



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월22일
(11) 등록번호 10-2697086
(24) 등록일자 2024년08월16일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 21/00 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-7027800
(22) 출원일자(국제) 2018년02월27일
심사청구일자 2021년02월22일
- (85) 번역문제출일자 2019년09월23일
(65) 공개번호 10-2019-0123752
(43) 공개일자 2019년11월01일
(86) 국제출원번호 PCT/US2018/019996
(87) 국제공개번호 WO 2018/160585
국제공개일자 2018년09월07일
- (30) 우선권주장
62/464,756 2017년02월28일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
US20160074474 A1
WO2015164757 A1
- (73) 특허권자
더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아
미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 씨빅 센터
블러바드 3600, 9플로어
- (72) 발명자
윌슨 제임스 엠.
미국 펜실베이니아 19103 필라델피아 텔란시 스트리트 1831
헌더러 크리스티안
미국 펜실베이니아 19123 필라델피아 브라운 스트리트 212 아파트먼트 8에이
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 14 항

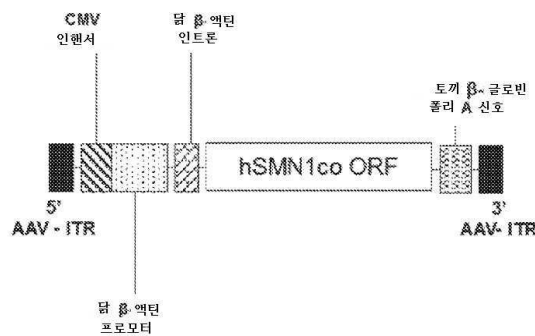
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 척수근 위축증의 치료에 유용한 조성물

(57) 요약

AAVhu68 캡시드 및 상기 캡시드 내의 적어도 하나의 발현 카세트를 갖는 rAAV 벡터가 본 명세서에 기술된다. 상기 적어도 하나의 발현 카세트는 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 숙주 세포에서 상기 SMN 서열의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함한다. 또한 이러한 rAAVhu68.SMN 벡터를 함유하는 조성물 및 환자에서 척수근 위축증을 위해서 이를 사용하는 방법이 제공된다.

대표도



(52) CPC특허분류

A61P 21/00 (2018.01)

A61P 25/00 (2018.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0318 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2800/22 (2013.01)

(72) 발명자

카츠 네이션

미국 코네티컷 06907 스탬포드 호프 스트리트 1111
유닛 3

왕 치

미국 펜실베이니아 19144 필라델피아 웨스트 위노나
스트리트 228 1층

(30) 우선권주장

62/618,437 2018년01월17일 미국(US)

62/515,902 2017년06월06일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

제조합 아데노-연관 바이러스(recombinant adeno-associated viral: rAAV) 벡터로서, AAVhu68 캡시드 및 세포에서 SMN 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 적어도 하나의 발현 카세트를 포함하며,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 1 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하고,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 잔기 위치를 기준으로, 위치 157에서 발린을 가지는 AAVhu68 vp1 및 AAVhu68 vp2 단백질과 위치 67에서 글루탐산을 가지는 AAVhu68 vp1 단백질을 가지는 것을 더 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 2

제1 항에 있어서, 암호화된 SMN 단백질은 서열번호 2의 아미노산 서열을 가지는 아이소폼 D 단백질인 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 3

제2 항에 있어서,

SMN 아이소폼 D를 암호화하는 핵산 서열은

(a) 서열번호 1 또는 서열번호 2의 아미노산 서열을 갖는 SMN 단백질을 암호화하는 것과 적어도 70% 동일성을 공유하는 서열;

(b) 서열번호 3;

(c) 서열번호 4;

(d) 서열번호 5: 또는

(e) 서열번호 6

인 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 4

제1 항에 있어서, 발현 제어 서열은 프로모터를 포함하며; 프로모터는 닭 β -액틴(CB) 프로모터 또는 CB7 프로모터를 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 5

제1 항에 있어서,

(i) 인핸서, 인트론, 코작 서열, 폴리A, 전사 후 조절 요소 중 하나 이상; 및/또는

(ii) 캡시드를 제공하는 AAV와 상이한 AAV로부터의 5' 및/또는 3' AAV 반전 말단 반복부(inverted terminal repeat: ITR) 서열, 또는 AAV2로부터 유래된 AAV 반전 말단 반복부 서열

을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 6

AAVhu68 캡시드 내의 벡터 게놈을 포함하는 제조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터로서, 상기 벡터 게놈은 AAV 5' ITR, 거대세포바이러스 극 초기 인핸서, 닭 베타 액틴 프로모터, 인트론, 서열번호 1의 핵산 서열, 폴리 A 및 AAV 3' 반전 말단 반복부 서열을 포함하며, AAVhu68 캡시드는 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질의 AAVhu68 vp1 단백질의 이중 집단을 포함하며, 질량 분석법에 의해서 측정된 결과, 서

열번호 8의 1 내지 736의 아미노산 서열(VP1), 서열번호 8의 138 내지 736의 아미노산 서열(VP2), 및 서열번호 8의 203 내지 736의 아미노산 서열(VP3) 캡시드를 기준으로 N57, N329, N452, 및 N512에서의 50% 내지 100% 탈아마이드화를 더 포함하고, 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, AAVhu68 vp1 단백질은 위치 67에서 글루탐산을 포함하고, AAVhu68 vp2 단백질은 위치 157에서 발린을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 7

제6 항에 있어서, 벡터 계놈은 서열번호 15 또는 서열번호 25의 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 rAAV 벡터.

청구항 8

제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 따른 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터로서, rAAV는 대상체에서 척수근 위축증(spinal muscular atrophy)을 치료하는 데 유용한, 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV) 벡터.

청구항 9

대상체에서 척수근 위축증을 치료하기 위한 제1 항 내지 제7 항 중 어느 한 항에 따른 rAAV 벡터를 포함하는 억제학적 조성물로서, 억제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및/또는 보존제를 포함하는, 억제학적 조성물.

청구항 10

제9 항에 있어서, 상기 rAAV는 척추강내 전달을 위해서 제형화된 조성물 내에 존재하는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 11

제9 항에 있어서, 상기 대상체는 포유동물 또는 인간인 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 12

제9 항에 있어서, 상기 조성물은

(i) 또 다른 요법과 병용하여 투여되고;

(ii) 1×10^{10} GC/g 너 질량 내지 3×10^{14} GC/g 너 질량의 투여량, 5×10^{13} GC의 투여량으로, 또는 1.85×10^{14} GC의 투여량으로 투여되고; 및/또는

(iii) 1회 초과로 투여되는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 13

제12 항에 있어서, 상기 rAAV는 7.2 내지 7.8의 pH를 갖는 수성 용액 중에 현탁되는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 14

제12 항에 있어서, 척수근위축증은 18세 이하의 소아, 또는 성인에서 일어나는 것을 특징으로 하는 억제학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경 기술

- [0001] 척수근 위축증(spinal muscular atrophy: SMA)은 스플라이솜(spliceosome) 생물발생에 관여된 도처에서 발현되는 단백질(운동 뉴런의 생존(survival of motor neuron) - SMN)을 암호화하는 유전자인 텔로머(telomeric) SMN1에서의 돌연변이에 의해서 유발되는 신경근 질환이다. SMA는 SMN1 유전자의 돌연변이 또는 결실에 의해서 유발되는 상염색체 열성 장애이다. 기능성 SMN1 유전자의 제공은 표현형을 구제하는 것으로 밝혀져 있다(예를 들어, 문헌[Tanguy et al, Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice, Frontiers in Molecular Neuroscience, 8(36) (July 2015)] 참고).
- [0002] 국제 SMA 콘소시엄 분류는 발병 연령 및 운동 발달 마일스톤에 따라서, SMA 표현형의 몇몇 중증도를 한정한다. SMA 0 지정은 태아기 발병 및 중증 관절 구축, 양측안면 마비 및 호흡 부전을 반영하는 것으로 제안된다. 타입 1(또는 I) SMA, I형 베르드니히-호프만병(Werdnig-Hoffmann I disease)은 출생 6개월 내에 발병되는 가장 중증의 출생 후 형태이다. 환자는 바르게 앉을 수 없고, 심각한 호흡기 기능장애를 갖는다. 타입 2(또는 II) SMA는 초기 2세 이내에 발병하는 중간 형태이고; 소아는 바르게 앉을 수 있지만, 걸을 수 없다. 임상 과정은 다양하다. 타입 3(또는 III)(쿠겔베르그-벨란더병(Kugelberg-Welander disease))은 2세 이후에 시작되고, 통상적으로 만성적인 발달을 갖는다. 소아는 적어도 유아기에 서있을 수 있고, 도움 없이 걸을 수 있다. 성인 형태(타입 4 또는 IV)는 가장 경증이고, 30세 이후에 발병되고; 보고된 사례가 거의 없고, 유병률은 정확히 알려져 있지 않다.
- [0003] 다수의 유전적 신경근 질환 및 후천적 신경근 질환은 하부 운동 뉴런의 변성을 포함한다. 가장 일반적이고, 임상적인 예 중 하나는, 척수근 위축증(SMA), 하부 운동 뉴런의 선택적인 사멸을 특징으로 하는 운동 뉴런의 생존(SMN) 단백질의 유전된 결핍, 점진적인 심약 및 보통 유아기 사망이다. 불명확한 이유로 인해서 SMN 결핍은 하부 운동 뉴런에 대한 선택적인 독성을 초래하여, 점진적인 뉴런 손실 및 근육 약화를 초래한다. 질환의 중증도는 상동 유전자(SMN2)의 중심절 복제의 카피수에 의해서 변형되는데, 이것은 전장 SMN 전사체의 단지 소량의 생산을 초래하는 스플라이스 부위 돌연변이를 보유한다. SMN2의 1 내지 2개의 카피를 보유하는 환자는, 최초 수개월의 생애 이내의 발병 및 호흡 부전으로의 신속한 진행을 특징으로 하는, SMA의 중증 형태를 나타낸다. SMN2의 3개의 카피를 갖는 환자는 일반적으로, 6개월 연령 이후에 전형적으로 나타나는 질환의 약화된 형태를 나타낸다. 다수는 보행 능력을 얻지 못하지만, 그들은 호흡 부전으로 거의 진행되지 않으며, 보통 성인까지 생존한다. 4개의 SMN2 카피를 갖는 환자는 성인까지 나타나지 않으며 근육 약화가 점진적으로 발병한다. 일시적인 처방 치유 이외의 SMA에 대한 치료는 현재 존재하지 않는다.
- [0004] SMN 발현과 질환 중증도 간의 명확한 상관관계뿐만 아니라 비교적 적은 수의 영향을 받는 세포는 SMA를 유전자 요법을 위한 우수한 표적으로 만든다. 이전 연구는, SMA 표현형이 혈액 뇌 장벽을 통과하는 능력을 갖는 AAV 벡터 혈청형의 전신 주사를 사용하여 트랜스제닉 마우스 모델에서 수집될 수 있다는 것을 입증하였다(예를 들어, 문헌[Tanguy et al, Systemic AAVrh10 provides higher transgene expression than AAV9 in the brain and the spinal cord of neonatal mice, Frontiers in Molecular Neuroscience, 8(36) (July 2015)] 참고). 문헌[Passini et al, HGT, 2014]에는, scAAV9.GusB.SMN1 벡터를 사용하여 SMN Δ 7 마우스에서 최대 200일 동안 생존

이 용량 의존적으로 증가된 것이 보고되어 있다. 문헌[Meyer et al, Molecular Therapy, 2014]에는 2.7×10^9 GC/새끼(pup) 내지 3.3×10^{10} GC/새끼의 투여량에서 scAAV9.CBA.SMN1 벡터를 사용하여 최대 450일 동안 생존이 용량 의존적으로 증가된 것이 보고되어 있다. 그러나, 더 낮은 투여량은 매우 적은 개선을 나타내었다(또한, 문헌 [Passini et al, JCI, 2010 and Passini et al, Sci Trans Med, 2011] 참고). 이러한 문헌 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0005] SMA를 위한 효과적인 치료법이 여전히 필요하다.

발명의 내용

[0006] 일 양상에서, AAVhu68 캡시드 및 적어도 하나의 발현 카세트를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (recombinant adeno-associated viral: rAAV) 벡터가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 발현 카세트는 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 핵산 서열 및 숙주 세포에서 상기 SMN 서열의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함하고, 여기서 AAVhu68 캡시드는 서열번호 7에 의해서 암호화된 생산된 단백질로부터 독립적으로 선택된 아미노산 서열을 갖거나 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 갖는 AAVhu68vp1 캡시드 단백질의 집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp1 단백질의 이중 집단을 갖는다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp2 단백질의 이중 집단을 갖는다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp3 단백질의 이중 집단을 갖는다. 일 실시형태에서, AAVhu68 캡시드 단백질 암호 서열은 서열번호 7의 서열을 갖는다. 일 실시형태에서, SMA 암호 서열은 서열번호 1의 서열을 갖는다.

[0007] AAV 5' ITR, CB7 프로모터, 인트론, 서열번호 1의 핵산 서열, 폴리A 및 AAV 3' 반전 말단 반복부 서열을 포함하는 핵산 분자를 내부에 패키징한 AAVhu68 캡시드를 포함하는 rAAV 벡터가 추가로 제공되며, 여기서 AAVhu68 캡시드는 vp1 단백질의 집단, vp2의 집단 및 vp3 단백질의 집단을 포함하며, 여기서 AAVhu68 캡시드 단백질은 서열번호 8의 vp1, vp2 및/또는 vp3의 아미노산 서열을 갖는 서열번호 7 캡시드 단백질에 의해서 생산된 단백질로부터 독립적으로 선택된 아미노산 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp1 단백질의 이중 집단을 갖는다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp2 단백질의 이중 집단을 갖는다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 vp3 단백질의 이중 집단을 갖는다.

[0008] 예컨대 상기에 기술된 AAVhu68 벡터를 함유하는 약제학적 조성물이 제공된다. 적어도 하나의 벡터 스톱에 부가하여, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및/또는 보존제 중 적어도 1종을 추가로 함유한다.

[0009] 척수근 위축증의 치료를 필요로 하는 대상체에서, rAAVhu68.SMA 벡터 또는 본 명세서에 제공된 조작된 hSMN을 위한 또 다른 전달 비히클을 사용하여, 척수근 위축증을 치료하는 방법이 추가로 제공된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 척추강내로 투여될 수 있다.

[0010] 특정 실시형태에서, rAAVhu68.SMN1은 본 명세서에 기술된 바와 같이 또는 환자에서, 선택적으로는 공동 요법으로, 척수근 위축증을 치료하는 데 사용하기 위한 조성물로서 제공된다. 특정 실시형태에서, 환자는 SMA 타입 3을 갖는다. 특정 실시형태에서, 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화된다.

[0011] 선택적으로는 공동 치료 요법으로, SMA를 갖는 환자를 치료하기 위한 본 명세서에 기술된 바와 같은 rAAVhu68.SMA의 용도, 또는 이를 함유하는 조성물이 제공된다. 이러한 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화될 수 있다.

[0012] 본 발명의 다른 양상 및 이점은 하기 본 발명의 상세한 설명으로부터 명확할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1a는 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 벡터 게놈의 개략적인 표현. ITR은 AAV2 반전 말단 반복부를 나타낸다. CB7은 거대세포바이러스 인헨서를 갖는 닭 베타 액틴 프로모터를 나타낸다. RBG 폴리A는 토끼 베타 글로빈 폴리 아데닐화 신호를 나타낸다.

도 1b 및 도 1c는 네이티브 hSMN1, 변이체 D(수탁 번호 NM_000344.3)(서열번호 3) 대 본 명세서에 기술된 코돈 최적화된 서열(서열번호 1)의 정렬을 나타낸 도면.

도 2는 면역조직화학(IHC) 및 현장 혼성화(*in situ* hybridization: ISH)에 의한 뇌 및 척수에서의 형질도입의 평가를 나타낸 도면. SMN1의 면역조직화학을 피질, 소뇌 및 척수 박편 상에서 수행하였고, 대표적인 영상은 상부 3개의 패널에 나타낸다. 코돈-최적화된 hSMN1 리보핵산(RNA)에 대한 ISH을 피질 박편에서 수행하였고, 대표

적인 결과를 하부 패널에 나타낸다. 샘플을 새끼당 3×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리되거나 또는 처리되지 않은 SMN Δ 7(KO) 마우스로부터 수집하였다. 야생형(WT) 및 이형접합(Het) 한배새끼를 양성 대조군으로서 제공하였다.

도 3A는 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC/새끼의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리되거나 또는 처리되지 않은 SMN Δ 7(KO) 마우스의 생존 곡선. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다.

도 3B는 도 3A에 기술된 생존 곡선의 통계학적 분석의 표. 중위 생존율을 계산하고, 열거하였다.

도 4a는 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC/새끼의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG 벡터로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스의 체중의 선 그래프. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다.

도 4b는 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC/새끼의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스의 생후 15일의 체중의 그래프. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다.

도 4c는 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC/새끼의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스의 생후 30일의 체중의 그래프. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼를 대조군으로서 제공하였다.

도 4d 내지 도 4j는 성별에 의한 정규화 후 체중의 선 그래프. 새끼당 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스에 대해서 생후 3 내지 13일 또는 15일로부터 2일마다 실험을 수행하였다. 야생형/이형접합 한배새끼(WT) 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다. P 값을 통계학적 분석을 통해서 계산하였고, 도면에 나타내었다.

도 5A는 뒷다리 부유 시험(Hind-Limb Suspension Test)을 사용한 점수 시스템의 도면.

도 5B는 새끼당 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스에서 생후 3 내지 13일로부터 2일마다 기록된 뒷다리 점수의 그래프를 나타낸 도면. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다.

도 6a 내지 도 6c는 동물이 정향 반사 시험(Righting Reflex Test)에서 그의 본래 자세로 되돌아가는데 걸리는 시간을 나타낸 그래프. 새끼당 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스에 대해서 생후 7 내지 17일로부터 2일마다 실험을 수행하였다. 야생형(WT)/이형접합(Het) 한배새끼 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다.

도 6d 내지 도 6j는 동물이 성별에 의한 정규화 후 정향 반사 시험에서 그의 본래 자세로 되돌아가는데 걸리는 시간을 나타낸 그래프. 새끼당 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 처리된 SMN Δ 7(KO) 마우스에 대해서 생후 7 내지 17일로부터 2일마다 실험을 수행하였다. 야생형/이형접합 한배새끼(WT) 및 PBS 주사된 마우스를 대조군으로서 제공하였다. P 값을 통계학적 분석을 통해서 계산하였고, 도면에 나타내었다.

도 7은 동축 삽입 방법을 위한 선택적인 도입기 니들을 포함하는, 수조내(intracisternal) 전달을 위한 장치의 도면이고, 이것은 10cc의 벡터 주사기, 10cc의 사전 충전된 플러쉬 주사기, T-연결기 연장 세트, 22G \times 5" 척추 니들 선택적인 18G \times 3.5" 도입기 니들을 포함한다.

도 8a는 도 8b 내지 도 8d의 핵산 서열에 의해서 암호화된 vp1 캡시드 서열의 아미노산 서열을 나타낸 정렬을 제공한 도면. 정렬은 AAV9[서열번호 16], AAVhu31(정렬에서 hu.31로 표지됨)[서열번호 18] 및 AAVhu32(정렬에서 hu.32로 표지됨)[서열번호 19]와 함께, AAVhu68의 vp1 단백질[서열번호 8]을 포함한다. AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32와 비교할 때, 2개의 돌연변이(A67E 및 A157V)가 AAVhu68에서 중요한 것으로 발견되었으며, 도면에서 원으로 나타낸다.

도 8b 내지 도 8d는 AAV9[서열번호 22], AAVhu31[서열번호 20] 및 AAVhu32[서열번호 21]와 함께, AAVhu68[서열번호 7]의 vp1 캡시드를 암호화하는 핵산 서열의 정렬을 제공한 도면.

도 9A 및 도 9B는 다양한 용량(1×10^9 GC, WT, n=7, KO, n=1; 3×10^9 GC, WT, n=7, KO, n=1; 1×10^{10} GC, WT, n=3, KO, n=5; 3×10^{10} GC, WT, n=1, KO, n=1; 또는 7×10^{10} GC, WT, n=5, KO, n=3)에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG를

사용하여 ICV로 처리된 성체 야생형 마우스(HET/WT, 도 9A) 또는 SMN Δ 7 마우스(KO, 도 9B)에서 중량 모니터링 결과를 나타낸 그래프. PBS 주사된 동물(WT, n=3; KO, n=4)을 대조군으로서 제공하였다.

도 10A 및 도 10B는 다양한 용량(1×10^9 GC, WT, n=7, KO, n=1; 3×10^9 GC, WT, n=7, KO, n=1; 1×10^{10} GC, WT, n=3, KO, n=5; 3×10^{10} GC, WT, n=1, KO, n=1; 또는 7×10^{10} GC, WT, n=5, KO, n=3)에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG를 사용하여 ICV로 처리된 성체 야생형 마우스(HET/WT, 도 10A) 또는 SMN Δ 7 마우스(KO, 도 10B)에서 정향 반사 결과를 나타낸 그래프. PBS 주사된 동물(WT, n=3; KO, n=5)을 대조군으로서 제공하였다.

도 11A 내지 도 11H는 실시예 10에 기술된 바와 같은 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 척추강내로 처리된 성체 레서스 마카크에서의 임상 병리학, CSF 화학 및 CSF 세포학을 나타낸 그래프.

