙주", "대상체" 및 "환자"는 본원에서 상호교환가능하게 사용되며, 인간을 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유동물; 유인원을 포함한 비-인간 영장류; 포유류 스포츠 동물(예를 들어, 말); 포유류 농장 동물(예를 들어, 양, 염소 등); 포유류 동물 애완동물(개, 고양이 등); 및 설치류(예를 들어, 마우스, 쥐 등)을 지칭한다.

[0067] 일부 실시 양태에서, 개체는 이전에 AAV에 자연적으로 노출되었고 결과적으로 항-AAV 항체(즉, AAV 중화 항체)를 보유하는 인간이다. 일부 실시 양태에서, 개체는 이전에 AAV 벡터를 투여받았고(결과적으로 항-AAV 항체를 보유할 수 있음) 상이한 병태의 치료 또는 동일한 병태의 추가 치료를 위해 벡터의 재투여를 필요로 하는 인간이다. 예를 들어, 간, 근육 및 망막(이 비히클에 대한 중화 항체에 의해 영향을 받는 모든 조직)에 대한 AAV 유전자 전달과 관련된 임상 시험의 긍정적인 결과를 기반으로 하여 이러한 치료 적용/질병 표적이 많이 있다.

[0068] 본원에 사용된 용어 "유효량"은 유익하거나 원하는 임상 결과에 영향을 미치기에 충분한 양이다. 유효량은 하나 이상의 투여로 투여될 수 있다. 본 개시 내용의 목적을 위해, 화합물(예를 들어, 감염성 rAAV 비리온)의 유효량은 특정 질병 상태(예를 들어, 폐 질환)(및/또는 이와 관련된 증상)의 진행을 완화, 개선, 안정화, 역전, 예방, 지연 또는 지체시키기에 충분한 양이다. 따라서, 감염성 rAAV 비리온의 유효량은 개체의 표적 세포(또는 표적 세포들)에 이종성 핵산을 효과적으로 전달할 수 있는 감염성 rAAV 비리온의 양이다. 유효량은 예를 들어, 이종성 핵산 서열에 의해 인코딩된 유전자 산물(RNA, 단백질)을 세포 또는 조직에서 예를 들어, RT-PCR, 웨스턴 블롯, ELISA, 형광 또는 기타 리포터 판독 등과 같이 이 분야에서 잘알려진 기술을 사용하여 검출함으로써 전임상적으로 결정할 수 있다. 유효량은 예를 들어, 이 분야에서 알려진 방법을 사용하여 질병의 발병 또는 진행의 변화를 검출함으로써 임상적으로 결정할 수 있다.

[0069] 용어 "유도 진화"는 시험관 내 및/또는 생체 내에서 캡시드 엔지니어링 방법론을 지칭하며, 이는 유전적 다양화 및 선택 과정의 반복적 라운드를 통해 자연적 진화를 모방하여, 생물 분자의 기능을 점진적으로 개선하는 유익

한 돌연변이를 축적한다. 유도 진화는 종종 라이브러리에서 AAV 변이체를 선택하기 위한 "바이오패닝(biopanning)"이라고 하는 생체 내 방법을 포함하는 데, 이 변이체는 관심 세포 또는 조직 유형의 감염성 수준을 보다 효율적으로 보유한다.

[0070] 용어 "간섭 RNA"는 인공 miRNA를 포함한 소형 간섭 RNA와 microRNA(miRNA)를 모두 포함한다.

[0071] "2A 펩타이드"는 동일한 mRNA로부터 등몰 수준의 다중 유전자를 생성하는 약 20개 아미노산의 "자가 절단(self-cleaving)" 펩타이드를 지칭하며 다중 시스트론(multicistronic) 벡터에서 IRES 요소 대신 사용될 수 있다. 비제한적인 예로는 T2A, P2A, E2A 및 F2A 펩타이드 서열을 포함한다. 이종성 핵산이 다중 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 실시 양태에서, 다중(예를 들어, 2) 유전자 산물의 발현은 다중(예를 들어, 2) 독립(independent) 프로모터에 의해 매개될 수 있거나, 다중 이식유전자가 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site)(IRES) 또는 2A 펩타이드 서열에 의해 분리된 단일 프로모터에 의해 매개될 수 있다.

[0072] "증가된 내성(increased resistance)"이란 대상체 감염성 rAAV 비리온이 인간 항-AAV 항체의 존재 하에 증가된 감염성을 나타낸다는 것을 의미한다. 바이러스 감염성은 감염성 바이러스 입자 대 총 바이러스 입자의 비율로 표현될 수 있다. 따라서 증가된 감염성은 감염성 바이러스 입자 대 총 바이러스 입자의 증가된 비율을 의미한다. 인간 항-AAV 항체에 대한 AAV의 내성을 결정하기 위해, AAV의 감염성은 인간 항-AAV 항체의 다양한 농도의 존재 하에 측정되어 인간 항-AAV 항체의 부재 하에 유전자 전달 효율(즉, 감염성)을 50%로 감소시키는 데 필요한 항체 농도(예를 들어, 혈청 농도, IVIG 농도 등)(mg/mL)를 얻는다. 인간 항-AAV 항체의 부재 하에 유전자 전달 효율을 50%로 감소시키는 데 더 높은 항체 농도가 필요한 바이러스는 항체 중화에 대한 내성이 증가했다고 한다. 따라서 내성이 2배 증가한다는 것은 인간 항-AAV 항체의 부재 하에 유전자 전달 효율을 50%로 감소시키는 데 필요한 항체 농도의 2배 증가를 의미한다. 일부 실시 양태에서, 대상체 감염성 rAAV 비리온은 야생형 AAV(예를 들어, AAV2(야생형 AAV 혈청형 2)) 또는 야생형 캡시드 단백질을 포함하는 AAV가 나타내는 내성보다 인간 AAV 중화 항체에 대해 적어도 약 1.5배(예를 들어, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 12배, 적어도 약 15배, 적어도 약 17배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 150배, 적어도 약 200배, 적어도 약 250배, 적어도 약 300배 등) 더 큰 내성을 나타낸다.

[0073] 대상체 감염성 rAAV 비리온은 인간 AAV 중화 항체의 존재 하에 포유류 세포의 증가된 형질도입을 나타낸다고 할 수 있다. 일부 실시 양태에서, 대상체 감염성 rAAV 바이러스는 야생형 AAV(예를 들어, AAV2(야생형 AAV 혈청형 2)) 또는 야생형 캡시드 단백질을 포함하는 AAV가 나타내는 형질도입보다 인간 AAV 중화 항체의 존재 하에 포유류 세포에 대해 적어도 약 1.5배(예를 들어, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 12배, 적어도 약 15배, 적어도 약 17배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 150배, 적어도 약 200배, 적어도 약 250배, 적어도 약 300배 등) 더 큰 형질도입을 나타낸다.

[0074] 일부 실시 양태에서, 대상체 감염성 rAAV 비리온은 야생형 AAV 캡시드 단백질에 결합하는 중화 항체에 대한 감소된 결합을 나타낸다. 예를 들어, 대상체 감염성 rAAV 비리온은 야생형 AAV 캡시드 단백질에 결합하는 항체의 결합 친화성(binding affinity)과 비교하여 야생형 AAV 캡시드 단백질에 결합하는 중화 항체에 대해 적어도 약 1.5배(예를 들어, 적어도 약 1.5배, 적어도 약 2배, 적어도 약 3배, 적어도 약 4배, 적어도 약 5배, 적어도 약 7.5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 12배, 적어도 약 15배, 적어도 약 17배, 적어도 약 20배, 적어도 약 25배, 적어도 약 30배, 적어도 약 40배, 적어도 약 50배, 적어도 약 75배, 적어도 약 100배, 적어도 약 150배, 적어도 약 200배, 적어도 약 250배, 적어도 약 300배 등) 감소된 결합(예를 들어, 감소된 친화성)을 나타낸다.

[0075] 일부 실시 양태에서, 항-AAV 중화 항체는 약 10^{-7} M 미만, 약 5×10^{-6} M 미만, 약 10^{-6}M 미만, 약 5×10^{-5} M 미만, 약 10-5 M 미만, 약 10^{-4} M 미만 또는 그 이하의 친화성으로 대상체 감염성 rAAV 비리온에 결합한다.

[0076] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 비-외피 캡시드 내부에 함유된 4.7kb 단일 가닥 DNA 게놈을 갖는 파보바이러스 계열이다. 자연적으로 발생하는 AAV의 바이러스 게놈에는 2개의 역 말단 반복부(ITR)가 있으며-이는 복제 및 패키징 신호의 바이러스 기원으로 기능하며- 2개의 주요 오픈 리딩 프레임(ORF)인 rep(바이러스 복제, 전사 조절, 부위 특이적 통합 및 비리온 조립에 기능하는 단백질을 인코딩) 및 cap을 측면에 배치하고 있다. cap ORF는 60-머 바이러스 캡시드를 형성하기 위해 조립되는 3개의 구조 단백질을 코딩한다. 많은 자연적으로 발생하는 AAV

변이체 및 혈청형이 단리되었으며, 그 중 어느 것도 인간 질병과 관련이 없다.

[0077] AAV의 재조합 버전은 유전자 전달 벡터로 사용될 수 있으며, 여기서 관심 있는 마커 또는 치료 유전자는 rep 및 cap 대신 ITR 사이에 삽입된다. 이러한 벡터는 시험관 내 및 생체 내에서 분열 세포(dividing cell)와 미분열 세포 모두를 형질도입하는 것으로 나타났으며, 수년간 유사 분열 후 조직에서 안정적인 이식유전자 발현을 초래할 수 있다. 예를 들어, Knipe D M, Howley P M, *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa., USA, 2007; Gao G-P, Alvira M R, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson S M. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Nati Acad Sci U S A* 2002; 99: 11854-9;Atchison R W, Casty B C, Hammon W M. Adenovirus-Associated Defective Virus Particles, *Science* 1965; 149: 754-6; Hoggan M D, Blacklow N R, Rowe W P. Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics, *Proc Natl Acad U S A* 1966; 55: 1467-74; Blacklow N R, Hoggan M D, Rowe W P. Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1967; 58: 1410-5; Bantel-Schaal U, zur Hauser" H. Characterization of the DNA of a defective human parvovirus isolated from a genital site. *Virology* 1984; 134: 52-63; Mayor H D, Melnick J L. Small deoxyribonucleic acid-containing viruses (picodnavirus group). *Nature* 1966; 210: 331-2; Mori S, Wang L, Takeuchi T, Kanda T. Two novel adeno-associated viruses from cynomolgus monkey: pseudotyping characterization of capsid protein. *Virology* 2004; 330: 375-83; Flotte T R. Gene therapy progress and prospects: recombinant adeno-associated virus (rAAV) vectors. *Gene Ther* 2004; 11: 805-10을 참조.

[0078] 재조합 AAV(본원에서 "AAV" 또는 "rAAV"로 상호교환적으로 지칭)는 점점 더 많은 임상 시험에서 유망한 결과를 산출했다. 그러나 항-캡시드 면역 반응, 특정 조직의 낮은 형질도입, 특정 세포 유형에 대한 표적 전달 불능 및 비교적 낮은 보유 능력(carrying capacity)과 같이 AAV의 유용성을 제한할 수 있는 유전자 전달 장애가 있다. 많은 상황에서 AAV를 개선할 수 있는 능력을 가진 합리적인 설계를 효과적으로 강화할 수 있는 충분한 기계론적인 지식이 없다. 대안으로, 유도 진화는 특정 생물의학적 요구를 충족하는 새로운 AAV 변이체를 만드는 전략으로 등장했다. 유도 진화 전략은 유전적 다양화 및 선택 과정을 활용하여 생물 분자의 기능을 점진적으로 개선하는 유익한 돌연변이의 축적을 가능하게 한다. 이 과정에서 야생형 AAV cap 유전자는 여러 가지 접근법으로 다양화되어 바이러스 입자 라이브러리를 생성하기 위해 패키징된 대규모 유전자 라이브러리를 만든 다음, 유전자 전달 장벽을 극복할 수 있는 새로운 변이체를 단리하기 위해 선택적 압력을 가한다. 중요한 점은, 기능의 유도 진화를 위해서는 유전자 전달 문제의 기계론적 근거를 알 필요가 없으므로, 향상된 벡터의 개발을 가속화할 수 있다는 것이다.

[0079] 일반적으로, 본원에 개시된 변이체는 AAV 라이브러리 및/또는 라이브러리들의 사용을 통해 생성되었다. 이러한 AAV 라이브러리 또는 라이브러리들은 바이러스 게놈 엔지니어링 분야의 숙련된 기술자에게 알려져 있고 쉽게 이용할 수 있는 다양한 유도 진화 기술을 사용하여 AAV 캡시드의 구조 단백질을 인코딩하는 유전자인 cop 유전자를 돌연변이시켜 생성된다. 예를 들어, Bartel et al. Am. Soc. Gene Cell Then. 15th Annu. Meet. 20, 5140 (2012); Bowles, D. et al. J. Virol. 77, 423-432 (2003); Gray et al. Mol. Ther. 18, 570-578 (2010); Grimm, D. et al. J. Virol. 82, 5887-5911; Koerber, J. T. et al. Mol. Then. 16, 1703-1709 (2008); Li W. et al. Mol. Ther. 16, 1252-1260 (2008); Koerber, J. T. et al. Methods Mol. Biol, 434, 161-170 (2008); Koerber, J. T. et al. Hum. Gene Then. 18, 367-378 (2007); 및 Koerber, J. T. et al. Mol. Ther. 17, 2088-2095 (2009)을 참조. 이러한 기술은 제한 없이 다음과 같다: i) 사전 결정된, 변경 가능한 속도로 AAV cap 오픈 리딩 프레임(ORF)에 무작위 점 돌연변이를 도입하기 위한 오류- 발생성(error-prone) PCR; ii) 시험관 내 또는 생체 내 바이러스 재조합 또는 "DNA 셔플링(shuffling)"을 통해 AAV cap 유전자의 무작위 키메라를 생성하여 다중 AAV 혈청형을 갖는 유전자 라이브러리를 생성; iii) cap ORF에서 변성 올리고뉴클레오타이드를 연결하여 캡시드의 정의된 부위에 무작위 펩타이드를 삽입; iv) 전치 돌연변이 유발(transpose mutagenesis)을 사용하여 AAV cap ORF의 무작위 위치에 펩타이드 인코딩 시퀀스를 정의된 대로 삽입; v) AAV 캡시드의 표면 루프를 자연 AAV 혈청형 및 변이체 간의 각 아미노산 위치의 보존 수준을 기반으로 생물정보학적으로 설계된 펩타이드 서열 라이브러리로 교체하여 "루프-스왑(loop-swap)" 라이브러리를 생성; vi) AAV 혈청형 간 변성 위치에서의 무작위 아미노산 치환을 통한 조상 변이체 라이브러리 생성(Santiago-Ortiz et al., 2015); 및 이러한 기술의 조합.

[0080] DNA 셔플링은 부모 특성을 고유하고 종종 유익한 방식으로 결합하는 키메라를 생성하지만, 일부는 패키징이 불가능하여 라이브러리의 다양성을 실제로 감소시킬 수 있다. 라이브러리의 다양성 농도는 제한 없이 위의 iii-

iv)와 같은 펩타이드 삽입 기술을 통해 달성된다. 라이브러리의 다양성은 또한 위의 v)와 같은 기술에 집중되며, 이러한 농도는 AAV 캡시드의 표면 노출 루프에 있는 여러 고가변성 영역으로 향한다. 많은 기술이 캡시드의 작은 영역만 돌연변이된 변이체 캡시드를 생성하지만, 이러한 기술은 전체 캡시드를 변형하기 위해 추가 돌연변이 유발 전략과 쌍을 이룰 수 있다.

[0081] AAV 라이브러리 또는 라이브러리들이 생성되면, 바이러스는 패키징되어 각 AAV 입자가 캡시드를 인코딩하는 cap 유전자를 둘러싼 돌연변이 캡시드로 구성되고 정제된다. 라이브러리의 변이체는 그런 다음 AAV 분야의 숙련된 기술자에게 알려져 있고 쉽게 이용할 수 있는 시험관 내 및/또는 생체 내 선택적 압력 기술에 적용된다. 예를 들어, Maheshri, N. et al. Nature Biotech, 24, 198-204 (2006); Dalkara, D. et al. Sci. Tran.sl. Med. 5, 189ra76 (2013); Lisowski, L. et al. Nature. 506, 382-286 (2013); Yang, L. et al.1PNAS, 106, 3946-3951 (2009); Gao, G. et al. Mol. Them. 13, 77-87 (2006); 및 Bell, P. et al. Hum. Gene. Ther. 22, 985-997 (2011)를 참조. 예를 들어, 제한 없이 AAV 변이체는 i) 다양한 분획의 용출이 변경된 결합 특성을 갖는 변이체를 생성하는 친화성 컬럼; ii) 인체 세포의 행동을 모방하는 조직 샘플 또는 불멸 세포주에서 단리된 일차 세포 - 증가된 효율성 및/또는 조직 특이성을 갖는 AAV 변이체를 생성; iii) 임상적 유전자 치료 환경을 모방하는 동물 모델 - 표적 조직을 성공적으로 감염시킨 AAV 변이체를 생성; iv) 이식된 인간 세포를 감염시킨 AAV 변이체를 생성하는 인간 이종이식(xenograft) 모델; 및/또는 이들의 선택 기술의 조합을 사용하여 선택될 수 있다.

[0082] 바이러스가 선택되면, 제한 없이 아데노바이러스-매개 복제, PCR 증폭, 차세대 시퀀싱 및 클로닝 등과 같은 알려진 기술에 의해 회수될 수 있다. 그런 다음 바이러스 클론은 선택 기술의 반복적인 라운드를 통해 농축되고 AAV DNA는 관심 있는 선택된 변이체 cap 유전자를 회수하기 위해 단리된다. 이러한 선택된 변이체는 추가 변형 또는 돌연변이를 거칠 수 있으며, 그 자체로 AAV 바이러스 적합성을 반복적으로 증가시키기 위한 추가 선택 단계의 새로운 시작점으로 작용한다. 그러나 특정한 경우에 추가 돌연변이 없이 성공적인 캡시드가 생성되었다.

[0083] 본원에 개시된 AAV 변이체는 에어로졸 투여 후 영장류 폐 스크린을 사용하는 것을 포함하는, 상기 설명한 기술과 같은 생체 내 유도 진화 방법론의 사용을 통해 적어도 부분적으로 생성되었다. 따라서, 본원에 개시된 AAV 변이체 캡시드는 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질보다 영장류 폐 세포의 더 효율적인 형질도입을 부여하는 아미노산 서열의 하나 이상의 변형을 포함한다. 본원에 사용된 "상응하는 모 AAV 캡시드 단백질"은 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질과 동일한 야생형 또는 변이체 AAV 혈청형의 AAV 캡시드 단백질을 지칭하지만 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질의 하나 이상의 아미노산 서열 변형을 포함하지 않는다.

[0084] 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질에 비해 공유 결합에 의해 AAV 캡시드 단백질 GH 루프 또는 루프 IV에 삽입된 약 5개 아미노산에서 약 20개 아미노산의 이종성 펩타이드를 포함한다. AAV 캡시드 단백질의 "GH 루프" 또는 루프 IV는 AAV 캡시드 단백질의 OH 루프 또는 루프 IV로 기술 분야에서 언급되는 용매 접근 가능 부분(solvent-accessible portion)을 의미한다. AAV 캡시드의 OH 루프/루프 IV에 대해 예를 들어, van Viet et al, (2006) *Mol. Ther.* 14:809; Padron et al. (2005) *J. Virol,* 79:5047; and Shen et al, (2007) *Mol. Ther.* 15:1955를 참조. 따라서 예를 들어, 삽입 부위는 AAV VP1 캡시드 단백질의 대략 아미노산 411-650 내에 있을 수 있다. 예를 들어, 삽입 부위는 AAV1 VP1의 아미노산 571-612, AAV2 VP1의 아미노산 570-611, AAV3A VP1의 아미노산 571-612, AAV3B VP1의 아미노산 571-612, AAV4 VP1의 아미노산 569-610, AAV5 VP1의 아미노산 560-601, AAV6 VP1의 아미노산 571 내지 612, AAV7 VP1의 아미노산 572 내지 613, AAV8 VP1의 아미노산 573 내지 614, AAV9 VP1의 아미노산 571 내지 612, 또는 AAV10 VP1의 아미노산 573 내지 614, 또는 이의 임의의 변이체의 상응하는 아미노산 내에 위치할 수 있다. 해당 분야의 숙련자는 다양한 AAV 혈청형의 캡시드 단백질의 아미노산 서열의 비교에 근거하여, "AAV2의 아미노산에 상응하는" 삽입 부위가 주어진 AAV 혈청형의 캡시드 단백질에 어디에 있는지 알 것이다. 또한 야생형 AAV 서열 식별 번호: 1-11의 정렬에 대한 미국 출원 공개 번호 2019/0255192의 도 6을 참조. 이는 야생형(자연적으로 발생) 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3A, AAV3B 및 AAV4-10 사이 및 전체에 걸친 아미노산 위치를 제공하며, 이의 전체 내용은 참조로 본원에 포함된다.

[0085] 특정 실시 양태에서, 삽입 부위는 임의의 야생형 AAV 혈청형 또는 AAV 변이체의 VP1의 아미노산 570-614 사이에 위치한 두 인접 아미노산 사이의 단일 삽입 부위이며, 예를 들어, 삽입 부위는 임의의 AAV 혈청형 또는 변이체의 VP1의 아미노산 570-610, 아미노산 580-600, 아미노산 570-575, 아미노산 575-580, 아미노산 5809585, 아미노산 585-590, 아미노산 590-600 또는 아미노산 600-614에 위치한 두 인접 아미노산 사이이다. 예를 들어, 삽입 부위는 아미노산 580과 581, 아미노산 581과 582, 아미노산 583과 584, 아미노산 584와 585, 아미노산 585와 586, 아미노산 586과 587, 아미노산 587과 588, 아미노산 588과 589, 또는 아미노산 589와 590 사이일 수 있다. 삽입 부위는 아미노산 575와 576, 아미노산 576과 577, 아미노산 577과 578, 아미노산 578과 579, 또는

아미노산 579와 580 사이일 수 있다. 삽입 부위는 아미노산 590과 591, 아미노산 591과 592, 아미노산 592와 593, 아미노산 593과 594, 아미노산 594와 595, 아미노산 595와 596, 아미노산 596과 597, 아미노산 597과 598, 아미노산 598과 599, 또는 아미노산 599와 600 사이일 수 있다. 예를 들어, 삽입 부위는 AAV2의 아미노산 587과 588 사이, AAV1의 아미노산 590과 591 사이, AAV3A의 아미노산 588과 589 사이, AAV3B의 아미노산 588과 589 사이, AAV4의 아미노산 584와 585 사이, AAV5의 아미노산 575와 576 사이, AAV6의 아미노산 590과 591 사이, AAV7의 아미노산 589와 590 사이, AAV8의 아미노산 590과 591 사이, AAV9의 아미노산 588과 589 사이 또는 AAV10의 아미노산 588과 589 사이일 수 있다. 특정 실시 양태에서, 삽입 부위는 AAV2의 아미노산 587과 588 사이 또는 AAV2의 아미노산 588과 589 사이이다.