도 12A 및 도 12B는 실시예 10에 기술된 바와 같은 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 척추강내로 처리된 성체 레서스 마카크에서 ISH(도 12A) 및 IHC(도 12B)에 의한 운동 뉴런 형질도입의 정량을 제공한 도면. 형광투시 유도 및 조영제를 사용하여 대조(cisterna magna)(대조내; ICM) 또는 요수조(lumbar cistern)(요추 천자; LP)에서 니들 배치를 확인하였다. 총 주사 부피는 ICM군(n=3)의 경우에는 1.0ml였고, LP 군의 경우 2.5ml(n=4) 또는 5.0 ml(n=4)였다. 주사 1개월 후, 동물을 희생시키고, 트랜스젠 mRNA의 경우에는 현장 혼성화(ISH)에 의해서 그리고 인간 SMN 단백질의 경우에는 면역조직화학(IHC)에 의해서 척수 단편에서 운동 뉴런 형질도입을 정량하였다.

도 13은 실시예 10에 기술된 바와 같은 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG로 척추강내로 처리된 성체 레서스 마카크에서의 생체내 분포를 제공한 도면.

도 14A 및 도 14B는 실시예 9에 기술된 바와 같은 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 ICV로 처리된 성체 C57BL/6J 마우스에서의 중량 모니터링 결과를 제공한 도면. 도 14A는 암컷 대상체에서의 중량 모니터링 결과를 제공한 도면. 도 14B는 수컷 대상체에서의 중량 모니터링 결과를 제공한 도면.

도 15a 및 도 15b는 AAVhu68.SMN 벡터에 대한 제조 흐름 다이어그램.

도 16A 내지 도 16E는 비인간 영장류에게 인간 SMN을 발현하는 AAV 벡터를 정맥내 투여한 후 급성 트랜스아미나제(transaminase) 증가를 나타낸 그래프. 도 16A는 실시예 14에 기술된 바와 같은 연구 설계를 제공한 도면. 도 16B는 혈청 ALT의 플롯을 제공한 도면. 도 16C는 혈청 AST의 플롯을 제공한 도면. 도 16D는 혈청 알칼리 포스파타제의 플롯을 제공한 도면. 도 16E는 혈청 총 빌리루빈의 플롯을 제공한 도면. 동물 16C176에게 안락사가 필요한 급성 간부전이 발생한지 연구일 5일 이후에 모든 동물에 대해서 비계획적 실험실 평가를 수행하였다. 동물 16C116 및 16C215에 대해서 AST를 연구일 5일에 수행하였다. 파선은 실험실 표준 범위를 나타낸다.

도 17A 내지 도 17D는 동물 16C176에 대한 간 조직병리학적 소견을 나타낸 대표적인 IHC 영상. 간문맥에서의 사인파형(sinusoidal) 피브린 침착(도 17B, 화살촉) 및 급성 피브린 혈전(도 17C)과 함께 거대 급성 간세포 괴사(도 17A)(헤마톡실린 및 에오신; 축척 막대 = $10 \mu\text{m}$ (도 17A 및 17C), $50 \mu\text{m}$ (도 17B)). 피브리노겐에 대한 면역조직화학은 현저한 문맥주위의 사인파형 피브린 침착(도 17D)을 도시한다(피브리노겐 IHC, 축척 막대는 $100 \mu\text{m}$ (도 17D)을 나타낸다).

도 18A 내지 도 18D는 주사 28일 후 인간 SMN을 발현하는 AAVhu68이 정맥내(IV)로 처리된 영아 NHP에서의 대표적인 신경계 조직병리학적 소견을 제공한 도면. 두 동물 모두는 척수의 등 백질 신경로(dorsal white matter tract)의 축삭병을 가졌다(도 18A). 등 축삭병은 전형적으로 양측성이었고, 축삭 변성과 일치하는, 골수성대식세포(myelomacrophage)가 있거나 없는 확장성 미엘린초(dilated myelin sheath)를 특징으로 하였다. 척수의 후근 신경절(dorsal root ganglia)(도 18B)은 중앙 염색질용해(central chromatolysis), 위성증(satellitosis) 및 뉴런 세포체를 둘러싸고 침입한 단핵구 세포 침윤물(신경세포포식현상(neuronophagia))을 특징으로 하는 미세 내지 경증의 뉴런 세포체 변성을 나타내었다. 유사한 축삭병은 뒷다리의 말초 신경(좌골 신경, 도 18C) 및 앞다리(정중 신경, 도 18D)에서 관찰되었다. 급성 간부전으로 인해서 5일에 안락사시킨 동물(16C176)은 신경계에서 소견을 갖지 않았다(헤마톡실린 및 에오신 염색; 축척 막대 = $200 \mu\text{m}$ (도 18A), $100 \mu\text{m}$ (도 18B 내지 18D)).

도 19는 레서스 마카크에서 벡터 생체내 분포를 제공한다. 간부전 및 쇼크가 발생하여 벡터 투여 5일 이후에 안락사시킨 동물 16C176을 제외하고는, 인간 SMN을 발현하는 정맥내 AAVhu68로 처리된 레서스 마카크를 주사 28일 후에 안락사시켰다. 벡터 게놈을 정량 PCR에 의해서 조직 샘플에서 검출하였다. 벡터 게놈 카피(GC)/숙주 이배체 게놈으로서 값을 표현한다. DRG = 후근 신경절. 데이터를 4개의 간엽(미엽(caudate), 좌엽, 중엽 및 우엽)에 대해서 나타낸다.

도 20A 내지 도 20G는 레서스 마카크에서의 SMN 발현을 나타낸 도면(인간 SMN RNA가 간에서 ISH에 의해서 검출됨(도 20A)). 간을 알부민(도 20B) 및 GFP(도 20C)에 대한 대조군 프로브로 염색하였다. SMN 발현 세포는 척수에서 ISH에 의해서 식별되었다(도 20D). 운동 뉴런은 ChAT ISH에 의해서 식별되었다(도 20E). 형질도입된 뉴런의 희귀한 패치가 뇌(도 20F, DAPI 핵 염색)에서 SMN ISH에 의해서 검출되었다. 척수의 각각의 수준에서 형질도입된 ChAT+ 운동 뉴런의 백분율을 정량하였다(도 20G). 오차 막대 = SEM.

도 21A 내지 도 21D는 7일령 및 30일령에서 인간 SMN을 발현하는 정맥내 AAVhu68로 처리된 새끼 돼지의 대표적인 조직병리학적 소견을 제공한 도면. 두 군 전체에서, 척수의 등 백질 신경로의 축삭병이 관찰되었다(도 21A). 등 축삭병은 양측성이었고, 축삭 변성과 일치하는, 골수성대식세포가 있거나 없는 확장성 미엘린초를 특징으로 하였다. 척수의 후근 신경절(도 21B)은 중앙 염색질용해, 위성증 및 뉴런 세포체를 둘러싸고 침입한 단핵구 세포 침윤물(신경세포식현상)을 특징으로 하는 다양한 정도의 뉴런 세포체 변성을 나타내었다. 유사한 축삭병은 대부분의 새끼 돼지에서 뒷다리의 말초 신경(좌골 신경, 도 21C) 및 앞다리(정중 신경, 도 21D)에서 다양한 정도로 관찰되었다(헤마톡실린 및 에오신; 축삭 막대 = 200 μ m(도 21A), 100 μ m(도 21B 내지 도 21D)).

도 22는 새끼 돼지에서 백터 생체내 분포를 제공한 도면. 인간 SMN을 발현하는 정맥내 AAVhu68로 처리된 갓 난 새끼 돼지를 주사 13 내지 14일 후에 안락사시켰다. 백터 게놈을 정량 PCR에 의해서 조직 DNA 샘플에서 검출하였다. 백터 게놈 카피(GC)/숙주 이배체 게놈으로서 값을 표현한다. DRG = 후근 신경절. 데이터를 4개의 간엽(미엽(caudate), 좌엽, 중엽 및 우엽)에 대해서 나타낸다.

도 23A 내지 도 23F는 새끼 돼지의 척수에서 SMN 발현을 나타낸 대표적인 영상. 인간 SMN RNA를 경추(도 23A), 흉추(도 23B) 및 요추(도 23C) 척수 분절에서 ISH에 의해서 검출하였다. 운동 뉴런을 상응하는 박편에서 ChAT ISH에 의해서 식별하였다(도 23D 내지 도 23F). 대표적인 영상을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 재조합 AAVhu68 백터로서, AAVhu68 캡시드 및 재조합 AAVhu68 백터를 필요로 하는 환자에서 이의 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에서 운동 뉴런의 생존(SMN) 유전자를 암호화하는 핵산을 갖는 재조합 AAVhu68 백터가 본 명세서에 제공된다. rAAVhu68 캡시드는 서열번호 7로부터 생산된 아미노산 서열 및/또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 독립적으로 갖는 단백질을 함유한다. SMA 환자의 치료를 위한 조성물에서의 이러한 백터의 용도와 마찬가지로, 이러한 백터를 함유하는 조성물이 제공된다. 실시에는 SMA 3(때로는 쿠겔베르그-벨란더병)의 치료에 초점을 맞추지만, 단독 또는 다른 공동 요법과 조합된 이러한 rAAV 백터는 SMA 타입 1, 2 또는 4에 대해서 고려된다. SMA는 염색체 5 상의 SMN1 유전자에서 결실 돌연변이에 대해서 혈액 시험을 사용하여 진단될 수 있다. 추가로 근육 시험, 예컨대, 근전도 또는 근육 생검을 사용하여 진단을 보조할 수 있다.

[0015] I. AAV

[0016] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "계통군"은 그것이 AAV의 군과 관련되는 경우, AAV vp1 아미노산 서열의 정렬을 기초로, (적어도 1000개의 복제부의) 적어도 75%의 부트스트랩(bootstrap) 값 및 0.05 이하의 프아송 보정 거리 측정치(Poisson correction distance measurement)에 의한 이웃-연결 알고리즘(Neighbor-Joining algorithm)을 사용하여 결정되는 바와 같이 서로에 계통 발생적으로 관련된 AAV의 군을 지칭한다. 이웃-연결 알고리즘은 문헌에 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics* (Oxford University Press, New York (2000)) 참고). 이러한 알고리즘을 구현하는 데 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램이 입수 가능하다. 예를 들어, MEGA v2.1 프로그램은 변형된 네이-고조보리(Nei-Gojobori) 방법을 구현한다. 이러한 기술 및 컴퓨터 프로그램, 및 AAV vp1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당업자는 선택된 AAV가 본 명세서에 식별된 계통군 중 하나에 또는 또 다른 계통군에 포함되는지, 또는 이러한 계통군에 포함되지 않는지를 쉽게 결정할 수 있다(예를 들어, 문헌[G Gao, *et al*, J Virol, 2004 Jun; 78(10): 6381-6388] 참고, 이것은 계통군 A, B, C, D, E 및 F를 식별하고, 신규 AAV의 핵산 서열, 젠뱅크 수탁 번호 AY530553 내지 AY530629를 제공함)(또한 국제 특허 제W02005/033321호 참고).

[0017] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "AAV9 캡시드"는 다수의 AAV9 vp 단백질로 구성된 자가 조립된 AAV 캡시드이다. AAV9 vp 단백질은 전형적으로 서열번호 16의 vp1 아미노산 서열(젠뱅크 수탁: AAS99264)을 암호화하는, 서열번호 22의 핵산 서열 또는 이와 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열에 의해서 암호화된 대안적인 스플라이스 변이체로서 발현된다. 이러한 스플라이스 변이체는 서열번호 16의 상이한 길이의 단백질을 생성한다. 특정 실시형태에서, "AAV9 캡시드"는 AAS99264와 99% 동일하거나 또는 서열번호 16과 99% 동일한 아미노산 서열을 갖는 AAV를 포함한다(또한 미국 특

허 제US7906111호 및 국제 특허 제W02005/033321호 참고). 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 "AAV9 변이체"는 예를 들어, 국제 특허 제W02016/049230호, 미국 특허 제US 8,927,514호, 제US 2015/0344911호, 및 제US 8,734,809호에 기술된 것을 포함한다.

[0018] rAAVhu68은 AAVhu68 캡시드 및 벡터 계놈으로 구성된다. AAVhu68 캡시드는 vp1의 이중 집단, vp2의 이중 집단, 및 vp3 단백질의 이중 집단의 조립체이다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이 vp 캡시드 단백질을 지칭하는 데 사용되는 경우, 용어 "이중" 또는 이의 임의의 문법적 변형은 예를 들어, 상이한 변형된 아미노산 서열을 갖는 vp1, vp2 또는 vp3 단량체(단백질)를 갖는 동일하지 않은 요소로 이루어진 집단을 지칭한다. 서열번호 8은 AAVhu68 vp1 단백질의 암호화된 아미노산 서열을 제공한다(또한 미국 가특허 출원 제62/614,002호, 제62/591,002호 및 제62/464,748호 참고, 이들 각각은 발명의 명칭이 "Novel Adeno-Associated Virus (AAV) Clade F Vector and Uses Therefor"이며, 이들은 본 명세서에 전문이 참고로 포함됨).

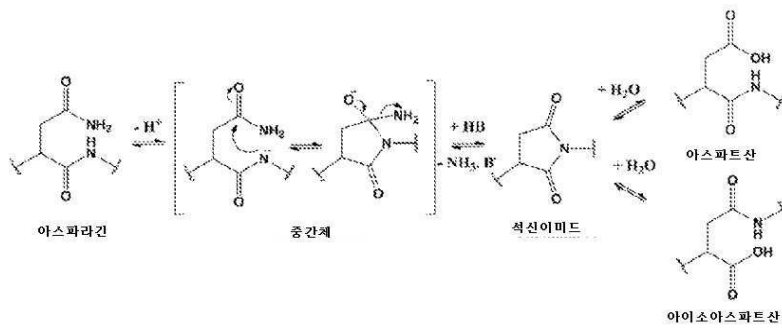
[0019] AAVhu68 캡시드는 서열번호 8에서 예측된 아미노산 잔기로부터 변형을 갖는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질 내의 하위집단을 함유한다. 이러한 하위집단은, 최소한, 특정 탈아미이드화된(deamidated) 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 특정 하위집단은 서열번호 8에서 아스파라긴 - 글리신 쌍 내에 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아미이드화된 아스파라긴(N) 위치를 포함하고, 선택적으로 다른 탈아미이드화된 아미노산을 추가로 포함하며, 여기서 탈아미이드화는 아미노산 변화 및 다른 선택적인 변형을 초래한다. 서열번호 26은 변형된 AAVhu68 캡시드의 아미노산 서열을 제공하며, 이것은 탈아미이드화되거나 달리 변형될 수 있는 잔기 위치를 설명한다.

[0020] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, vp 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 공통적으로 적어도 하나의 정의된 특징을 갖고, 적어도 하나의 군 구성원 내지 참조군의 모든 구성원보다 적은 수의 군 구성원으로 이루어진 vp 단백질의 군을 지칭한다. 예를 들어, vp1 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 적어도 하나(1)의 vp1 단백질이고, 조립된 AAV 캡시드 내의 모든 vp1 단백질보다 더 적다. vp3 단백질의 "하위집단"은 달리 명시되지 않는 한, 하나(1)의 vp3 단백질 내지 조립된 AAV 캡시드 내의 모든 vp3 단백질보다 더 적은 수일 수 있다. 예를 들어, vp1 단백질은 vp 단백질의 하위집단일 수 있고; vp2 단백질은 vp 단백질의 별개의 하위집단일 수 있고, vp3은 조립된 AAV 캡시드 내의 vp 단백질의 더 추가의 하위집단이다. 또다른 예에서, vp1, vp2 및 vp3 단백질은 예를 들어, 아스파라긴 - 글리신 쌍에서, 상이한 변형, 예를 들어, 적어도 1개, 2개, 3개 또는 4개의 고도로 탈아미이드화된 아스파라긴을 갖는 하위집단을 함유할 수 있다.

[0021] 달리 명시되지 않는 한, 고도로 탈아미이드화된 참조 아미노산 위치에서 예측된 아미노산 서열과 비교할 때, 참조된 아미노산 위치에서 적어도 45% 탈아미이드화된, 적어도 50% 탈아미이드화된, 적어도 60% 탈아미이드화된, 적어도 65% 탈아미이드화된, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 97%, 99%, 최대 약 100% 탈아미이드화된 것을 지칭한다(예를 들어, 서열번호 8의 아미노산 57에서 아스파라긴의 적어도 80%가 총 vp1 단백질을 기준으로 탈아미이드화될 수 있거나 또는 서열번호 8의 아미노산 409에서 아스파라긴의 20%가 총 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 기준으로 탈아미이드화될 수 있다). 이러한 백분율은 2D-젤, 질량 분석법 기술, 또는 다른 적합한 기술을 사용하여 결정될 수 있다.

[0022] 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, AAVhu68 캡시드 내의 vp 단백질에서의 적어도 고도로 탈아미이드화된 잔기의 탈아미이드화는 본래 주로 비효소적이라고 여겨지는데, 이는 선택된 아스파라긴, 더 적은 정도로는, 글루타민 잔기를 탈아미이드화시키는 캡시드 단백질 내의 작용기에 의해서 유발된다. 대부분의 탈아미이드화 vp1 단백질의 효율적인 캡시드 조립은, 이러한 사건이 캡시드 조립 이후에 일어나거나 개별 단량체(vp1, vp2 또는 vp3)에서의 탈아미이드화는 구조적으로 양호하게 용인되고, 조립 동역학에 크게 영향을 미치지 않음을 나타낸다. 일반적으로, 세포 유입 이전에 내부에 위치될 것이라고 간주되는 VP1-고유한(VP1-u) 영역(약 aa 1 내지 137)에서의 대규모의 탈아미이드화는, VP 탈아미이드화가 캡시드 조립 이전에 일어날 수 있음을 시사한다.

[0023] 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, N의 탈아미이드화는, 이의 C-말단 잔기의 골격 질소 원자가 Asn의 측쇄 아미노산 원자에 대한 친핵성 공격을 수행함으로써 일어날 수 있다. 중간체 폐환(ring-closed) 석신이미드 잔기가 형성되는 것으로 여겨진다. 이어서 석신이미드 잔기는 신속한 가수분해가 수행되어 최종 산물 아스파르트산(Asp) 또는 아이소 아스파르트산(IsoAsp)이 생성된다. 따라서, 특정 실시형태에서, 아스파라긴(N 또는 Asn)의 탈아미이드화는 Asp 또는 IsoAsp를 생성하고, 이것은 하기에 설명되는 바와 같이, 예를 들어 석신이미드 중간체를 통해서 상호 전환될 수 있다.



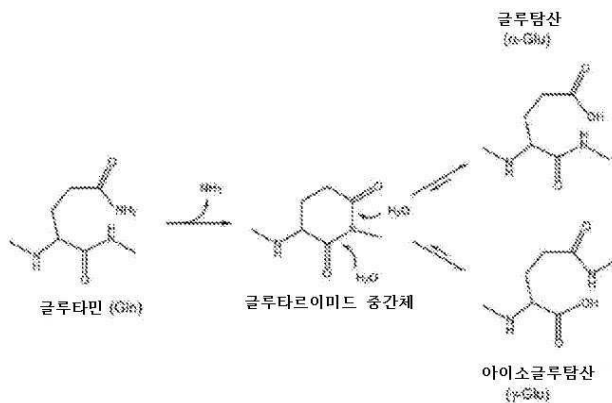
[0024]

[0025]

본 명세서에 제공된 바와 같이, 서열번호 8의 각각의 탈아미드화된 N은 독립적으로 아스파르트산(Asp), 아이소아스파르트산(isoAsp), 아스파테이트 및/또는 Asp와 isoAsp의 상호전환 블렌드 또는 이들의 조합물일 수 있다. α-와 아이소아스파르트산의 임의의 적합한 비가 존재할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비는 10:1 내지 1:10의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 약 50:50의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 또는 약 1:3의 아스파르트산 대 아이소아스파르트산, 또는 또 다른 선택된 비일 수 있다.

[0026]

특정 실시형태에서, 서열번호 8 내의 하나 이상의 글루타민(Q)은 글루탐산(Glu), 즉, α-글루탐산, γ-글루탐산(Glu), 또는 α-글루탐산과 γ-글루탐산의 블렌드로 탈아미드화되며, 이것은 일반적인 글루타라이미드 중간체를 통해서 상호전환될 수 있다. α-글루탐산과 γ-글루탐산의 임의의 적합한 비가 존재할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 비는 10:1 내지 1:10의 α 대 γ, 약 50:50의 α:γ, 또는 약 1:3의 α:γ, 또는 또 다른 선택된 비일 수 있다.



[0027]

[0028]

따라서, rAAVhu68은 최소한, 적어도 하나의 고도로 탈아미드화된 아스파라긴을 포함하는 적어도 하나의 하위 집단을 포함하는, 탈아미드화된 아미노산을 갖는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 rAAVhu68 캡시드 내의 하위 집단을 포함한다. 또한, 다른 변형은 특히 선택된 아스파르트산(D 또는 Asp) 잔기 위치에서 이성질체화를 포함할 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, 변형은 Asp 위치에서의 아미드화를 포함할 수 있다.

[0029]

특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 적어도 4 내지 적어도 약 25개의 탈아미드화된 아미노산 잔기 위치를 갖는 vp1, vp2 및 vp3의 하위집단을 함유하며, 서열번호 8의 암호화된 아미노산 서열과 비교할 때 이의 적어도 1 내지 10%는 탈아미드화된다. 이들 대부분은 N 잔기일 수 있다. 그러나, Q 잔기가 또한 탈아미드화될 수 있다.

[0030]

특정 실시형태에서, AAV68 캡시드는 하기 중 하나 이상을 추가로 특징으로 한다. AAVhu68 캡시드 단백질은 하기를 포함한다: 서열번호 8의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, 서열번호 7로부터 생산된 vp1 단백질 또는 서열번호 8의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp1 단백질; 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp2 단백질, 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp2 단백질 또는 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp2 단백질, 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산

된 AAVhu68 vp3, 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp3 단백질 또는 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp3 단백질.

[0031] 추가로 또는 대안적으로, vp1 단백질의 이중 집단, 선택적으로 위치 157에서 발린을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAV 캡시드가 제공되며, 여기서 적어도 vp1 및 vp2 단백질의 하위집단은 서열번호 8의 vp1 캡시드의 넘버링을 기준으로 위치 157에서 발린을 포함하고, 선택적으로 위치 67에서 글루탐산을 추가로 포함한다. 추가로 또는 대안적으로, 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백질의 이중 집단, 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp2 단백질의 이중 집단 및 서열번호 8의 적어도 아미노산 203 내지 736을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAVhu68 캡시드가 제공되며, 여기서 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 아미노산 변형을 갖는 하위집단을 함유한다.

[0032] AAVhu68 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 전형적으로 서열번호 8의 전장 vp1 아미노산 서열(아미노산 1 내지 736)을 암호화하는 동일한 핵산 서열에 의해서 암호화된 대안적인 스플라이스 변이체로서 발현된다. 선택적으로 vp1-암호 서열은 단독으로 사용되어 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 발현한다. 대안적으로, 이러한 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211), 또는 서열번호 8의 aa 203 내지 736을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열 중 하나 이상과 함께 공동 발현될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, vp1-암호 및/또는 vp2-암호 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 nt 412 내지 nt 2211), 또는 서열번호 8의 aa 138 내지 736을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열과 함께 공동 발현될 수 있다.

[0033] 본 명세서에 기술된 바와 같이, rAAVhu68은 서열번호 8의 vp1 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 핵산, 및 선택적으로 예를 들어, vp1 및/또는 vp2-고유 영역이 없는 vp 3 단백질을 암호화하는 추가 핵산 서열로부터 캡시드를 발현하는 생산 시스템에서 생산된 rAAVhu68 캡시드이다. 단일 핵산 서열 vp1을 사용한 제조로부터 유래된 rAAVhu68은 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질의 이중 집단을 생산한다. 보다 특별하게는, AAVhu68 캡시드는 서열번호 8에서 예측된 아미노산 잔기로부터 변형을 갖는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질 내의 하위집단을 함유한다. 이러한 하위집단은, 최소한, 탈아미드화된 아스파라긴(N 또는 Asn) 잔기를 포함한다. 예를 들어, 아스파라긴 - 글리신 쌍 내의 아스파라긴은 고도로 탈아미드화된다.

[0034] 일 실시형태에서, AAVhu68 vp1 핵산 서열은 서열번호 7의 서열, 또는 이와 상보성인 가닥, 예를 들어, 상응하는 mRNA 또는 tRNA를 갖는다. 특정 실시형태에서, vp2 및/또는 vp3 단백질은 추가로 또는 대안적으로 예를 들어, 선택된 발현 시스템에서 vp 단백질의 비를 변경하기 위해서, vp1과 상이한 핵산 서열로부터 발현될 수 있다. 특정 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211)을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다. 특정 실시형태에서, vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 nt 412 내지 2211)을 암호화하는 핵산 서열이 또한 제공된다.

[0035] 그러나, 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 다른 핵산 서열이 rAAVhu68 캡시드를 제조하는 데 사용하기 위해서 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 7의 핵산 서열 또는 서열번호 8을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 99% 동일한, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 7의 약 nt 412 내지 약 nt 2211의 핵산 서열 또는 서열번호 8의 vp2 캡시드 단백질(약 aa 138 내지 736)을 암호화하는 서열번호 7의 약 nt 412 내지 약 nt 2211과 적어도 70% 내지 99%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211의 핵산 서열 또는 서열번호 8의 vp3 캡시드 단백질(약 aa 203 내지 736)을 암호화하는 서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211과 적어도 70% 내지 99%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%,

적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 동일한 서열을 갖는다.

[0036] DNA(게놈 또는 cDNA), 또는 RNA(예를 들어, mRNA)를 비롯한, 이러한 AAVhu68 캡시드를 암호화하는 핵산 서열을 설계하는 것은 관련 기술 분야의 기술에 포함된다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 서열번호 7에 제공된다(또한 도 8b 내지 도 8d 참고). 다른 실시형태에서, 서열번호 7과 70% 내지 99.9%의 동일성의 핵산 서열은 AAVhu68 캡시드 단백질을 발현하도록 선택될 수 있다. 특정 다른 실시형태에서, 핵산 서열은 서열번호 7과 적어도 약 75% 동일하거나, 적어도 80% 동일하거나, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97% 동일하거나, 또는 적어도 99% 내지 99.9% 동일하다. 이러한 핵산 서열은 다양한 방법에 의해서 설계될 수 있는 선택된 시스템(즉, 세포 타입)에서 발현에 대해서 코돈-최적화될 수 있다. 이러한 최적화는 입수 가능한 온라인(예를 들어, 젠아트(GeneArt)) 방법, 공개된 방법 또는 코돈 최적화 서비스를 제공하는 회사, 예를 들어, DNA2.0(미국 캘리포니아주 멘로 파크 소재)을 사용하여 수행될 수 있다. 한 코돈 최적화 방법은 예를 들어, 본 명세서에 참고로 전문이 포함된 미국 국제 특허 공개 제WO 2015/012924호에 기술되어 있다(또한, 예를 들어, 미국 특허 공개 제2014/0032186호 및 미국 특허 공개 제2006/0136184호 참고). 적합하게는, 이러한 산물에 대한 오픈 리딩 프레임(ORF)의 전체 길이는 변형된다. 그러나, 일부 실시형태에서, ORF의 단편이 변경될 수 있다. 이러한 방법 중 하나를 사용함으로써, 임의의 주어진 폴리펩타이드 서열에 빈도를 적용할 수 있고, 폴리펩타이드를 암호화하는 코돈-최적화된 암호 영역의 핵산 단편을 생산할 수 있다. 코돈에 대한 실제 변화를 수행하기 위해서 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 코돈-최적화된 암호 영역을 합성하기 위해서 다수의 선택이 사용 가능하다. 이러한 변형 또는 합성은 당업자에게 널리 공지된 표준 및 일상적인 분자 생물학 조작을 사용하여 수행될 수 있다. 한 접근법에서, 각각 80 내지 90개 뉴클레오타이드 길이의 일련의 상보성 올리고뉴클레오타이드 쌍 및 목적하는 서열의 길이의 스페닝은 표준 방법에 의해서 합성된다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 쌍은, 어닐링 시, 이것이 응집성(cohesive) 단부를 함유하는, 80 내지 90개의 염기 쌍의 이중 가닥 단편을 형성하도록 합성되고, 예를 들어, 쌍 내의 각각의 올리고뉴클레오타이드는 쌍 내의 다른 올리고뉴클레오타이드와 상보성인 영역을 넘어서서 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 또는 그 초과 염기를 연장하도록 합성된다. 올리고뉴클레오타이드의 각각의 쌍의 단일 가닥 단부는 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 쌍의 단일 가닥 단부와 어닐링되도록 설계된다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링되는 것이 허용되며, 이어서 이러한 이중 가닥 단편 중 대략 5 내지 6개는 응집성 단일 가닥 단부를 통해서 함께 어닐링되는 것이 허용되고, 이어서 이것은 함께 결합되고, 표준 박테리아 클로닝 벡터, 예를 들어, 인비트로젠 코퍼레이션사(Invitrogen Corporation)(미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)로부터 입수 가능한 TOPO(등록상표) 벡터 내에 클로닝된다. 이어서 작제물은 표준 방법에 의해서 서열결정된다. 함께 결합된 80 내지 90개의 염기 쌍 단편의 5 내지 6개의 단편, 즉, 약 500개의 염기 쌍의 단편으로 이루어진 이러한 작제물 중 몇몇이 제조되어, 전체 목적하는 서열이 일련의 플라스미드 작제물에서 표현된다. 이어서, 이러한 플라스미드의 삽입물은 적절한 제한 효소로 절단되고, 함께 결합되어 최종 작제물을 형성한다. 이어서, 최종 작제물은 표준 박테리아 클로닝 벡터 내에 클로닝되고, 서열결정된다. 추가 방법은 당업자에게 즉시 자명할 것이다. 또한, 유전자 합성법은 상업적으로 쉽게 입수 가능하다.

[0037] 특정 실시형태에서, AAVhu68 vp1, vp2 및 vp3 단백질에서 N-G 쌍 내의 아스파라긴(N)은 고도로 탈아미드화된 다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 고도로 탈아미드화된 AAVhu68 캡시드 단백질 내에 적어도 4개의 아스파라긴(N) 위치를 갖는 AAV vp 1, vp2 및/또는 vp3 캡시드 단백질의 하위집단을 함유한다. 특정 실시형태에서, N-N 쌍(N-N-N 삼중 제외) 중 약 20 내지 50%는 탈아미드화를 나타낸다. 특정 실시형태에서, 제 1 N은 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 제 2 N은 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 탈아미드화는 약 15% 내지 약 25% 탈아미드화이다. 서열번호 8의 위치 259의 Q에서의 탈아미드화는 AAVhu68 단백질의 AAVhu68 vp1, vp2 및 vp3 캡시드 단백질의 약 8% 내지 약 42%이다.

[0038] 특정 실시형태에서, rAAVhu68 캡시드는 추가로 D297 the vp1, vp2 및 vp3 단백질에서의 아미드화를 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드에서 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 위치 297에서 D의 약 70% 내지 약 75%는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 아미드화된다.

[0039] 특정 실시형태에서, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 Asp는 D-Asp로 이성질체화된다. 이러한 이성질체는 일반적으로 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 잔기 위치 97, 107, 384 중 하나 이상에서 Asp의 약 1% 미만의 양으로 존재한다.

[0040] 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 하기 표에 언급된 위치에서 2개, 3개, 4개 또는 그 초과 탈아미드화된 잔기의 조합물을 포함하는 하위집단을 갖는 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 갖는 AAVhu68 캡시드를 갖는다. rAAV에서의 탈아미드화는 2D 젤 전기영동법, 및/또는 질량 분석법, 및/또는 단백질 모델링 기술을 사용하여 결정될 수 있다. 온라인 크로마토그래피는 Acclaim PepMap 칼럼 및 NanoFlex 소스를 갖는 Q Exactive HF(썬다 피셔 사이언

티픽사(Thermo Fisher Scientific))에 커플링된 Thermo UltiMate 3000 RSLC 시스템(써모 피셔 사이언티픽사)을 사용하여 수행될 수 있다. MS 데이터는 조사 스캔(200 내지 2000m/z)으로부터의 가장 풍부한 서열결정전(not-yet-sequenced) 전구체 이온을 동력학적으로 선택하는 Q Exactive HF에 대한 데이터 의존적인 탑-20 방법을 사용하여 획득된다. 서열결정은 예측된 자동 이득 제어로 결정된 $1e5$ 이온의 목표 값을 사용한 고 에너지 충돌 분열 단편화를 통해서 수행되고, 전구체의 단리는 $4m/z$ 의 창으로 수행되었다. 조사 스캔은 m/z 200에서 120,000의 분해능으로 획득되었다. HCD 스펙트럼에 대한 분해능은 50ms의 최대 이온 주입 및 30의 정규화된 충돌 에너지를 사용하여 m/z 200에서 30,000으로 설정될 수 있다. S-렌즈 RF 수준은 50에서 설정되어, 소화로부터 펩타이드에 의해서 점유된 m/z 영역 영역의 최적의 전달을 제공할 수 있다. 전구체 이온은 단편화 선택으로부터 단일, 비배정, 또는 6 및 더 높은 전하 상태로 제외될 수 있다. BioPharma Finder 1.0 소프트웨어(써모 피셔 사이언티픽사)가 획득된 데이터의 분석을 위해서 사용될 수 있다. 펩타이드 매핑을 위해서, 고정된 변형으로서 설정된 카바마이드메틸화; 및 가변 변형으로서 설정된 산화, 탈아미드화, 및 포스포릴화, 10-ppm 질량 정확도, 높은 프로테아제 특이성 및 MS/MS 스펙트럼에 대한 0.8의 신뢰 수준을 갖는 단기식 단백질 FASTA 데이터베이스를 사용하여 탐색을 수행한다. 적합한 프로테아제의 예는 예를 들어, 트립신 또는 키모트립신을 포함할 수 있다. 탈아미드화된 펩타이드의 질량 분석법적 식별은 비교적 간단한데, 그 이유는 탈아미드화가 무손상 분자 +0.984Da의 질량(-OH와 -NH₂기 간의 질량 차이)에 추가되기 때문이다. 특정 펩타이드의 백분율 탈아미드화는 탈아미드화된 펩타이드의 질량 면적을, 탈아미드화된 펩타이드와 네이티브 펩타이드의 면적의 합으로 나눈으로써 결정된다. 가능한 탈아미드화 부위의 수를 고려하여, 상이한 부위에서 탈아미드화된 동중 원소종(isobaric species)이 단일 피크에서 동시에 이동할 수 있다. 결론적으로, 다수의 잠재적인 탈아미드화 부위를 갖는 펩타이드로부터 기원한 단편 이온을 사용하여 탈아미드화의 다수의 부위를 위치시키거나 구별할 수 있다. 이러한 경우에, 관찰된 동위원소 패턴 내의 상대 강도를 사용하여 상이한 탈아미드화된 펩타이드 이성질체의 상대 풍부도를 구체적으로 결정할 수 있다. 이러한 방법은, 모든 이성질체 종에 대한 단편화 효율성이 동일하고, 탈아미드화 부위에 의존적이라고 가정한다. 이러한 예시적인 방법에 대한 다수의 변경이 사용될 수 있음이 당업자에 의해서 이해될 것이다. 예를 들어, 적합한 질량 분석기는, 예를 들어, 사극자 비행 시간 질량 분석기(quadrupole time of flight mass spectrometer: QTOF), 예컨대, Waters Xevo 또는 Agilent 6530 또는 오비트랩 장비(orbitrap instrument), 예컨대, Orbitrap Fusion 또는 Orbitrap Velos(써모 피셔사(Thermo Fisher))를 포함할 수 있다. 적합하게는 액체 크로마토그래피 시스템은 예를 들어, Waters 또는 Agilent 시스템으로부터의 Acquity UPLC 시스템(1100 또는 1200 시리즈)을 포함한다. 적합한 데이터 분석 소프트웨어는 예를 들어, MassLynx(워터스사(Waters)), Pinpoint 및 Pepfinder(써모 피셔 사이언티픽사), Mascot(매트릭스 사이언스사(Matrix Science)), Peaks DB(바이오인포매틱스 솔루션즈사(Bioinformatics Solutions))를 포함할 수 있다. 추가의 다른 기술은 예를 들어, 문헌[X. Jin et al, Hu Gene Therapy Methods, Vol. 28, No. 5, pp. 255-267, published online June 16, 2017]에 기술될 수 있다.

예측된 AAVHu68[서열번호 8]을 기초로 하는 탈아미드화	AAVhu68 캡시드 내의 VP1/VP2/VP3 단백질을 기초로 하는 평균 %	
탈아미드화된 잔기 + I(이웃하는 AA)	넓은 범위의 백분율(%)	좁은 범위(%)
N57 (N-G)	78 내지 100%	80 내지 100, 85 내지 97
N66 (N-E)	0 내지 5	0, 1 내지 5
N94 (N-H)	0 내지 15,	0, 1 내지 15, 5 내지 12, 8
N118 (N-L)	0 내지 2	0, 1 내지 2
~N253 (N-N)	10 내지 25	15 내지 22
Q259 (Q-I)	8 내지 42	10 내지 40, 20 내지 35
~N270 (N-D)	12 내지 30	15 내지 28
~N304 (N-N) (위치 303 또한 N)	0 내지 5	1 내지 4
N319	0 내지 5	0, 1 내지 5, 1 내지 3

[0041]

예측된 AAVHu68[서열번호 8]을 기초로 하는 탈아미이드화	AAVhu68 캡시드 내의 VP1/VP2/VP3 단백질을 기초로 하는 평균 %	
탈아미이드화된 잔기 + 1(이웃하는 AA)	넓은 범위의 백분율(%)	좁은 범위(%)
(N-I)		
N329 * (N-G)*(위치 328 또한 N)	65 내지 100	70 내지 95, 85 내지 95, 80 내지 100, 85 내지 100,
N336 (N-N)	0 내지 100	0, 1 내지 10, 25 내지 100, 30 내지 100, 30 내지 95
~N409 (N-N)	15 내지 30	20 내지 25
N452 (N-G)	75 내지 100	80 내지 100, 90 내지 100, 95 내지 100,
N477 (N-Y)	0 내지 8	0, 1 내지 5
N512 (N-G)	65 내지 100	70 내지 95, 85 내지 95, 80 내지 100, 85 내지 100,
~N515 (N-S)	0 내지 25	0, 1 내지 10, 5 내지 25, 15 내지 25
~Q599 (Asn-Q-Gly)	1 내지 20	2 내지 20, 5 내지 15
N628 (N-F)	0 내지 10	0, 1 내지 10, 2 내지 8

[0042]

예측된 AAVHu68[서열번호 8]을 기초로 하는 탈아미이드화	AAVhu68 캡시드 내의 VP1/VP2/VP3 단백질을 기초로 하는 평균 %	
탈아미이드화된 잔기 + 1(이웃하는 AA)	넓은 범위의 백분율(%)	좁은 범위(%)
N651 (N-T)	0 내지 3	0, 1 내지 3
N663 (N-K)	0 내지 5	0, 1 내지 5, 2 내지 4
N709 (N-N)	0 내지 25	0, 1 내지 22, 15 내지 25
N735	0 내지 40	0, 1 내지 35, 5 내지 50, 20 내지 35

[0043]

[0044]

특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 N 잔기의 적어도 45%가 서열번호 8의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로 위치 N57, N329, N452, 및/또는 N512 중 적어도 하나에서 탈아미이드화된 캡시드 단백질을 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, 이러한 N-G 위치(즉, 서열번호 8의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, N57, N329, N452, 및/또는 N512) 중 하나 이상에서 N 잔기의 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도

90%가 탈아미드화된다. 이들 또는 다른 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 추가로 N 잔기의 약 1% 내지 약 20%가 서열번호 8의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, 위치: N94, N253, N270, N304, N409, N477, 및/또는 Q599 중 하나 이상에서 탈아미드화를 갖는 단백질의 집단을 갖는 것을 특징으로 한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 은 적어도 서열번호 8의 아미노산 서열의 넘버링을 기준으로, 위치 N35, N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, N735 또는 이들의 조합물 중 하나 이상에서 탈아미드화된 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, 캡시드 단백질은 하나 이상의 아미드화된 아미노산을 가질 수 있다.

[0045] 추가의 다른 변형이 관찰되며, 이들 중 대부분은 하나의 아미노산을 상이한 아미노산기로 전환시키지 않는다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및 vp3에서 적어도 하나의 Lys은 아세틸화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 Asp는 D-Asp로 이성질체화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 S(Ser, 세린)는 포스포릴화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 T(Thr, 트레오닌)는 포스포릴화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 W(trp, 트립토판)는 산화된다. 선택적으로, 캡시드의 vp1, vp2 및/또는 vp3에서 적어도 하나의 M(Met, 메티오닌)은 산화된다. 특정 실시형태에서, 캡시드 단백질은 하나 이상의 포스포릴화를 갖는다. 예를 들어, 특정 vp1 캡시드 단백질은 위치 149에서 포스포릴화될 수 있다.

[0046] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백질의 이중 집단(여기서 vp1 단백질은 위치 67에서 글루탐산(Glu) 및/또는 위치 157에서 발린(Val)을 포함함); 선택적으로 위치 157에서 발린(Val)을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단; 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함한다. AAVhu68 캡시드는 적어도 하나의 하위집단을 함유하는데, 여기서 서열번호 8의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 위치 57에 위치된 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 아스파라긴(N)의 적어도 65% 및 vp1, v2 및 vp3 단백질의 위치 329, 452 및/또는 512에서 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 아스파라긴(N)의 적어도 70% 탈아미드화되고, 여기서 탈아미드화는 아미노산 변화를 초래한다. 본 명세서에 보다 상세하게 논의된 바와 같이, 탈아미드화된 아스파라긴은 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합물로 탈아미드화될 수 있다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 하기 중 하나를 추가로 특징으로 한다: (a) vp2 단백질 각각은 독립적으로 적어도 서열번호 8의 vp2 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 산물임; (b) vp3 단백질 각각은 독립적으로 적어도 서열번호 8의 vp3 단백질을 암호화하는 핵산 서열의 산물임; (c) vp1 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 7, 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열임. 선택적으로 그 서열은 단독으로 사용되어 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 발현한다. 대안적으로, 이러한 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 137) 및/또는 vp2-고유 영역(약 aa 1 내지 약 aa 202)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp3 아미노산 서열(약 aa 203 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211), 또는 서열번호 8의 aa 203 내지 736을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열 중 하나 이상과 함께 공동 발현될 수 있다. 추가로, 또는 대안적으로, vp1-암호 및/또는 vp2-암호 서열은 vp1-고유 영역(약 aa 1 내지 약 137)이 없는 서열번호 8의 AAVhu68 vp2 아미노산 서열(약 aa 138 내지 736), 또는 이와 상보성인 가닥, 상응하는 mRNA 또는 tRNA(서열번호 7의 nt 412 내지 nt 2211), 또는 서열번호 8의 aa 138 내지 736을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99%(예를 들어, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 동일한 서열을 암호화하는 핵산 서열과 함께 공동 발현될 수 있다.

[0047] 추가로 또는 대안적으로, rAAVhu68 캡시드는 적어도 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 N57, N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N329, N336, N409, N410, N452, N477, N512, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709 또는 이들의 조합물 중 하나 이상에서 탈아미드화된 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (e) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 N66, N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, 또한 이들의 조합물 중 하나 이상에서 1% 내지 20%의 탈아미드화를 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (f) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 위치 57에서의 N의 65% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함하고; (g) rAAVhu68 캡시드는 vp1 단백질의 위치 57에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함하고; (h) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 329에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1

단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (i) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 452에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (j) rAAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 512에서의 N의 80% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함하고; (k) rAAV는 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함하고; (l) rAAV는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 9의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다.