[0086] 일부 실시 양태에서, 본원에 개시된 펩타이드 삽입은 5개 아미노산, 6개 아미노산, 7개 아미노산, 8개 아미노산, 9개 아미노산, 10개 아미노산, 11개 아미노산, 12개 아미노산, 13개 아미노산, 14개 아미노산, 15개 아미노산, 16개 아미노산, 17개 아미노산, 18개 아미노산, 19개 아미노산 또는 20개 아미노산의 길이를 갖는다. 다른 실시 양태에서, 본원에 개시된 펩타이드 삽입은 본원에 개시된 펩타이드 삽입 중 어느 하나의 아미노 말단(N-말단) 및/또는 카르복실 말단(C-말단)에 1개 내지 4개의 스페이서 아미노산을 포함한다. 예시적인 스페이서 아미노산에는 제한 없이, 류신(leucine)(L), 알라닌(alanine)(A), 글리신(glycine)(G), 세린(serine)(S), 트레오닌(threonine)(T) 및 프로린(proline)(P)이 포함된다. 특정 실시 양태에서, 펩타이드 삽입은 N-말단에 2개의 스페이서 아미노산과 C-말단에 2개의 스페이서 아미노산을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 펩타이드 삽입은 N-말단에 2개의 스페이서 아미노산과 C-말단에 1개의 스페이서 아미노산을 포함한다.

[0087] 일부 실시 양태에서, 삽입 펩타이드는 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39)으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다.

[0088] 다른 바람직한 실시 양태에서, 삽입 펩타이드는 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39)으로부터 선택된 아미노산 서열의 아미노 및/또는 카르복실 말단에 1-3개의 스페이서 아미노산(Y_1-Y_3)을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성된다. 이러한 특정 실시 양태에서, 삽입 펩타이드는 LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로 구성된 그룹으로부터 선택된다.

[0089] 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은 GH 루프 또는 루프 IV에서 약 5개 아미노산 내지 약

20개 아미노산의 펩타이드 삽입 외에 다른 아미노산 서열 변형을 포함하지 않는다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로 구성된 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하는 펩타이드 삽입을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 변이체 AAV 캡시드는 다른 아미노산 치환, 삽입 또는 삭제가 포함되지 않는다(즉, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 상기 삽입을 포함하고 다른 면에서는 상응하는 AAV 캡시드 단백질과 동일하다). 다시 말해, 상기 삽입을 포함하는 변이체 AAV 캡시드 단백질은 펩타이드가 삽입된 모 AAV 캡시드 단백질과 다른 면에서는 동일하다. 다른 예로서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 펩타이드 삽입을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 여기서 펩타이드 삽입은 AAV2 캡시드의 VP1의 아미노산 587과 588 사이 또는 다른 모 AAV의 VP1의 상응하는 아미노산 사이, 예를 들어 AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589 사이, AAV4의 VP1의 아미노산 586과 587 사이, AAV5의 VP1의 아미노산 577과 578 사이, AAV7의 VP1의 아미노산 589와 590 사이, AAV8 또는 AAV10의 VP1의 아미노산 590과 591 사이 등에 위치하며, 여기서 변이체 AAV 캡시드 단백질 서열은 다른 면에서는 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질 서열 예를 들어, 서열 식별 번호: 1-12 중 어느 하나와 동일하다.

[0090] 다른 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은 예를 들어, 본원에 개시되거나 당해 기술 분야에 공지된 바와 같이 GH 루프에 펩타이드 삽입을 포함하는 것 외에도, 모 AAV 캡시드 단백질과 비교하여 약 1 내지 약 100개의 아미노산 치환 또는 결실, 예를 들어, 약 1 내지 약 5개, 약 2 내지 약 4개, 약 2 내지 약 5개, 약 5

내지 약 10개, 약 10 내지 약 15개, 약 15 내지 약 20개, 약 20 내지 약 25개, 약 25-50개, 약 50-100개의 아미노산 치환 또는 삭제를 포함한다. 따라서, 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 캡시드 단백질은 상응하는 모 AAV 캡시드, 예를 들어, 서열 식별 번호: 1-12에 표시된 야생형 캡시드 단백질과 85% 이상, 90% 이상, 95% 이상 또는 98% 이상, 예를 들어, 또는 99% 이상의 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 캡시드 단백질은 AAV2 캡시드 단백질(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열과 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포함한다.

[0091] 추가 실시 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 펩타이드의 삽입 전에 넘버링(numbering)된 AAV2 VP1 캡시드 단백질의 아미노산 잔기(들) 1, 6, 15, 16, 18, 30, 34, 37, 38, 57, 65, 66, 81, 91, 99, 101, 103, 109, 118, 120, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 144, 164, 176, 188, 196, 200, 213, 220, 226, 236, 240, 250, 283, 312, 344, 347, 363, 368, 371, 376, 399, 428, 436, 449, 451, 456, 463, 469, 472, 484, 491, 524, 532, 535, 551, 585, 591, 593, 594, 608, 641, 688, 698, 705, 708, 719, 721 및/또는 735, 또는 다른 AAV 캡시드 단백질의 상응하는 아미노산 잔기(들)에 존재한다. 이러한 일부 실시 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 펩타이드의 삽입 전에 넘버링된 AAV2 VP1 캡시드 단백질의 Y6F, S16Y, G18E, P30L, R37L, H38Q, V65A, L91I, E99D, R103L, R103C, S109T, V118A, Q120H, E133D, E134Q, P135A, V136G, K137E, T138R, T200I, D213Y, G220R, P250S, D283E, N312K, T344S, E347D, G376A, P399H, G406E, Q428H, P436H, N449D, P451Q, N469D, D472N, T491I, K532E, K544E, R585K, A591D, A593E, D594N, D608N, H641N, K688R, N705S 및 V708I, 또는 다른 AAV 캡시드 단백질의 상응하는 아미노산 잔기(들)로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 다른 이러한 실시 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 펩타이드의 삽입 전에 넘버링된 AAV2 VP1 캡시드 단백질의 M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L188I, S196Y, G226E, G236V, I240T, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, 1456K, S463Y, D472N, R484C, A524T, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L 및 L735Q, 또는 다른 AAV 캡시드 단백질의 상응하는 아미노산 잔기(들)로 구성된 그룹으로부터 선택된다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 대상체 변이체 캡시드 단백질은 AAV2 VP1 캡시드 단백질(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 잔기 708에 아미노산 치환을 포함한다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 대상체 변이체 캡시드 단백질은 AAV2 VP1 캡시드 단백질(서열 식별 번호: 2)에 비해 V708I 아미노산 치환을 포함하고, 선택적으로 본원에 기술된 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다.

[0092] 일부 실시 양태에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질은 rAAV에 하나 이상의 폐 세포 유형의 증가된 감염성을 부여하고 또한 AAV2(야생형 AAV 혈청형 2)가 나타내는 내성과 비교하여 인간 AAV 중화 항체에 대한 증가된 저항성을 rAAV에 부여한다. 일부 경우에, rAAV는 AAV2(야생형 AAV 혈청형 2)가 나타내는 내성과 비교하여 인간 AAV 중화 항체에 대한 증가된 내성을 나타낸다. 일부 경우에, rAAV는 AAV2가 나타내는 내성보다 인간 AAV 중화 항체에 대해 적어도 약 1.5배(예를 들어, 적어도 약 3배, 적어도 약 5배, 적어도 약 10배, 적어도 약 30배 등) 더 큰 내성을 나타낸다. 일부 경우에, rAAV는 야생형 AAV 혈청형 2(AAV2)가 나타내는 포유류 세포의 형질도입과 비교하여 인간 AAV 중화 항체의 존재 하에 하나 이상의 포유류 폐 세포 유형의 증가된 형질도입을 나타낸다.

[0093] 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 다음을 포함한다: a) 캡시드 단백질의 GH-루프에 펩타이드 삽입, 여기서 펩타이드 삽입은 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64),

LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성, 및 b) AAV2(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열과 비교하여 M1L, L15P, P34A, N57D, N66K, R81Q, Q101R, S109T, R144K, R144M, Q164K, T176P, L1881, S196Y, G226E, G236V, I2401, P250S, N312K, P363L, D368H, N449D, T456K, S463Y, D472N, R484C, A5241, P535S, N551S, A593E, I698V, V708I, V719M, S721L, L735Q 및 이들의 조합의 아미노산 치환 또는 다른 AAV 모 혈청형(즉, AAV2 외)의 상응하는 치환 중 하나 이상, 여기서, 치환된 아미노산(들)이 상응하는 위치에 자연적으로 발생하지 않는다. 바람직한 실시 양태에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 V708I 치환을 포함한다. 바람직하게는, 펩타이드 삽입 부위는 AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 혈청형 캡시드 단백질에서 상응하는 위치 사이에 위치한다.

[0094] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 HDITKNI (서열 식별 번호: 12)를 포함하는 또는 아미노산 서열 LAHDITKNIA(서열 식별 번호: 40)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV102)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖거나 100% 동일하다:

[0095] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LAHDITKNIA**RQAATADVNTQGVLP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 68)

[0096] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590~591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LAHDITKNIA(서열 식별 번호: 40) 및 HDITKNI(서열 식별 번호: 12)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되고, b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린(valine)에서 이소류신(isoleucine)으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌(alanine)에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴(asparagine)에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌(hreonine)에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민(glutamine)에서 이소류신으로의 치환을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되며, 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 하나와 동일하다. 바람직한 실시 예에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 HDITKNI(서열 식별 번호: 12)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 아미노산 서열, 또는 아미노산 서열 LAHDITKNIA(서열 식별 번호: 40)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0097] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 HDITKNI(서열 식별 번호: 12)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LAHDITKNIA(서열 식별 번호: 40)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0098] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 NQDYTKT(서열 식별 번호: 13)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LANQDYTKTA(서열 식별 번호: 41)를 포함하거나, 본질적으로 이

로 구성되거나, 또는 이로 구성된 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV103)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖거나 100% 동일하다:

[0099] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LANQDYTKTA**RQAATADVNTQGVLP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 69)

[0100] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41) 및 NQDYTKT (서열 식별 번호: 13)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되고 b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하고 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 NQDYTKT (서열 식별 번호: 13)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0101] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 NQDYTKT (서열 식별 번호: 13)를 포함하는 또는 아미노산 서열 LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하고 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0102] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 DNTVTRS (서열 식별 번호: 14)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 또는 아미노산 서열 LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV104)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 서열 동일성, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖거나 100% 동일하다:

[0103] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LADNTVTRSA**RQAATADVNTQGVLP

GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 70)

[0104] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42) 및 DNTVTRS (서열 식별 번호: 14)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되고, b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하며 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 DNTVTRS (서열 식별 번호: 14)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0105] 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 DNTVTRS (서열 식별 번호: 14)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 또는 아미노산 서열 LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0106] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 SNSVQSI (서열 식별 번호: 15)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 또는 아미노산 서열 LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV105)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 서열 동일성, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖거나 100% 동일하다:

[0107] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGNLASNSVQSIARQAATADVNTQGVLP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 71)

[0108] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43) 및 SNSVQSI (서열 식별 번호: 15)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되고 b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하며 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 SNSVQSI (서열 식별 번호: 15)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LASNSVQSIA (서열 식별 번

호: 43)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0109] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 SNSVQSI (서열 식별 번호: 15)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0110] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 NSTRHTD (서열 식별 번호: 16)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 또는 아미노산 서열 LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV106)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 서열 동일성, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖거나 100% 동일하다:

[0111] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LANSTRHTDA**RQAATADVNTQGVLP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 72)

[0112] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44) 및 NSTRHTD (서열 식별 번호: 16)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되고 b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에서 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하며 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 NSTRHTD (서열 식별 번호: 16)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0113] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 NSTRHTD (서열 식별 번호: 16)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0114] 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 아미노산 서열 TNRTSPD (서열 식별 번호: 17)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 또는 아미노산 서열 LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 변이체

AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다. 특히 바람직한 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 다음 아미노산 서열(AAV107)과 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 서열 동일성, 적어도 약 99%의 서열 동일성을 갖는 아미노산 서열을 갖거나 100% 동일하다:

[0115] MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEFQE
RLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDPQPLGQPPAAPSGLGTNTMA
TGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPTYNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGF
RPKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNN
FTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHL
NGRDSLVNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQRGN**LATNRTSPDA**RQAATADVNTQGVLP
GMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPE**I**QYTSNY
NKSINVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL (서열 식별 번호: 73)

[0116] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45) 및 TNRTSPD (서열 식별 번호: 17)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되고 b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에서 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하며 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 TNRTSPD (서열 식별 번호: 17)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0117] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 아미노산 서열 TNRTSPD (서열 식별 번호: 17)를 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 아미노산 서열 LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45)를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2의 아미노산 서열과 동일하다.

[0118] 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드는 AAV2의 VP1의 아미노산 587과 588 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 아미노산 사이에 ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38) 및 SPGATTN (서열 식별 번호: 39)으로부터 선택되는 아미노산 서열 또는 LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열를 포함하거나, 본질적으로 이로 구성되거나, 또는 이로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함하며, AAV2 캡시드(서열 식별 번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 하나 이상의 아미노산 치환을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 하나 이상의 아미노산 치환은 AAV2 캡시드(서열 식별

번호: 2)의 아미노산 서열에 비해 잔기 708 또는 다른 AAV 캡시드의 상응하는 잔기에 V708I 아미노산 치환을 포함한다. 변이체 AAV 캡시드는 서열 식별 번호: 2 또는 상응하는 모 AAV 캡시드에 표시된 아미노산 서열의 전체 길이와 적어도 약 85%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98%, 또는 적어도 약 99% 이상의 아미노산 서열 동일성을 가질 수 있다.

[0119] 관련 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 a) AAV1, AAV3A, AAV3B, AAV6 또는 AAV9의 VP1의 아미노산 588과 589, AAV4의 아미노산 586과 587, AAV5의 아미노산 577과 578, AAV7의 아미노산 589와 590, 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 590-591 사이에 위치한 펩타이드 삽입, 펩타이드 삽입은 HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되고 b) AAV3A 또는 AAV3B의 아미노산 709에 발린에서 이소류신으로의 치환, AAV1 또는 AAV6의 위치 709에 알라닌에서 이소류신으로의 치환, AAV4의 아미노산 707 또는 AAV9의 아미노산 709에 아스파라긴에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV7의 아미노산 710 또는 AAV8 또는 AAV10의 아미노산 711에 트레오닌에서 이소류신으로의 치환 또는 AAV5의 아미노산 697에 글루타민에서 이소류신으로의 치환을 포함하며 선택적으로 다른 면에서는 서열 식별 번호: 1 및 3-12 중 어느 하나와 동일하다. 바람직한 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38) 및 SPGATTN (서열 식별 번호: 39)으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 삽입 및 b) AAV2의 아미노산 서열과 비교하여 아미노산 708에 발린에서 이소류신으로의 아미노산 치환을 포함하며, 여기서 변이체 캡시드 단백질은 2 내지 5개, 5 내지 10개, 또는 10 내지 15개의 아미노산 치환을 포함한다.

[0120] 또 다른 실시 양태에서, 변이체 캡시드 단백질은 a) AAV2 캡시드의 아미노산 587과 588 사이에 ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호:

21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38) 및 SPGATTN (서열 식별 번호: 39)으로부터 선택된 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는, 또는 LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 아미노산 서열로 구성되는 펩타이드 삽입을 포함한다.

[0121] 다른 실시 양태에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 서열 식별 번호: 2의 wt AAV2의 아미노산 586-597의 치환을 포함하며, 이는 다음 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성된다: VPTGaEtLNvnG(서열 식별 번호: 74); 소문자는 야생형 AAV2 서열의 아미노산에 상응함). 다시 말해서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 AAV2에 비해 다음 아미노산 치환을 포함한다: G586V, N587P, R588T, Q589, A591E, A593L, D594N 및 T597G. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 상기 언급된 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2와 동일할 수 있거나, 서열 식별 번호: 2와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일할 수 있다.

[0122] 다른 실시 양태에서, 하나 이상의 폐 세포에 대한 개선된 향성을 갖는 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 서열 식별 번호: 2의 wt AAV2의 아미노산 588-597의 치환을 포함하며, 이는 다음 아미노산 서열을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성된다: LAPDFTTLDA (서열 식별 번호: 75). 다시 말해, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 AAV2에 비해 다음 아미노산 치환을 포함한다: R588L, Q589A, A590P, A591D, T592F, A593T, D594T, V595L, N596D 및 T597A. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 앞서 언급한 아미노산 치환을 포함할 수 있으며, 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2와 동일할 수 있거나, 서열 식별 번호: 2와 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일할 수 있다.

[0123] 또 다른 실시 양태에서, 하나 이상의 폐 세포에 대한 개선된 향성을 갖는 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 서열 식별 번호: 6(SSTTAPATGTYN; 서열 식별 번호: 76)의 wt AAV5의 아미노산 575-586을 TGRQNPDMSGLS (서열 식별 번호: 77) TGQRALDLRGLS (서열 식별 번호: 78), TGWMSNQWLGLS (서열 식별 번호: 79), TGVSQEPWAGLS (서열 식별 번호: 80), TGVSLLVPSGLS (서열 식별 번호: 81), TGGMGSWHSGLS (서열 식별 번호: 82), TGSPLVFQAGLS (서열 식별 번호: 83), TGLYDNSHVGLS (서열 식별 번호: 84), TGDGDVGgGGLS (서열 식별 번호: 85), TGPSpNPYtGLS (서열 식별 번호: 86), TGNSGLAEAGLS (서열 식별 번호: 87) 및 TGLYSPNDGGLS (서열 식별 번호: 88)로부터 선택된 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성된다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은 상기 언급된 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 다은 면에서는 서열 식별 번호: 6과 동일할 수 있거나, 서열 식별 번호: 6과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일할 수 있다.

[0124] 또 다른 실시 양태에서, 하나 이상의 폐 세포에 대한 개선된 향성을 갖는 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 서열 식별 번호: 6(PANPGTTATYLEG; 서열 식별 번호: 89)의 wt AAV5의 아미노산 533-545를 FSPTYPSVWWFQR (서열 식별 번호: 90), VMPWgLVFVCFDF (서열 식별 번호: 91), CMTAWPVDASFLN (서열 식별 번호: 92), IYLRLGIYWCAGV (서열 식별 번호: 93), GLGGSStGSRTSA (서열 식별 번호: 94), LFICFCCFYA(1)FF (서열 식별 번호: 95), IDDDCSVaGyRSW (서열 식별 번호: 96), SNGITFKDRRCLL (서열 식별 번호: 97), FMIGNKVPIA(1)Pg (서열 식별 번호: 98) 및 IYLRLGIYWCAGN (서열 식별 번호: 99)으로부터 선택된 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성된다. 관련 실시 양태에서, 하나 이상의 폐 세포에 대한 개선된 향성을 갖는 변이체 AAV 캡시드 단백질이 제공되며, 이는 서열 식별 번호: 6(PANPGTTATYLE; 서열 식별 번호: 100)의 wt AAV5의 아미노산 533-544를 다음 아미노산 서열로 치환하는 것을 포함한다: LSTpFIVaGSGI(서열 식별 번호: 101). 각 서열의 소문자는 야생형 AAV5 서열의 아미노산에 상응한다. 변이체 AAV 캡시드 단백질은

상기 언급된 아미노산 치환을 포함할 수 있고, 다른 면에서는 서열 식별 번호: 6과 동일할 수 있거나, 서열 식별 번호: 6과 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일할 수 있다.

[0125] 본원에 개시된 AAV 변이체는 에어로졸 투여 후 영장류 폐 스크린의 사용을 수반하는 생체 내 유도 진화의 사용을 통해 생성되었다. 일부 실시 양태에서, 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질은 AAV 비리온에 존재할 때, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질 또는 야생형 AAV를 포함하는 AAV 비리온에 의한 폐 세포의 형질도입과 비교하여 폐 세포의 증가된 형질도입을 부여한다. 예를 들어, 일부 실시 양태에서, 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질은 AAV 비리온에 존재할 때, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질 또는 야생형 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온보다 영장류 폐 세포의 더 효율적인 형질도입을 부여하며, 예를 들어, 폐 세포는 모 AAV 캡시드 단백질 또는 야생형 AAV를 포함하는 AAV 비리온보다 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온을 더 많이 흡수한다(take up). 이러한 일부 실시 양태에서, AAV 변이체 비리온 또는 변이체 rAAV는 야생형 AAV 비리온 또는 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV에 의한 폐 세포의 형질도입과 비교하여 적어도 2배, 적어도 5배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배 또는 50배 이상의 증가된 폐 세포의 형질도입을 나타낸다. 이러한 특정 실시 양태에서, 본원에 개시된 변이체 캡시드 단백질은 AAV 비리온에 존재할 때, 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질 또는 야생형 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 비리온보다 더 광범위한 영장류 폐 세포의 형질도입을 부여한다. 다시 말해, 변이체 AAV 비리온은 상응하는 모 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 비리온에 의해 형질도입되지 않는 세포 유형을 형질도입하고, 따라서 상응하는 모 AAV 비리온보다 폐의 더 많은 세포 유형을 형질도입한다. 일부 실시 양태에서, AAV 변이체 비리온은 폐 세포를 우선적으로 형질도입한다. 예를 들어, 대상체 rAAV 비리온은 다른 폐 세포 또는 비-폐 세포 예를 들어, 폐 외부의 세포보다 2배, 5배, 10배, 15배, 20배, 25배, 50배 또는 50배 이상의 특이성으로 폐 세포를 감염시키다. 일부 실시 양태에서, 형질도입된 폐 세포는 상기도 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 상기도 상피 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 폐포 상피 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 1차, 2차 또는 3차 기관지 상피 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 기관 상피 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 섬모 기도 상피 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 폐포 상피 1형(AECI) 또는 2형(AECII) 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 평활근 세포이다. 일부 실시 양태에서, 폐 세포는 내피 세포이다. 폐 세포의 형질도입 증가, 예를 들어 증가된 형질도입 효율, 보다 광범위한 형질도입, 보다 우선적인 형질도입 등은 유전자 발현을 측정하기 위한 기술 분야의 수많은 방법에 의해 시험관 내 또는 생체 내에서 쉽게 평가될 수 있다. 예를 들어, AAV는 유비쿼터스(ubiquitous) 또는 조직 특이적 프로모터의 제어 하에 있는 리포터 유전자, 예를 들어 형광 단백질을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 게놈과 함께 패키징될 수 있으며, 형질도입의 정도는, 예를 들어 형광 현미경에 의해 형광 단백질을 검출하여 평가된다. 또 다른 예로서, AAV는 바코드(bar coded) 핵산 서열을 포함하는 게놈과 함께 패키징될 수 있으며, 형질도입의 정도는, 예를 들어 PCR에 의해 핵산 서열을 검출하여 평가된다. 또 다른 예로, AAV는 폐 질환 치료를 위한 치료 유전자를 포함하는 발현 카세트를 포함하는 게놈과 함께 패키징될 수 있으며, AAV를 투여받은 고통받는 환자의 폐 질환 치료를 검출하여 형질도입의 정도를 평가할 수 있다.