[0048]

특정 실시형태에서, AAVhu68은 탈아미드화를 감소시키기 위해서, 아스파라긴-글리신 쌍에서 글리신을 변화시키도록 변형된다. 다른 실시형태에서, 아스파라긴은 상이한 아미노산, 예를 들어, 더 느린 속도로 아미드화시키는 글루타민으로; 또는 아미드기가 결핍된 아미노산으로(예를 들어, 글루타민 및 아스파라긴은 아미드기를 함유함); 그리고/또는 아민기가 결핍된 아미노산으로(예를 들어, 라이신, 아르기닌 및 히스티딘은 아미드기를 함유함) 변경된다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 아미드 또는 아민 측쇄가 결핍된 아미노산은 예를 들어, 글리신, 알라닌, 발린, 류신, 아이소류신, 세린, 트레오닌, 시스테인, 페닐알라닌, 타이로신 또는 트립토판, 및/또는 프롤린을 지칭한다. 예컨대, 기술된 변형은 암호화된 AAVhu68 아미노산 서열에서 발견되는 아스파라긴-글리신 쌍 중 1개, 2개 또는 3개에 존재할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형은 아스파라긴 - 글리신 쌍 중 4개 모두에서 일어나지는 않는다. 따라서, AAVhu68 및/또는 조작된 AAVhu68 변이체의 탈아미드화를 감소시키는 방법은 더 낮은 탈아미드화 속도를 갖는다. 추가로, 또는 대안적으로 하나 이상의 다른 아미드 아미노산은 AAVhu68의 탈아미드화를 감소시키기 위해서 비-아미드 아미노산으로 변화될 수 있다.

[0049]

이러한 아미노산 변형은 종래의 유전자 조작 기술에 의해서 수행될 수 있다. 예를 들어, 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열이 생성될 수 있는데, 여기서 서열번호 8(아르기닌 - 글리신 쌍)에서 위치 58, 330, 453 및/또는 513의 글리신을 암호화하는 코돈 중 1개 내지 3개가 글리신이 아닌 아미노산을 암호화하도록 변형된다. 특정 실시형태에서, 변형된 아르기닌 코돈을 함유하는 핵산 서열은 서열번호 8에서 위치 57, 329, 452 및/또는 512에 위치된 아르기닌 - 글리신 쌍 중 1개 내지 3개가 조작되어, 변형된 코돈은 아르기닌이 아닌 아미노산을 암호화한다. 각각의 변형된 코돈은 상이한 아미노산을 암호화할 수 있다. 대안적으로, 변경된 코돈 중 하나 이상은 동일한 아미노산을 암호화할 수 있다. 특정 실시형태에서, 이러한 변형된 AAVhu68 핵산 서열은 네이티브 hu68 캡시드보다 더 낮은 탈아미드화를 갖는 캡시드를 갖는 돌연변이체 rAAVhu68을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 이러한 돌연변이체 rAAVhu68은 감소된 면역성을 갖고/갖거나 저장, 특히 현탁액 형태로의 저장에 대한 안정성을 증가시킬 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "코돈"은 아미노산을 암호화하는 서열의 3개의 뉴클레오타이드를 지칭한다.

[0050]

일 실시형태에서, 하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스(rAAV)가 제공된다: (A) 하기 중 하나 이상을 포함하는 AAV68 캡시드: (1) 서열번호 8의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, 서열번호 7로부터 생산된 vp1 단백질 또는 서열번호 8의 1 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp1 단백질; 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp2 단백질, 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp2 단백질 또는 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 412 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp2 단백질, 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp3, 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211을 포함하는 서열로부터 생산된 vp3 단백질 또는 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 203 내지 736의 예측된 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7의 적어도 뉴클레오타이드 607 내지 2211과 적어도 70% 동일한 핵산 서열로부터 생산된 vp3 단백질을 포함하는 AAVhu68; 및/또는 (2) 선택적으로 위치 157에 발린 및/또는 위치 67에 글루탐산을 포함하는 vp1 단백질의 이중 집단, 선택적으로 위치 157에 발린을 포함하는 vp2 단백질의 이중 집단, 및 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하는 AAV 캡시드 단백질(여기서 적어도 vp1 및 vp2 단백질의 하위집단은 서열번호 8의 vp1 캡시드의 넘버링을 기준으로 위치 157에서 발린을 포함하고, 선택적으로 위치 67에서 글루탐산을 추가로 포함함); 및/또는 (3) 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp1 단백질의 이중 집단, 서열번호 8의 적어도 약 아미노산 138 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp2 단백질의 이중 집단 및 서열번호 8의 적어도 아미노산 203 내지 736을 암호화하는 핵산 서열의 산물인 vp3 단백질의 이중 집단(여기서 vp1, vp2 및 vp3 단백질은 서열번호 8에서 아스파라긴 - 글리신 쌍 내에 적어도 2개의 고도로 탈아미드화된 아스파라긴(N)을 포함하는 아미노산 변형을 갖는 하위 집단을 함유하고, 선택적으로 추가로 다른 탈아미드화

된 아미노산을 포함하는 하위집단을 포함하며, 여기서 탈아미드화는 아미노산 변화를 초래함); 및 (B) AAVhu68 캡시드 내의 벡터 게놈으로서, 벡터 게놈은 AAV 반전 말단 반복부 서열 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함하는 핵산 분자를 포함하는, 벡터 게놈. 예를 들어, 4개의 잔기(N57, N329, N452, N512)는 일상적으로 높은 수준의 탈아미드화를 나타낸다. 추가 잔기(N94, N253, N270, N304, N409, N477 및 Q599)는 또한 다양한 로트에 걸쳐서 최대 약 20%의 탈아미드화 수준을 나타낸다.

[0051] 특정 실시형태에서, 탈아미드화된 아스파라긴은 아스파르트산, 아이소아스파르트산, 상호전환 아스파르트산/아이소아스파르트산 쌍, 또는 이들의 조합물로 탈아미드화된다. 특정 실시형태에서, 탈아미드화된 글루타민(들)은 (α)-글루탐산, γ-글루탐산, 상호전환 (α)-글루탐산/γ-글루탐산 쌍, 또한 이들의 조합물로 탈아미드화된다.

[0052] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 하기 중 하나 이상을 갖는 하위집단을 포함한다: (a) 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, vp1 단백질의 위치 57에 위치된 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 아스파라긴(N)의 적어도 65%는 탈아미드화됨; (b) 서열번호 8의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 위치 329에서 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 N의 적어도 75%는 탈아미드화됨; (c) 서열번호 8의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 위치 452에서 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 N의 적어도 50%는 탈아미드화됨; 및/또는 (d) 서열번호 8의 아미노산 서열의 잔기 넘버링을 기준으로, vp1, v2 및 vp3 단백질의 위치 512에서 아스파라긴 - 글리신 쌍에서 N의 적어도 75%는 탈아미드화됨. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 질량 분석법에 의해서 결정되는 경우 vp1 단백질의 위치 57에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서 AAVhu68 캡시드는 질량 분석법에 의해서 결정되는 경우 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 329에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서 hu68 캡시드는 질량 분석법에 의해서 결정되는 경우 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 452에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서 hu68 캡시드는 서열번호 8의 넘버링을 기준으로, 위치 512에서의 N의 75% 내지 100%가 탈아미드화된 vp1 단백질, vp2 단백질, 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, 단백질을 암호화하는 핵산 서열은 서열번호 7이거나, 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 80% 내지 적어도 99% 동일한 서열이다. 특정 실시형태에서, 서열은 서열번호 7과 적어도 80% 내지 97% 동일하다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68 캡시드는 N57, 329, 452, 512 또한 이들의 조합물 중 하나 이상으로부터 선택된 적어도 4개의 위치에서 적어도 약 50% 내지 100% 탈아미드화를 포함하는 서열번호 8로부터의 아미노산 변형을 갖는 적어도 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 위치 N94, N113, N252, N253, Q259, N270, N303, N304, N305, N319, N328, N336, N409, N410, N477, N515, N598, Q599, N628, N651, N663, N709, 또한 이들의 조합물 중 적어도 하나 이상에서 1% 내지 약 40%의 탈아미드화를 추가로 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, hu68 캡시드는 아세틸화된 라이신, 인산화된 세린 및/또는 트레오닌, 이성질체화된 아스파르트산, 산화된 트립토판 및/또는 메티오닌, 또는 아미드화된 아미노산 중 하나 이상에서 하나 이상의 변형으로부터 선택된 하나 이상의 변형을 추가로 포함하는 vp1, vp2 및/또는 vp3 단백질의 하위집단을 포함한다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68은 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 9의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 벡터 게놈은 AAVhu68이 아닌 AAV 공급원으로부터의 AAV ITR 서열을 포함한다.

[0053] 특정 실시형태에서, 제조합 아데노-연관 바이러스 hu68(rAAVhu68)의 혼합된 집단을 포함하는 조성물이 제공되며, 여기서 rAAVhu68 각각은 본 명세서에 기술된 바와 같은 rAAVhu68로부터 독립적으로 선택된다. 특정 실시형태에서, 평균 AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1 내지 1.5의 vp2 대 3 내지 10의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 평균 AAVhu68 캡시드는 약 1의 vp1 대 약 1의 vp2 대 3 내지 6의 vp3 단백질의 비의 약 60개의 총 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시형태에서, 조성물은 정맥내 전달을 위해서 제형화된다. 특정 실시형태에서, 조성물은 비강내 또는 근육내 전달을 위해서 제형화된다. 특정 실시형태에서, 조성물은 적어도 rAAVhu68 벡터 스톱 및 선택적인 담체, 부형제 및/또는 보존제를 포함한다.

[0054] 제조합 AAVhu68을 생산하는 데 유용한 임의의 적합한 rAAV 생산 시스템이 사용될 수 있다. 예를 들어, 이러한 생산 시스템은 (a) 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 AAVhu68 캡시드 핵산 서열; (b) AAVhu68 캡시드 내에 패키징하기에 적합한 핵산 분자(상기 핵산 분자는 적어도 하나의 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 숙주 세포에서 산물의 발현을 지시하는 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자 산물을 암호화하는 비-AAV 핵산 서열을 포함

함); 및 (c) 재조합 AAVhu68 캡시드 내에 핵산 분자를 패키징하는 것을 허용하기에 충분한 AAV rep 기능 및 헬퍼 기능을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, (a)의 핵산 서열은 서열번호 7이거나, 또는 서열번호 8의 아미노산 서열을 암호화하는 서열번호 7과 적어도 70% 내지 적어도 99% 동일한 서열이다. 특정 실시형태에서, 시스템은 서열번호 8의 약 aa 203 내지 약 아미노산 736의 AAVhu68 vp3을 암호화하는 서열번호 7의 약 nt 607 내지 약 nt 2211의 핵산 서열을 선택적으로 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 시스템은 인간 배아 신장 293 세포 또는 바콜로바이러스 시스템을 포함한다.

[0055] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드의 탈아미드화를 감소시키는 방법이 제공된다. 이 방법은 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열로부터 AAVhu68 캡시드를 생산하는 단계를 포함하며, 핵산 서열은 서열번호 8에서 위치 58, 330, 453 및/또는 513에 위치한 아르기닌-글리신 쌍 중 1 내지 3개에서 독립적으로 변형된 글리신 코돈을 포함하여, 변형된 코돈은 글리신이 아닌 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 이 방법은 변형된 AAVhu68 vp 코돈을 함유하는 핵산 서열로부터 AAVhu68 캡시드를 생산하는 단계를 포함하며, 핵산 서열은 서열번호 8에서 위치 57, 329, 452 및/또는 512에 위치한 아르기닌-글리신 쌍 중 1 내지 3개에서 독립적으로 변형된 아르기닌 코돈을 포함하여, 변형된 코돈은 아르기닌이 아닌 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 각각의 변형된 코돈은 상이한 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 2개 이상의 변형된 코돈은 동일한 아미노산을 암호화한다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 바와 같은 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 아르기닌 - 글리신 쌍에서 돌연변이를 함유하여, 글리신은 알라닌 또는 세린으로 변화된다. 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 1개, 2개 또는 3개의 돌연변이체를 함유할 수 있고, 여기서 참조 AAVhu68은 본래 4개의 NG 쌍을 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 NG 쌍 내에 단일 돌연변이를 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 2개의 상이한 NG 쌍 내에 돌연변이를 함유한다. 특정 실시형태에서, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 AAVhu68 캡시드에서 구조적으로 분리된 위치에 위치한 2개의 상이한 NG 쌍이다. 특정 실시형태에서, 돌연변이는 VP1-고유 영역에 존재하지 않는다. 특정 실시형태에서, 돌연변이 중 하나는 VP1-고유 영역에 존재한다. 선택적으로, 돌연변이체 AAVhu68 캡시드는 NG 쌍 내에 어떠한 변형도 함유하지 않지만, NG 쌍의 외부에 위치한 하나 이상의 아스파라긴 또는 글루타민에서 탈아미드화를 최소화 또는 제거하기 위해서 돌연변이를 함유한다.

[0056] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "암호화된 아미노산 서열"은 아미노산으로 번역될 지칭된 핵산 서열의 공지된 DNA 코돈의 번역을 기준으로 예측된 아미노산을 지칭한다. 하기 표는 단일 문자 암호(SLC) 및 3 문자 암호(3LC) 둘 모두를 나타낸, DNA 코돈 및 20개의 일반적인 아미노산을 나타낸다.

아미노산	SLC	3 LC	DNA 코돈
아이소류신	I	Ile	ATT, ATC, ATA
류신	L	Leu	CTT, CTC, CTA, CTG, TTA, TTG
발린	V	Val	GTT, GTC, GTA, GTG
페닐알라닌	F	Phe	TTT, TTC
메티오닌	M	Met	ATG
시스테인	C	Cys	TGT, TGC
알라닌	A	Ala	GCT, GCC, GCA, GCG
글리신	G	Gly	GGT, GGC, GGA, GGG
프롤린	P	Pro	CCT, CCC, CCA, CCG
트레오닌	T	Thr	ACT, ACC, ACA, ACG
세린	S	Ser	TCT, TCC, TCA, TCG, AGT, AGC
타이로신	Y	Tyr	TAT, TAC
트립토판	W	Trp	TGG
글루타민	Q	Gln	CAA, CAG
아스파라긴	N	Asn	AAT, AAC
히스티딘	H	His	CAT, CAC
글루탐산	E	Glu	GAA, GAG
아스파르트산	D	Asp	GAT, GAC
라이신	K	Lys	AAA, AAG
아르기닌	R	Arg	CGT, CGC, CGA, CGG, AGA, AGG
정지 코돈	경지		TAA, TAG, TGA

[0057]

[0058]

캡시드, 이에 따라서 암호 서열을 생성하는 방법 및 rAAV 바이러스 벡터의 생산 방법이 기술되어 있다(예를 들어, 문헌[Gao, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100 (10), 6081-6086 (2003)] 및 미국 특허 제US 2013/0045186A1호 참고). 다른 캡시드, 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 특허 제WO 2003/042397호; 제WO 2005/033321호, 제WO 2006/110689호; 제US 7588772 B2호에 기술된 것 등은 인간 대상체에서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 본 발명은 AAVhu68 vp1 암호 서열과 AAVhu68 rep 암호 서열 사이에 스페이서 서열을 포함하는 조작된 분자를 제공한다.

[0059]

상기에 나타난 바와 같이, AAVhu68 서열 및 단백질은 rAAV의 생산에 유용하다. 하기 실시예는 AAVhu68 또는 AAV9 벡터를 갖는 rAAV 벡터의 생산을 기술한다. 그러나, 다른 실시형태에서, 또 다른 AAV 캡시드가 선택된다. 조직 특이성은 캡시드 유형에 의해서 결정된다. 예를 들어, AAVhu68을 갖는 바이러스 벡터는 코 상피 세포에 형질도입하기에 유용한 것으로서 하기 실시예에 설명되어 있다. AAVhu68의 서열은 본 명세서에 기술되어 있다. 추가로, AAV9 캡시드 및 AAV9로부터 유래된 키메라 캡시드를 갖는 벡터의 생성 방법이 기술되어 있다(예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제7,906,111호 참고). 코 세포 또는 또 다른 적합한 표적(예를 들어, 근육 또는 폐)에 형질도입하는 다른 AAV 혈청형이 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, rh10, AAVrh64R1, AAVrh64R2, rh8(예를 들어, 참고, 미국 공개 특허 출원 제2007-0036760-A1호; 미국 공개 특허 출원 제2009-0197338-A1호; 및 유럽 특허 제1310571호)을 비롯한, AAV 바이러스 벡터(DNase 내성 바이러스 입자)의 캡시드를 위한 공급원으로서 선택될 수 있다. 또한, 국제 특허 제WO 2003/042397호(AAV7 및 다른 유인원 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), 국제 특허 제WO 2005/033321호(AAV9), 및 제WO 2006/110689호 또는 아직 발견되지 않은 것을 참고하거나, 또는 그것을 기반으로 하는 재조합 AAV가 AAV 캡시드를 위한 공급원으로서 사용될 수 있다. 이러한 문헌은 또한 AAV를 생성하기 위해서 선택될 수 있는 다른 AAV를 기술하며, 참고로 포함된다. 일부 실시형태에서, 바이러스 벡터에서 사용하기 위한 AAV 캡시드(cap)는 상기에 언급된 AAV cap 또는 이의 암호화 핵산 중 하나의 돌연변이유발에 의해서(즉, 삽입, 결실 또는 치환에 의해서) 생성될 수 있다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드는 상기에 언급된 AAV 캡시드 단

백질 중 2개 또는 3개 또는 4개 또는 그 초과로부터의 도메인을 포함하는 키메라이다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드는 2개 또는 3개의 상이한 AAV 또는 재조합 AAV로부터의 Vp1, Vp2 및 Vp3 단백질의 모자이크이다. 일부 실시형태에서, rAAV 조성물은 상기에 언급된 cap 중 하나 초과를 포함한다.

[0060] AAVhu68 캡시드는 특정 실시형태에서 유용할 수 있다. 예를 들어, 이러한 캡시드는 유전자 요법 환자에서 AAVhu68 농도 수준을 모니터링하기 위한 검정에서 유용한 단일론성 항체를 생성시키고/시키거나 시약을 생성시키는 데 사용될 수 있다. 항-AAVhu68 항체를 생성시키기 위한 기술, 이러한 항체 또는 빈 캡시드의 표지 및 적합한 검정 포맷은 당업자에게 공지되어 있다.

[0061] 보다 전형적으로, 본 명세서에 제공된 AAVhu68 캡시드는 재조합 AAV 벡터를 생성시키는 데 유용하며, 여기서 조작된 핵산 서열은 AAVhu68 캡시드 내에 패키징된다. "rAAVhu68" 또는 "rAAVhu68 벡터"라고 지칭되는 이러한 재조합 AAV 벡터, 및 이의 용도는 본 출원의 또 다른 섹션에 보다 상세하게 논의된다. 이러한 rAAVhu68 벡터는 양호한 수율 및/또는 패키징 효율을 제공하는 재조합 AAV(rAAV) 벡터를 생성시키고, 다수의 상이한 세포 및 조직 유형을 형질도입하는 데 유용한 rAAV 벡터를 제공하는 데 유용하다. 이러한 세포 및 조직 타입은 폐, 심장, 근육, 간, 췌장, 신장, 뇌, 해마, 운동 피질, 소뇌, 코 상피 세포, 심장 근육 세포 또는 심근세포, 간세포, 폐 내피 세포, 근세포(myocyte), 폐 상피 세포, 도세포(islet cell), 세엽 세포, 신장 세포, 및/또는 운동 뉴런을 포함하지만 이들로 제한되지 않는다.

[0062] 특정 실시형태에서, AAVhu68 캡시드를 갖는 벡터는 AAV9를 기반으로 하는 벡터와 비교할 때 패키징된 벡터의 수율의 적어도 15% 증가를 제공한다. AAVhu68과 AAVrh10 간의 비교에서, AAVhu68은 뇌혈관내(intracerebroventricular) 투여 이후에 낮은 용량(예를 들어 약 1×10^9)에서 AAVrh10보다 더 양호한 형질도입 효율을 제공하는 것을 발견하였다. AAVhu68과 AAV9 간의 추가 비교에서, AAVhu68은 뇌혈관내 투여 이후에 뇌의 소뇌, 운동 피질 및 해마에서(예를 들어 약 1×10^{11} GC에서) AAV9보다 더 양호한 형질도입 효율을 제공하는 것을 발견하였다.

[0063] "재조합 AAV" 또는 "rAAV"는 2개의 요소, AAV 캡시드 및 AAV 캡시드 내에 패키징된 적어도 비-AAV 암호 서열을 함유하는 벡터 게놈을 함유하는 DNase-내성 바이러스 입자이다. 특정 실시형태에서, 캡시드는 vp1 단백질, vp2 단백질 및 vp3 단백질로 구성된 약 60개의 단백질을 함유하는데, 이것은 자가 조립되어 캡시드를 형성한다. 달리 명시되지 않는 한, "재조합 AAV" 또는 "rAAV"는 구 "rAAV 벡터"와 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. rAAV는 "복제-결합 바이러스" 또는 "바이러스 벡터"인데, 그 이유는 그것이 임의의 기능성 AAV rep 유전자 또는 기능성 AAV cap 유전자가 결핍되어 있고, 자손을 생성할 수 없기 때문이다. 특정 실시형태에서, 유일한 AAV 서열은, ITR 사이에 위치한 유전자 및 조절 서열이 AAV 캡시드 내에 패키징되는 것을 가능하게 하기 위해서 벡터 게놈의 극단 5' 및 3' 단부에 전형적으로 위치한, AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)이다.

[0064] 일반적으로, 용어 "뉴클레아제-내성"은, AAV 캡시드가 유전자를 숙주 세포에 전달하도록 설계된 발현 카세트 주변에서 완전히 조립되고, 생산 공정으로부터 존재할 수 있는 오염된 핵산을 제거하도록 설계된 뉴클레아제 인큐베이션 단계 동안 분해(소화)로부터 이들 게놈 서열을 보호하는 것을 나타낸다.

[0065] 특정 실시형태에서, rAAV의 제조에 사용되는 비-바이러스 유전 요소는 벡터(예를 들어, 생산 벡터)로서 지칭될 것이다. 특정 실시형태에서, 이러한 벡터는 플라스미드이지만, 다른 적합한 유전 요소가 고려된다. 이러한 생산 플라스미드는 rAAV 생산 동안 발현되는 서열, 예를 들어, rAAV에 패키징되지 않은 rAAV의 생산에 필요한 AAV 캡시드 또는 rep 단백질을 암호화할 수 있다. 대안적으로, 이러한 생산 플라스미드는 rAAV에 패키징된 벡터 게놈을 운반할 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "벡터 게놈"은 바이러스 입자를 형성하는 rAAV 캡시드 내부에 패키징된 핵산 서열을 지칭한다. 이러한 핵산 서열은 AAV 반전 말단 반복부 서열(ITR)을 함유한다. 본 명세서 실시예에서, 벡터 게놈은 최소 5' 내지 3', AAV 5' ITR, 암호 서열(들), 및 AAV 3' ITR을 함유한다. 캡시드와 상이한 공급원 AAV인 AAV2로부터의 ITR 또는 전장 ITR이 아닌 ITR이 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, ITR은 생산 동안 rep 기능을 제공하는 AAV 또는 트랜스상보성(transcomplementing) AAV와 동일한 AAV 공급원으로부터 유래된다. 추가로, 다른 ITR이 사용될 수 있다. 추가로, 벡터 게놈은 유전자 산물의 발현을 지시하는 조절 서열을 함유한다. 벡터 게놈의 적합한 성분은 본 명세서에 보다 상세하게 논의된다.

[0067] 특정 실시형태에서, 용어 "발현 카세트"는 hSMN 서열 및 이에 따른 조절 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리A)을 포함하는 핵산 분자를 지칭하며, 여기서 카세트는 바이러스 벡터(예를 들어, 바이러스 입자)의 캡시드 내에 패키징될 수 있다. 전형적으로, 바이러스 벡터를 생성시키기 위한 이러한 발현 카세트는 바이러스 게놈의

패키징 신호에 의해서 측접된 본 명세서에 기술된 hSMN 서열 및 다른 발현 제어 서열, 예컨대 본 명세서에 기술된 것을 함유한다. 예를 들어, AAV 바이러스 벡터의 경우, 패키징 신호는 5' 반전 말단 반복부(ITR) 및 3' ITR이다. 특정 실시형태에서, 용어 "트랜스젠"은 "발현 카세트"과 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 다른 실시형태에서, 용어 "트랜스젠"은 선택된 유전자, 예를 들어, "hSMN1"에 대한 암호 서열 만을 지칭한다.

[0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "SMN"은 SMN의 임의의 아이소폼을 포함하며, 이것은 본 명세서에 제공된 조성물 또는 방법이 전달되는 경우 목적하는 기능을 회복시키거나, 증상을 감소시키거나 또는 또 다른 목적하는 생리학적 결과를 제공한다. 본 명세서에 제공된 예는 가장 긴 아이소폼인 아이소폼 D를 사용하는데, 이것은 SMN 결핍 또는 결함에 의해서 영향을 받지 않은 환자로부터의 유전자에 의해서 생산된 우세한 전사체인 것으로 생각된다. 아이소폼 D는 294 아미노산 단백질[예를 들어, NCBI 수탁 NM_000334/NP_000335; ENSEMBL ID ENST00000380707 참고]을 제공하며, 단백질 서열은 서열번호 2에서 재현되고, 암호 서열은 서열번호 3에서 재현된다. 그러나, 또 다른 아이소폼이 선택될 수 있다. 예를 들어, 아이소폼 B는 3' 암호 서열에서 교호하는 인-프레임 엑손을 가져서, 아이소폼 D보다 길이가 더 짧지만(262개 아미노산), 그 아이소폼과 동일한 N-말단 및 C-말단을 갖는 단백질을 생성한다(NCBI 수탁 번호 NM_022874/NP_075012; ENSEMBL ID ENST00000503079 참고). 아이소폼 B 암호 및 단백질 서열은 각각 서열번호 11 및 12에서 재현된다. 아이소폼 A는 끝에서 두 번째 엑손이 결핍되어 있는데, 이것은 아이소폼 D와 비교할 때 교호하는 번역 정지 코돈을 초래한다. 따라서, 아이소폼 A는 아이소폼 D와 비교할 때 더 짧고(282개 아미노산), 구별되는 C-말단을 갖는다(문헌 NCBI 수탁 번호 NM_001297715/NP_001284644; ENSEMBL ID ENSTL00000506163 참고). 아이소폼 A 암호 및 단백질 서열 각각은 서열번호 13 및 14에서 재현된다.

[0069] 특정 실시형태에서, 조작된 인간(h) 운동 뉴런의 생존(SMN) cDNA가 본 명세서에 제공되는데, 이것은 네이티브 hSMN 서열(서열번호 3)과 비교할 때 번역을 최대화하도록 설계된다. 인트론은 암호 서열의 상류에 혼입되어 mRNA의 5' 캡핑 및 안정성을 개선시킬 수 있다(예를 들어, 서열번호 15 및 25 참고). 이러한 조성물은 본 명세서에 기술된 바와 같은 척수근 위축증의 치료를 위한 방법에서 사용될 수 있다. 비교 목적을 위해서, 네이티브 인간 SMN 암호 서열 및 조작된 cDNA의 정렬을 도 1b 및 도 1c에 도시한다.

[0070] 본 명세서에 기술된 hSMN cDNA 서열은 시험관내에서 또는 합성에 의해서 또는 관련 기술 분야에 널리 공지된 기술을 사용한 임의의 다른 적합한 방법에 의해서 생성될 수 있다. 예를 들어, 문헌[Xiong et al, PCR-based accurate synthesis of long DNA sequences, Nature Protocols 1, 791 - 797 (2006)]에 기술된 바와 같이, 긴 DNA 서열 방법의 PCR-기반 정밀 합성(PCR-based accurate synthesis: PAS)이 사용될 수 있다. 이중 비대칭 PCR과 중첩 연장 PCR 방법을 조합한 방법이 문헌[Young and Dong, Two-step total gene synthesis method, Nucleic Acids Res. 2004; 32(7): e59]에 기술되어 있다(또한, 문헌[Gordeeva et al, J Microbiol Methods. Improved PCR-based gene synthesis method and its application to the Citrobacter freundii phytase gene codon modification. 2010 May;81(2):147-52. Epub 2010 Mar 10] 참고; 또한 올리고뉴클레오타이드 합성 및 유전자 합성에 대한 하기 특허 참고: [Gene Seq. 2012 Apr;6(1):10-21]; 미국 특허 제8008005호; 및 미국 특허 제7985565호). 이러한 문헌 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 또한, PCR을 통해서 DNA를 생성하기 위한 키트 및 프로토콜이 상업적으로 입수 가능하다. 이것은 Taq 중합효소; OneTaq(등록상표)(뉴 잉글랜드 바이오랩스사(New England Biolabs)); Q5(등록상표) High-Fidelity DNA 중합효소(뉴 잉글랜드 바이오랩스사); 및 GoTaq(등록상표) G2 중합효소(프로메가사(Promega))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 중합효소의 사용을 포함한다. DNA는 또한 본 명세서에 기술된 hOTC 서열을 함유하는 플라스미드로 형질주입된 세포로부터 생성될 수 있다. 키트 및 프로토콜은 공지되어 있고, 상업적으로 입수 가능하고, QIAGEN 플라스미드 키트; Chargeswitch(등록상표) Pro Filter Plasmid Kits(인비트로젠사(Invitrogen)); 및 GenElute^(상표명) Plasmid Kits(시그마 알드리치사(Sigma Aldrich))를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 본 명세서에서 유용한 다른 기술은 열순환에 대한 필요성이 제거된 서열-특이적 등은 증폭 방법을 포함한다. 열 대신에, 이 방법은 전형적으로 가닥 치환 DNA 중합효소, 예컨대, Bst DNA 중합효소, Large Fragment(뉴 잉글랜드 바이오랩스사)를 사용하여 듀플렉스 DNA를 분리한다. DNA는 또한 RNA-의존성 DNA 중합효소인 역전사효소(RT)의 사용을 통한 증폭을 통해서 RNA 분자로부터 생성될 수 있다. RT는 본래 RNA 주형에 상보성이고, cDNA라고 지칭되는 DNA의 가닥을 중합시킨다. 이어서, 이러한 cDNA는 상기에 요약된 PCR 또는 등은 방법을 통해서 추가로 증폭될 수 있다. 시판 DNA는 또한 GenScript; GENEWIZ(등록상표); GeneArt(등록상표)(라이프 테크놀로지스사(Life Technologies)); 및 인테그레이티드 디엔에이 테크놀로지스사(Integrated DNA Technologies)를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 회사로부터 상업적으로 생성될 수 있다.

[0071] 또한 본 명세서에는 조작된 hSMN 서열을 포함하는 바이러스 벡터가 제공된다. 일 실시형태에서, rAAVhu68.SMN은

외부 성분 및 내부 DNA 계놈으로 이루어진 바이러스 벡터이다. 외부 벡터 성분은 본 명세서에 정의된 바와 같은 AAVhu68 캡시드이다. 2개의 AAV 반전 말단 반복부(ITR)에 의해서 축적된 인간 운동 뉴런의 생존(hSMN) 트랜스젠으로 이루어진 단일 가닥 DNA 계놈은 캡시드 내에 패키징된다. 인헨서, 프로모터, 인트론, hSMN1 암호 서열 및 (폴리A) 신호는 hSMN 트랜스젠을 포함한다. ITR은 벡터 생산 동안 계놈의 복제 및 패키징에 책임이 있는 유전 요소이고, rAAV를 생성하는 데 필요한 유일한 바이러스 시스템 요소이다. hSMN 암호 서열의 발현은 거대세포바이러스(CMV) 극 초기 인헨서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 간의 혼성체인, CB7 프로모터에 의해서 지시된다. 이러한 프로모터로부터의 전사는 CI의 존재에 의해서 향상된다. rBG 폴리A 신호는 인간 hSMN mRNA 전사체의 종결을 매개하기 위해서 포함된다. 특정 실시형태에서, "hSMN"은 hSMN1이다.

[0072] 일 양상에서, 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 암호 서열이 제공된다. "기능성 hSMN"이란, 적어도 약 50%, 적어도 약 75%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%이거나 또는 대략 동일하거나 또는 100%를 초과하는 질환과 연관되지 않은 운동 뉴런 단백질 또는 이의 자연 변이체 또는 이의 다형체의 네이티브 생존의 생물학적 활성도 수준을 제공하는 SMN 단백질을 암호화하는 유전자를 의미한다. 추가로, SMN1동족체- SMN2는 또한 SMN 단백질을 암호화하지만, 기능성 단백질을 덜 효율적으로 가공한다. SMN2의 카피 수를 기반으로, 기능성 hSMN 유전자가 결핍된 대상체는 다양한 정도로 SMA를 나타낸다. 따라서, 일부 대상체의 경우, SMN 단백질은 네이티브 SMN 단백질의 생물학적 활성도의 100% 미만을 제공하는 것이 바람직할 수 있다. 특정 실시형태에서, 용어 "hSMN1", "hSMN" 및 "기능성 hSMN"은 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0073] 시험관내에서 SMN 발현 및 활성도 수준을 측정하기 위한 다양한 검정이 존재한다(예를 들어, 상기에 언급된 문헌[Tanguy et al, 2015] 참고). 본 명세서에 기술된 방법은 또한 SMA 또는 이의 증상의 치료를 위한 임의의 다른 요법과 조합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 표준 치료(standard of care)는 FDA에 의해서 허용된 SMN2 프리-메신저(pre-messenger) 리보핵산(mRNA)-표적화 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO)인 누시너센(nusinersen) 및 EMA[SPINRAZA^(상표명), 바이오젠사(Biogen)]를 포함할 수 있다(예를 들어, 미국 특허 제6,166,197호, 제US 6,210,892호, 제US 7,101,993호; 제US 7,838,657호; 제US 8,110,560호; 제US 8,361,977호; 제US 8,980,853호 참고). 이것은 척추강내로 투여되는 SMN2-지향된 안티센스 올리고뉴클레오타이드이다. 제안된 투여량은 12mg(5 ml/투여)이다. 치료는 4회 부하 용량으로 시작되고; 첫 번째 3회 부하 용량은 14일 간격으로 투여되고, 제4 부하 용량은 제3 용량 30일 후에 투여되고, 유지 용량은 그 후 4개월 단위로 1회 투여된다.

[0074] 일 실시형태에서, 기능성 SMN의 아미노산 서열은 서열번호 2의 것 또는 이와 95% 동일성을 공유하는 서열이다. 일 실시형태에서, 변형된 hSMN 암호 서열이 제공된다. 바람직하게는, 변형된 hSMN 암호 서열은 전장 네이티브 hSMN 암호 서열에 대해서 약 80% 미만의 동일성, 바람직하게는 약 75% 동일성 또는 그 미만을 갖는다(도 1b 및 도 1c, 서열번호 3). 일 실시형태에서, 변형된 hSMN 암호 서열은 AAV-매개된 전달(예를 들어, rAAV) 이후에 네이티브 hSMN과 비교할 때 개선된 번역을 특징으로 한다. 일 실시형태에서, 변형된 hSMN 암호 서열은 전장 네이티브 hSMN1 암호 서열과 약 80%, 79%, 78%, 77%, 76%, 75%, 74%, 73%, 72%, 71%, 70%, 69%, 68%, 67%, 66%, 65%, 64%, 63%, 62%, 61% 미만 또는 그 보다 더 낮은 동일성을 공유한다. 일 실시형태에서, 변형된 hSMN 암호 서열은 서열번호 1, 또는 서열번호 1과 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 그 초과와 동일성을 공유하는 서열이다. 다른 실시형태에서, 상이한 SMN 암호 서열이 선택된다.

[0075] 추가의 다른 실시형태에서, 아이소폼 D가 아닌 SMN 아이소폼에 대한 암호 서열이 선택된다. 추가로 또는 대안적으로, 본 명세서에 제공된 조성물 또는 요법은 상이한 SMN 단백질을 암호화하는 벡터 스톱과 조합하여 아이소폼 D SMN 단백질을 암호화하는 AAVhu68.SMN 스톱을 사용한 치료를 조합할 수 있다. 이러한 벡터 스톱은 AAVhu68 캡시드, 또는 상이한 캡시드를 가질 수 있다.

[0076] 핵산 서열과 관련하여 용어 "백분율(%) 동일성", "서열 동일성", "백분율 서열 동일성", 또는 "동일한 백분율"은 관련성을 위해서 정렬되는 경우 동일한 2개의 서열에서의 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교의 길이는 계놈의 전장, 유전자 암호 서열의 전장, 또는 적어도 약 500 내지 5000개의 뉴클레오타이드의 단편에 대한 것일 수 있으며, 이것이 바람직하다. 그러나, 예를 들어, 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 통상적으로 적어도 약 20 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36 또는 그 초과와 뉴클레오타이드의 더 작은 단편 간의 동일성이 또한 바람직할 수 있다.

[0077] 백분율 동일성은 단백질, 폴리펩타이드, 약 32개의 아미노산, 약 330개의 아미노산, 또는 이의 펩타이드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 암호 서열의 전장에 걸친 아미노산 서열에 대해서 쉽게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 적어도 약 8개의 아미노산 길이일 수 있고, 최대 약 700개의 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 간의 "동일성", "상동성", 또는 "유사성"을 지칭하는 경우, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"

은 "정렬된" 서열을 참고로 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은 보통 참조 서열과 비교할 때 누락되거나 추가된 염기 또는 아미노산에 대한 수정을 함유하는 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다.

[0078] 동일성은 서열의 정렬을 제조함으로써 그리고 관련 기술 분야에 공지되거나 상업적으로 입수 가능한 다양한 알고리즘 및/또는 컴퓨터 프로그램[예를 들어, BLAST, ExPASy; ClustalO; FASTA; 예를 들어, 니들만-번치(Needleman-Wunsch) 알고리즘, 스미쓰-워터만(Smith-Waterman) 알고리즘]의 사용을 통해서 결정될 수 있다. 정렬은 다양한 공공 또는 상업적으로 입수 가능한 다중 서열 정렬 프로그램 중 임의의 것을 사용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램, 예를 들어, "Clustal Omega" "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME", 및 "Match-Box" 프로그램이 아미노산 서열에 대해서 사용 가능하다. 일반적으로, 이 프로그램 중 임의의 것이 디폴트 설정에서 사용되지만, 당업자는 필요에 따라 이러한 설정을 변경시킬 수 있다. 대안적으로, 당업자는 적어도 참조된 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 것과 같은 동일성 또는 정렬의 수준을 제공하는 또 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 이용할 수 있다(예를 들어, 문헌[J. D. Thomson et al, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)] 참고).

[0079] 다중 서열 정렬 프로그램이 또한 핵산 서열에 대해 이용 가능하다. 그러한 프로그램의 예는 "Clustal Omega" "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "BLAST", "MAP", 및 "MEME"를 포함하며, 이들은 인터넷 상의 웹 서버를 통해 접근 가능하다. 그러한 프로그램의 다른 공급원은 당업자에게 공지되어 있다. 대안적으로, 벡터 NTI가 또한 사용된다. 또한 상기에 기술된 프로그램에 함유된 것을 포함하여, 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 사용될 수 있는 다수의 알고리즘이 관련 기술 분야에 공지되어 있다. 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 GCG 버전 6.1의 프로그램인 Fasta^(상표명)를 사용하여 비교될 수 있다. Fasta^(상표명)는 의문의 서열과 검색 서열 사이의 최상의 중복 영역의 정렬 및 백분율 서열 동일성을 제공한다. 예를 들어, 핵산 서열 사이의 백분율 서열 동일성은 GCG 버전 6.1(본 명세서에 참고로 포함됨)에서 제공되는 바와 같이 디폴트 파라미터(6의 워드 크기 및 득점 매트릭스에 대한 NOPAM 인자)와 함께 Fasta^(상표명)를 사용하여 결정될 수 있다.

[0080] II. 발현 카세트 및 벡터

[0081] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 hSMN 유전자는 바이러스 벡터를 생성시키고/시키거나 숙주 세포로의 전달에 유용한, 상부에 보유된 hSMN1 서열을 전달하는, 적합한 유전자 요소(벡터), 예컨대, 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 에피솜 등으로 조작된다. 선택된 벡터는 형질주입, 전기침공법, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA-코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질 융합을 비롯한, 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 그러한 작제물을 제조하기 위해 사용되는 방법은 핵산 조작 분야의 당업자에게 공지되어 있고, 이것은 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기술을 포함한다[예를 들어, 문헌[Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY] 참고]. 일 양상에서, hSMN 핵산 서열을 포함하는 발현 카세트가 제공된다.

[0082] 따라서, 일 양상에서, AAV 캡시드 및 적어도 하나의 발현 카세트를 포함하는 아데노-관련 바이러스 벡터가 제공되며, 여기서 적어도 하나의 발현 카세트는 SMN을 암호화하는 핵산 서열 및 숙주 세포에서 SMN 서열의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함한다. AAV 벡터는 또한 AAV ITR 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, ITR은 캡시드를 공급하는 것과 상이한 AAV로부터 유래된다. 바람직한 실시형태에서, ITR 서열은 AAV2로부터 유래되거나, 편의를 위해 그리고 규제 승인을 가속화하기 위해 사용될 수 있는 결실된 버전(Δ ITR)이다. 그러나, 다른 AAV 공급원으로부터의 ITR이 선택될 수 있다. ITR의 공급원이 AAV2로부터 유래되고, AAV 캡시드가 또 다른 AAV 공급원으로부터 유래된 경우, 생성된 벡터는 위형이라 지칭될 수 있다. 전형적으로, AAV 벡터 계놈은 AAV 5' ITR, hSMN 암호 서열 및 임의의 조절 서열, 및 AAV 3' ITR을 포함한다. 그러나, 이들 요소의 다른 구성이 적합할 수 있다. D-서열 및 말단 분해능 부위(terminal resolution site: trs)가 결실된 Δ ITR이라 지칭되는 5' ITR의 짧은 버전이 기술되어 있다. 다른 실시형태에서, 전장 AAV 5' 및 3' ITR이 사용된다.

[0083] 일 양상에서, 바이러스 벡터의 생성에 유용한 DNA 분자(예를 들어, 플라스미드)인 작제물이 제공된다. 발현 카세트는 전형적으로 발현 제어 서열의 일부로서, 예를 들어, 선택된 5' ITR 서열과 hSMN 암호 서열 사이에 위치한 프로모터 서열을 함유한다. 본 명세서에 기술된 예시적인 플라스미드 및 벡터는 CMV 극 초기 인핸서(CMV IE)를 갖는 흔한 닭 β -액틴 프로모터(CB)를 사용한다. 대안적으로, 뉴런-특이적 프로모터가 사용될 수 있다[예를 들어, 문헌[the Lockery Lab neuron-specific promoters database, accessed at chinook.uoregon.edu/promoters.html] 참고]. 그러한 뉴런-특이적 프로모터는, 제한 없이, 예컨대 시냅신 I(SYN), 칼슘/칼모듈린- 의존성 단백질 카이나제 II, 튜불린 알파 I, 뉴런-특이적 엔올라제 및 혈소판-유래된 성장 인자 베타 쉐 프로모터를 포함한다(본 명세서에 참고로 포함됨 문헌[Hioki et al, Gene Therapy, June

2007, 14(11):872-82 참고). 다른 뉴런-특이적 프로모터는 67kDa 글루탐산 데카복실라제(GAD67), 호메오박스 Dlx5/6, 글루타메이트 수용체 1(GluR1), 프레프로타킨인 1(Tac1) 프로모터, 뉴런-특이적 엔올라제(NSE) 및 도파민 작용성 수용체 1(Drd1a) 프로모터를 포함한다(예를 들어, 문헌[Delzor et al, Human Gene Therapy Methods. August 2012, 23(4): 242-254] 참고). 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 GUSb 프로모터이다(www.jci.org/articles/view/41615#B30).