[0126] 본원에 이종성 핵산을 폐 세포에 전달하는 방법이 제공되며, 이는 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별

번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV 비리온과 폐 세포를 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시 양태에서, 이 방법은 *시험관 내(in vito)* 또는 *생체 외(ex vivo)* 방법이다. 일부 실시 양태에서, 이종성 핵산은 단백질 및/또는 짧은 간섭 RNA를 인코딩한다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 폐 세포는 폐 또는 기관의 임의의 세포이다. 다른 바람직한 실시 양태에서, 폐 세포는 폐포 상피 세포, 기관지(1차, 2차 또는 3차) 상피 세포 또는 기관 상피 세포를 포함하되 이에 국한되지 않는 기도 상피 세포이다. 일부 바람직한 측면에서, 폐 세포는 섬모 기도 상피 세포이다. 일부 바람직한 측면에서, 폐 세포는 폐포 상피 1형(AECI) 또는 2형(AECII) 세포이다. 다른 실시 양태에서, 폐 세포는 평활근 또는 내피 세포이다. 다른 실시 양태에서, 폐 세포는 기저(basal) 세포, 배상(goblet) 세포 또는 난모세포(oocyte)이다.

[0127] 또한, 대상체(예를 들어, 인간 대상체)의 폐에 이종성 핵산을 전달하는 방법이 제공되며, 이는 대상체에게 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV 비리온을 투여하는 단계가 포함된다. 일부 실시 양태에서, 이종성 핵산은 단백질 및/또는 짧은 간섭 RNA를 인코딩한다. 관련 실시 양태에서, 대상체(예를 들어, 인간 대상체)의 상기도, 비인두, 부비동, 입/구강(buccal) 영역 및/또는 타액선에 이종성 핵산을 전달하는 방법은 대상체에게 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62),

LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV 비리온을 투여하는 단계를 포함한다. 관련 측면에서, rAAV 또는 동일한 것을 포함하는 약학적 조성물은 폐, 기관지내(endobronchial), 비강내, 기관내 및/또는 기관지내(intrabronchial) 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 바람직한 측면에서, 대상체의 폐로 이종성 핵산의 전달은 하나 이상의 인코딩된 유전자 산물을 대상체의 폐로 전달한다. 유전자 산물의 용도에는 세포 내 인자 수준을 향상시키거나, 인자 분비를 통해 이웃 세포 내 인자 수준을 향상시키거나, 세포 내 인자 수준을 감소시키거나, 인자 분비를 통해 이웃 세포 내 인자 수준을 감소시키는 것이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 유전자 산물은 결함이 있거나 결여된 유전자 산물의 수준을 보완하도록(예를 들어, 유전자 산물은 치료적 대체 유전자일 수 있음), 결함이 있는 유전자 산물의 수준을 감소시키도록(예를 들어, 유전자 산물은 결함이 있는 유전자 산물의 발현을 감소시키는 siRNA 또는 miRNA와 같은 간섭 RNA일 수 있음), 새로운 지원 유전자 산물을 도입하도록, 지원 유전자 산물의 수준을 보완하도록, 방해하는 유전자 산물의 수준을 감소시키도록, 또는 방해하는 유전자 산물의 수준을 감소시키고 지원 유전자 산물의 수준을 도입하거나 보완하도록 설계될 수 있다.

[0128] 또한, 폐 질환을 치료하는 방법이 본원에 제공되며, 이는 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 재조합 AAV(rAAV)의 치료적 유효량을 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 하나 이상의 유전자 산물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 또한, 본원에 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58),

LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 폐 질환을 치료하기 위한 재조합 AAV(rAAV)의 용도가 제공되며, 하나 이상의 유전자 산물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 또한, 본원에 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 폐 질환 치료를 위한 약제를 제조하는데 있어서 재조합 AAV(rAAV)의 용도가 제공되며, 하나 이상의 유전자 산물은 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 일부 측면에서, 이종성 핵산은 다중 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는데, 이 경우 다중(예를 들어, 2) 유전자 산물의 발현은 다중(예를 들어, 2) 독립 프로모터에 의해 매개될 수 있거나 단일 프로모터에 의해 매개될 수 있으며, 다중 이식유전자는 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site)(IRES) 또는 2A 펩타이드 서열에 의해 분리된다. 바람직한 실시 양태에서, 이종성 핵산은 치료 단백질 및/또는 치료적 짧은 간섭 RNA를 인코딩한다. 관련된 측면에서, rAAV에 의해 전달된 유전자 산물(들)은 방해하는 유전자 산물의 수준을 감소시키고/시키거나 지원 유전자 산물의 수준을 도입하거나 보충한다.

[0129] 본원에 개시된 변이체 rAAV 벡터 또는 비리온 및/또는 방법을 사용하여 치료할 수 있는 폐 질환에는 단일 유전자 질환, 복합(complex) 유전 질환, 후천성 질환 및 외상성 손상이 포함되지만 이에 국한되지는 않는다. 일부 측면에서 폐 질환은 만성 폐쇄성 폐 질환(chronic obstructive pulmonary disease)(COPD), 특발성 폐 섬유증(idiopathic pulmonary fibrosis)(IPF), 낭포성 섬유증, 폐동맥 고혈압, 폐 고혈압, 폐암(1차, 2차 및 전이성), 표면 활성제 결핍(surfactant deficiency), 바이러스 및/또는 박테리아 감염, 급성 기관지염, 폐렴(바이러스, 박테리아 및 진균 폐렴 포함), 호흡기 감염(인두염(pharyngitis), 크룹(croup), 아스페르길루스(aspergillus), 쿠시디오미코시스(coocidiomycosis), 한타바이러스 폐 증후군(hantavirus pulmonary syndrome) 및 히스토플라스마증(histoplasmosis) 포함), 화학 및 과민성 폐렴, 결핵 및 기타 항산균 감염(mycobacterial infection)(항산균 아비움(mycobacterium avium) 포함, 이에 국한되지 않음), 사르코이드증(sarcoidosis), 호흡 세포융합 바이러스(respiratory syncytial virus), 폐부종, 급성 호흡곤란 증후군(acute respiratory distress syndrome)(ARDS), 진폐증(흑색 폐 질환, 석면증 및 규폐증 포함), 간질성 폐 질환 (육아종 및 자가면역 질환 포함), 폐색전증, 흉막 삼출액, 흉막염, 중피종, 기흉, 급성 기관지염, 세기관지염(폐쇄세기관지염 포함), 유아 돌연사 증후군, 수면 무호흡증, 기관지확장증, 기관지폐이형성증, 암호성 기질화 폐렴, 전자담배 또는 베이핑 사용과 관련된 폐 손상(E-cigarette or vaping use associated lung injury)(EVALI), 중동호흡기증후군(E-cigarette or vaping use associated lung injury)(MERS), 원발성 섬모 운동 이상증, 중증 급성 호흡기 증후군(Severe Acute Respiratory Syndrome)(SARS), 알파-1-안티트립신 결핍증, 천식, 간질성 폐질환, COVID-19(코로나바이러스감염증 2019)로부터 선택된다.

[0130] 일부 측면에서, IPF 치료를 위해 표적화될 수 있는 유전자는 SFTPA1(계면활성제(surfactant) A1) 및 카베올린(Caveolin)-1을 포함하지만 이에 국한되지 않는다. COPD 치료를 위해 표적화될 수 있는 유전자는 알파-1-안티트립신, 알파-1-안티키모트립신, 알파-1-마크로글로불린, 매트릭스 메탈로프로티네이스 1(matrix metalloproteinase 1)(MMP1), 매트릭스 메탈로프로티네이스 12(matrix metalloproteinase 12)(MMP12), 미세소체 에폭사이드 가수분해효소(microsomal epoxide hydrolyase), CYP1A1, 글루타치온 S-트랜스퍼라제, 헴(heme) 산화효소-1, TGF-베타-1, TNF-알파, IL-1 복합체, IL-8, IL-13, 인간 백혈구 항원(HLA-B7 및 Bw16), 비타민 D 결합 단백질 및 베타-2-아드레날린 수용체 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 유전자를 포함하지만 이에 국한되지 않는다.

[0131] 일부 측면에서, COVID-19를 치료하는 방법이 제공되며, 이는 (i) 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 또는 이 rAAV를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하며, 여기서 유전자 산물(들)은 바이러스 유전자 산물 또는 숙주 세포 유전자를 녹다운(knock-down), 변형 및/또는 과발현하여 폐 또는 비인두에서 바이러스 병원성 또는 복제를 감소 또는 제거하고/하거나 바이러스의 에피토프(epitope)에 대한 중화 항체를 발현한다.

[0132] 일부 측면에서, IPF를 치료하는 방법이 제공되며, 이는 (i) 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 또는 이 rAAV를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 바람직한 실시 양태에서, rAAV는 IPF를 치료하기 위해 제공되며, rAAV는 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 SFTPA1 및/또는 카베올린-1 또는 그 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.

[0133] 일부 측면에서, COPD를 치료하는 방법이 제공되며, 이는 (i) 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 (ii) 하나 이상의 프로모터에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 이종성 핵산을 포함하는 재조합 AAV(rAAV) 또는 이 rAAV를 포함하는 약학적 조성물의 치료적 유효량을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함한다. 일부 바람직한 실시 양태에서, rAAV는 COPD를 치료하기 위해 제공되며, rAAV는 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 알파-1-안티트립신 또는 그 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다.

[0134] 일부 바람직한 측면에서, 대상체 변이체 AAV 캡시드와 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV는 본원에 기술된 바와 같이 낭포성 섬유증 또는 이와 관련된 폐 질환을 치료하거나 낭포성 섬유증 또는 이와 관련된 폐 질환을 치료하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위해 제공된다. 바람직하게는 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시 양태에서, 인간 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 천연 인간 CFTR 단백질을 인코딩하고 다음 서열 또는 이와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다:

[0135] ATGCAGAGGTCGCCTCTGGAAAAGGCCAGCGTTGTCTCCAAACTTTTTTTCAGCTGGACCAGACCAATTTTGAGGAAAGGATACAGACAGCGCCTGGAATTG
TCAGACATATACCAAATCCCTTCTGTTGATTCTGCTGACAATCTATCTGAAAAATTGGAAAGAGAATGGGATAGAGAGCTGGCTTCAAAGAAAAATCCTAAA
CTCATTAATGCCCTTCGGCGATGTTTTTTCTGGAGATTTATGTTCTATGGAATCTTTTTATATTTAGGGGAAGTCACCAAAGCAGTACAGCCTCTCTTACTG
GGAAGAATCATAGCTTCCTATGACCCGGATAACAAGGAGGAACGCTCTATCGCGATTTATCTAGGCATAGGCTTATGCCTTCTCTTTATTGTGAGGACACTG
CTCCTACACCCAGCCATTTTTGGCCTTCATCACATTGGAATGCAGATGAGAATAGCTATGTTTAGTTTGATTTATAAGAAGACTTTAAAGCTGTCAAGCCGT
GTTCTAGATAAAATAAGTATTGGACAACTTGTTAGTCTCCTTTCCAACAACCTGAACAAATTTGATGAAGGACTTGCATTGGCACATTTCGTGTGGATCGCT
CCTTTGCAAGTGGCACTCCTCATGGGGCTAATCTGGGAGTTGTTACAGGCGTCTGCCTTCTGTGGACTTGGTTTCCTGATAGTCCTTGCCCTTTTTCAGGCT
GGGCTAGGGAGAATGATGATGAAGTACAGAGATCAGAGAGCTGGGAAGATCAGTGAAAGACTTGTGATTACCTCAGAAATGATTGAAAATATCCAATCTGTT
AAGGCATACTGCTGGGAAGAAGCAATGGAAAAAATGATTGAAAACTTAAGACAAACAGAACTGAAACTGACTCGGAAGGCAGCCTATGTGAGATACTTCAAT
AGCTCAGCCTTCTTCTTCTCAGGGTTCTTTGTGGTGTTTTTATCTGTGCTTCCCTATGCACTAATCAAAGGAATCATCCTCCGGAAAATATTCACCACCATC
TCATTCTGCATTGTTCTGCGCATGGCGGTCACTCGGCAATTTCCCTGGGCTGTACAAACATGGTATGACTCTCTTGGAGCAATAAACAAAATACAGGATTTC
TTACAAAAGCAAGAATATAAGACATTGGAATATAACTTAACGACTACAGAAGTAGTGATGGAGAATGTAACAGCCTTCTGGGAGGAGGGATTTGGGGAATTA
TTTGAGAAAGCAAAACAAAACAATAACAATAGAAAAACTTCTAATGGTGATGACAGCCTCTTCTTCAGTAATTTCTCACTTCTTGGTACTCCTGTCCTGAAA
GATATTAATTTCAAGATAGAAAGAGGACAGTTGTTGGCGGTTGCTGGATCCACTGGAGCAGGCAAGACTTCACTTCTAATGGTGATTATGGGAGAACTGGAG
CCTTCAGAGGGTAAAATTAAGCACAGTGGAAGAATTTCATTCTGTTCTCAGTTTTCCTGGATTATGCCTGGCACCATTAAAGAAAATATCATCTTTGGTGTT
TCCTATGATGAATATAGATACAGAAGCGTCATCAAAGCATGCCAACTAGAAGAGGACATCTCCAAGTTTGCAGAGAAAGACAATATAGTTCTTGGAGAAGGT

GGAATCACACTGAGTGGAGGTCAACGAGCAAGAATTTCTTTAGCAAGAGCAGTATACAAAGATGCTGATTTGTATTTATTAGACTCTCCTTTTGGATACCTA
GATGTTTTAACAGAAAAAGAAATATTTGAAAGCTGTGTCTGTAAACTGATGGCTAACAAAACTAGGATTTTGGTCACTTCTAAAATGGAACATTTAAAGAAA
GCTGACAAAATATTAATTTTGCATGAAGGTAGCAGCTATTTTTATGGGACATTTTCAGAACTCCAAAATCTACAGCCAGACTTTAGCTCAAAACTCATGGGA
TGTGATTCTTTCGACCAATTTAGTGCAGAAAGAAGAAATTCAATCCTAACTGAGACCTTACACCGTTTCTCATTAGAAGGAGATGCTCCTGTCTCCTGGACA
GAAACAAAAAAACAATCTTTTAAACAGACTGGAGAGTTTGGGGAAAAAAGGAAGAATTCTATTCTCAATCCAATCAACTCTATACGAAAATTTTCCATTGTG
CAAAAGACTCCCTTACAAATGAATGGCATCGAAGAGGATTCTGATGAGCCTTTAGAGAGAAGGCTGTCCTTAGTACCAGATTCTGAGCAGGGAGAGGCGATA
CTGCCTCGCATCAGCGTGATCAGCACTGGCCCCACGCTTCAGGCACGAAGGAGGCAGTCTGTCCTGAACCTGATGACACACTCAGTTAACCAAGGTCAGAAC
ATTCACCGAAAGACAACAGCATCCACACGAAAAGTGTCACTGGCCCCTCAGGCAAACTTGACTGAACTGGATATATATTCAAGAAGGTTATCTCAAGAAACT
GGCTTGGAAATAAGTGAAGAAATTAACGAAGAAGACTTAAAGGAGTGCTTTTTTGATGATATGGAGAGCATACCAGCAGTGACTACATGGAACACATACCTT
CGATATATTACTGTCCACAAGAGCTTAATTTTTGTGCTAATTTGGTGCTTAGTAATTTTTCTGGCAGAGGTGGCTGCTTCTTTGGTTGTGCTGTGGCTCCTT
GGAAACACTCCTCTTCAAGACAAAGGGAATAGTACTCATAGTAGAAATAACAGCTATGCAGTGATTATCACCAGCACCAGTTCGTATTATGTGTTTTACATT
TACGTGGGAGTAGCCGACACTTTGCTTGCTATGGGATTCTTCAGAGGTCTACCACTGGTGCATACTCTAATCACAGTGTCGAAAATTTTACACCACAAAATG
TTACATTCTGTTCTTCAAGCACCTATGTCAACCCTCAACACGTTGAAAGCAGGTGGGATTCTTAATAGATTCTCCAAAGATATAGCAATTTTGGATGACCTT
CTGCCTCTTACCATATTTGACTTCATCCAGTTGTTATTAATTGTGATTGGAGCTATAGCAGTTGTCGCAGTTTTACAACCCTACATCTTTGTTGCAACAGTG
CCAGTGATAGTGGCTTTTATTATGTTGAGAGCATATTTCCTCCAAACCTCACAGCAACTCAAACAACTGGAATCTGAAGGCAGGAGTCCAATTTTCACTCAT
CTTGTTACAAGCTTAAAAGGACTATGGACACTTCGTGCCTTCGGACGGCAGCCTTACTTTGAAACTCTGTTCCACAAAGCTCTGAATTTACATACTGCCAAC
TGGTTCTTGTACCTGTCAACACTGCGCTGGTTCCAAATGAGAATAGAAATGATTTTTGTCATCTTCTTCATTGCTGTTACCTTCATTTCCATTTTAACAACA
GGAGAAGGAGAAGGAAGAGTTGGTATTATCCTGACTTTAGCCATGAATATCATGAGTACATTGCAGTGGGCTGTAAACTCCAGCATAGATGTGGATAGCTTG
ATGCGATCTGTGAGCCGAGTCTTTAAGTTCATTGACATGCCAACAGAAGGTAAACCTACCAAGTCAACCAAACCATACAAGAATGGCCAACTCTCGAAAGTT
ATGATTATTGAGAATTCACACGTGAAGAAAGATGACATCTGGCCCTCAGGGGGCCAAATGACTGTCAAAGATCTCACAGCAAAATACACAGAAGGTGGAAAT
GCCATATTAGAGAACATTTCCTTCTCAATAAGTCCTGGCCAGAGGGTGGGCCTCTTGGGAAGAACTGGATCAGGGAAGAGTACTTTGTTATCAGCTTTTTTG
AGACTACTGAACACTGAAGGAGAAATCCAGATCGATGGTGTGTCTTGGGATTCAATAACTTTGCAACAGTGGAGGAAAGCCTTTGGAGTGATACCACAGAAA
GTATTTATTTTTTCTGGAACATTTAGAAAAAACTTGGATCCCTATGAACAGTGGAGTGATCAAGAAATATGGAAAGTTGCAGATGAGGTTGGGCTCAGATCT
GTGATAGAACAGTTTCCTGGGAAGCTTGACTTTGTCCTTGTGGATGGGGGCTGTGTCCTAAGCCATGGCCACAAGCAGTTGATGTGCTTGGCTAGATCTGTT
CTCAGTAAGGCGAAGATCTTGCTGCTTGATGAACCCAGTGCTCATTTGGATCCAGTAACATACCAAATAATTAGAAGAACTCTAAAACAAGCATTTGCTGAT
TGCACAGTAATTCTCTGTGAACACAGGATAGAAGCAATGCTGGAATGCCAACAATTTTTGGTCATAGAAGAGAACAAAGTGCGGCAGTACGATTCCATCCAG
AAACTGCTGAACGAGAGGAGCCTCTTCCGGCAAGCCATCAGCCCCTCCGACAGGGTGAAGCTCTTTCCCCACCGGAACTCAAGCAAGTGCAAGTCTAAGCCC
CAGATTGCTGCTCTGAAAGAGGAGACAGAAGAAGAGGTGCAAGATACAAGGCTTTAG (서열 식별 번호: 102)

[0136] 바람직한 실시 양태에서, 인간 CFTR 또는 생물학적으로 활성화된 절단된 CFTR 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 인간에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다. 일부 실시 양태에서, 뉴클레오타이드 서열은 아미노산 708-759가 결여된 생물학적으로 활성화된 절단된 인간 CFTR 단백질을 인코딩하고 다음의 뉴클레오타이드 서열 또는 이와 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 포함한다:

[0137] ATGCAGCGCAGCCCACTGGAGAAGGCAAGCGTGGTGTCCAAGCTGTTCTTTTCCTGGACCAGGCCTATCCTGAGGAAGGGATACAGGCAGCGGCTGGAGCTG
AGCGACATCTATCAGATCCCTTCTGTGGACAGCGCCGATAATCTGTCCGAGAAGCTGGAGAGAGAGTGGGATAGGGAGCTGGCCTCTAAGAAGAACCCAAAG
CTGATCAATGCCCTGCGGAGATGCTTCTTTTGGCGGTTCATGTTCTACGGCATCTTCCTGTATCTGGGCGAGGTGACCAAGGCCGTGCAGCCACTGCTGCTG
GGCAGAATCATCGCCTCTTACGACCCCGATAACAAGGAGGAGAGGAGCATCGCCATCTATCTGGGCATCGGCCTGTGCCTGCTGTTTATCGTGAGGACACTG
CTGCTGCACCCAGCCATCTTCGGCCTGCACCACATCGGCATGCAGATGAGAATCGCCATGTTCAGCCTGATCTACAAGAAGACCCTGAAGCTGAGCTCCAGG
GTGCTGGACAAGATCTCCATCGGCCAGCTGGTGTCCCTGCTGTCTAACAATCTGAACAAGTTTGATGAGGGACTGGCCCTGGCACACTTCGTGTGGATCGCA
CCACTGCAGGTGGCCCTGCTGATGGGCCTGATCTGGGAGCTGCTGCAGGCAAGCGCCTTTTGCGGACTGGGCTTCCTGATCGTGCTGGCCCTGTTCCAGGCA
GGACTGGGACGCATGATGATGAAGTACAGAGACCAGAGGGCCGGCAAGATCTCTGAGCGGCTGGTCATCACCAGCGAGATGATCGAGAACATCCAGTCCGTG
AAGGCCTATTGTTGGGAGGAGGCCATGGAGAAGATGATCGAGAATCTGCGCCAGACAGAGCTGAAGCTGACCAGAAAGGCCGCCTACGTGAGGTACTTCAAC
TCTAGCGCCTTCTTTTTCTCTGGCTTTTTCGTGGTGTTCCTGAGCGTGCTGCCATACGCCCTGATCAAGGGCATCATCCTGCGGAAGATCTTTACCACAATC
TCCTTCTGCATCGTGCTGAGAATGGCCGTGACAAGGCAGTTTCCCTGGGCCGTGCAGACCTGGTATGACTCTCTGGGCGCCATCAATAAGATCCAGGATTTC
CTGCAGAAGCAGGAGTACAAGACACTGGAGTATAACCTGACCACAACCGAGGTGGTCATGGAGAATGTGACCGCCTTCTGGGAGGAGGGCTTTGGCGAGCTG
TTCGAGAAGGCCAAGCAGAACAATAACAATCGCAAGACATCTAACGGCGACGATAGCCTGTTTTTCAGCAATTTTTCCCTGCTGGGCACCCCCGTGCTGAAG
GACATCAACTTCAAGATCGAGAGGGGACAGCTGCTGGCAGTGGCAGGCTCCACAGGCGCCGGCAAGACCTCTCTGCTGATGATGATCATGGGCGAGCTGGAG
CCAAGCGAGGGCAAGATCAAGCACTCCGGCCGGATCTCTTTTTGCAGCCAGTTCTCCTGGATCATGCCCGGCACCATCAAGGAGAATATCATCTTTGGCGTG
TCCTACGATGAGTACAGATATAGGTCTGTGATCAAGGCCTGTCAGCTGGAGGAGGACATCAGCAAGTTCGCCGAGAAGGATAACATCGTGCTGGGCGAGGGC
GGCATCACACTGAGCGGAGGACAGAGGGCAAGGATCTCCCTGGCCAGAGCCGTGTACAAGGACGCCGATCTGTATCTGCTGGACAGCCCCTTTGGCTATCTG

GATGTGCTGACCGAGAAGGAGATCTTCGAGTCCTGCGTGTGCAAGCTGATGGCCAATAAGACAAGGATCCTGGTGACCTCTAAGATGGAGCACCTGAAGAAG
GCCGACAAGATCCTGATCCTGCACGAGGGCTCCTCTTACTTTTATGGCACATTCAGCGAGCTGCAGAATCTGCAGCCTGACTTCAGCTCCAAGCTGATGGGC
TGTGACTCCTTTGATCAGTTCTCTGCCGAGAGGCGCAACTCCATCCTGACAGAGACCCTGCACAGATTCTCTCTGGAGGGCGACGCACCCGTGAGCTGGACA
GAGACCAAGAAGCAGTCCTTTAAGCAGACCGGCGAGTTCGGCGAGAAGAGGAAGAATTCTATCCTGAACCCTATCAATAGCACACTGCAGGCCCGGAGAAGG
CAGTCTGTGCTGAACCTGATGACCCACAGCGTGAACCAGGGCCAGAATATCCACAGAAAGACAACCGCCAGCACAAGGAAGGTGTCCCTGGCACCTCAGGCA
AACCTGACCGAGCTGGACATCTACTCCCGCCGGCTGTCTCAGGAGACCGGACTGGAGATCTCTGAGGAGATCAATGAGGAGGATCTGAAGGAGTGCTTTTTC
GACGATATGGAGAGCATCCCAGCCGTGACAACCTGGAACACATACCTGCGCTATATCACCGTGCACAAGTCCCTGATCTTTGTGCTGATCTGGTGTCTGGTC
ATCTTCCTGGCAGAGGTGGCAGCATCTCTGGTGGTGCTGTGGCTGCTGGGCAACACACCCCTGCAGGACAAGGGCAATTCTACCCACAGCCGCAACAATTCC
TACGCCGTGATCATCACATCTACCTCTAGCTACTACGTGTTCTACATCTATGTGGGCGTGGCCGATACACTGCTGGCCATGGGCTTTTTCCGGGGCCTGCCC
CTGGTGCACACACTGATCACCGTGAGCAAGATCCTGCACCACAAGATGCTGCACAGCGTGCTGCAGGCCCCTATGTCCACACTGAACACCCTGAAGGCCGGC
GGCATCCTGAATCGGTTTTCCAAGGACATCGCCATCCTGGACGATCTGCTGCCTCTGACCATCTTTGATTTCATCCAGCTGCTGCTGATCGTGATCGGAGCA
ATCGCAGTGGTGGCCGTGCTGCAGCCTTACATCTTCGTGGCCACAGTGCCAGTGATCGTGGCCTTTATCATGCTGCGCGCCTATTTCCTGCAGACCAGCCAG
CAGCTGAAGCAGCTGGAGAGCGAGGGCCGGTCCCCTATCTTTACACACCTGGTGACCTCCCTGAAGGGACTGTGGACACTGAGGGCCTTCGGCCGGCAGCCA
TACTTTGAGACCCTGTTCCACAAGGCCCTGAACCTGCACACAGCCAATTGGTTTCTGTATCTGAGCACCCTGCGCTGGTTTCAGATGCGGATCGAGATGATC
TTCGTGATCTTTTTCATCGCCGTGACCTTCATCTCCATCCTGACAACCGGAGAGGGAGAGGGAAGAGTGGGAATCATCCTGACACTGGCCATGAACATCATG
TCTACCCTGCAGTGGGCCGTGAATTCCTCTATCGACGTGGATAGCCTGATGAGATCTGTGAGCAGGGTGTTTAAGTTCATCGACATGCCCACAGAGGGCAAG
CCTACAAAGAGCACCAAGCCATACAAGAACGGCCAGCTGTCCAAAGTGATGATCATCGAGAATTCTCACGTGAAGAAGGACGATATCTGGCCATCCGG (서열 식별 번호: 103)

[0138] 바람직하게는 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일부 측면에서, 프로모터는 구성적(constitutive) 프로모터, 선택적으로 절단된 거대세포바이러스 즉시/조기(cytomegalovirus immediate/early)(CMVie) 인핸서/프로모터이며 인간 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 다른 측면에서, 프로모터는 조직 특이적 프로모터이며, 바람직하게는 프로모터가 폐 세포에서 핵산의 우선적 발현을 유도(direct)하고 인간 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 바람직한 실시 양태에서, 프로모터는 절단된 CMVie 프로모터이며 인간 CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된다. 특히 바람직한 실시 양태에서, CMVie 프로모터는 다음 서열 또는 이와 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98% 또는 적어도 99% 동일한 서열을 갖는 CMV173이다:

[0139] ACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCC
CGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGT (서열 식별 번호: 104)

[0140] 특히 바람직한 실시 양태에서, rAAV 벡터는 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 5'로부터 3'에: (a) AAV2 말단 반복부, (b) 프로모터, (c) 인간 낭포성 섬유증 막관통 전도도 조절자

(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)(CFTR) 단백질 또는 인간 CFTR 단백질 서열의 아미노산 708-759가 결여된 생물학적으로 활성인 절단된 CFTR 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열, (d) 폴리아데닐화 서열 및 (e) AAV2 말단 반복부를 포함하는 핵산을 포함한다.

[0141] 일부 측면에서, 대상체에게 낭포성 섬유증의 하나 이상의 특성을 개선하는 데 효과적인 양의 rAAV가 투여되는데, 이의 비제한적인 예로는 상부 및 하부 기도 염증, 비정상적인 상피 사이토카인 신호 전달 및 상승된 IgE 수준이 있다. 다른 측면에서, 본원에 낭포성 섬유증과 관련된 폐 질환을 치료하는 방법이 제공되며, 여기에는 상기도 질환, 하부 기도 질환, 비인두 질환, 부비동염 및/또는 낭포성 섬유증과 관련된 타액선 질환이 포함되지만 이에 국한되지는 않으며, 이는 대상체에게 (i) HDITKNI (서열 식별 번호: 12), NQDYTKT (서열 식별 번호: 13), DNTVTRS (서열 식별 번호: 14), SNSVQSI (서열 식별 번호: 15), NSTRHTD (서열 식별 번호: 16), TNRTSPD (서열 식별 번호: 17), ISDQTKH (서열 식별 번호: 18), QADTTKN (서열 식별 번호: 19), NAVKTDF (서열 식별 번호: 20), TNQTLSA (서열 식별 번호: 21), ENRTTSN (서열 식별 번호: 22), PQQDTTH (서열 식별 번호: 23), NATNHVI (서열 식별 번호: 24), TNNSKPD (서열 식별 번호: 25), SKLTLNN (서열 식별 번호: 26), VTAGMGA (서열 식별 번호: 27), PNSTTNN (서열 식별 번호: 28), NSTSRID (서열 식별 번호: 29), VASHTNN (서열 식별 번호: 30), RSHQEIP (서열 식별 번호: 31), LNTTKDI (서열 식별 번호: 32), IIDATKN (서열 식별 번호: 33), NHISQTN (서열 식별 번호: 34), SNSAHIT (서열 식별 번호: 35), STHQSNN (서열 식별 번호: 36), KTPNLTS (서열 식별 번호: 37), SNTPALS (서열 식별 번호: 38), SPGATTN (서열 식별 번호: 39), LAHDITKNIA (서열 식별 번호: 40), LANQDYTKTA (서열 식별 번호: 41), LADNTVTRSA (서열 식별 번호: 42), LASNSVQSIA (서열 식별 번호: 43), LANSTRHTDA (서열 식별 번호: 44), LATNRTSPDA (서열 식별 번호: 45), LAISDQTKHA (서열 식별 번호: 46), LAQADTTKNA (서열 식별 번호: 47), LANAVKTDFA (서열 식별 번호: 48), LATNQTLSAA (서열 식별 번호: 49), LAENRTTSNA (서열 식별 번호: 50), LAPQQDTTHA (서열 식별 번호: 51), LANATNHVIA (서열 식별 번호: 52), LATNNSKPDA (서열 식별 번호: 53), LASKLTLNNA (서열 식별 번호: 54), LAVTAGMGAA (서열 식별 번호: 55), LAPNSTTNNA (서열 식별 번호: 56), LANSTSRIDA (서열 식별 번호: 57), LAVASHTNNA (서열 식별 번호: 58), LARSHQEIPA (서열 식별 번호: 59), LALNTTKDIA (서열 식별 번호: 60), LAIIDATKNA (서열 식별 번호: 61), LANHISQTNA (서열 식별 번호: 62), LASNSAHITA (서열 식별 번호: 63), LASTHQSNNA (서열 식별 번호: 64), LAKTPNLTSA (서열 식별 번호: 65), LASNTPALSA (서열 식별 번호: 66) 및 LASPGATTNA (서열 식별 번호: 67)로부터 선택된 펩타이드 삽입을 포함하거나, 이로 구성되거나, 또는 본질적으로 이로 구성되는 캡시드 단백질 및 (ii) 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 인간 낭포성 섬유증 막관통 전도도 조절자(CFTR) 단백질 또는 인간 CFTR 단백질 서열의 아미노산 708-759가 결여된 생물학적으로 활성인 절단된 CFTR 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하는 감염성 rAAV의 치료적 유효량이 투여되는 단계를 포함한다.

[0142] 대상체 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 본 발명의 rAAV 유전자 치료 벡터는 다양한 수단에 의해 환자에게 투여되어 표적 세포(예를 들어, 상부 기도 세포)에서 유전자 산물(예를 들어, CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분)의 치료적으로 효과적인 수준을 달성하고 유지할 수 있다. 일부 측면에서, 감염성 rAAV는 대상체(예를 들어, 낭포성 섬유증이 있는 대상체)에게 하나 이상의 투여량으로 투여되며, 각 투여량은 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{15} 벡터 게놈(vector genome)(vg), 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{14} vg, 약 1×10^{14} 내지 약 1×10^{15} vg, 또는 약 1×10^{15} 과 약 5×10^{15} vg 사이를 포함한다. 일부 바람직한 측면에서, 각 투여량은 약 1×10^{14} vg 또는 약 1×10^{15} vg의 rAAV를 포함한다. 다른 측면에서, 약 10^{12} 내지 10^{14} 벡터 게놈(vg)/kg의 rAAV의 적어도 한 번의 투여량은 폐 질환을 치료하기 위해 대상체에게 투여된다. 관련된 측면에서, 대상체에게 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{14} vg/kg, 약 1×10^{12} 내지 약 9×10^{13} vg/kg, 약 1×10^{12} vg/kg 내지 약 9×10^{12} vg/kg, 바람직하게는 약 2×10^{12} vg/kg 내지 약 3×10^{12} vg/kg, 더 바람직하게는 약 2.6×10^{12} vg/kg, 약 2.7×10^{12} vg/kg, 약 2.8×10^{12} vg/kg, 약 2.9×10^{12} vg/kg, 약 3.0×10^{12} vg/kg 또는 약 3.1×10^{12} vg/kg이 투여된다.

[0143] 일부 측면에서, 치료는 대상체에게 단일 용량 투여를 넘지 않으며 유전자 산물(예를 들어, CFTR 또는 이의 생물학적으로 활성인 부분)의 지속적이고 유지되는 치료 농도를 달성하는 데 효과적이다. 관련 측면에서, 치료는 대상체 변이체 캡시드 단백질과 유전자 산물을 인코딩하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV의 약 1×10^{13} 내지 약 1×10^{15} 플라크 형성 단위(plaque forming unit)(pfu), 바이러스 입자(virus particle)(vp) 또는 바이러스 게놈(vg)을 인간(예를 들어, 낭포성 섬유증이 있는 인간)에게 흡입하여 단일 용량 투여를 넘지 않는 것을 포함한다. 다른 측면에서, 용량 치료는 다중 용량 일정일 수 있다. 인간에게 AAV 벡터를 투여하는 것과 관련된 방법은 이

전에 Kay et al.(2000, Nat Genet 24:257-261)에 의해 기술되었으며, 이의 전체 내용은 참조로 본원에 포함된다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 감염성 rAAV는 폐, 기관지내, 비강내, 기관내 및/또는 기관지내 투여에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 바람직한 실시 양태에서, 감염성 rAAV는 rAAV를 포함하는 에어로졸 현탁액의 흡입에 의해 투여된다(예를 들어, 분무기를 통해).

[0144] 본 발명의 목적을 위해, 본원에 개시 내용은 상기 기술한 바와 같은 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 단리된 핵산을 제공한다. 단리된 핵산은 AAV 벡터, 예를 들어 재조합 AAV 벡터일 수 있다.

[0145] 본원에 개시 내용은 제한 없이, 대상체 핵산을 포함하는 단리된(유전자적으로 변형된) 숙주 세포와 같은 숙주 세포를 추가로 제공한다. 본 발명에 따른 숙주 세포는 시험관 내 세포 배양으로부터의 세포와 같은 단리된 세포일 수 있다. 이러한 숙주 세포는 본원에 설명된 바와 같이 대상체 rAAV 변이체 비리온을 생성하는 데 유용하다. 일 실시 양태에서, 이러한 숙주 세포는 핵산으로 안정적으로 유전자적으로 변형된다. 다른 실시 양태에서, 숙주 세포는 핵산으로 일시적으로 유전자적으로 변형된다. 이러한 핵산은 전기천공, 인산칼슘 침전, 리포좀 매개 형질감염 등을 포함하되 이에 국한되지 않는 확립된 기술을 사용하여 숙주 세포에 안정적으로 또는 일시적으로 도입된다. 안정적인 형질전환을 위해, 핵산은 일반적으로 선택 가능한 마커, 예를 들어 네오마이신 내성과 같은 여러 잘 알려진 선택 가능한 마커 중 하나를 추가로 포함할 것이다. 이러한 숙주 세포는 핵산을 다양한 세포, 예를 들어 뮤린 세포를 포함한 포유류 세포 및 영장류 세포(예를 들어, 인간 세포)에 도입하여 생성된다. 예시적인 포유류 세포에는 일차 세포 및 세포주가 포함되지만 이에 국한되지 않으며, 예시적인 세포주에는 293 세포, COS 세포, HeLa 세포, Vero 세포, 3T3 마우스 섬유아세포, C3H10T1/2 섬유아세포, CHO 세포 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 예시적인 숙주 세포에는 HeLa 세포(예를 들어, American Type Culture Collection(ATCC) 번호 CCL-2), CHO 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL9618, CCL61, CRL9096), 293 세포(예를 들어, ATCC 번호, CRL-1573), Vero 세포, NIH 3T3 세포(예를 들어, ATCC 번호 CRL-1658), Huh-7 세포, BHK 세포(예를 들어, ATCC 번호 CCL10), PC12 세포(ATCC 번호 CRL1721)), COS 세포, COS-7 세포(ATCC 번호 CRL1651), RAT1 세포, 마우스 L 세포(ATCC 번호 CCL1.3), 인간 배아 신장(human embryonic kidney)(HEK) 세포(ATCC 번호 CRL1573), HLHepG2 세포 등이 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 숙주 세포는 또한 AAV를 생성하는 Sf9 세포와 같은 곤충 세포를 감염시키기 위해 바큘로바이러스를 사용하여 만들어질 수 있다(예를 들어, 미국 특허 번호 7,271,002; 미국 특허 출원 일련 번호 12/297,958 참조). 일부 실시 양태에서, 유전자적으로 변형된 숙주 세포는 상기기술된 바와 같이 변이체 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산에 더하여, 하나 이상의 AAV rep 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함한다. 다른 실시 양태에서, 숙주 세포는 추가로 rAAV 변이체 벡터를 포함한다. rAAV 변이체 비리온은 이러한 숙주 세포를 사용하여 생성될 수 있다. rAAV 비리온을 생성하는 방법은 예를 들어, 미국 특허 공개 번호 2005/0053922 및 미국 특허 공개 번호 2009/0202490에 기술되어 있다.

[0146] 본원에 개시된 변이체 rAAV 벡터의 일부 실시 양태에서, 관심 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 구성적 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 적합한 구성적 프로모터에는 예를 들어, 거대세포바이러스 프로모터(cytomegalovirus promoter)(CMV)(Stinski et al, (1985) Journal of Virology 55(2): 431-441), CMV 초기 인핸서/닭 β-액틴(CMV early enhancer/chicken β-actin)(CBA) 프로모터/토끼 β-글로빈 인트론(rabbit-β-globin intron)(CAG)(Miyazaki et al. (1989) *Gene* 79(2): 269-277, C^{SB} (Jacobson et al.(2006) *Molecular Therapy* 13(6): 1074-1084), human elongation factor 1α promoter (EF1α) (Kim et al. (1990) *Gene* 91(2): 217-223), 인간 연장 인자 1α 프로모터(human elongation factor 1α promoter)(EF1α)(human elongation factor 1α promoter), 인간 인산글리세르산 키나제 프로모터(human phosphoglycerate kinase promoter)(PGK)(Singer-Sam et al. (1984) *Gene* 32(3): 409-417, mitochondrial heavy-strand promoter (Loderio et al. (2012) *PNAS* 109(17): 6513-6518), 유비퀴틴 프로모터(ubiquitin promoter)를 포함한다. 다른 실시 양태에서, 관심 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 유도성 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 어떤 경우에, 관심 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 조직 특이적 또는 세포 유형 특이적 조절 요소에 작동 가능하게 연결된다. 예를 들어, 어떤 경우에, 관심 유전자 산물을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열은 폐 특이적 조절 요소, 예를 들어, 폐 세포에서 작동 가능하게 연결된 유전자의 선택적 발현을 부여하는 조절 요소에 작동 가능하게 연결된다. 폐 특이적 프로모터에는 제한 없이, 표면활성제 단백질 B(surfactant protein B)(SPB) 유전자 프로모터 및 표면활성제 단백질 C(surfactant protein C)(SPC) 프로모터가 포함된다.

[0147] 또한, 본원에 다음을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다: a) 대상체 변이체 AAV 캡시드 단백질 및 하나 이상의

유전자 산물을 인코딩하는 이종성 핵산을 포함하는 rAAV; 및 b) 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 완충액. 일부 바람직한 실시 양태에서, 핵산은 치료 유전자를 인코딩하고/하거나 간섭 RNA를 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 일부 실시 양태에서, 약학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 또는 완충액은 인간 또는 비인간 환자에게 사용하기에 적합하다. 이러한 부형제, 담체, 희석제 및 완충액에는 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 모든 약학적 제제(pharmaceutical agent)가 포함된다. 약학적으로 허용 가능한 부형제에는 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체가 포함되지만 이에 국한되지 않는다. 약학적으로 허용 가능한 염은 예를 들어, 염산염, 브롬화물, 인산염, 황산염 등과 같은 무기산 염 및 아세트산염, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조산염 등과 같은 유기산의 염을 포함할 수 있다. 또한, 습윤제 또는 유화제, 계면활성제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 이러한 비히클(vehicle)에 존재할 수 있다. 광범위한 약학적으로 허용 가능한 부형제가 당해 기술 분야에 알려져 있으므로 본원에서 자세히 논의할 필요가 없다. 약학적으로 허용 가능한 부형제는 다양한 출판물 예를 들어, A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy," 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems (1999) H. C. Ansel et al., eds., 7^{th} ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., eds., 3^{rd} ed. Amer. Pharmaceutical Assoc.에 충분히 기술되어 있다.

[0148] 일부 실시 양태에서, 약학적 조성물은 1×10^{8} 내지 1×10^{15} 벡터 입자 또는 벡터 게놈, 1×10^{10} 내지 1×10^{13} 벡터 입자 또는 벡터 게놈, 또는 약 1×10^{10}, 약 2×10^{10}, $3x\ 10^{10}$, 약 4×10^{10}, 약 5×10^{10}, 약 6×10^{10}, 약 7×10^{10}, 약 8×10^{10}, 약 9×10^{10}, 약 1×10^{11}, 약 2×10^{11}, 약 3×10^{11}, 약 4×10^{11}, 약 5×10^{11}, 약 6×10^{11}, 약 7×10^{11}, 약 8×10^{11}, 약 9×10^{11}, 약 1×10^{12}, 약 2×10^{12}, 약 3×10^{12}, 약 4×10^{12}, 약 5×10^{12}, 약 6×10^{12}, 약 7×10^{12}, 약 8×10^{12}, 약 9×10^{12} 또는 약 1×10^{13} 벡터 입자 또는 벡터 게놈을 포함한다. 일부 측면에서, 약제적 조성물은 약 1×10^{11} 내지 약 1×10^{12} 벡터 입자 또는 벡터 게놈을 포함한다.

[0149] **실시예**

[0150] 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 실시 양태를 설명하며, 어떤 식으로든 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다. 본 발명은 바람직한 실시 양태와 관련하여 기술되었지만, 본 출원을 읽으면 해당 분야의 숙련자에게 다양한 수정이 명백할 것이다.

[0151] **실시예 1**

[0152] 유도 진화 스크린을 사용하여 비인간 영장류(non-human primate)(NHP)에 기관 내 에어로졸을 투여한 후 영장류 폐의 보다 효율적인 형질도입과 영장류 폐 상부 기도 세포로의 향상된 유전자 전달 효율을 부여시킬 수 있는 AAV 캡시드 변이체를 식별했다. 선택 과정에는 *생체 내(in vivo)* NHP 폐와 *시험관 내(in vitro)* 인간 폐 배양물로의 전달의 사용을 통합했다.

[0153] 방법

[0154] 치료 벡터 진화(Therapeutic Vector Evolution)

[0155] 에어로졸 투여 후 영장류 폐의 상부 기도 세포에 광범위하게 형질도입할 수 있는 AAV 캡시드 변이체를 발견하기 위해 유도 진화 과정이 적용되었다(**도 1**). 간단히 말해, 약 10억 개의 고유한(unique) 합성 변이체 AAV 캡시드 시퀀스의 라이브러리가 다양한 분자 생물학 기술과 여러 가지 다른 AAV 혈청형을 템플릿으로 사용하여 37개의 다른 독점(proprietary) 하위 라이브러리에서 생성되었다. 라이브러리는 HEK293T 세포에 패키징되어 각 바이러스 입자가 동일한 캡시드를 인코딩하는 바이러스 게놈을 둘러싼 합성 캡시드 껍질로 구성되도록 바이러스 입자를 생성했다. 그런 다음 라이브러리 내의 변이체는 임상 유전자 요법 치료를 모방하기 위해 NHP 및 인간 세포 배양물에서 *생체 내* 및 *시험관 내* 선택적 압력 기술을 거쳤다. 모든 합성 라이브러리는 첫 번째 선택 라운드에 주사되었다. 폐 조직 또는 세포 배양물에서 DNA를 수확한 후, 조직에서 증폭된 캡시드의 게놈은 다음 선택 라운드의 시작 라이브러리로 위와 같이 패키징되었다. 이 절차는 총 5회 사이클 동안 수행되었다.

[0156] 다음의 특정 선택 기준이 충족될 경우 모티프(motif)는 "히트"로 선언되었다: (1) 모티프가 선택의 두 개 이상의 연속 라운드에서 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타냄 또는 (2) 모티프가 선택의 한 개 이상의 라운드에서 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타냄.

[0157] 모델 시스템이 *생체 내* NHP에서 *시험관 내* 근위(proximal) 기도 기관형(organotypic) 배양으로 전환된 시점은 NHP 전달의 두 번째 및 세 번째 라운드 이후에 수행된 시퀀싱 분석 결과를 기반으로 했다(**도 2**). 간단히 말해, *시험관 내* 인간 ALI 모델 시스템으로의 전환은 다음과 같은 경우에 발생했다: (1) 가장 빈번한 Hit가 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타내고 (2) 시퀀싱된 클론의 특정 백분율 미만이 고유한 시퀀스를 나타냄.

[0158] 다음 선택 완료 기준이 충족될 때 선택이 완료된 것으로 간주되었다: 라운드에서 2개 미만의 새로운 "Hit"가 식별되고 (1) 결합된 "Hit"가 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타내거나 (2) 단일 "Hit"가 개체군의 특정 백분율을 나타냄.

[0159] 세포주 및 라이브러리 생산

[0160] HEK293T 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA)에서 얻었다. 세포는 10% 소 태아 혈청(FBS; Gibco, Carlsbad, CA)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Invitrogen, Carlsbad, CA)이 보충된 Dulbecco의 변형 Eagle 배지에서 37℃및 5% CO_2에서 배양했다. 바이러스 라이브러리는 삼중 형질감염을 사용하여 HEK293T 세포에서 생산되었고, 바이러스는 요오드산올(iodizanol) 구배 원심분리[19,21]와 아미콘(Amicon) 여과로 정제했다. DNase-저항성 게놈 역가는 이전에 기술된 바와 같이 정량적 PCR(quantitative PCR)(qPCR)을 통해 결정했다.[19,21]

[0161] 기관내 주사 및 조직 수확

[0162] 선택의 각 라운드에 대해, 4-6세 사이의 5.5-7.1kg 사이의 체중을 가진 수컷 시노몰구스 원숭이(cynomolgus macaque)(*Macaca fascicularis*) 한 마리에게 투여했다. 동물은 근육 내(intramuscularly)(IM)로 전달된 10mg/kg 케타민과 15μg/kg 덱스메데토미딘으로 마취되었다. 라이브러리 5mL를 1.75mg/mL의 인간 정맥 내 면역글로불린(human intravenous immunoglobulin)(IVIG)과 사전-혼합하여 아래에 설명된 대로 투여했다. 각 동물에게 5mm 기관 내 튜브를 삽관했고, 튜브 끝은 쇄골 수준(쇄골융기부 위 약 5cm)에 위치했으며, 형광 투시 검사를 통해 위치를 확인했다. 동물은 투여를 위해 앉은 자세로 의자에 위치시켰다.

[0163] 선택의 첫 번째 라운드에 대해, 분무기 장치를 기관 내 튜브의 원위부(dislal end)에 연결하고, 조류용 호흡기를 사용하여 20cm H_2O의 압력으로 15±1 호흡/분의 속도로 호흡을 전달했다. 선택의 두 번째 및 세 번째 라운드에서, AeroEclipse II 분무기 장치를 기관 내 튜브의 원위부에 연결하고, 조류용 호흡기를 사용하여 15-20cm H_2O의 압력으로 12-24 호흡/분의 속도로 호흡을 전달했다. 투여가 완료된 후, 각 동물에서 튜브를 제거하고 진정을 역전시키기 위해 0.15mg/kg 아티파메졸을 근육 내(IM) 주사했다. 동물은 마취에서 완전히 회복될 때까지 시각적으로 모니터링한 후 홈 케이지로 돌아갔다.

[0164] 안락사는 15±1일째에 정맥 주사로 100mg/kg 펜토바르비탈 나트륨을 투여하여 훈련된 수의과 직원에 의해 수행되었다. 기관을 포함한 폐는 아래에 자세히 설명된 대로 제거 및 절개되었다. DNA는 상부 기도 세포에서 단리되어 바이러스 게놈 증폭까지 -20℃에 보관되었다.

[0165] 상부 기도 상피 세포 단리

[0166] NHP 또는 인간 폐를 인산 완충 식염수(phosphate buffered saline)(PBS; Gibco, Carlsbad, CA)로 세척하여 과도한 점막 분비물과 잔류 혈액을 제거했다. 기관과 1차, 2차, 3차 기관지를 폐 실질 조직에서 단리했다. 과도한 지지 조직과 림프절을 제거했다. 기관과 기관지를 2-4cm 크기로 잘라 효소 용액에 넣어 상피 세포를 제거했다(Pronase, 1.4 mg/mL 및 DNase, 0.1 mg/mL). 기관과 1차 기관지를 함께 처리하고 2차 및 3차 기관지 세포 용액을 4℃에서 48시간 동안 배양했으며, 하루에 두 번 튜브 자리바꿈(inversion)을 했다. 효소는 총 부피의 최대 10%까지 FBS를 첨가하여 비활성화했다. 그런 다음 절편을 세로로 자르고 연골에서 상피 내벽을 긁어냈다. 세포를 수집하여 300 x g에서 10분 동안 원심분리했다. 세포 펠릿을 PBS로 두 번 헹구었다. 펠릿을 5% FBS가 포함된 보충제가 포함된 기도 상피 세포 기저 배지(ATCC, Manassas, Virginia)에 재현탁하고, 세포를 조직 배양 처리된 10cm 접시에 플레이팅하여 섬유아세포가 부착되도록 하여, 기도 상피 세포에 대한 세포 단리를 더욱 정제했다. 접종 2~4시간 후, 부착되지 않은 세포가 있는 배지를 수집하여 300 x g에서 10분 동안 원심분리했다. 펠릿화된 세포를 용해하여 라이브러리 DNA를 추출하거나 PBS에 재현탁하고, 계수하여 *시험관 내* 선택 라운드를 위해 접종했다.

[0167] 시험관 내 라이브러리 형질도입

[0168] 인간 ALI 배양물은 인간 태반 콜라겐, 유형 IV(Sigma)에 접종한 후 30일 후에 형질도입되었다. 형질도입 당일에

3개의 삽입물(insert)을 Trypsin-EDTA 0.05%(ThermoFisher)와 함께 37℃에서 10분 동안 배양했다. 트립신(Trypsin)은 Defined Trypsin Inhibitor(ThermoFisher)로 비활성화했다. 삽입물에서 세포를 수집하여 혈구계산기로 계수했다. 삽입물당 평균 세포 수를 결정하여 삽입물당 필요한 총 바이러스 게놈을 계산했다. 배양물에서 생성된 점액은 PBS로 세척하여 바이러스 형질도입 전에 제거했다. 라운드 4에 대해 감염 다중도(MOI) 50,000, 라운드 5에 대해 10,000, 25,000 및 50,000을 사용했다. 각 라운드는 두 개의 병렬 세트로 진행되었는데, 하나는 라이브러리가 세포 투여 전 30분 동안 1:10 희석된 인간 IVIG와 사전-혼합되었고, 다른 하나는 IVIG와 사전-혼합이 없었다. 세포는 라이브러리와 함께 24시간 동안 정단에서 노출되었다. 감염 후 4일 동안 DNA를 배양물에서 단리하여 바이러스 게놈 증폭까지 -20℃에 보관했다.

[0169] DNA 정량화, DNA 증폭 및 시퀀싱 분석

[0170] DNA를 DNeasy Blood & Tissue 키트(Qiagen)를 사용하여 위에서 설명한 세포에서 단리했다. AAV 라이브러리 게놈을 디지털 드롭릿 중합효소 연쇄 반응(digital droplet polymerase chain reaction)(ddPCR)으로 정량화했다. AAV 변이체 *cap* 유전자를 PCR로 증폭했다. *cap* 유전자를 NotI 및 HindIII를 사용하여 pSub2 라이브러리 패키징 플라스미드에 삽입했다. 그런 다음 *cap* 유전자를 타사 DNA 시퀀싱 시설에서 시퀀싱했다. 시퀀싱 파일은 Geneious 소프트웨어(Biomatters)를 사용하여 분석했다.

[0171] 결과

[0172] 전달 장치 매개변수 및 상부 기도 세포 단리를 위한 파일럿 연구

[0173] Valley Biosystem의 사내 분문기와 AeroEclipse II 호흡 작동 분무기(Trudell Medical International)의 두 가지 전달 장치가 여러 임상적으로 변환 가능한 장치와의 다운스트림(downstream) 호환성을 가능하게 하기 위해 사용되었다. 두 전달 장치는 모두 Evans blue 염료를 전달하는 파일럿 연구에서 평가되어 환기 매개변수가 모든 폐엽과 폐포낭에 적절하게 분배되는지 확인했다. Valley Biosystem의 사내 분무기는 폐포 구획을 포함한 모든 폐엽에 양호한 분배를 보였으며, 종속 폐엽에서 더 강한 염색이 관찰되었다. 선택의 첫 번째 라운드와 병행하여 추가적인 방법 개발 및 기도 전달 장치 테스트를 수행하여 AeroEclipse II 호흡 작동 분무기를 성공적으로 개발하여 적용하여 삽관된 NHP에 에어로졸화된 AAV 입자를 전달했다. 염색 분포 연구를 통해 두 개의 두개엽(cranial lobe)을 포함한 6개의 NHP 폐엽 모두에 대한 우수하고 비의존적인 전달이 확인되었다. 그런 다음 AeroEclipse II 분무기가 선택의 라운드 2와 3에 사용되었다.

[0174] 총 6개의 NHP 폐를 사용하여 상부 기도 세포 단리 프로토콜을 최적화했다. 프로토콜 최적화를 통해 치료 벡터 진화 중에 사용된 세 세트의 NHP 폐 모두에서 단리된 기관 및 1차, 2차, 3차 기관지의 높은 세포 수율과 순도의 결과를 가져왔다.

[0175] 라이브러리 생성 및 생산

[0176] 치료 벡터 진화 프로그램의 라운드 1을 시작하기 전에, 모든 37개의 캡시드 라이브러리가 합성, 제조 및 특성화되었다. **도 3a**에 표시된 바와 같이, 플라스미드 라이브러리의 다양성은, > 10억 개의 유전적 변이체 시퀀스의 총 다양성에 대해 라이브러리당 약 $1x10^{6}$에서 > $1x10^{8}$개의 고유한 변이체를 포함하는 것으로 추정되었다. 이는 AAV 변이체의 고품질, 매우 다양한 시작 라이브러리를 나타낸다. 다음으로, 각 개별 라이브러리의 생산은 선택의 첫 번째 라운드에 충분한 재료를 생성하기 위해 완료되었다. **도 3b**에 표시된 바와 같이, 모든 라이브러리는 *생체 내* 치료 벡터 진화 선택을 위한 재료를 생산하기에 충분한 수준으로 제조되었다. 생산 후 및 라이브러리 투여 전에, 모든 라이브러리의 시퀀스는 비기능적 돌연변이(즉, 프레임시프트 돌연변이 또는 종료 코돈)의 존재와 Sanger 시퀀싱에 의한 고유한 시퀀스의 빈도에 대해 평가되었다. 대부분 라이브러리는 비기능적 돌연변이의 빈도가 최소였으며, 모든 라이브러리는 NHP에 대한 첫 번째 라운드의 투여에 통합되었다.

[0177] NHP 폐로의 에어로졸 전달

[0178] 선택의 첫 번째 라운드에 대해 모든 라이브러리를 결합하여 Valley Biosystems의 사내 분무기 시스템을 사용하여 단일 용량 에어로졸 투여를 통해 단일 NHP에 성공적으로 투여했다. 투여 전에 라이브러리를 1.75mg/mL 인간 IVIG와 배양했다. 이는 인간 NAb의 높지만 생리학적으로 관련성 있는 폐 점액 농도를 나타낸다. 투여된 라이브러리 용량 1.7×10^{12} vg는 제조 고려 사항을 기반으로 현재 가능한 최대 용량보다 약 100배 낮은 용량을 나타낸다. 따라서 이는 기관과 기관지에서 상부 기도 세포를 형질도입할 수 있는 벡터를 발견할 수 있는 엄격한 선택적 압력을 나타낸다. NHP 폐는 투여 후 2주 후에 수확했다. 세포는 별도의 기관/1차 기관지 및 2차/3차 기관지 샘플에서 폐에서 단리되었고 DNA는 세포에서 단리되었다. 두 영역 모두에서 높은 총 세포 수율과 아세틸화된 튜

불린+ 세포의 높은 개체군이 얻어졌다. 이 과정은 점점 더 낮은 용량의 바이러스 라이브러리를 사용하여 두개의 추가 라운드를 위해 반복되었다.

[0179] 선택의 각 라운드에서 DNA 단리 후, AAV 바이러스 라이브러리 게놈을 ddPCR로 정량화하여 관심 세포 유형에 라이브러리 벡터가 성공적으로 국소화되었는지 확인했다. 각 라운드에서 투여한 낮은 용량에 상응하는 상부 기도에 존재하는 바이러스 게놈의 양에 있어서 용량 의존적 감소가 있었다(**도 4**).

[0180] ddPCR에 의한 정량화 외에도, 조직에서 캡시드 유전자를 증폭하는 것은 라이브러리 벡터를 관심 세포 유형으로 성공적으로 국소화한 것을 나타낸다. NHP에서 선택의 각 라운드에서 증폭된 캡시드는 시퀀스 분석을 위해 AAV 라이브러리 패키징 플라스미드로 클로닝되었고 선택의 이후 라운드를 개시했다. 라이브러리 내의 개별 클론에 대한 시퀀싱을 수행하여 개체군 내의 변이체의 빈도를 확인했다. 각 라운드의 기관/1차 기관지 및 2차/3차 기관지 샘플에서 최소 90개의 클론에 대한 시퀀싱을 수행했다. 변이체는 시퀀싱 데이터 내의 모티프의 존재에 대해 평가됐다. 변이체는 여러 시퀀스에서 발생한 통일된 변이(예를 들어, 캡시드 내의 일관된 위치에 있는 특정 점돌연변이 또는 특정 펩타이드 삽입 시퀀스)의 존재를 기반으로 모티프로 그룹화됐다. 모티프는 선택의 두 개 이상의 연속된 라운드에서 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타내거나, 선택의 한 개 이상의 라운드에서 시퀀싱된 개체군의 특정 백분율을 나타낼 경우 Hit로 지정되었다.

[0181] 기관/1차 기관지 영역 내의 두 모티프(Point Mut. #1, Peptide Insertion #1(서열 식별 번호: 40))와 2차/3차 기관지 영역 내의 한 모티프(Peptide Insertion #2(서열 식별 번호: 41))가 *생체 내* 라운드 3에 따라 Hit로 지명되었다(**도 5**). 또한, 관심 있는 두 모티프(Peptide Insertion #3(서열 식별 번호: 42), Peptide Insertion #4(서열 식별 번호: 43))가 치료 벡터 진화의 추가 *시험관 내* 라운드에 따라 두 모티프 중 하나 또는 둘 다 Hit로 지명될 수 있는지 확인하기 위해 모니터링되는 모티프로 식별되었다. 기관/1차 기관지 영역의 Point Mut. #1과 2차/3차 기관지 영역의 Peptide Insertion #2가 각 영역에 대해 가장 빈번한 hit였으며, 이러한 Hit 각각은 해당 영역에 대한 시퀀싱된 AAV 개체군의 특정 백분율을 나타냈다(**도 5**). 총 시퀀싱된 개체군 내에서 시퀀싱된 AAV 클론의 특정 백분율은 고유한 AAV 시퀀스를 나타냈다. 따라서 치료 벡터 진화 프로그램의 라운드 3을 위해 수행된 시퀀싱 분석을 기반으로 모델 시스템은 나머지 선택 과정 동안 *생체 내* NHP에서 *시험관 내* 근위(proximal) 기도 기관형 배양으로 전환되었다.

[0182] 인간 ALI 배양으로의 정단 전달

[0183] 선택의 *시험관 내* 라운드 4 및 5를 위해, 3명의 인간 폐 기증자(donor)의 세포를 풀링(pool)해서 다층 공기-액체 계면(ALI) 배양의 트랜스웰 시스템에서 배양했다. 세포는 줄무늬(striated) 층을 형성하고 점액을 생성한다. 인간 *체외(ex vivo)* 폐 상피 기도 배양의 세포 배양 구성은 라이브러리 형질도입 전에 아세틸화 튜불린(섬모 세포의 마커), 사이토케라틴 5(기저 세포의 마커), 점액(배상 세포의 마커)에 대한 항체를 사용하여 면역세포화학 분석을 통해 해동 후 30일 후에 평가했다.

[0184] AAV 라이브러리는 라운드 4 및 5에 대해 각각 MOI 50,000 및 10,000에서 근위 기도 기관형 배양 시스템의 정단 쪽에 투여되었다. 선택의 *생체 내* 부분과 유사하게, *시험관 내* 각 라운드에서 DNA를 단리한 후, AAV 바이러스 라이브러리 게놈을 ddPCR로 정량화하여 관심 세포 유형에 대한 라이브러리 벡터의 성공적인 국소화를 확인했다. 선택의 *생체 내* 부분과 달리 라운드 간에 용량 의존성은 관찰되지 않았으며**(도 6a)**. 이는 *시험관 내*에서 사용된 높은 MOI 때문일 가능성이 높다. 더욱이, 인간 IVIG로 사전 배양한 것은 형질도입 후 게놈 존재에 유의한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다**(도 6b)**.

[0185] 이전과 마찬가지로, 조직에서 캡시드 유전자를 증폭하는 것은 관심 세포 유형에 대한 라이브러리 벡터의 성공적인 국소화를 나타내다. *시험관 내*에서 선택의 각 라운드에서 증폭된 캡시드는 시퀀스 분석을 위해 AAV 라이브러리 패키징 플라스미드로 다시 클로닝되었고 선택의 이후 라운드를 시작했다. 라이브러리 내의 개별 클론에서 시퀀싱을 다시 수행하여 개체군 내의 변이체 빈도를 확인했다. 각 라운드에 대해 인간 IVIG가 없는 상태와 있는 상태에서 최소 89개 클론에 대한 시퀀싱이 수행되었다.

[0186] 선택의 *생체 내* 부분 동안 식별된 Hits(Point Mut. #1, Peptide Insertion #1, Peptide Insertion #2)는 *시험관 내* 선택의 두 라운드 이후에도 비교적 높은 빈도로 유지되었다**(도 7)**. 관심 있는 변이체 중 하나(Peptide Insertion #3)는 빈도가 감소했고 Hit로 지명될 기준을 충족하지 못했다. 라운드 3 이후에 모니터링되는 다른 변이체(Peptide Insertion #4)는 라운드 4 이후에 Hit로 지명될 기준을 충족했지만 라운드 5에서도 빈도가 감소했다**(도 7)**. 라운드 4에 따라 두 개의 추가 모티프(Peptide Insertion #5(서열 식별 번호: 44), Peptide Insertion #6(서열 식별 번호: 45))가 Hit로 지명되었다. 라운드 5에서 새로운 Hit는 확인되지 않았고, 결합된

Hit는 시퀀싱된 개체군의 50% 이상을 나타냈다(**도 7**). 따라서 치료 벡터 진화 프로그램의 라운드 5에 대해 수행된 시퀀싱 분석을 기준으로 발견 프로그램이 완료된 것으로 간주되었다.

[0187] *결과*

[0188] AAV 캡시드는 분무기를 사용하여 라이브러리의 기관 내 에어로졸 투여를 1개 라운드 실시한 후 NHP에서 선택의 3개 후속 라운드에서 기관과 1차, 2차, 및 3차 기관지에서 단리된 단리된 상부 기도 세포 개체군에서 성공적으로 증폭되었다. 인간 *시험관 내* ALI 배양물은 선택의 2개 후속 라운드에 활용되었다. NHP 폐 또는 인간 ALI 배양물에서 바이러스 게놈을 성공적으로 증폭한 후 라이브러리 내의 개별 클론에서 시퀀싱을 수행했다. 개별 시퀀스는 통합 변이체의 존재에 따라 모티프로 그룹화되었고 시퀀싱 분석 내의 빈도와 변이의 다양성에 따라 평가되었다. 분석 후, 6개 변이체 시퀀스가 추가 특성화를 위해 지명된 hit로 나타났다. 이 6개 변이체(AAV102~AAV107, 서열 식별 번호: 68~73)는 AAV2 기반 캡시드로, 각각이 루프 영역에 삽입된 펩타이드와 V708I 아미노산 치환을 포함한다.