[0084] 다른 프로모터, 예컨대 구성 프로모터, 조절 가능한 프로모터[예를 들어, 국제 특허 제WO 2011/126808호 및 제WO 2013/04943호 참고] 또는 생리학적 신호에 반응성인 프로모터가 본 명세서에 기술된 벡터에 사용되고 활용될 수 있다. 프로모터(들)는 상이한 공급원으로부터, 예를 들어, 인간 사이토메갈로바이러스(CMV) 극 초기 인핸서/프로모터, SV40 초기 인핸서/프로모터, JC 폴리모바이러스 프로모터, 미엘린 염기성 단백질(MBP) 또는 신경교 섬유질 산성 단백질(GFAP) 프로모터, 헤르페스 단순 바이러스(HSV-1) 잠복 관련 프로모터(LAP), 라우스 육종 바이러스(RSV) 긴 말단 반복부(LTR) 프로모터, 뉴런-특이적 프로모터(NSE), 혈소판 유래된 성장 인자(PDGF) 프로모터, hSYN, 멜라닌-농축 호르몬(MCH) 프로모터, CBA, 매트릭스 메탈로단백질 프로모터(MPP), 및 닭 베타-액틴 프로모터 등으로부터 선택될 수 있다.

[0085] 프로모터에 더하여, 발현 카세트 및/또는 벡터는 하나 이상의 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 효율적인 RNA 처리 신호, 예컨대, 스플라이싱 및 폴리아데닐화(폴리A) 신호; 세포질의 mRNA를 안정화시키는 서열, 예를 들어 WPRE; 번역 효율을 향상시키는 서열(즉, 코작 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 필요에 따라, 암호화된 산물의 분비를 향상시키는 서열을 함유할 수 있다. 적합한 폴리A 서열의 예는, 예를 들어, SV40, SV50, 소 성장 호르몬(bGH), 인간 성장 호르몬, 및 합성 폴리A를 포함한다. 적합한 인핸서의 예는 CMV 인핸서이다. 다른 적합한 인핸서는 CNS 적응증에 적절한 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 1종 이상의 발현 인핸서를 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 2종 이상의 발현 인핸서를 함유한다. 이러한 인핸서는 서로 동일하거나 상이할 수 있다. 예를 들어, 인핸서는 CMV 극 초기 인핸서를 포함할 수 있다. 이러한 인핸서는 서로에 인접하게 위치된 2개의 카피에 존재할 수 있다. 대안적으로, 인핸서의 이중 카피는 하나 이상의 서열에 의해서 분리될 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 추가로 인트론, 예를 들어, 닭 베타-액틴 인트론을 함유한다. 다른 적합한 인트론은 관련 기술 분야에 공지된 것을 포함하고, 예를 들어, 예컨대, 국제 특허 제WO 2011/126808호에 기술되어 있다. 선택적으로, 하나 이상의 서열이 mRNA를 안정화시키기 위해서 선택될 수 있다. 그러한 서열의 예는 변형된 WPRE 서열인데, 그것은 폴리A 서열의 상류에서 그리고 암호 서열의 하류에서 조각될 수 있다[예를 들어, 문헌[MA Zanta-Boussif, et al, Gene Therapy (2009) 16: 605-619] 참고].

[0086] 이러한 제어 서열은 hSMN 유전자 서열에 "작동 가능하게 연결된"다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된"은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 트랜스로 또는 관심 유전자를 제어하도록 하는 거리에서 작용하는 발현 제어 서열 둘 모두를 지칭한다.

[0087] 일 실시형태에서, 자가-상보성 AAV가 제공된다. 이와 관련하여 약어 "sc"는 자가-상보성을 지칭한다. "자가-상보성 AAV"는 제조할 AAV 핵산 서열에 의해서 보유된 암호 영역이 분자내 이중 가닥 DNA 템플레이트를 형성하도록 설계된 작제물을 지칭한다. 감염 시, 제2 가닥의 세포 매개 합성에 대한 기다림보다는, scAAV의 2개의 상보성 절반들은 즉시 복제 및 전사의 준비가 되어 있는 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA)를 형성하도록 회합될 것이다(예를 들어, 문헌[D M McCarty et al, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", Gene Therapy, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254] 참고). 자가-상보성 AAV는 예를 들어, 각각 전문이 참고로 본 명세서에 포함된 미국 특허 제6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호에 기술되어 있다.

[0088] 대상체로의 전달에 적합한 AAV 바이러스 벡터를 생성하고 분리하는 방법은 관련 기술 분야에 공지되어 있다(예를 들어, 미국 공개 특허 출원 제2007/0036760호(2007년 2월 15일), 미국 특허 제7790449호; 미국 특허 제7282199호; 국제 특허 제WO2003/042397호; 제WO2005/033321호, 제WO2006/110689호; 및 미국 특허 제7588772B2호 참고). 한 시스템에서, 생산자 세포주는 ITR에 의해서 축적된 트랜스젠을 암호화하는 작제물 및 rep 및 cap을 암호화하는 작제물(들)로 일시적으로 형질주입된다. 제2 시스템에서, rep 및 cap을 안정적으로 공급하는 패키징 세포주는 ITR에 의해서 축적된 트랜스젠을 암호화하는 작제물로 일시적으로 형질주입된다. 이러한 시스템 각각에서, AAV 비리온은 헬퍼 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스로의 감염에 대한 반응으로 생산되어, 오염시키는 바이러스로부터 rAAV의 분리를 필요로 한다. 보다 최근에, AAV를 회수하기 위해서 헬퍼 바이러스로의 감염을 필요로 하지 않는 시스템이 개발되었다 - 필요한 헬퍼 기능(즉, 아데노바이러스 E1, E2a, VA, 및 E4 또는 헤르페스바이러스 UL5, UL8, UL52, 및 UL29, 및 헤르페스바이러스 중합효소)이 또한 트랜스로, 시스템에 의해

공급된다. 이러한 더 새로운 시스템에서, 헬퍼 기능은 필요한 헬퍼 기능을 암호화하는 작제물로의 세포의 일시적인 형질주입에 의해 공급될 수 있거나, 또는 세포는 헬퍼 기능을 암호화하는 유전자를 안정적으로 함유하도록 조작될 수 있고, 그의 발현은 전사 또는 번역후 수준에서 제어될 수 있다. 또 다른 시스템에서, ITR 및 rep/cap 유전자가 축적된 트랜스젠은 곤충 세포 내부로 바콜로바이러스-기반 벡터로의 감염에 의해 도입된다. 이러한 생산 시스템에 대한 리뷰에 대해서는, 일반적으로 예를 들어, 문헌[Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929](그 내용은 전문이 본 명세서에 참고로 포함됨)을 참고하기 바란다. 이러한 및 다른 AAV 생산 시스템의 제조 및 사용 방법은 하기 미국 특허에 기술되어 있으며, 이들 각각의 내용은 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다: 제5,139,941호; 제5,741,683호; 제6,057,152호; 제6,204,059호; 제6,268,213호; 제6,491,907호; 제6,660,514호; 제6,951,753호; 제7,094,604호; 제7,172,893호; 제7,201,898호; 제7,229,823호; 및 제7,439,065호.

[0089] 선택적으로, 본 명세서에 기술된 hSMN 유전자는 rAAV 이외의 바이러스 벡터를 포함하는, 다른 전달 시스템 내에서 조작될 수 있다. 그러한 다른 바이러스 벡터는 아데노바이러스; 헤르페스 바이러스; 렌티바이러스; 레트로바이러스; 보카바이러스 등을 포함하지만 이들로 제한되지 않는 사용될 수 있는 유전자 요법에 적합한 임의의 바이러스를 포함할 수 있다. 적합하게, 이러한 다른 벡터 중 하나가 생성되는 경우에, 그것은 복제-결합 바이러스 벡터로서 제조된다.

[0090] 특정 실시형태에서, 조작된 AAVhu68.SMN 벡터가 제공된다. 일 실시형태에서, rAAVhu68SMN의 벡터 게놈은 서열번호 15의 서열을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, rAAVhu68SMN의 벡터 게놈은 서열번호 25의 서열을 갖는다. 특정 실시형태에서, 용어 "rAAVhu68.SMN1" 및 "rAAVhu68.SMN"은 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0091] III. 조성물 및 용도

[0092] 또한 본 명세서에는 약제학적 조성물이 제공된다. 본 명세서에 기술된 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합으로 이를 필요로 하는 대상체에게 전달하기 위해서 설계된다.

[0093] 이러한 전달 수단은 본 명세서에 기술된 AAV 조성물(들)을 함유하는 현탁액의 직접 전신 전달을 회피하도록 설계된다. 적합하게는, 이것은 전신 투여와 비교할 때 용량 감소, 독성 감소 및/또는 AAV 및/또는 트랜스젠 산물에 대한 바람직하지 않은 면역 반응 감소의 이익을 가질 수 있다.

[0094] 대안적으로, 다른 투여 경로가 선택될 수 있다(예를 들어, 경구, 흡입, 비강내, 기관내, 동맥내, 안내, 정맥내, 근육내, 및 다른 비경구 경로).

[0095] 선택적으로, 면역억제 공동요법이 이를 필요로 하는 대상체에서 사용될 수 있다. 이러한 공동요법을 위한 면역억제제는 글루코코티코이드, 스테로이드, 항대사산물, T-세포 저해제, 마크롤라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그), 및 알킬화제를 비롯한 세포정지제, 항-대사산물, 세포독성 항생제, 항체 또는 이뮤노필린에 대해서 활성인 작용제를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 면역 억제제는 질소 머스터드, 니트로소유레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토프린, 플루오로유라실, 닥티노마이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-관련 항체, 항-IL-2 항체, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, IFN- β , IFN- γ , 오피오이드 또는 TNF- α (종양 괴사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7일, 또는 그 초과 일 이전 또는 이후에 시작될 수 있다. 이러한 면역억제 요법은 1종, 2종 또는 그 초과 약물(예를 들어, 글루코코티코이드, 프레드니솔론, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 투여를 포함할 수 있다. 이러한 면역억제 약물은 이를 필요로 하는 대상체에게 동일한 용량 또는 조정된 용량으로 1회, 2회 또는 그 초과 횟수로 투여될 수 있다. 이러한 요법은 동일한 날에 2종 이상의 약물(예를 들어, 프레드니솔론, 마이코페놀레이트 모페틸(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 공동투여를 포함할 수 있다. 이들 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 이후에, 동일 용량으로 또는 조정된 용량으로 계속될 수 있다. 이러한 요법은 필요에 따라 약 1주(7일), 약 60일 또는 더 길 수 있다. 특정 실시형태에서, 타크롤리무스-무함유 요법이 선택된다.

[0096] 본 명세서에 기술된 rAAVhu68.hSMN 벡터는 단일 조성물 또는 다중 조성물로 투여될 수 있다. 선택적으로, 2종 이상의 상이한 rAAV가 전달될 수 있다[예를 들어, 국제 특허 제WO 2011/126808호 및 제WO 2013/049493호 참고]. 또 다른 실시형태에서, 이러한 다중 바이러스는 상이한 복제-결합 바이러스(예를 들어, AAV, 아데노바이러스, 및/또는 렌티바이러스)를 함유할 수 있다. 대안적으로, 전달은 예를 들어, 미셀(micelle), 리포솜, 양이온

성 지질 - 핵산 조성물, 폴리-글리칸 조성물 및 다른 중합체, 지질 및/또는 콜레스테롤-기반-핵산 접합체, 및 본 명세서에 기술된 것과 같은 다른 작제물을 비롯한, 다양한 전달 조성물 및 나노 입자와 커플링된 비-바이러스 작제물, 예를 들어, "네이키드 DNA", "네이키드 플라스미드 DNA", RNA 및 mRNA에 의해 매개될 수 있다(예를 들어, 문헌[X. Su et al, Mol. Pharmaceutics, 2011, 8 (3), pp 774-787; web publication: March 21, 2011]; 국제 특허 제W02013/182683호, 제W0 2010/053572호 및 제W0 2012/170930호(이들 모두는 본 명세서에 참고로 포함됨) 참고). 그러한 비-바이러스 hSMN 전달 작제물은 상기에 기술된 경로에 의해 투여될 수 있다. 바이러스 벡터, 또는 비-바이러스 DNA 또는 RNA 전달 모이어티는 유전자 전달 및 유전자 요법 적용에 사용하기 위한 생리학적으로 허용 가능한 담체와 함께 제형화될 수 있다.

[0097] 특정 실시형태에서, rAAVhu68.SMA는 대상체로의 전달을 위해서 저장 및/또는 제형화되기 이전에 생산과 연관된 임의의 오염물로부터 정제된다. 많은 적합한 정제 방법이 선택될 수 있다. 적합한 정제 방법의 예는 예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065970호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌, 미국 특허 출원 제62/322,071호(출원일 2016년 4월 13일), 및 제62/226,357호(출원일 2015년 12월 11일, 발명의 명칭 "Scalable Purification Method for AAV9")에 기술되어 있다. AAV8에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065976호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌 미국 특허 출원 제62/322,098호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/266,341호(출원일 2015년 12월 11일) 및 rh10에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US16/66013호(출원일 2016년 12월 9일) 및 이의 우선권 문헌, 미국 특허 출원 제62/322,055호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/266,347호(발명의 명칭 "Scalable Purification Method for AAVrh10", 또한 출원일 2015년 12월 11일), 및 AAV1에 대한 정제 방법, 국제 특허 출원 제PCT/US2016/065974호(출원일 2016년 12월 9일), 및 이의 우선권 문헌 미국 특허 출원 제62/322,083호(출원일 2016년 4월 13일) 및 제62/26,351호("Scalable Purification Method for AAV1", 출원일 2015년 12월 11일)은 모두 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0098] 본 명세서에 기술된 rAAVhu68.SMN1 벡터의 경우, 게놈 카피("GC")의 정량은 제형에 함유된 용량의 척도로서 사용될 수 있다. 발명의 복제-결합 바이러스 조성물의 게놈 카피(GC) 수를 측정하기 위해서 관련 기술 분야에 공지된 임의의 방법이 사용될 수 있다. AAVGC 수 적정을 수행하는 한 가지 방법은 다음과 같다: 생산 공정으로부터 오염 숙주 DNA를 제거하기 위해서 정제된 AAV 벡터 샘플이 먼저 DNase로 처리된다. 이어서 캡시드로부터 게놈을 방출시키기 위해서 DNase 내성 입자에 열처리가 적용된다. 방출된 게놈은 다음에 바이러스 게놈의 특이적 영역(예를 들어 폴리 A 신호)을 표적으로 하는 프라이머/프로브 세트를 사용하여 실시간 PCR에 의해 정량된다. 게놈 카피를 측정하기 위한 다른 적합한 방법은 정량-PCR(qPCR), 특히 최적화된 qPCR 또는 디지털 드롭플렛 PCR 이다[Lock Martin, et al, Human Gene Therapy Methods. April 2014, 25(2): 115-125. doi:10.1089/hgtb.2013.131, published online ahead of editing December 13, 2013]. 대안적으로, ViroCyt3100이 입자 정량 또는 유세포 분석법을 위해서 사용될 수 있다.

[0099] rAAVhu68.SMN1 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 약 1.0×10^9 GC 내지 약 9×10^{15} GC(예를 들어, 약 2.5kg 내지 약 70kg 체중을 기준으로), 바람직하게는 인간 환자의 경우 1.0×10^{12} GC 내지 1.0×10^{14} GC의 범위 내인 rAAV의 양을 함유하도록 투여 단위로 제형화될 수 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 또는 9×10^9 GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 또는 9×10^{10} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 또는 9×10^{11} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 또는 9×10^{12} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 또는 9×10^{13} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 또는 9×10^{14} GC를 함유하도록 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 적어도 1×10^{15} , 2×10^{15} , $3 \times$

10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 또는 9×10^{15} GC를 함유하도록 제형화된다. 일 실시형태에서, 인간 적용을 위해서, 용량은 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량당 1×10^{10} 내지 약 1×10^{15} GC의 범위일 수 있다.

[0100] 특정 실시형태에서, 용량은 약 1×10^9 GC/g 너 질량 내지 약 1×10^{12} GC/g 너 질량의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 용량은 약 3×10^{10} GC/g 너 질량 내지 약 3×10^{11} GC/g 너 질량의 범위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 용량은 약 5×10^{10} GC/g 너 질량 내지 약 1.85×10^{11} GC/g 너 질량의 범위일 수 있다.

[0101] 일 실시형태에서, rAAVhu68.SMN1은 적어도 약 적어도 1×10^9 GC 내지 약 1×10^{15} , 또는 약 1×10^{11} 내지 5×10^{13} GC의 용량으로 전달될 수 있다. 이러한 용량 및 농도의 전달을 위한 적합한 부피는 당업자에 의해서 결정될 수 있다. 예를 들어, 약 $1 \mu\text{l}$ 내지 150ml 의 부피가 선택될 수 있고, 더 높은 부피가 성인에 대해서 선택된다. 전형적으로, 신생아 유아의 경우, 적합한 부피는 약 0.5ml 내지 약 10ml 이고, 더 나이든 유아의 경우, 약 0.5ml 내지 약 15ml 가 선택될 수 있다. 걸음마기 유아(toddler)의 경우, 약 0.5ml 내지 약 20ml 의 부피가 선택될 수 있다. 소아의 경우, 최대 약 30ml 의 부피가 선택될 수 있다. 십대 초반 및 십대의 경우, 최대 약 50ml 의 부피가 선택될 수 있다. 추가의 다른 실시형태에서, 환자에게 척추강내 투여를 제공할 수 있고, 약 5ml 내지 약 15ml 의 부피, 또는 약 7.5ml 내지 약 10ml 가 선택된다. 다른 적합한 부피 및 투여량이 결정될 수 있다. 투여량은 임의의 부작용에 대해서 치료 이익의 균형을 이루도록 조절될 것이고, 이러한 투여량은 재조합 백터가 이용되는 치료 응용에 따라서 달라질 수 있다.

[0102] 상기에 기술된 rAAVhu68.SMN1은 공개된 방법에 따라서 숙주 세포에 전달될 수 있다. 특정 실시형태에서, 인간 환자에 대한 투여를 위해서, rAAV는 적합하게는 염수, 계면활성제, 및 생리학적으로 상용성인 염 또는 염의 혼합물을 함유하는 수성 용액 중에 현탁된다. 적합하게는, 이 제형은 생리학적으로 허용 가능한 pH, 예를 들어, pH 6 내지 9, 또는 pH 6.5 내지 7.5, pH 7.0 내지 7.7, 또는 pH 7.2 내지 7.8로 조정된다. 뇌척수액의 pH가 약 7.28 내지 약 7.32이기 때문에, 척추강내 전달을 위해, 이 범위 내의 pH가 바람직할 수 있는 반면; 정맥내 전달을 위해, 6.8 내지 약 7.2의 pH가 바람직할 수 있다. 그러나, 가장 넓은 범위 및 이들 하위 범위 내의 다른 pH는 다른 전달 경로에 대해 선택될 수 있다.

[0103] 적합한 계면활성제, 또는 계면활성제의 조합물은 비독성인 비이온성 계면활성제로부터 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 1차 하이드록실기에서 종결되는 2작용성 블록 공중합체 계면활성제, 예를 들어, 폴록사머(Poloxamer) 188로서도 알려져 있고 중성 pH를 갖는 플루로닉(Pluronic)(등록상표) F68[바스프사(BASF)]은 평균 분자량이 8400이다. 다른 계면활성제 및 다른 폴록사머, 즉, 폴리옥시에틸렌(폴리(에틸렌 옥사이드))의 2개의 친수성 쇄가 측접된 폴리옥시프로필렌(폴리(프로필렌 옥사이드))의 중심 소수성 쇄로 구성된 비이온성 트라이블록 공중합체, SUTOL HS 15(마크로골(Macrogol)-15 하이드록시스테아레이트), LABRASOL(폴리옥시 카프릴 글리세리드), 폴리옥시 10 올레일 에터, TWEEN(폴리옥시에틸렌 솔비탄 지방산 에스터), 에탄올 및 폴리에틸렌 글리콜이 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 제형은 폴록사머를 함유한다. 이들 공중합체는 통상적으로 글자 "P"(폴록사머에 대해) 다음에 3개의 숫자로 명명되며: 처음 2개의 숫자 $\times 100$ 은 폴리옥시프로필렌 코어의 대략의 분자량을 제공하고, 마지막 숫자 $\times 10$ 은 폴리옥시에틸렌 함량 백분율을 제공한다. 일 실시형태에서 폴록사머 188이 선택된다. 계면활성제는 약 0.0005 % 내지 약 0.001%의 현탁액의 양 중에 존재할 수 있다.