[0189] 위에 기술된 각 선택 라운드에 대한 펩타이드 삽입 모티프의 빈도 요약은 아래 표 1에 제공된다:

[0190] [표 1]

Peptide Insertion	SEQ ID NO:	Round 1 T/1°	Round 1 2/3°	Round 2 T/1°	Round 2 2/3°	Round 3 T/1°	Round 3 2/3°	Round 4 (+ IVIG)	Round 4 (- IVIG)	Round 5 (+ IVIG)	Round 5 (- IVIG)
LAHDITXNIA	40					10.78%	3.03%	9.7%	10.8%	11.7%	17.1%
LANQDYTKTA	41			0.54%		3.92%	10.10%	6.8%	8.9%	9.7%	7.6%
LADNTVTRSA	42			1.63%		5.88%	3.03%	0.5%	2.3%	2.9%	1.0%
LASNSVQSIA	43			0.54%		0.98%	7.07%	6.3%	4.2%	4.9%	3.8%
LANSTRHTDA	44					0.98%	3.03%	10.6%	4.7%	16.5%	9.3%
LATNRTSEDA	45			0.54%			1.01%	10.1%	9.9%	10.7%	15.2%
LAISDQTKHA	46		1.10%	0.54%		0.98%	4.04%		1.9%	2.9%	1.0%
LAQADTTKNA	47		1.10%			2.94%	2.02%	2.4%	3.3%	1.0%	2.9%
LANAVKTDFA	48					0.98%		1.9%	3.8%	2.9%	2.9%
LATNQTLSAA	49					1.96%	1.01%	3.9%	3.3%	3.9%	1.9%
LAENRTTSNA	50					3.92%	2.02%	3.4%	3.3%		3.8%
LAPQQDTTHA	51					0.98%	4.04%	2.4%	3.3%	4.9%	1.0%
LANATNHVIA	52					1.96%		1.0%	2.3%		1.9%
LATNNSKEDA	53							1.4%	2.3%	1.0%	
LASKLTLNNA	54			0.54%			1.01%	0.5%	0.5%		1.0%
LAVTAGMGAA	55						3.03%	1.9%	0.9%		
LAPNSTTNNA	56			0.54%		0.98%	1.01%	0.5%	1.9%		
LANSTSRIDA	57						2.02%	3.4%	1.4%	3.9%	2.9%
LAVASHTNNA	58			1.09%			4.04%	0.5%	0.5%		1.0%
LARSHQEIPA	59					1.96%	1.01%	0.5%	1.4%	1.0%	1.0%
LALNTTKDIA	60						2.02%	1.0%	0.9%	4.9%	
LAIIDATKNA	61					0.98%	1.01%	0.5%	1.9%	1.0%	4.8%
LANHISQTNA	62			0.54%		2.94%		1.4%	0.5%	1.0%	
LASNSAHITA	63					1.96%		0.5%	1.4%		
LASTHQSNNA	64			1.09%		0.98%	4.04%	1.0%	0.5%		
LAKTPNLTSA	65			1.09%		2.94%		1.0%	0.9%		1.0%
LASNTPALSA	66			0.54%		0.98%	1.01%	1.4%	1.4%		1.9%
LASPGATTNA	67							1.4%	0.9%	1.0%	

[0191]

[0192] T/1° = 기관/1차 기관지(trachea/primary bronchi)

[0193] 2/3° = 2차/3차 기관지(secondary/tertiary bronchi)

[0194] IVIG = 인간 정맥 면역글로불린(human intravenous immunoglobulin) (1:10)

[0195] 유도 진화 스크린에서 식별된 시퀀싱된 클론은 펩타이드 삽입만 있는 변이체 캡시드(예를 들어, 서열 식별 번호: 40, 41, 42, 43, 44 또는 45)을 포함하고 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2와 동일하며, 다양한 아미노산 치환과 조합된 펩타이드 삽입이 있는 변이체 캡시드도 포함한다. 유도 진화 스크린에서 식별된 시퀀싱된 클론에서 표 1의 삽입 펩타이드와 조합하여 허용되는 아미노산 치환(서열 식별 번호: 2에 대한 넘버링)의 요약은 표 2에 제공된다(각 경우에서, 변이체 AAV 캡시드 단백질은 다른 면에서는 서열 식별 번호: 2와 동일함):

[0196] [표 2]

Insertion	SEQ ID NO	Substitution(s)	Insertion	SEQ ID NO	Substitution(s)
LAHDITKNIA	40	V708I	LAQADTTKNA	47	S109T
LAHDITKNIA	40	E99D + V708I	LAQADTTKNA	47	R585K
LAHDITKNIA	40	E347D	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	K532E + V708I	LAQADTTKNA	47	R103L + K532E
LAHDITKNIA	40	D283E + V708I	LAQADTTKNA	47	E133D
LAHDITKNIA	40	G18E + G220R + V708I	LAQADTTKNA	47	T491I + K532E
LAHDITKNIA	40	T138R	LAQADTTKNA	47	R585K + V708I
LAHDITKNIA	40	R37L + H38Q + V708I	LANAVKTDFA	48	D608N + V708I
LANQDYTKTA	41	V708I	LANAVKTDFA	48	Q120H + V708I
LANQDYTKTA	41	N449D + D472N + V708I	LAENRTTSNA	50	V708I
LANQDYTKTA	41	P436H	LAENRTTSNA	50	T138R
LANQDYTKTA	41	K544E	LAENRTTSNA	50	S109T
LANQDYTKTA	41	K532E + V708I	LAENRTTSNA	50	S109T + V708I
LANQDYTKTA	41	P250S + V708I	LARSHQEIPA	59	G376A + V708I
LANQDYTKTA	41	S109T + N312K + H641N + V708I	LAIIDATKNA	61	T138R + G376A + Q428H + V708I
LANQDYTKTA	41	N705S + V708I	LATNNSKPDA	53	K532E
LANQDYTKTA	41	K532E + K688R + V708I	LATNNSKPDA	53	V118A + M371I
LANQDYTKTA	41	P451Q + A593E + V708I	LANSTSRIDA	57	K532E + V708I
LASNSVQSIA	43	D213Y + V708I	LASPGATTNA	67	Y6F
LASNSVQSIA	43	T200I	LAISDQTKHA	46	E134Q + P135A + V136G + K137E + V708I
LASNSVQSIA	43	T344S + E347D			
LASNSVQSIA	43	V708I			
LADNTVTRSA	42	V708I			
LANSTRHTDA	44	L91I			
LANSTRHTDA	44	P30L + A593E + V708I			
LANSTRHTDA	44	P250S + V708I			
LANSTRHTDA	44	V708I			
LATNQTLSAA	49	R103C + V708I			
LATNQTLSAA	49	V118A + V708I			
LAPQQDTTHA	51	S109T + V708I			
LAPNSTTNNA	56	S16Y + V708I			
LAPQQDTTHA	51	N469D + V708I			
LATNRTSPDA	45	A591D + V708I			
LATNRTSPDA	45	V708I			

[0197]

[0198] **실시예 2**

[0199] 상기 식별된 6개 변이체 캡시드 서열(AAV102-AAV107; 서열 식별 번호: 68-73)은 상부 기도 상피 세포 형질도입에 대한 선호도(preference)를 나타내며, 다양한 범위의 감염 다중도(MOI)에서 비인간 영장류(NHP) 및 인간 *체외* 폐 상부 기도 공기-액체 계면(ALI) 배양물에서 *시험관 내*에서 특성화되었다.

[0200] 간략히 말해서, 재조합 AAV(rAAV)가 제조되었으며, 각각은 리포터 카세트를 함유하는 AAV102-AAV107의 *cap* 변이체 서열을 포함하며, 유비쿼터스 프로모터(CMV 인핸서, 닭(chicken) 베타-액틴 프로모터 및 토끼(rabbit) 베타-글로빈 스플라이스 수용체 부위, CAG)가 EGFP를 구동한다. 6개 변이체 AAV 캡시드, AAV101 및 천연 혈청형 AAV2 및 AAV5의 형질도입은 12,500, 25,000, 50,000 및 100,000의 4개 감염 다중도에서 *시험관 내*에서 평가되었다.

[0201] *시험관 내* 기관형 ALI 배양물에서 기도 상피의 향상된 형질도입을 위해 설계된 1세대 캡시드 변이체(AAV101)는 자연적으로 발생하는 AAV 캡시드보다 우수한 것으로 나타났다(미국 특허 공개 번호 2021/0395772의 서열 식별 번호: 12 참조, 그 내용은 본원에 참조로 포함됨). 그러나, 낭포성 섬유증(cystic fibrosis)(CF)에서 임상적 이

점을 달성하기에 충분한 수준에서 *시험관 내* 및 *생체 내* 모두에서 효율적으로 형질도입할 수 있는 벡터를 식별하기 위해 추가적인 발견이 수행되었다.

[0202] 방법

[0203] AAV 제조

[0204] 변이체 캡시드 단백질 AAV101-AAV107과 천연 혈청형 AAV2 및 AAV5를 포함하는 rAAV는 상업적으로 이용 가능한 형질감염 시약과 플랫웨어(flatware)에서 배양된 인간 배아 신장 293(HEK293) 세포를 활용한 삼중 플라스미드 형질감염 공정으로 생산되었다. 형질감염된 세포는 상층액과 함께 수확한 다음, 뉴클레아제로 처리하고 0.2㎛ 필터를 통해 정제했다. 정제된 수확물은 친화성 크로마토그래피(AVB Sepharose HP, Cytiva Life Sciences)를 사용하여 정제하고 완충액을 0.005% Pluronic F68이 포함된 DPBS로 교환했다. 0.2㎛ 여과 후, 대량 약물 물질(bulk drug substance)(BDS)을 크리오바이알(cryovial)(Corning)에 분주하여 -80℃에서 보관했다.

[0205] AAV 역가 분석을 위한 디지털 드롭릿 PCR(ddPCR)

[0206] 바이러스 게놈 역가는 ddPCR로 결정한다. 테스트 샘플을 희석하고 DNase로 처리한 다음 0.02% Pluronic F68, ddPCR Supermix 및 SV40PolyA 시퀀스에 상응하는 primers/FAM 표지 프로브(probe)가 있는 DPBS로 추가로 희석한다. 20㎕ 샘플을 Bio-Rad Automated Droplet Generator를 사용하여 드롭릿으로 분할하고 PCR을 거친 다음 Bio-Rad QX200 Droplet Reader에서 읽으며, 이 리더는 각 드롭릿을 개별적으로 형광 신호에 대해 측정한다. 데이터는 Bio-Rad QuantaSoft 소프트웨어를 사용하여 분석하며, 이 소프트웨어는 양성 및 음성 드롭릿의 푸아송(poisson) 통계 분석을 사용하여 타겟 시퀀스의 절대 정량을 제공한다. 비템플릿(no-template) 대조군을 사용하여 샘플의 음성 기준선(baseline)을 설정한다. 내부 ddPCR 참조(reference) 표준 바이러스를 참조 표준 대조군으로 사용한다.

[0207] 상부 기도 상피 세포 단리 및 배양

[0208] 기도 상피 세포는 NHP 및 이식 거부된 인간 기증자 폐(Donor Network West)의 기관 및 1차 기관지 내지 3차 기관지에서 공개 프로토콜(Karp et al., 2002)에 따라 단리되었다. 단리된 세포는 동결되어 액체 질소에 보관되었다.

[0209] 기도 상피 세포를 인간 태반 콜라겐 IV(60㎍/mL, MilliporeSigma, Burlington, MA)에 해동시키고 기관지 상피 세포 성장 키트(ATCC, Manassas, VA)에 성장 보충제를 넣은 기도 상피 세포 기저 배지에서 트랜스웰 삽입물(0.4㎛, 0.32cm^2, Corning, Corning, NY)에 넣었다. 접종 2일 후, 삽입물과 기저 챔버에서 배지를 흡인했다. 기저 챔버는 제공된 성장 보충제(Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada)가 들어간 PneumaCult ALI 기저 배지로 보충했다. 기저 배지는 2-3일마다 교체했다. 트랜스웰의 정단 측에 있는 액체는 공기-액체 계면(ALI)이 달성될 때까지 매일 흡인했다. 세포는 세포 특성화 및 형질도입 전에 30일 동안 성숙시켰다.

[0210] AAV 형질도입

[0211] 배양 후 적어도 30일 후, 세포를 광범위하게 세척하여 쌓인 점액을 제거했다. 각 종의 삽입물 3개를 수확하여 세포를 계수했다. 각 종의 AAV 역가와 평균 세포 수를 기준으로, 바이러스의 부피를 희석하여 MOI가 12,500, 25,000, 50,000 및 100,000이 되도록 했다. 부피를 희석제로 균등화하여 각 종의 삽입물당 100㎕ 형질도입 부피를 얻었다. 인간 세포는 정단 및 기저 형질도입되었고, NHP 세포는 점액 세척 후 AAV로 정단 형질도입되었다(조건당 n=1). 삽입물의 액체는 감염 후 24시간 후에 흡인하고 기저 구획 배지를 교환했다. 감염 후 7일 동안 면역세포화학을 위해 세포를 고정했다.

[0212] 면역세포화학

[0213] 세포를 실온에서 20분 동안 4% 파라포름알데히드로 고정했다. 그런 다음 Zeiss Axio Observer D.1 형광 현미경을 사용하여 세포를 이미징하여 세포 위에서 아래로 보이는 EGFP를 시각화했다. 그런 다음 세포를 함유하는 삽입물을 최적 절단 온도 배지(optimal cutting temperature media)(OCT, ThermoFisher, Waltham, MA)에 포매(embed)하고 CryoStar 저온유지장치(cryostat)에서 20㎛ 슬라이스로 절편했다. 삽입물의 횡단면을 함유하는 슬라이드를 실온에서 1시간 동안 PBS에서 0.02% 트리톤(triton) X-100에 2% 염소 혈청, 5% 소 혈청 알부민으로 차단했다. 그런 다음 슬라이드를 실온에서 2시간 동안 1차 항체와 함께 배양하고 0.02% 트리톤 X-100으로 3번 세척한 다음 실온에서 1시간 동안 2차 항체와 함께 배양했다. 그런 다음 슬라이드를 실온에서 5분 동안 DAPI(핵 염색)로 대조 염색하고, 세 번 세척한 후 Prolong Gold Anti-fade mountant(ThermoFisher)를 사용하여 커버 슬

립으로 밀봉했다. 그런 다음 Zeiss Axio Observer D.1 형광 현미경을 사용하여 세포를 이미징했다.

[0214] AAV 전사체 검출을 위한 디지털 드롭릿 중합효소 연쇄 반응(ddPCR)

[0215] 제조업체의 지침(Qiagen, Hilden, Germany)에 따라 Qiagen RNeasy Plus Mini Kit을 사용하여 각 삽입물에서 RNA를 추출했다. RNA를 정량화하고 제조업체의 지침(총 부피 40μL, Bio-Rad, Hercules, CA)에 따라 iScript cDNA 합성 키트를 사용하여 2μg의 cDNA를 생성했다. cDNA 희석은 물에 1:10 및 1:100으로 희석하여 총 부피를 50μL로 만들고 분석 플레이트 웰당 2μL를 첨가했다. 마스터믹스는 2× Supermix ddPCR™(dUTP 없음, Bio-Rad) 및 ddPCR 호환 프라이머/프로브 믹스(HPRT1 HEK - housekeeper, 20× ID Bio-Rad 및 SV40 FAM ID(Furuta-Hanawa, Yamaguchi, & Uchida, 2019))로 만들어졌으며 웰당 총 부피는 최대 18μL이다. SV40 프라이머/프로브는 SV40 폴리아데닐화 부위가 바이러스로 전달된 이식유전자 카세트의 일부로 포함되어 있기 때문에 EGFP 이식유전자 전사 수준을 측정하기 위한 대용품이다. 마스터믹스와 cDNA는 ddPCR™ 96웰 분석 플레이트에서 결합되어 제조업체의 지침에 따라 QX200™ AutoDG Droplet Digital™ PCR 시스템에 로드되었다. 드롭릿이 생성되었고 플레이트는 C1000 Touch Thermal Cycler로 옮겨 PCR을 실행했다. ThermoCycler 조건은 다음과 같다: 94℃ 10분, 94℃ 30초, 60℃ 1분(2-3단계 반복, 39x), 98℃ 10분, 12℃에서 유지. 그런 다음 플레이트를 QX200™ Droplet Reader로 옮겨 FAM 및 HEK 채널에서 읽도록 매개변수를 설정했다. 데이터는 QuantaSoft 소프트웨어에서 임계값 3000으로 분석한 다음 추가 분석이 완료된 Excel 파일로 옮겼다. SV40 대 하우스키퍼(housekeeper) 값의 비율을 사용하여 그래프를 만들었으며, 실행 가능한 판독을 갖는 가장 낮은 희석을 사용했다.

[0216] 평균 형광 강도 계산

[0217] ALI 형질도입된 각 웰에 대해, Zeiss Axio Observer D.1 형광 현미경을 사용하여 10x 대물렌즈를 사용하여 웰당 3개의 이미지를 촬영했다. 이미지화된 영역은 웰에서 웰로 일관되고 편향되지 않은 패턴으로 선택되었다. 각 이미지의 노출 시간은 표준 AAV2 MOI 25,000 형질도입 웰을 사용하여 설정했다. 이미지화 후 모든 이미지는 ImageJ 소프트웨어를 사용하여 처리했다. 배경 형광을 뺀 다음 "Measure Mean Gray Value" 도구를 사용하여 MFI 값을 생성했다. 각 웰의 3개 이미지의 평균을 구하여 각 웰의 최종 MFI 값을 찾았다. 그런 다음 조건 내의 각 웰의 평균을 구하고 표준 편차를 계산하여 최종 그래프(도 3b)를 생성했다.

[0218] 결과

[0219] 새로운 캡시드의 AAV 제조

[0220] 변이체 캡시드 단백질과 야생형 혈청형을 포함하는 rAAV는 CellSTACK에서 배양된 HEK293 세포에서 삼중 형질감염을 통해 제조되었고 친화성 크로마토그래피를 사용하여 정제되었다. 상류(upstream) 생산성(세포 배양 표면적의 제곱 센티미터당 로그 바이러스 게놈(vg)의 단위로 보고됨)은 상층액과 세포 수확 후 ddPCR 분석을 통해 측정되었다(표 1, 상류 생산성). 모든 새로운 캡시드는 GFP 페이로드(payload)를 패키징할 수 있었고 플랫웨어 생산 공정을 사용하여 생산된 다른 AAV 벡터와 비슷한 생산성을 보였다. 하류(downstream) 수율(회수된 vgs의 %로 보고됨)은 친화성 정제 및 완충액 교환 후 ddPCR을 통해 결정했다(표 3, 하류 수율). AAV101-EGFP에 대한 초기 패키징 및 수율 데이터도 생산성 및 수율 비교를 위해 표 3에 나타냈다.

[0221] [표 3]

Vector	Peptide Insert*	Amino Acid Substitution*	Upstream Productivity (log vg/cm²)	Downstream Yield (% vgs recovered)
AAV101-EGFP	N/A	N/A	9.97	42%
AAV102-EGFP	LAHDITKNIA (SEQ ID NO:40)	V708I	9.95	46%
AAV103-EGFP	LANQDYTKTA (SEQ ID NO:41)	V708I	10.02	40%
AAV104-EGFP	LADNTVTRSA (SEQ ID NO:42)	V708I	10.02	61%
AAV105-EGFP	LASNSVQSIA (SEQ ID NO:43)	V708I	9.82	56%
AAV106-EGFP	LANSTRHTDA (SEQ ID NO:44)	V708I	10.01	57%
AAV107-EGFP	LATNRTSPDA (SEQ ID NO:45)	V708I	9.88	52%

[0222]

[0223] * 서열 식별 번호: 2의 AAV2 캡시드에 비해

[0224] AAV 신규 변이체의 형질도입 효율

[0225] 실시예 1에서 식별된 6개 신규 변이체의 형질 도입 효율을 AAV 대조군: AAV2, AAV5 및 AAV101과 비교했다. 각 캡시드에는 EGFP를 구동하는 유비퀴터스 프로모터(CAG)가 있는 카세트를 포함했다. 점액을 제거한 후 인간 및 NHP 상부 기도 상피 세포에 형질도입했다. 감염 후 7일에, 세포를 에피플루오레시스(epifluorescence) 현미경을 사용하여 위에서 아래로 이미지화하여 EGFP를 시각화했다.

[0226] 정단으로 형질도입된 인간 세포에 대해, AAV2 및 AAV5 대조군에서 최소 EGFP 발현이 감지되었다. 6개 새로운 변이체 중 AAV102 및 AAV103 형질도입 효율은 형광 현미경으로 분석한 결과, 낮은 용량에서 AAV2, AAV5 및 AAV101보다 더 높았다(**도 8a**). MOI 100,000에서 AAV103 형질도입은 낮았는데, 아마도 그 웰의 점막 세척이 비효율적이기 때문일 수 있다. AAV106 형질도입은 AAV2 및 AAV5보다 높았다.

[0227] 정단으로 형질도입된 NHP 세포에서 EGFP 패턴은 웰 내부에서 가변적이었다. 트랜스웰의 바깥쪽 가장자리 주변의 향상된 형질도입이 트랜스웰 중앙에서 제한된 형질도입이 있는 링 패턴으로 반복적으로 관찰되었다. 전반적으로, 새로운 변이체는 AAV2, AAV5 및 AAV101보다 더 강력한 형질도입 효율을 보였다. AAV102 및 AAV104는 가장 높은 수준의 EGFP를 발현했다(**도 8b**). NHP 형질도입 패턴은 아마도 가장자리 효과로 인해 인간 배양물에서만큼 명확하지 않았다. NHP 형질도입에 대해 표시된 모든 이미지는 형질도입을 시각화하기 위해 웰 가장자리의 일부를 포착한다.

[0228] 기저로 형질도입된 인간 세포에 대해, 서로 다른 패턴이 나타났다. AAV104는 AAV2, AAV5 및 AAV101보다 더 높은 가장 높은 형질도입 효율을 보였다(**도 8c**). AAV102 및 AAV103은 정단으로 투여 시와 같이 우수한 형질도입을 보이지 않았다. 전반적으로 기저 형질도입은 정단 형질 도입보다 낮은 것으로 나타났다. 이러한 캡시드 변이체가 *생체 내* NHP 및 *생체 내* 인간 ALI에 대한 정단 투여를 통해 선택되었다는 점을 감안할 때, 정단 투여에 비해 기저 투여 후 형질도입이 상대적으로 부족하다는 것은 놀라운 일이 아니다. NHP *시험관 내* 배양물은 기저로 형질도입되지 않았다.

[0229] 인간 *체외* 폐 상피 기도 배양의 세포 배양 조성은 아세틸화 튜불린(Ac-tub; 섬모 세포), 사이토케라틴 5(KRT5; 기저 세포) 및 점액(MUC5ac; 배상 세포)에 대한 항체를 사용하여 면역세포화학 분석을 통해 해동 후 30일에 평가했다. 인간의 정단 및 기저로 형질도입된 세포의 단면 분석을 완료했으며 이 ALI 시스템 내의 특정 세포 변이체 향성에 대한 결정적이지 않은 결과를 얻었다(데이터 미제시). 이 이종성 배양 시스템 내의 각 캡시드의 특정 향성을 제대로 이해하려면 더 많은 분석이 필요하다. 추가 *생체 내* 연구는 각 캡시드에 대한 세포 특이적 형질도입을 더 잘 특성화하는 데 도움이 될 수도 있다.

[0230] 후속 연구를 완료하여 인간 ALI 배양물에서 초기 정단 형질도입 스크린에서 가장 성능이 좋은 변이체인 AAV102 및 AAV103을 AAV2 및 AAV101과 비교하여 추가로 조사했다. EGFP를 묘사하는 면역세포화학 분석은 **도 9a**에 나와 있다. 평균 형광 강도는 웰당 3개 이미지, 조건당 3개 웰의 데이터에서 평균화하여 그래프로 나타냈다(**도 9b**).

마지막으로 디지털 드롭릿 PCR은 각 변이체의 전사 수준을 결정했다(**도 9c**). 3개 분석 모두 낮은 MOI에서 정단으로 형질도입 시 *체외* 기도 배양물의 형질도입 효율에서 AAV102 및 AAV103이 AAV2보다 우수함을 확인했다.

[0231] 추가적인 후속 연구가 점액의 존재 및 부재 하에 AAV102-AAV107 각각에 의한 ALI 배양물에서 인간 기도 상피 세포의 정단 형질도입을 AAV2, AAV5, AAV6 및 AAV101과 비교하기 위해 완료되었다. 간단히 말해, 인간 폐 상피 세포 배양물은 적어도 30일 동안 공기-액체 계면에서 배양되었다. 세포는 점액의 존재 또는 부재 하에 CAG 프로모터에 의해 구동되는 EGFP 리포터 유전자를 보유하는 AAV102-AAV107 또는 대조 캡시드로 형질도입되었다(MOI = 25,000). 형질도입 후 7일에, 캡시드의 형질도입을 나타내는 EGFP 이미지를 촬영했다. 각 캡시드 AAV102-AAV107은 점액의 부재 하에서 형질도입 시 야생형 AAV 혈청형과 AAV101 대조군에 비해 더 강한 형질도입 효율을 보였다(도 10A 및 10B, 상단 패널). 점액의 존재 하에 형질도입하면 각 캡시드의 형질도입 효율이 감소했다(점액의 부재 하에 형질도입을 보이지 않은 AAV5 제외)(도 10A 및 10B의 상단 패널을 하단 패널과 비교).

[0232] 실시예 1에 따라 에어로졸 전달 기법과 인간 *체외* 상부 기도 상피 ALI 배양물에 대한 정단 투여를 사용하여 NHP에서 선택을 통해 식별된 6개 상위 AAV 캡시드 변이체의 시험관 내 분석은 변이체 캡시드 단백질을 포함하는 rAAV가 AAV101 및 야생형 AAV 혈청형과 비교해 인간 및 NHP *체외* 상부 기도 상피 ALI 배양물을 형질도입하는 데 더 우수함을 보여준다. 다양한 변이체는 투여 경로에 따라 형질도입을 선호하는 것으로 나타났다. AAV102 및 AAV103은 낮은 MOI에서 AAV101 및 WT 혈청형보다 인간 *시험관 내* 상부 기도 상피 ALI 배양물을 정단으로 형질도입했다. 기저로 형질도입된 인간 세포에서 AAV104는 가장 높은 형질도입 효율을 보였다.

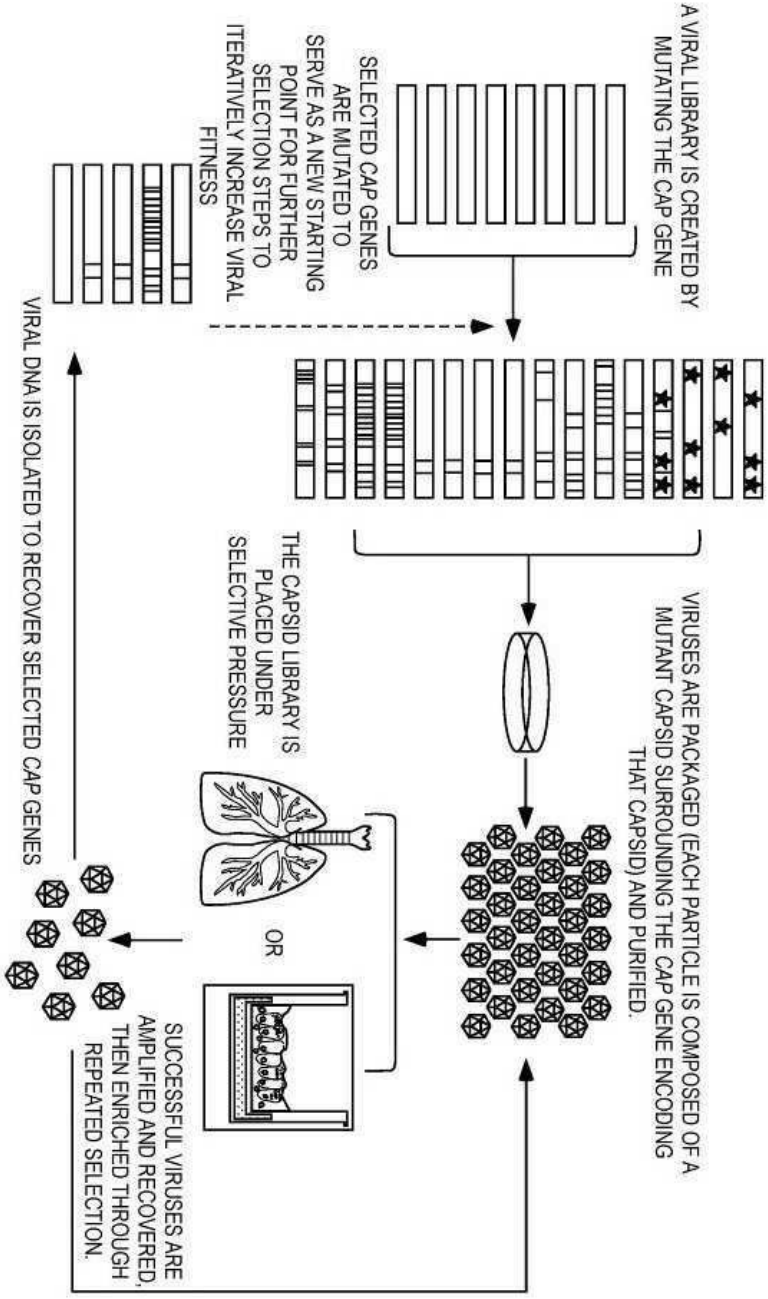
[0233] 실시예 3

[0234] 신규 AAV 캡시드 변이체는 중화 항체 스크린 및 NHP의 *생체 내* 벡터 특성화에서 검사된다.

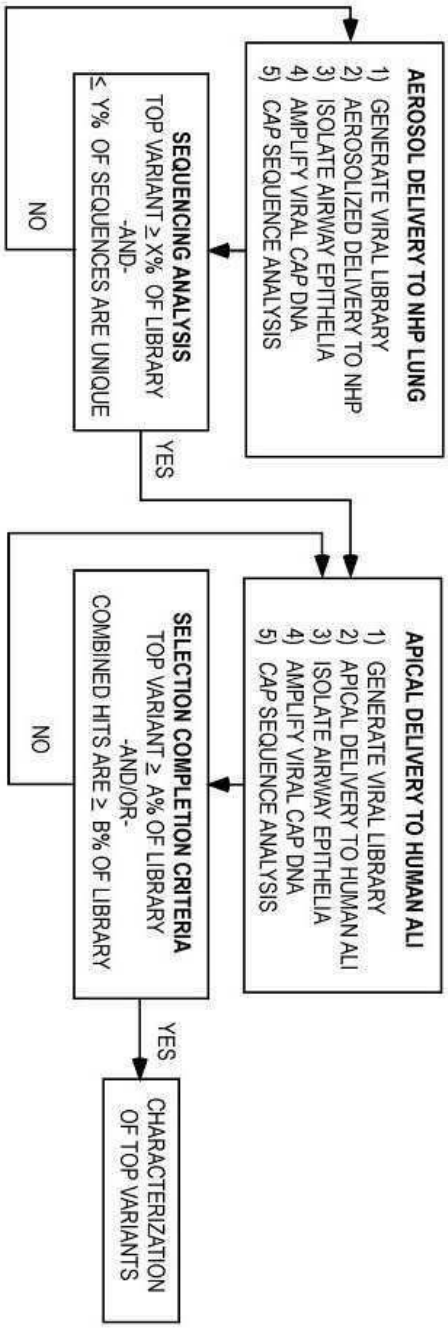
[0235] 본 발명의 재료 및 방법은 바람직한 실시 양태의 관점에서 설명되었지만, 본 발명의 개념, 정신 및 범위를 벗어남 없이 본원에 기술된 방법에 변형을 적용할 수 있다는 것은 당업자에게 명백할 것이다. 당업자에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체 및 변형은 본 발명의 정신, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

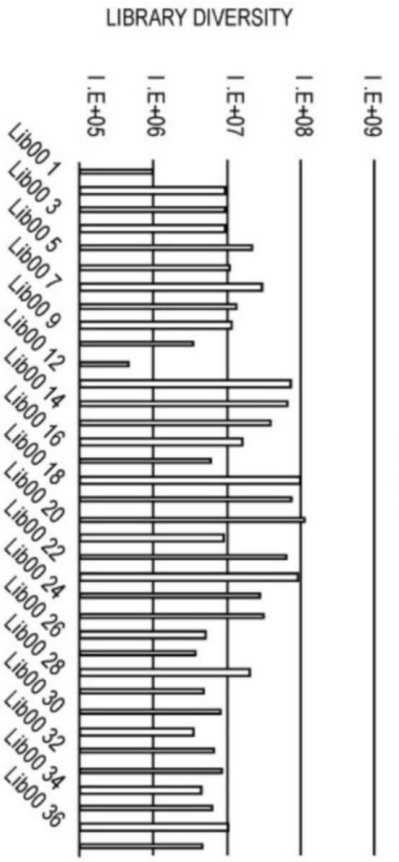
도면1


A VIRAL LIBRARY IS CREATED BY MUTATING THE CAP GENE
SELECTED CAP GENES ARE MUTATED TO SERVE AS A NEW STARTING POINT FOR FURTHER SELECTION STEPS TO ITERATIVELY INCREASE VIRAL FITNESS
VIRUSES ARE PACKAGED (EACH PARTICLE IS COMPOSED OF A MUTANT CAPSID SURROUNDING THE CAP GENE ENCODING THAT CAPSID) AND PURIFIED.
THE CAPSID LIBRARY IS PLACED UNDER SELECTIVE PRESSURE
OR
SUCCESSFUL VIRUSES ARE AMPLIFIED AND RECOVERED, THEN ENRICHED THROUGH REPEATED SELECTION.
VIRAL DNA IS ISOLATED TO RECOVER SELECTED CAP GENES

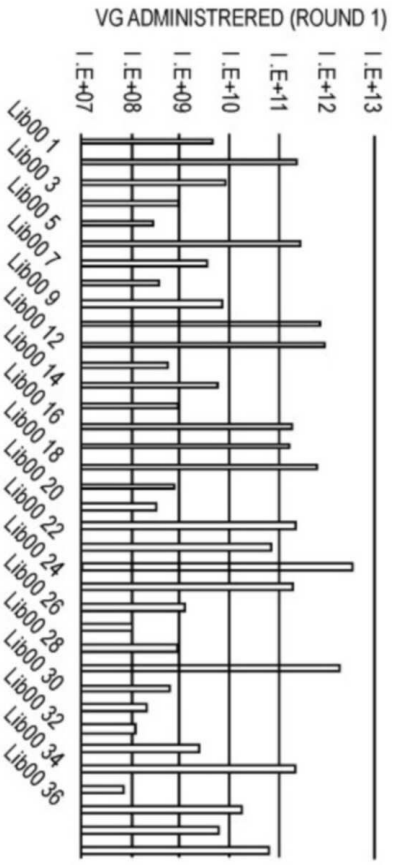
도면2


AEROSOL DELIVERY TO NHP LUNG
1) GENERATE VIRAL LIBRARY
2) AEROSOLIZED DELIVERY TO NHP
3) ISOLATE AIRWAY EPITHELIA
4) AMPLIFY VIRAL CAP DNA
5) CAP SEQUENCE ANALYSIS
SEQUENCING ANALYSIS
TOP VARIANT ≥ X% OF LIBRARY
-AND-
≤ Y% OF SEQUENCES ARE UNIQUE
NO
YES
APICAL DELIVERY TO HUMAN ALI
1) GENERATE VIRAL LIBRARY
2) APICAL DELIVERY TO HUMAN ALI
3) ISOLATE AIRWAY EPITHELIA
4) AMPLIFY VIRAL CAP DNA
5) CAP SEQUENCE ANALYSIS
SELECTION COMPLETION CRITERIA
TOP VARIANT ≥ A% OF LIBRARY
-AND/OR-
COMBINED HITS ARE ≥ B% OF LIBRARY
NO
YES
CHARACTERIZATION
OF TOP VARIANTS

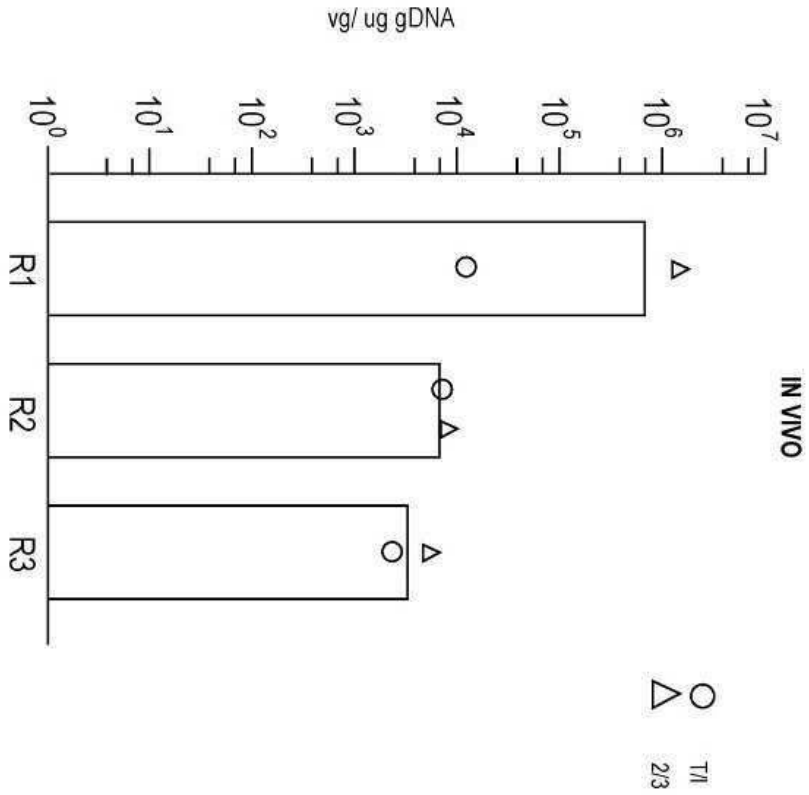
도면3a


LIBRARY DIVERSITY
1.E+05
1.E+06
1.E+07
1.E+08
1.E+09
Lib00 1
Lib00 3
Lib00 5
Lib00 7
Lib00 9
Lib00 12
Lib00 14
Lib00 16
Lib00 18
Lib00 20
Lib00 22
Lib00 24
Lib00 26
Lib00 28
Lib00 30
Lib00 32
Lib00 34
Lib00 36

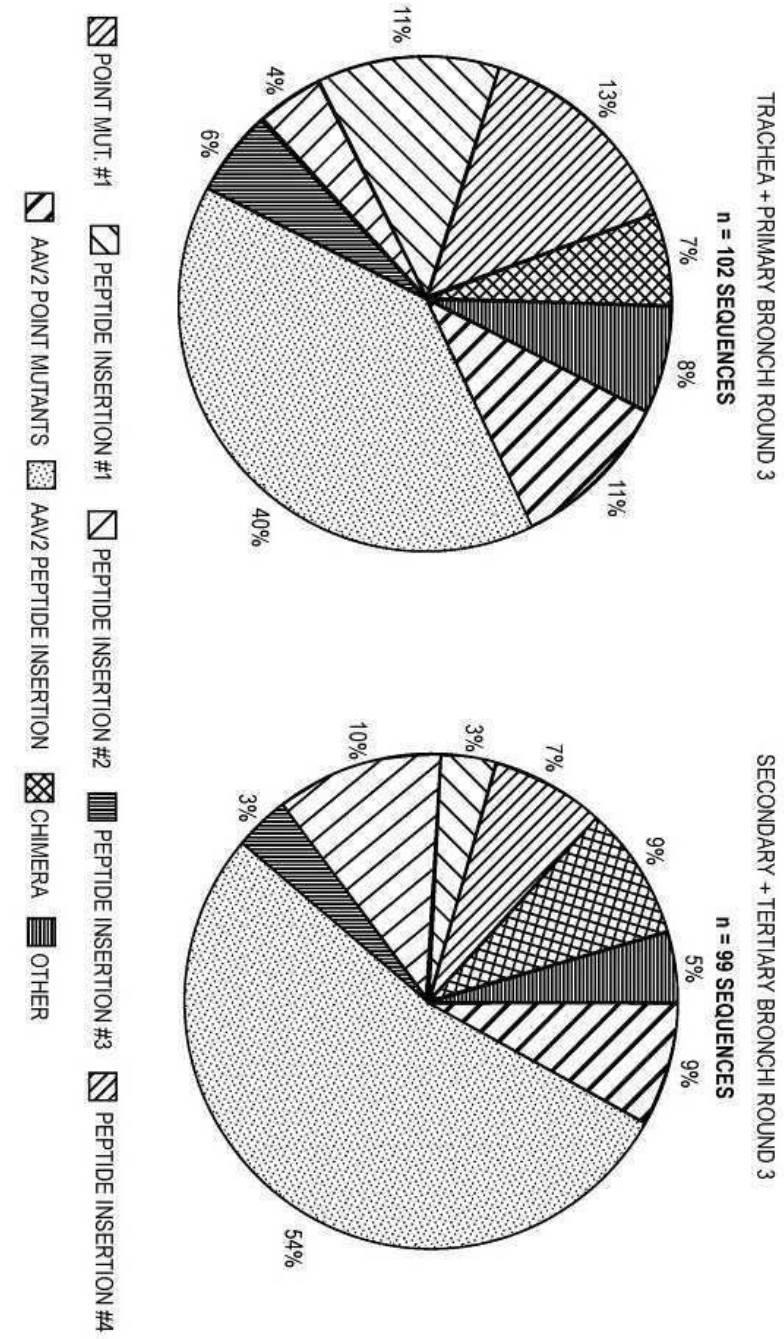
도면3b


VG ADMINISTRERED (ROUND 1)
1.E+07
1.E+08
1.E+09
1.E+10
1.E+11
1.E+12
1.E+13
Lib00 1
Lib00 3
Lib00 5
Lib00 7
Lib00 9
Lib00 12
Lib00 14
Lib00 16
Lib00 18
Lib00 20
Lib00 22
Lib00 24
Lib00 26
Lib00 28
Lib00 30
Lib00 32
Lib00 34
Lib00 36