[0104] 일례에서, 제형은 예를 들어, 물 중에, 염화나트륨, 중탄산나트륨, 텍스트로스, 황산마그네슘(예를 들어, 황산마그네슘 $\cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 염화칼륨, 염화칼슘(예를 들어, 염화칼슘 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 이염기성 인산나트륨, 및 이들의 혼합물 중 1종 이상을 포함하는 완충 염수 용액을 함유할 수 있다. 적합하게는, 척추강내 전달을 위해서, 오스몰농도는 뇌척수액과 상용성인 범위 이내(예를 들어, 약 275 내지 약 290)이다(예를 들어, emedicine.medscape.com/article/2093316-overview 참고). 임의적으로, 척추강내 전달을 위해서, 상업적으로 입수 가능한 희석제를 현탁화제로서, 또는 또 다른 현탁화제 및 다른 임의적인 부형제와 조합하여 사용할 수 있다(예를 들어, 엘리엇 B(등록상표) 용액[루카르 메디컬사(Lukare Medical)] 참고). 엘리엇 B 용액 각각 10ml 는 하기를 함유한다:

[0105]	염화나트륨, USP	73mg
[0106]	중탄산나트륨, USP	19mg
[0107]	텍스트로스, USP	8mg

- [0108] 황산마그네슘 · 7H₂O, USP 3mg
- [0109] 염화칼륨, USP 3mg
- [0110] 염화칼슘 · 2H₂O, USP 2mg
- [0111] 인산나트륨 이염기성 · 7H₂O, USP 2mg
- [0112] 주사용수, USP 충분한 양 10ml
- [0113] 전해질의 농도:
- [0114] 나트륨 149mEq/리터 중탄산나트륨 22.6mEq/리터
- [0115] 칼륨 4.0mEq/리터 클로라이드 132mEq/리터
- [0116] 칼슘 2.7mEq/리터 설페이트 2.4mEq/리터
- [0117] 마그네슘 2.4mEq/리터 포스페이트 1.5mEq/리터
- [0118] 성분의 제형 및 분자량은 하기와 같다:

성분	분자식	분자량
염화나트륨	NaCl	58.44
중탄산나트륨	NaHCO ₃	84.01
덱스트로스	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.16
황산마그네슘 · 7H ₂ O	Mg ₂ SO ₄ ·7H ₂ O	246.48
염화칼륨	KCl	74.55
염화칼슘 · 2H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O	147.01
인산나트륨 이염기성 · 7H ₂ O	Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	268.07

- [0119]
- [0120] 엘리엇 B 용액의 pH는 6 내지 7.5이고, 오스몰농도는 288mOsmol/리터(계산치)이다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68.SMN1 유전자를 함유하는 조성물은 6.8 내지 8, 또는 7.2 내지 7.8, 또는 7.5 내지 8의 범위의 pH에서 전달된다. 척추강내 전달의 경우, 7.5 초과와 pH, 예를 들어, 7.5 내지 8, 또는 7.8이 바람직할 수 있다.
- [0121] 특정 실시형태에서, 제형은 중탄산나트륨을 포함하지 않는 완충 염수 수성 용액을 함유할 수 있다. 이러한 제형은 물 중에, 인산나트륨 염화나트륨, 염화칼륨, 염화칼슘, 염화마그네슘 및 이들의 혼합물 중 1종 이상을 포함하는 완충 염수 수성 용액, 예컨대, 하버드 완충액(Harvard's buffer)을 함유할 수 있다. 수성 용액은 이전에 Lutrol(등록상표) F68하에 판매되었던 바스프사에 의해서 상업적으로 입수 가능한 폴록사머인 Kolliphor(등록상표) P188을 추가로 함유할 수 있다. 수성 용액은 7.2의 pH를 가질 수 있다.
- [0122] 또 다른 실시형태에서, 제형은 1mM 인산나트륨(Na₃PO₄), 150mM 염화나트륨(NaCl), 3mM 염화칼륨(KCl), 1.4mM 염화칼슘(CaCl₂), 0.8mM 염화마그네슘(MgCl₂), 및 0.001% Kolliphor(등록상표) 188을 포함하는 완충 염수 수성 용액을 함유할 수 있다(예를 들어, harvardapparatus.com/harvard-apparatus-perfusion-fluid.html 참고). 특정 실시형태에서, 하버드 완충액을 사용할 때 관찰되는 더 양호한 pH 안정성으로 인해서 하버드 완충액이 바람직하다. 하기 표는 하버드 완충액 및 엘리엇 B 완충액의 비교를 제공한다.

뇌척수액 (CSF) 조성물

성분	단위	CSF	엘리엇 B	하버드
Na+	mEq/L	117-137	149	150
K+	mEq/L	2.3-4.6	4.0	3.0
Mg+	mEq/L	2.2	2.4	0.8
Ca2+	mEq/L	2.2	2.7	1.4
Cl-	mEq/L	113-127	132	155
HCO3-	mEq/L	22.9	22.6	0
Phos	mg/dL	1.2-2.1	1.5	1.0
글루코스	mg/dL	45-80	80	-
플루로닉	%	-	0.001% (첨가됨)	0.001%(첨가됨)
오스몰농도	mOsm/L	295	288	290
pH		7.31	6.0-7.5* 9+로 이동 (8.2+ 걱정 없음)	7.2 (적정)

[0123]

[0124]

다른 실시형태에서, 제형은 1종 이상의 투과 인헨서를 함유할 수 있다. 적합한 투과 인헨서의 예는 예를 들어, 만니톨, 소듐 글리코콜레이트, 소듐 타우로콜레이트, 소듐 테옥시콜레이트, 소듐 살리실레이트, 소듐 카프틸레이트, 소듐 카프레이트, 소듐 라우릴 설페이트, 폴리옥시에틸렌-9-라우릴 에터, 또는 EDTA를 포함할 수 있다.

[0125]

또 다른 실시형태에서, 조성물은 담체, 희석제, 부형제 및/또는 아주반트를 포함한다. 적합한 담체는 전달 바이러스가 지시될 적응증의 관점에서 당업자에 의해 쉽게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 염수를 포함하는데, 이것은 다양한 완충 용액(예를 들어, 인산염 완충 염수)으로 제형화될 수 있다. 다른 예시적인 담체는 멸균 염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 아가, 펙틴, 땅콩 오일, 참기름, 및 물을 포함한다. 완충액/담체는 rAAV가 용합 배관에 첨착되는 것을 방지하지만 생체내에서 rAAV 결합 활성도를 방해하지 않는 성분을 포함해야 한다.

[0126]

선택적으로, 발명의 조성물은 rAAV 및 담체(들)에 더불어, 다른 종래의 약제학적 성분, 예를 들어, 보존제, 또는 화학적 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 칼륨 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0127]

본 발명에 따른 조성물은 상기에서 정의된 것과 같은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있다. 적합하게는, 본 명세서에 기술된 조성물은 약제학적으로 적합한 담체에 현탁된 및/또는 주입, 삼투압 펌프, 척수강내 카테터를 통한 대상체에 대한 전달을 위해, 또는 다른 장치 또는 경로에 의한 전달을 위해 설계된 적합한 부형제와 혼합된 하나 이상의 AAV의 유효량을 포함한다. 일례에서, 조성물은 척추강내 전달을 위해서 제형화된다. 일 실시형태에서, 척수강내 전달은 척추관, 예를 들어, 지주막하 공간으로의 주입을 포함한다.

[0128]

본 명세서에서 기술된 바이러스 벡터는 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 인간 환자)에게 hSMN을 전달하고, 대상체에 기능성 SMN을 공급하고/공급하거나 척수근 위축증을 치료하기 위한 의학의 제조에 사용될 수 있다. 치료 과정은 선택적으로 동일한 바이러스 벡터(예컨대, AAVhu68 벡터) 또는 상이한 바이러스 벡터(예를 들어, AAVhu68 및 AAVrh10)의 반복적인 투여를 포함할 수 있다. 또 다른 조합이 본 명세서에 기술된 바이러스 벡터 및 비-바이러스 벡터 전달 시스템을 사용하여 선택될 수 있다.

[0129]

본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "척추강내 전달" 또는 "척추강내 투여"는, 약물이 뇌척수액(CSF)에 도달하도록 척추관, 보다 구체적으로는 지주막하 공간 내로의 주사를 통한 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다. 척추강내 전달은 요추 천자(lumbar puncture), 뇌실내(intraventricular)(뇌혈관내(ICV) 포함), 후두골하

(suboccipital)/수조내, 및/또는 C1-2 천자를 포함할 수 있다. 예를 들어, 물질은 요추 천자에 의해서 지주막하 공간을 통한 확산을 위해서 도입될 수 있다. 또 다른 예에서, 주사는 대조 내로 행해질 수 있다.

[0130] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "수조내 전달" 또는 "수조내 투여"는 대조 소뇌연수의 뇌척수액 내로 직접, 보다 구체적으로는 후두골하 천자를 통해서 또는 대조 내로의 직접 주사에 의해서 또는 영구적으로 배치된 관을 통해서인 것인 약물에 대한 투여 경로를 지칭한다.

[0131] 일 실시형태에서, 전달은 본 명세서에 기술된 장치를 사용하여 수행될 수 있다.

[0132] IV. 약제학적 조성물을 뇌척수액에 전달하기 위한 장치 및 방법

[0133] 일 양상에서, 본 명세서에 제공된 백터는 이 부분에 제공되고, 실시예 및 도 7에 추가로 기술된 방법 및/또는 장치를 통해서 척추강내로 투여될 수 있다. 대안적으로, 다른 장치 및 방법이 선택될 수 있다. 방법은 척추 니들을 환자의 대조로 전진시키는 단계, 가요성 튜빙의 길이를 척추 니들의 근위 허브에 연결시키고, 밸브의 산출 포트를 가요성 튜빙의 근위 단부에 연결시키는 단계, 및 상기 전진 단계 및 연결 단계 후에 그리고 튜빙이 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후에, 임의의 양의 등장성 용액을 함유하는 제1 용기를 밸브의 플러쉬 입구 포트에 연결하는 단계, 및 그 후 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 제2 용기를 밸브의 백터 입구 포트에 연결하는 단계를 포함한다. 제1 용기 및 제 2용기를 밸브에 연결한 후에, 유체 유동을 위한 경로가 백터 입구 포트와 밸브의 출구 포트 사이에서 개방되고, 약제학적 조성물이 척추 니들을 통해서 환자에게 주사되고, 약제학적 조성물의 주사 후, 유체 유동을 위한 경로가 플러쉬 입구 포트 및 밸브의 출구 포트를 통해서 개방되고, 등장성 용액이 척추 니들로 주사되어 약제학적 조성물이 환자에게 플러싱된다.

[0134] 또 다른 양상에서, 약제학적 조성물의 수조내 전달을 위한 장치가 제공된다. 장치는 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 제1 용기, 등장성 용액을 함유하는 제2 용기, 및 약제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대조 내의 뇌척수액으로 직접 배출될 수 있는 척추 니들을 포함한다. 장치는 제1 용기에 서로 연결된 제1 입구 포트, 제2 용기에 서로 연결된 제2 입구 포트, 척추 니들에 서로 연결된 출구 포트, 및 약제학적 조성물 및 등장성 용액의 척추 니들을 통한 유동을 제어하기 위한 루어 락을 갖는 밸브를 추가로 포함한다.

[0135] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 컴퓨터 단층촬영(CT)은 신체 구조의 3차원 영상이 축을 따라서 제조된 일련의 평면 단면 영상으로부터 컴퓨터에 의해서 구축되는 방사선촬영을 지칭한다.

[0136] 도 7에 나타내는 장치 또는 의학적 장치(10)는 밸브(16)를 통해 상호 연결되는 하나 이상의 용기(12 및 14)를 포함한다. 용기(12 및 14)는 각각 약제학적 조성물, 약물, 백터, 또는 유사한 물질의 새로운 공급원 및 등장성 용액, 예컨대, 염수의 새로운 공급원을 제공한다. 용기(12 및 14)는 환자에게 유체의 주사를 가능하게 하는 의학 장치의 임의의 형태일 수 있다.

[0137] 예의 방식에 의해서, 각각의 용기(12 및 14)는 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있다. 예를 들어, 예시된 실시형태에서, 용기(12)는 임의의 양의 약제학적 조성물을 함유하는 개별 주사기로서 제공되고, 본 명세서에서 "백터 주사기"라 지칭된다. 단지 예의 목적을 위해서, 용기(12)는 약 10cc의 약제학적 조성물 등을 함유할 수 있다.

[0138] 마찬가지로, 용기(14)는 염수 용액의 양을 수용하는 별개의 주사기, 캐놀라 등의 형태로 제공될 수 있고 "플러쉬 주사기"로서 지칭될 수 있다. 단지 예의 목적을 위해, 용기(14)는 약 10cc의 염수 용액을 수용할 수 있다.

[0139] 대안으로서, 용기(12 및 14)는 주사기 이외의 형태로 제공될 수 있고, 단일 장치 내로 통합될 수 있으며, 예컨대 통합된 의학적 주사 장치는 한쌍의 별개의 챔버(약제학적 조성물에 대해서 하나 및 염수 용액에 대해서 하나)를 가진다. 또한, 챔버 또는 용기의 크기는 목적하는 양의 유체를 함유하도록 필요에 따라서 제공될 수 있다.

[0140] 예시된 실시형태에서, 밸브(16)는 스윙블(swivel) 수 루어 락(18)을 갖는 4-웨이 스태프로서 제공된다. 밸브(16)는 용기(12 및 14)(즉, 예시된 실시형태에서 백터 주사기 및 플러쉬 주사기)에 서로 연결되고, 스윙블 수 루어 락은 밸브(16)를 통과하는 경로가 용기(12 및 14) 각각에 대해서 폐쇄되거나 개방되는 것을 가능하게 한다. 이러한 방식에서, 밸브(16)를 통과하는 경로는 백터 주사기 및 플러쉬 주사기 둘 모두에 대해서 폐쇄될 수 있거나 또는 백터 주사기 및 플러쉬 주사기 중 선택된 하나에 대해서 개방될 수 있다. 4-웨이 스태프에 대한 대안으로서, 밸브는 3-웨이 스태프 또는 유체 제어 장치일 수 있다.

[0141] 예시된 실시형태에서, 밸브(16)는 연장 튜빙(20)의 길이의 하나의 단부 또는 유체를 위한 유사한 도관에 연결된다. 튜빙(20)은 목적하는 길이 또는 내부 부피를 기초로 선택될 수 있다. 단지 예의 방식으로, 튜빙은 약 6 내

지 7인치 길이일 수 있다.

- [0142] 예시된 실시형태에서, 튜빙(12)의 반대 단부(22)는 T-연결기 연장 세트(24)에 연결되고, 결국, 이것은 척추 니들(26)에 연결된다. 예의 방식으로, 니들(26)은 5인치, 22 또는 25게이지의 척추 니들일 수 있다. 또한, 선택으로서, 척추 니들(26)은 도입기 니들(28), 예컨대, 3 및 1/2인치, 18게이지 도입기 니들에 연결될 수 있다.
- [0143] 사용 시에, 척추 니들(26) 및/또는 임의적인 도입기 니들(28)은 대조를 향해서 환자에게 전진될 수 있다. 니들 전진 후, 니들(26 및/또는 28) 및 상응하는 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 골, 뇌줄기 및 척수)의 가시화를 허용하는 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상을 얻을 수 있다. 올바른 니들 배치는 니들 허브 내의 뇌척수액(CSF)의 관찰 및 대조 내의 니들 팁의 가시화에 의해서 확인된다. 그 후, 상대적으로 짧은 연장 튜빙(20)이 삽입된 척추 니들(26)에 부착될 수 있고, 이어서 4-웨이 스탭콕(16)이 튜빙(20)의 반대 단부에 부착될 수 있다.
- [0144] 상기 조립체는 환자의 CSF로 "자가-프라이밍"되도록 허용된다. 그 후, 사전 충전된 정상 염수 플러쉬 주사기(14)가 4-웨이 스탭콕(16)의 플러쉬 입구 포트에 부착되고, 약제학적 조성물을 함유하는 벡터 주사기(12)가 4-웨이 스탭콕(16)의 벡터 입구 포트에 부착된다. 그 후, 스탭콕(16)의 산출 포트가 벡터 주사기(12)에 대해서 개방되고, 벡터 주사기의 내용물이 일정 시간 기간에 걸쳐서 밸브(16) 및 조립된 장치를 통해서 환자에게 서서히 주사될 수 있다. 단지 예의 목적을 위해서, 이러한 시간 기간은 대략 1 내지 2분 및/또는 목적하는 임의의 다른 시간일 수 있다.
- [0145] 벡터 주사기(12)의 내용물이 주사된 후, 스탭콕(16) 상의 스위블 락(18)은 스탭콕(16) 및 니들 조립체가 부착된 사전 충전된 플러쉬 주사기(14)를 사용하여 목적하는 양의 생리 염수로 플러싱될 수 있도록 제2 위치로 돌려진다. 단지 예의 방식으로, 1 내지 2cc의 생리 염수가 사용될 수 있지만; 더 많거나 더 적은 양이 필요에 따라서 사용될 수 있다. 생리 염수는 모든 또는 대부분의 약제학적 조성물이 조립된 장치를 통해서 환자에게 주사되어, 약제학적 조성물이 조립된 장치 내에 거의 또는 전혀 남아있지 않도록 보장한다.
- [0146] 조립된 장치가 염수로 플러싱된 후, 니들(들), 연장 튜빙, 스탭콕, 및 주사기를 비롯한 이의 전체적으로 조립된 장치는 대상체로부터 제거되고, 폐기를 위해서 수술 트레이 상의 생물재해 폐기물 리셉터를 또는 두꺼운 용기(니들(들)을 위해서)에 놓인다.
- [0147] 스크리닝 공정은 연구 책임자에 의해서 수행될 수 있고, 이것은 궁극적으로 수조내(IC) 절차로 이어질 수 있다. 연구 책임자는 대상체(또는 지정된 간병인)에게 안전한 정보를 제공하기 위해서 공정, 절차, 투여 절차 자체 및 모든 가능한 안정성 위험을 기술할 수 있다. 병력, 수반된 의약, 신체 검사, 활력 징후, 심전도(ECG) 및 실험실 시험 결과가 수득되거나 수행되어, IC 절차에 대한 대상체 적격성의 스크리닝 평가에서 사용하기 위해서 신경방사선전문의, 신경외과의사, 및 마취과의사에게 제공된다.
- [0148] 적격성을 검토하기 위한 적절한 시간을 허용하기 위해, 다음의 절차는 제1 선별 방문과 연구 방문 전 1주까지 사이의 임의의 시간에 수행될 수 있다. 예를 들어, "제0일"에, 가돌리늄의 존재 또는 부재 하의 머리/목 자기 공명 영상화(MRI)(즉, 30ml/분/1.73m² 초과와 eGFR)가 얻어질 수 있다. 머리/목 MRI에 추가로, 연구자는 굽힘/연장 연구를 통해 목의 임의의 추가적인 평가에 대한 필요를 결정할 수 있다. MRI 프로토콜은 T1, T2, DTI, FLAIR 및 CINE 프로토콜 영상을 포함할 수 있다.
- [0149] 또한, 머리/목 MRA/MRV는 CSF 유동의 적절한 평가 및 CSF 공간 사이에서 의사소통의 가능한 차단 또는 결여의 식별을 허용하는 제도적 프로토콜에 따라서 수득될 수 있다(즉, 경막내/경막경유 수술의 이력이 있는 대상체는 배제될 수 있거나 또는 추가 시험(예를 들어, 방사성뉴클레오타이드 뇌수조조형술(cisternography)이 필요할 수 있음).
- [0150] 신경방사선전문의, 신경외과의사, 및 마취과의사는 궁극적으로 모든 입수 가능한 정보(스캔, 병력, 신체 검사, 랩 등)를 기초로 IC 절차에 대해서 각각의 대상체의 적격성을 논의하고, 결정한다. MPS 대상체의 특별한 생리학 적 요구를 명심하면서, 기도, 목(짧아짐/두꺼워짐) 및 머리 운동 범위(목 굽힘 정도)의 상세한 평가를 제공하는 마취 수술전 평가가 또한 "-28일" 내지 "1일"로부터 수득될 수 있다.
- [0151] IC 절차 이전에, CT 스위트(Suite)는 하기 장비를 확인하고, 의약이 제공된다: 성인 요추 천자(LP) 키트(기관마 다 공급됨); BD(백톤 디킨슨사) 22 또는 25게이지×3 - 7" 척추 니들(퀵케 베벨); 동축 도입기 니들, 중재자(interventionalist)의 재량으로 사용됨(척추 니들의 도입을 위해서); 스위블(스핀) 수 루어 락을 갖는 4 웨이 스몰 보어 스탭콕; 암 루어 락 어댑터를 갖는 T-연결기 연장 세트(튜빙), 대략적인 길이 6.7인치; 옴니파큐(Omnipaque) 180(이오핵술), 척추강내 투여용; 정맥내(IV) 투여용 아이오딘화 조영제; 주사용 1% 리도카인 용액(성인 LP 키트에 제공되지 않은 경우); 사전 충전된 10cc 생리 염수(멸균) 플러쉬 주사기; 방사선불투과성 마커

(들); 수술 준비 장비/면도기; 삽관된 대상체의 적절한 배치를 허용하기 위한 필로/지지체; 기관내 삽관 장비, 일반적인 마취 기계 및 기계적 환기; 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비(및 필요한 인원); 및 백터를 함유하는 10cc 주사기; 별도의 약제학 매뉴얼에 따라서 CT/수술실(OR)에서 준비하고 운반됨.

[0152] 절차에 대해서 정보를 제공한 동의서를 의료 기록 및/또는 연구 파일 내에서 확인하고 문서화한다. 영상의학과 및 마취통증의학과 스태프로부터의 절차를 위한 별개의 동의서를 제도적 요건에 따라서 획득한다. 대상체는 제도적 가이드라인에 따라서 적절한 병원 진료 유닛 내에 놓인 정맥내 접근(예를 들어, 2개의 IV 접근 부위)을 허용한다. 정맥내 유체를 마취과의사의 재량으로 투여한다. 마취과의사의 재량으로 그리고 제도적 가이드라인에 따라서, 대상체에게 적절한 환자 진료 유닛, 대기 구역 또는 수술/CT 절차 공간에서 일반적인 마취제의 투여와 함께 기관내 삽관을 유도하거나 행할 수 있다.

[0153] 요추 천자를 먼저 수행하여 5cc의 뇌척수액(CSF)을 제거하고, 그 다음 조영제(옴니파큐 180)를 척추강내로 주사하여 대조의 가시화를 돕는다. 적절한 대상체 배치 조작을 수행하여 대조 내에서 조영제의 확산을 가능하게 할 수 있다.

[0154] 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비를 대상체에게 부착한다. 대상체를 엎드리거나 측와위 위치로 CT 스캐너 테이블 상에 놓는다. 이송 및 배치 동안 대상체 안정성을 보장하기 위해서 적절한 스태프가 존재해야 한다. 적절하다고 생각되는 경우, 대상체를 수술전 평가 동안 안전한 것으로 결정된 정도까지 그리고 배치 후에 문서화된 정상 신경생리학적 모니터 신호를 사용하여 목 굽힘을 제공하는 방식으로 배치할 수 있다.