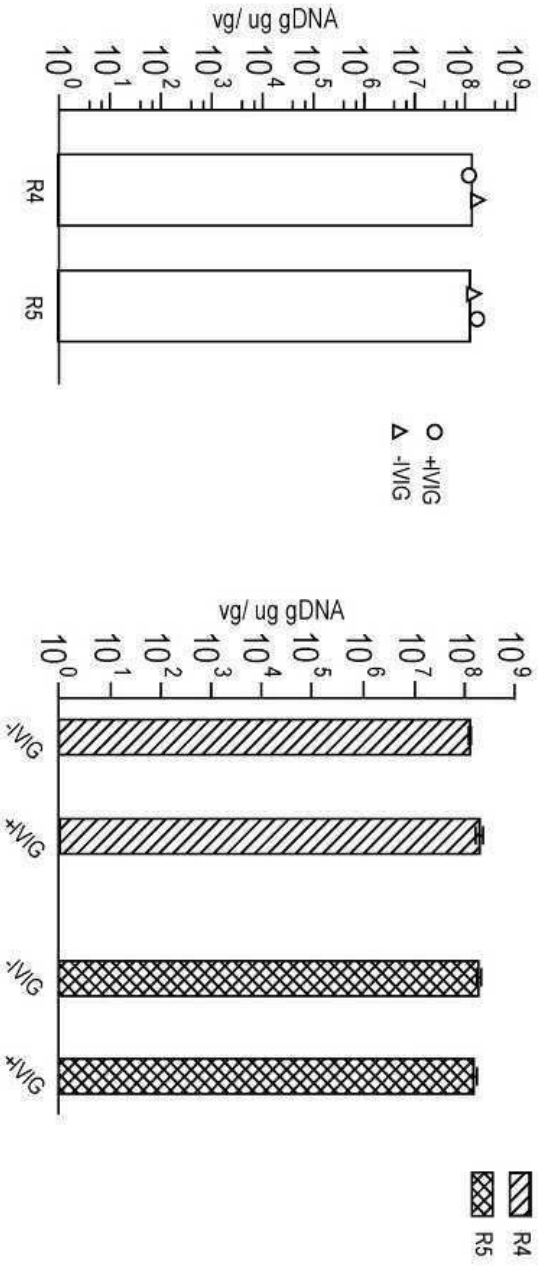
도면4



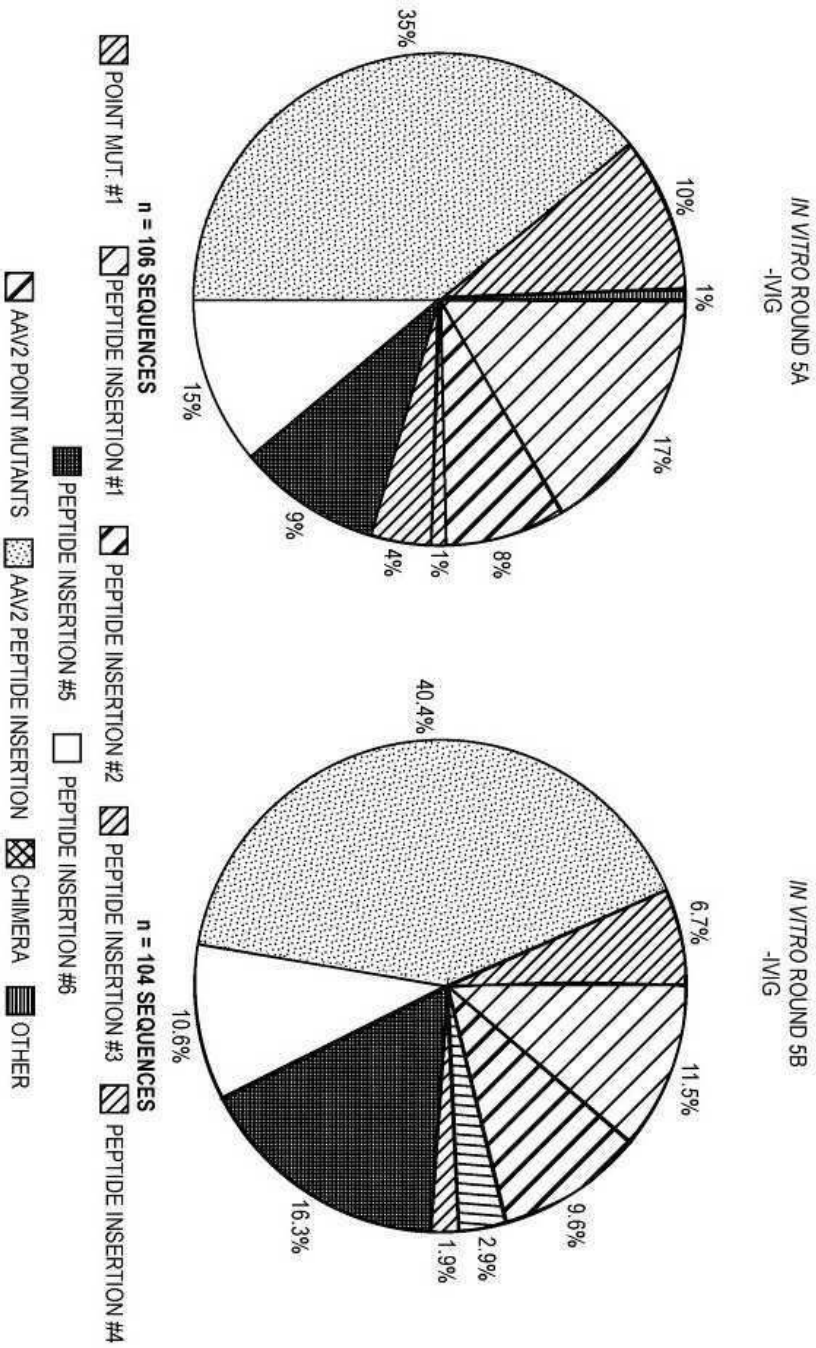
도면5


TRACHEA + PRIMARY BRONCHI ROUND 3
n = 102 SEQUENCES
11%
13%
7%
8%
11%
40%
6%
4%
SECONDARY + TERTIARY BRONCHI ROUND 3
n = 99 SEQUENCES
3%
7%
9%
5%
9%
54%
3%
10%
POINT MUT. #1
PEPTIDE INSERTION #1
PEPTIDE INSERTION #2
PEPTIDE INSERTION #3
PEPTIDE INSERTION #4
AAV2 POINT MUTANTS
AAV2 PEPTIDE INSERTION
CHIMERA
OTHER

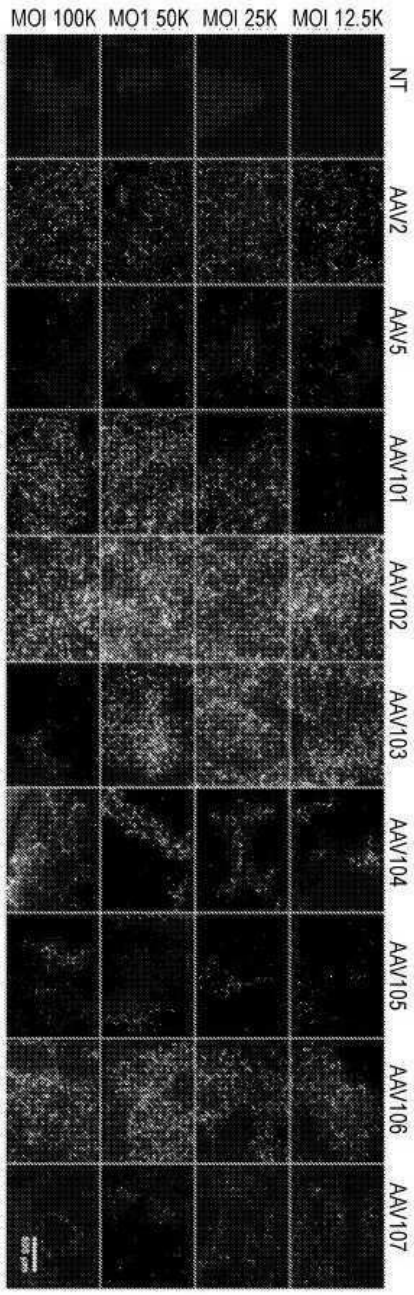
도면6


vg/ ug gDNA
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7 10^8 10^9
R4
R5
+IVIG
-IVIG
vg/ ug gDNA
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4 10^5 10^6 10^7 10^8 10^9
-IVIG
+IVIG
-IVIG
+IVIG
R5
R4

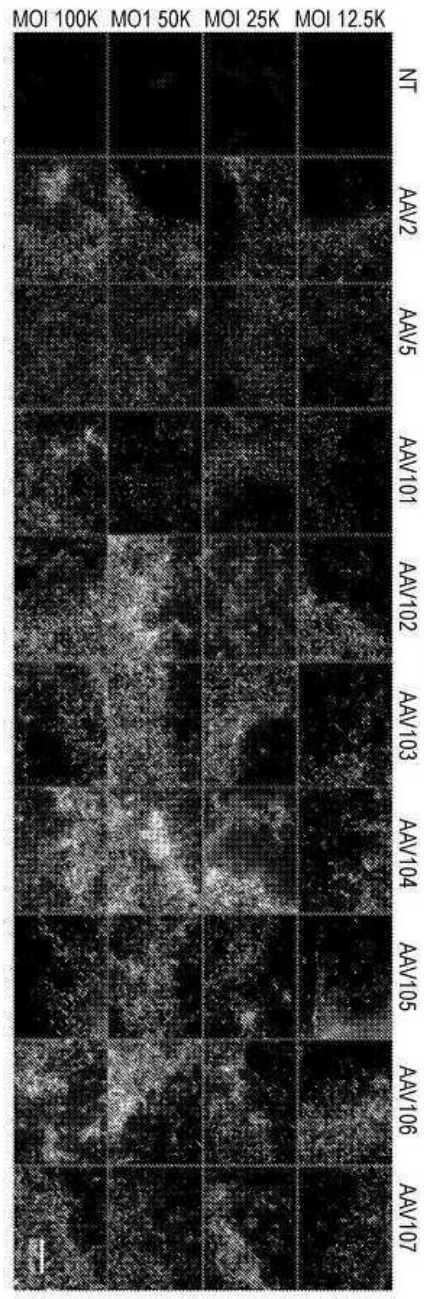
도면7


IN VITRO ROUND 5A
-IVIG
35%
10%
1%
17%
8%
1%
4%
9%
15%
IN VITRO ROUND 5B
-IVIG
40.4%
6.7%
11.5%
9.6%
2.9%
1.9%
16.3%
10.6%
n = 106 SEQUENCES
n = 104 SEQUENCES
POINT MUT. #1
PEPTIDE INSERTION #1
PEPTIDE INSERTION #2
PEPTIDE INSERTION #3
PEPTIDE INSERTION #4
PEPTIDE INSERTION #5
PEPTIDE INSERTION #6
AAV2 POINT MUTANTS
AAV2 PEPTIDE INSERTION
CHIMERA
OTHER

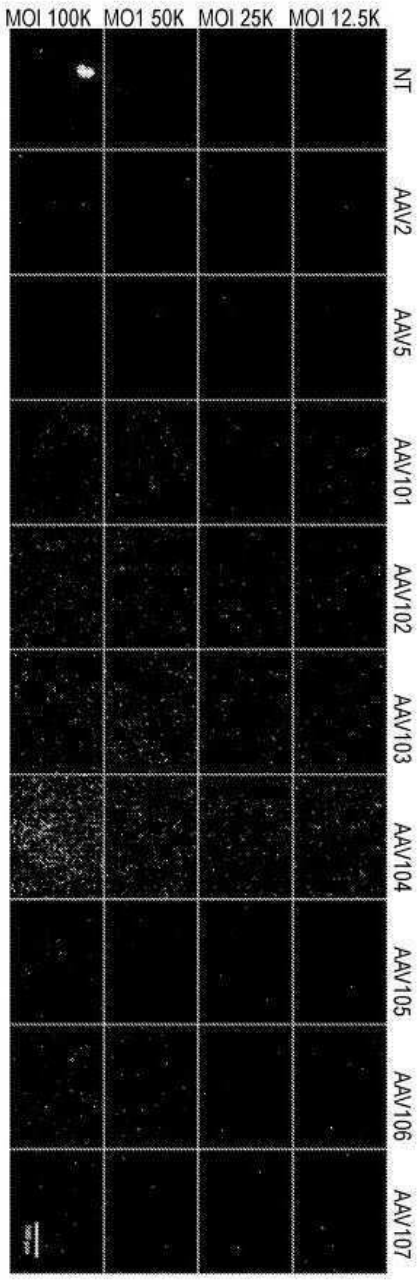
도면8a


MOI 100K
MO1 50K
MOI 25K
MOI 12.5K
NT
AAV2
AAV5
AAV101
AAV102
AAV103
AAV104
AAV105
AAV106
AAV107

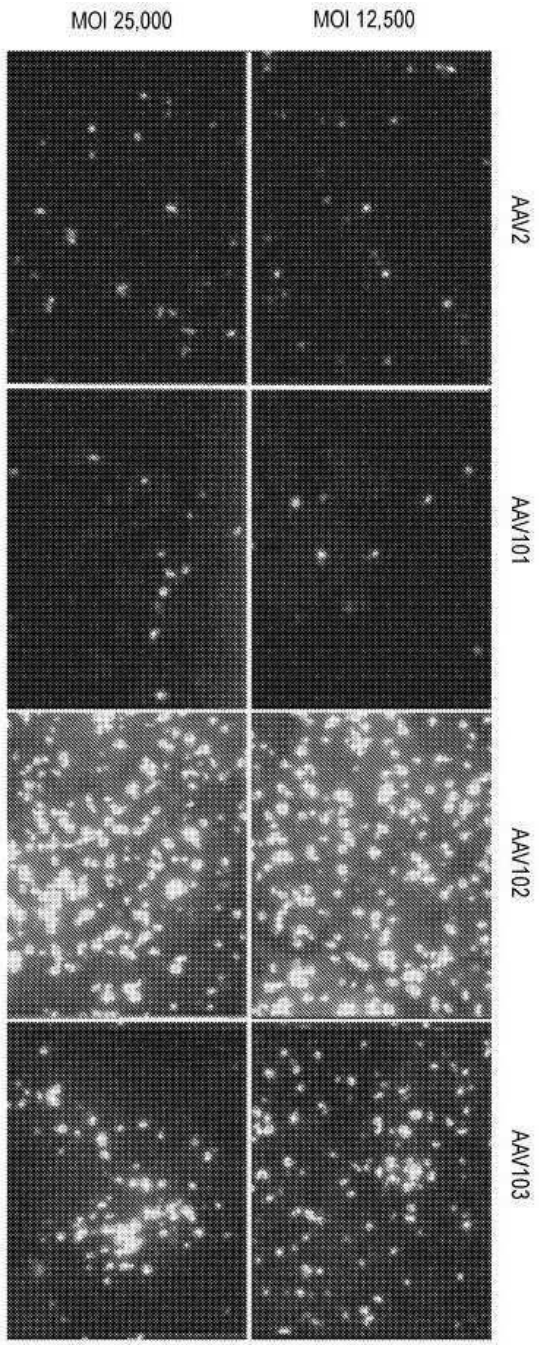
도면8b


MOI 100K
MO1 50K
MOI 25K
MOI 12.5K
NT
AAV2
AAV5
AAV101
AAV102
AAV103
AAV104
AAV105
AAV106
AAV107

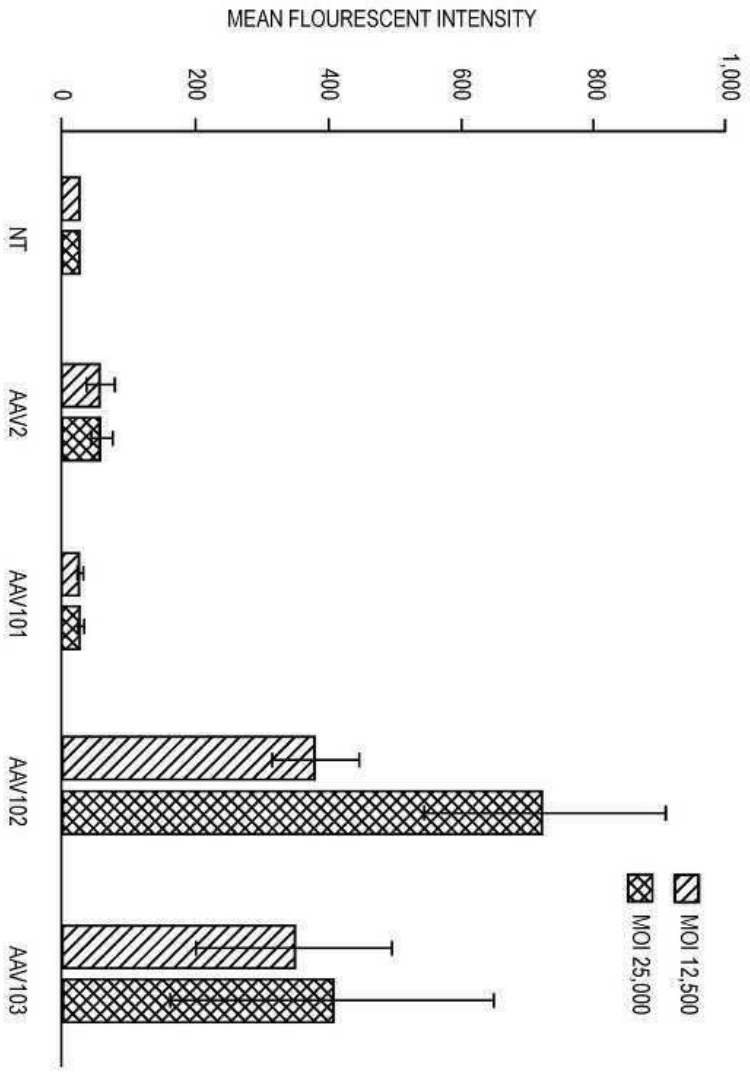
도면8c


MOI 100K
MO1 50K
MOI 25K
MOI 12.5K
NT
AAV2
AAV5
AAV101
AAV102
AAV103
AAV104
AAV105
AAV106
AAV107

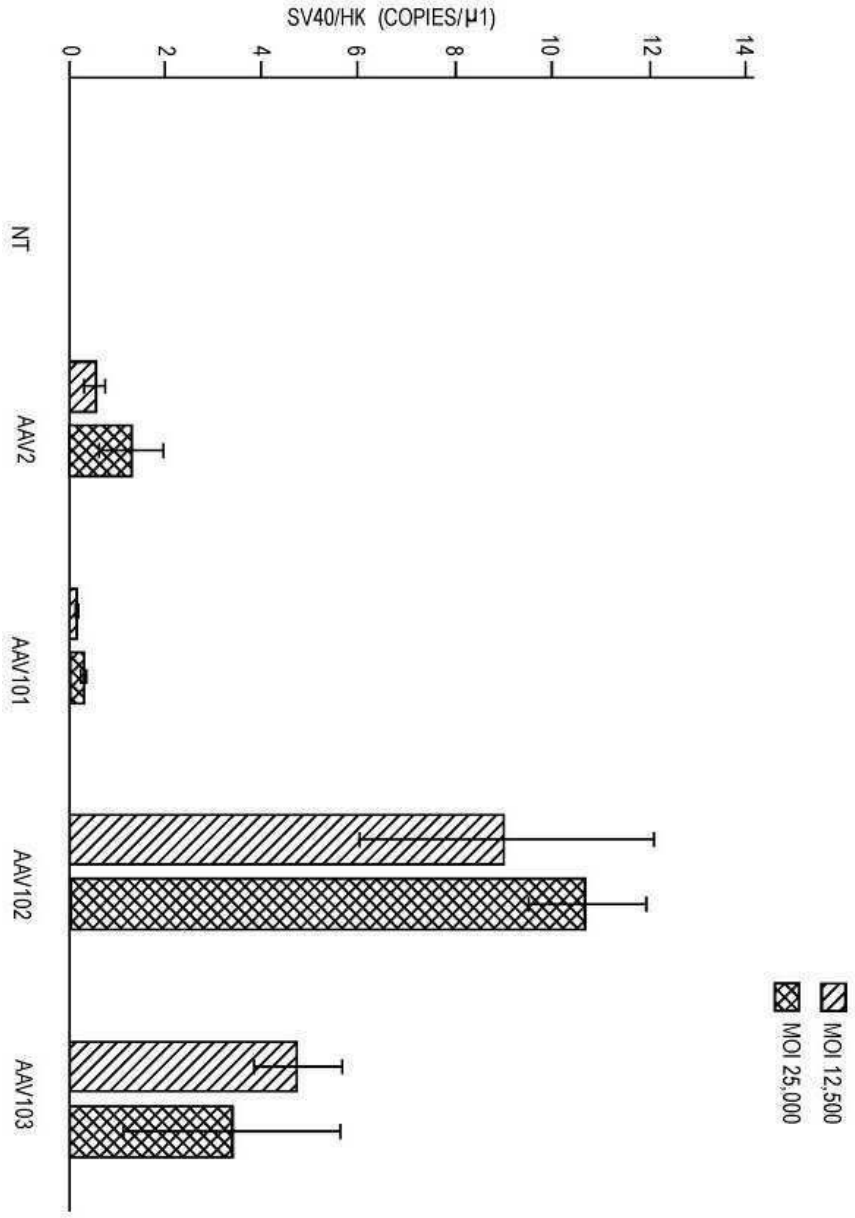
도면9a



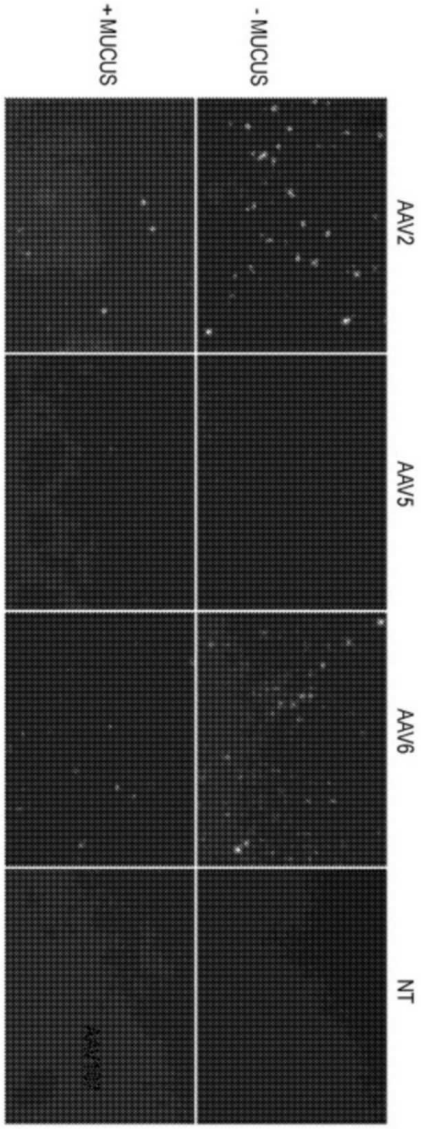
도면9b


MEAN FLOURESCENT INTENSITY
0
200
400
600
800
1,000
NT
AAV2
AAV101
AAV102
AAV103
MOI 12,500
MOI 25,000

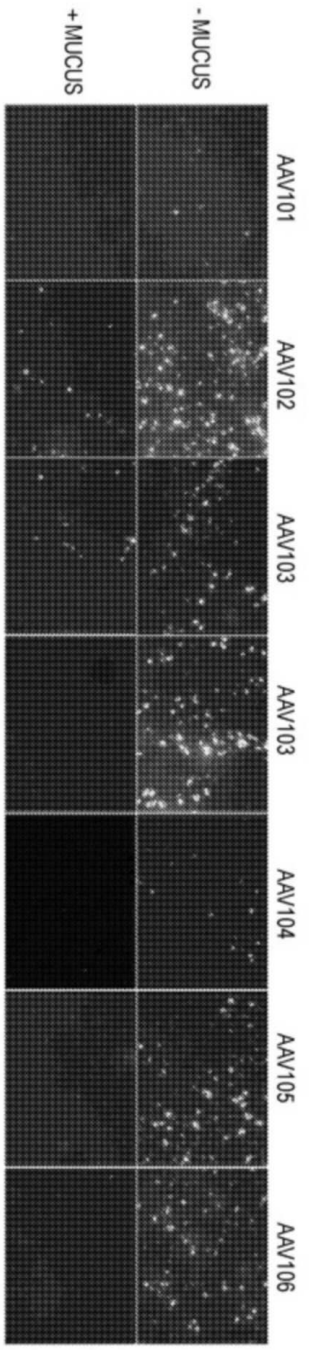
도면9c


SV40/HK (COPIES/μ1)
0
2
4
6
8
10
12
14
NT
AAV2
AAV101
AAV102
AAV103
MOI 12,500
MOI 25,000

도면10a



도면10b


+MUCUS
-MUCUS
AAV101
AAV102
AAV103
AAV103
AAV104
AAV105
AAV106

서 열 목 록 (첨부)

아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.