[0155] 하기 스태프가 현장에 존재하는지 확인할 수 있고, 식별할 수 있다. 절차를 수행하는 중재자/신경외과의사; 마취과의사 및 호흡 테크니션(들); 간호사 및 보조 의사; CT(또는 OR) 테크니션; 신경생리학 테크니션; 및 현장 코디네이터(Site Coordinator). "타입-아웃"을 의료기관 평가위원회 인증(Joint Commission/hospital protocol)/병원 프로토콜에 따라서 완결하여 올바른 대상체, 절차, 부위, 배치, 및 공간 내의 모든 필수적인 장비의 존재를 입증한다. 이어서, 책임 사이트 연구자는, 그/그녀가 대상체 준비를 진행할 수 있는지를 스태프와 함께 확인할 수 있다.

[0156] 두개저(skull base) 하의 대상체의 피부를 적절한 경우 면도한다. CT 스카우트 영상을 수행하고, 그 다음 표적 위치를 국한시키고, 혈관을 영상화하기 위해서 중재자가 필요하다고 판단하는 경우, IV 조영제를 사용하여 사전 절차 계획 CT를 수행한다. 표적 부위(대조)를 식별하고, 니들 궤도를 계획한 후, 피부를 수술준비시키고, 제도적 가이드라인에 따라서 멸균 기술을 사용하여 가린다. 방사선불투과성 마커를 중재자에 의해서 제시된 바와 같은 표적 피부 위치에 놓는다. 마커 하의 피부를 1% 리도카인으로의 침투를 통해서 마취시킨다. 이어서, 동축 도입기 니들을 사용하는 선택으로, 22G 또는 25G 척추 니들을 대조를 향해서 전진시킨다.

[0157] 니들 전진 후, 제도적 장비를 사용하여 실현 가능한 가장 얇은 CT 슬라이스 두께(이상적으로는 2.5mm 이하)를 사용하여 CT 영상을 취득한다. 니들 및 상응하는 연조직(예를 들어, 척추열 근육, 골, 뇌줄기 및 척수)의 적절한 가시화를 허용하는 가능한 가장 낮은 방사선 용량을 사용하여 순차적인 CT 영상을 취득한다. 니들 허브 내의 CSF의 관찰 및 대조 내의 니들 팁의 가시화에 의해서 올바른 니들 배치를 확인한다.

[0158] 중재자는 백터 주사기가 멸균 필드에 가깝게, 그러나 그 외부에 배치되는지를 확인한다. 백터 주사기 내의 약제학적 조성물을 취급 또는 투여하기 전에, 멸균 필드 내에서 절차를 돕는 스태프는 장갑, 마스크 및 눈 보호기를 착용한다.

[0159] 연장 튜빙을 삽입된 척추 니들에 부착하고, 이어서 이것을 4-웨이 스태프에 부착한다. 이러한 장치가 대상체의 CSF로 "자가-프라이밍"된 후, 10cc의 사전 충전된 생리 염수 플러쉬 주사기를 4-웨이 스태프의 플러쉬 입구 포트에 부착한다. 이어서 백터 주사기를 중재자에게 제공하고, 4-웨이 스태프 상의 백터 입구 포트에 부착한다.

[0160] 스태프의 스위블 록을 제1 위치에 놓음으로써 스태프의 출구 포트를 백터 주사기에 대해서 개방한 후, 주사 동안 주사기의 플러쉬 상에 과도한 힘이 적용되지 않도록 주의하면서, 백터 주사기의 내용물을 서서히 주입한다(대략 1 내지 2분에 걸쳐서). 백터 주사기의 내용물을 주사한 후, 스태프의 스위블 락을 스태프 및 니들 조립체가 부착된 사전 충전된 플러쉬 주사기를 사용하여 1 내지 2cc의 생리 염수로 플러싱될 수 있도록 제2 위치로 돌린다.

[0161] 준비되면, 이어서 중재자는 그/그녀가 대상체로부터 장치를 제거할 것을 스태프에게 알린다. 단일 행동으로, 니들, 연장 튜빙, 스태프, 및 주사기를 대상체로부터 서서히 제거하고, 폐기를 위해서 수술 트레이 상의 생물재해 폐기물 리셉터를 또는 두꺼운 용기(니들을 위해서)에 넣는다.

- [0162] 니들 삽입 부위를 출혈 또는 CSF 누출의 징후에 대해서 조사하고, 연구자에 의해서 제시된 바와 같이 처리한다. 부위를 제시된 바와 같이 거즈, 수술 테이프 및/또는 테가덤 드레싱(Tegaderm dressing)을 사용하여 드레싱한다. 이어서 대상체를 CT 스캐너로부터 제거하고, 들것 상에 반듯이 눕힌다. 이송 및 배치 동안 대상체 안정성을 보장하기 위해서 적절한 스태프가 존재한다.
- [0163] 마취를 중단하고, 마취 후 케어를 위한 제도적 가이드라인에 따라서 대상체를 케어한다. 신경생리학적 모니터를 대상체로부터 제거한다. 대상체가 누워있는 들것의 머리를 회복 동안 약간 상승시켜야 한다(약 30도). 제도적 가이드라인에 따라서 대상체를 적합한 마취 후 케어 유닛으로 옮긴다. 대상체가 의식을 적절하게 회복하고, 안정적인 상태가 된 후, 그/그녀를 프로토콜 위임 평가를 위해서 적절한 장소/유닛으로 이동시킬 것이다. 신경학적 평가가 프로토콜에 따라서 이어질 것이며, 1차 연구자는 병원 및 연구 스태프와 공동으로 대상 치료를 감독한다.
- [0164] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물의 전달 방법은 척추 니들을 환자의 대조로 전진시키는 단계; 가용성 튜빙의 길이를 척추 니들의 근위 허브에 연결시키고, 밸브의 출구 포트를 가요성 튜빙의 근위 단부에 연결시키는 단계; 상기 전진 단계 및 연결 단계 후에 그리고 튜빙이 환자의 뇌척수액으로 자가-프라이밍되도록 한 후에, 임의의 양의 등장성 용액을 함유하는 제1 용기를 밸브의 플러쉬 입구 포트에 연결하는 단계, 및 그 후 임의의 양의 억제학적 조성물을 함유하는 제2 용기를 밸브의 벡터 입구 포트에 연결하는 단계; 상기 제1 용기 및 제2 용기를 밸브에 연결시키는 단계 후에, 유체 유동을 위한 경로를 벡터 입구 포트와 밸브의 출구 포트 사이에서 개방시키는 단계 및 억제학적 조성물을 척추 니들을 통해서 환자에게 주사하는 단계; 및 억제학적 조성물을 주사하는 단계 후에, 유체 유동을 위한 경로를 플러쉬 입구 포트 및 밸브의 출구 포트를 통해서 개방시키는 단계 및 등장성 용액을 척추 니들로 주사하여 억제학적 조성물을 환자에게 플러싱하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 방법은 튜빙 및 밸브를 척추 니들의 허브에 연결시키는 단계 이전에 대조 내에서 척추 니들의 원위 팁의 적절한 배치를 확인하는 단계를 추가로 포함한다. 특정 실시형태에서, 확인하는 단계는 대조 내의 척추 니들의 원위 팁을 컴퓨터 단층촬영(CT) 영상을 사용하여 가시화하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 확인하는 단계는 척추 니들의 허브에서 환자의 뇌척수액의 존재를 관찰하는 단계를 포함한다.
- [0165] 상기에 기술된 방법에서, 밸브는 플러쉬 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 벡터 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제1 위치 및 벡터 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 플러쉬 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제2 위치로 스위블에 대해서 개작된 스위블 루어 락을 갖는 스태프코일 수 있고, 여기서 스위블 루어 락은 상기 억제학적 조성물이 환자에게 주사되는 경우에는 상기 제1 위치에 배치되고, 상기 억제학적 조성물이 등장성 용액에 의해서 상기 환자에게 플러싱되는 경우에는 상기 제2 위치에 배치된다. 특정 실시형태에서, 등장성 용액을 척추 니들에 주사하여 억제학적 조성물을 환자 내에서 플러싱한 후, 튜빙, 밸브, 및 제1 및 제2 용기가 조립체로서 이에 연결된 척추 니들을 환자로부터 배출한다. 특정 실시형태에서, 밸브는 스위블 수 루어 락을 갖는 4-웨이 스태프코일이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, T-연결기는 척추 니들의 허브에 위치되고, 튜빙을 척추 니들에 서로 연결한다. 임의로, 척추 니들은 척추 니들의 원위 단부에서 도입기 니들을 포함한다. 척추 니들은 5인치, 22 또는 24게이지 척추 니들일 수 있다. 특정 실시형태에서, 도입기 니들은 3.5인치, 18게이지 도입기 니들이다.
- [0166] 특정 양상에서, 방법은, 최소한, 임의의 양의 억제학적 조성물을 함유하기 위한 제1 용기; 등장성 용액을 함유하기 위한 제2 용기; 억제학적 조성물이 장치로부터 환자의 대조 내의 뇌척수액으로 직접 배출될 수 있는 척추 니들; 및 제1 용기에 서로 연결된 제1 입구 포트, 제2 용기에 서로 연결된 제2 입구 포트, 척추 니들에 서로 연결된 출구 포트, 및 억제학적 조성물 및 등장성 용액의 척추 니들을 통한 유동을 제어하기 위한 루어 락을 갖는 밸브로 구성된 장치를 사용한다. 특정 실시형태에서, 밸브는 제2 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 제1 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제1 위치 및 제1 입구 포트를 통한 유동을 동시에 차단하면서 제2 입구 포트로부터 출구 포트로의 유동을 허용하는 제2 위치로 스위블에 대해서 개작된 스위블 루어 락을 갖는 스태프코일이다. 임의로, 밸브는 스위블 수 루어 락을 갖는 4-웨이 스태프코일이다. 특정 실시형태에서, 제1 용기 및 제2 용기는 별개의 주사기이다. 특정 실시형태에서, 척추 니들은 가요성 튜빙의 길이를 통해서 밸브에 서로 연결되어 있다. T-연결기는 튜빙을 척추 니들에 서로 연결할 수 있다. 특정 실시형태에서, 척추 니들은 5인치, 22 또는 24게이지 척추 니들이다. 특정 실시형태에서, 장치는 추가로 척추 니들의 원위 단부에 연결된 도입기 니들을 추가로 포함한다. 임의로, 도입기 니들은 3.5인치, 18게이지 도입기 니들이다.
- [0167] 이러한 방법 및 이러한 장치는 본 명세서에 제공된 조성물의 척추강내 전달을 위해서 각각 임의로 사용될 수 있다. 대안적으로, 다른 방법 및 장치가 이러한 척추강내 전달을 위해서 사용될 수 있다.

- [0168] 일 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 단일 용량의 AAVhu68.SMA는 유전적으로 확인된 5q SMA 및/또는 타입 3 SMA의 임상 이력을 갖는 성인(적어도 18세(18세 이상))에게 투여된다. 다른 실시형태에서, 환자는 더 젊을 수 있다(예를 들어, 12세 내지 최대 18세; 6세 내지 12세; 3세 내지 6세; 18개월 내지 3세; 6개월 내지 18개월; 신생아). 환자는 비-보행 또는 보행 환자일 수 있다. 투여는 ICM(대조내) 주사에 의한 단일 용량의 벡터를 통해서 이루어질 수 있다. 일 실시형태에서, 용량은 약 3×10^{13} GC 내지 1×10^{14} GC의 고용량 범위이다. 그러나, 다른 적합한 범위가 본 명세서에 제공된다. 효능 평가는 하기 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 움직임 평가, 예컨대, 6분 발트 시험(six-minute walt test: 6MWT), 10미터 보행 시간, RULM 점수, 4 계단 오르기, 9홀 펙 시험(9 hole peg test); 폐 기능 시험, 예컨대, 강제 폐활량(FVC), 최대 호기압(MEP), 및 최대 흡기압(MIP); 호흡기 기능 시험, PedsQL(피로 규모), SMA-FRS(기능성 등급 규모), 전기생리학, 예컨대, 신경 전도 시험, CMAP(예를 들어, 척골 및 비골 CMAP 진폭, 및 감각 시험), SMN 단백질 농도 및 기타 탐색 바이오마커가 CSF에서 평가될 것이다.
- [0169] 일 실시형태에서, 적절한 농도의 벡터를 함유하는 주사기가 사용된다. 벡터 투여 이전에, 요추 천자를 수행하여 미리 결정된 부피 위 CSF를 제거하고, 그 다음 아이오딘화된 조영제를 척추강내로(IC) 주사하여 대조의 관련 해부학의 시각화를 돕는다. 척추강내 조영제에 대한 대안으로서 니들 삽입 이전에 또는 니들 삽입 동안에 정맥내(IV) 조영제가 투여될 수 있다. 사용되는 IV 또는 IC 조영제에 대한 결정은 의사의 재량이다. 환자는 수술 테이블에서 마취되고, 삽관되고, 배치된다. 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비를 참여자에게 부착한다. 주사 부위를 멸균 기술을 사용하여 수술준비시키고, 가린다. 척추 니들(22 내지 25G)을 형광투시 유도 하에서 대조내로 전진시킨다. 더 큰 도입기 니들을 사용하여 니들 배치를 돕는다. 니들 위치를 확인한 후, 연장 세트를 척추 니들에 부착하여, 환자 CSF의 충전을 가능하게 한다. 의사의 재량으로, 조영제를 함유하는 주사기를 연장 세트에 연결하고, 소량을 주사하여 대조 내의 니들 배치를 확인할 수 있다. CT 유도 +/- 조영제 주사에 의해서 니들 배치를 확인한 후, 벡터(예를 들어, 5.6mL)를 함유하는 주사기를 연장 세트에 연결한다. 주사기 내용물을 1 내지 2분에 걸쳐서 서서히 주사하여, 약 5mL의 부피를 전달한다. 니들을 환자로부터 서서히 제거한다.
- [0170] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "대상체"는 포유동물, 예를 들어, 인간, 마우스, 래트, 기니피그, 개, 고양이, 말, 염소, 돼지, 비인간 영장류, 예컨대, 원숭이, 침팬지, 개코원숭이 또는 고릴라이다. 일 실시형태에서, 대상체는 SMA를 갖는 인간 환자이다.
- [0171] 국제 SMA 콘소시엄 분류는 발병 연령 및 운동 발달 마일스톤에 따라서, SMA 표현형의 몇몇 증증도를 한정한다. SMA 0 지정은 태아기 발병 및 중증 관절 구축, 양측안면 마비 및 호흡 부전을 반영하는 것으로 제안된다. 타입 I SMA, I형 베르드니히-호프만병은 출생 6개월 내에 발병되는 가장 중증의 출생후 형태이다. 환자는 바르게 앉을 수 없고, 심각한 호흡기 기능장애를 갖는다. 타입 II SMA는 초기 2세 이내에 발병하는 중간 형태이고; 소아는 바르게 앉을 수 있지만, 걸을 수 없다. 임상 과정은 다양하다. 타입 III(쿠겔베르그-벨란더병)은 2세 이후에 시작되고, 통상적으로 만성적인 발달을 갖는다. 소아는 적어도 유아기에 서있을 수 있고, 도움 없이 걸을 수 있다. 성인 형태(타입 IV)는 가장 경증이고, 30세 이후에 발병되고; 보고된 사례가 거의 없고, 유병률은 정확히 알려져 있지 않다.
- [0172] 일부 예에서, SMA는 임신 대략 30 내지 36주에 태아에서 검출된다. 이러한 상황에서, 전달 후 가능한 빨리 신생아를 치료하는 것이 바람직할 수 있다. 자궁에서 태아를 치료하는 것도 바람직할 수 있다. 따라서, SMA를 갖는 신생아 대상체를 구제 및/또는 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 hSNM1 유전자를 신생아 대상체(예를 들어, 인간 환자)의 뉴런 세포에 전달하는 단계를 포함한다. SMA를 갖는 태아를 구제 및/또는 치료하는 방법이 제공되며, 이 방법은 hSNM 유전자를 자궁 내의 태아의 뉴런 세포에 전달하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 유전자는 본 명세서에 기술된 조성물로 척추강내 주사를 통해서 전달된다. 이 방법은 기능성 hSMN 단백질을 암호화하는 임의의 핵산 서열을 사용할 수 있는데, 본 명세서에 기술된 바와 같은 코돈 최적화된 hSMN이든 또는 네이티브 hSMN이든, 또는 "야생형" 단백질과 비교할 때 잠재된 활성도를 갖는 hSMN 대립유전자 또는 이들의 조합물이든 관계없다. 일 실시형태에서, 자궁 내에서의 치료는 본 명세서에 기술된 바와 같은 hSMN 작제물을 태아에서 SMA를 검출한 이후에 투여하는 것으로서 정의된다(예를 들어, 본 명세서에 참고로 포함된 문헌[David et al, Recombinant adeno-associated virus-mediated in utero gene transfer gives therapeutic transgene expression in the sheep, Hum Gene Ther. 2011 Apr;22(4):419-26. doi: 10.1089/hum.2010.007. Epub 2011 Feb 2] 참고).
- [0173] 일 실시형태에서, 신생아 치료는 본 명세서에 기술된 바와 같은 hSMN 작제물을 8시간, 최초 12시간, 최초 24시간, 또는 최초 48시간 이내에 전달을 투여하는 것으로서 정의된다. 또 다른 실시형태에서, 특히 영장류(인간 또

는 비인간)의 경우, 신생아 전달은 약 12시간 내지 약 1주, 2주, 3주, 또는 약 1개월의 기간 이내, 또는 약 24 시간 내지 약 48시간 이후이다. 또 다른 실시형태에서, 늦은 발병 SMA의 경우, 조성물은 증상의 발병 이후에 전달된다. 일 실시형태에서, 환자의 치료(예를 들어, 제1 주사)는 생후 1세 이전에 시작된다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, 영아에서, 작제물은 예를 들어, 1세 이후에 투여된다. 선택적으로, 1회 초과와 재투여가 허용된다. 이러한 재투여는 동일한 유형의 벡터, 상이한 바이러스 벡터, 또는 본 명세서에 기술된 바와 같은 비-바이러스 전달을 통해서 행해질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 치료는 최초 1세 이후에, 또는 최초 2 내지 3세 이후에, 5세 이후에, 11세 이후에, 또는 그 초과와 연령에 시작된다.

[0174] 본 발명에 따라서, AAV.hSMN의 "치료적 유효량"은 목적하는 결과, 즉, SMA 또는 이의 하나 이상의 증상의 치료를 달성하기 위해서 본 명세서에 기술된 것과 같이 전달된다. 다른 목적하는 결과는 근육 약화의 감소, 근육 강도 및 근긴장의 증가, 척추 측만증의 예방 또는 감소, 또는 호흡기 건강의 유지 또는 증가, 또는 떨림 또는 쉴록거림의 감소를 포함한다. 다른 목적하는 평가변수는 의사에 의해 결정될 수 있다.

[0175] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 바와 같은 AAV.hSMN을 함유하는 조성물의 치료 효과는 하기 파라미터 중 하나에 의해서 평가될 수 있다. 이러한 점수는 52주에, 또는 더 길거나 더 짧은 간격, 예를 들어, 8주, 12주, 36주, 48주, 또는 그 사이의 시간에서의 점수일 수 있다. 투여 후 미리 결정된 시간에서 RULM 점수를 기준선 점수와 비교한다. 운동 기능은 보행 대상체에서 6MWT 시험, 및 10미터 보행 시간에 의해서 측정될 수 있다. 운동 기능은 9홀 펙 시험(보행 및 비보행) 및 4 계단 오르기 시험(보행 단독)에 의해서 측정될 수 있다. 폐 기능은 강제 폐활량(FVC), 최대 호기압(MEP), 최대 흡기압(MIP)에 의해서 측정될 수 있다. 척골 및 비골 CMAP 진폭에서의 기준선으로부터의 변화를 평가할 수 있다. PedQLVersion 3.0 다차원 피로 규모, 성인 보고 모듈을 평가할 수 있다. SMA-FRS(기능성 순위 규모)를 평가할 수 있다. CSF, 혈청 및 소변에서 DNA 및 기타 AAV-기반 약물 성분 중의 벡터의 약동력학을 측정할 수 있다.

[0176] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 6MWT는 6MWT에서 보행 대상체에 의해서 허용되는 거리의 측정치이다. 6MWT는 실내에 위치한 길고 낮은 차량 직선 복도에서 수행될 것이다. 30-미터 거리는 두 단부가 주황색 콘으로 마킹될 것이다. 출발선은 밝은 색상의 테이프로 마킹될 것이다.

[0177] RULM: 수정된 상지 모듈은 대상체에 의해서 선택된 하나의 상지를 사용한 20개의 운동 시험으로 이루어진다. 각각의 시험에 대한 성능은 평가자에 의해서 0 내지 2의 스케일로 등급매겨진다.

[0178] 9홀 펙 시험: 9-HPT는 상지 기능의 간단하고, 표준화되고 정량적인 시험이다. 바른손 및 비바른손 둘 모두가 2회 시험된다. 대상체를 9개의 펙을 보유한 작고 얇은 용기 및 9개의 빈 구멍을 갖는 나무 또는 플라스틱 블록을 갖는 표에 앉힌다. 스태프위치를 시작할 때 시작 명령 시에, 대상체는 9개의 펙을 가능한 한 번에 한 개씩 들어서, 그것을 9개의 구멍에 넣고, 그것이 구멍 내에 있을 때, 그것을 다시 가능한 한 번에 한 개씩 신속하게 다시 제거하고, 그것을 얇은 용기에 다시 넣는다. 시험을 완결하는 총 시간을 기록한다. 바른손을 사용한 2회의 연속적인 시험 직후에 비바른손을 사용한 2회의 연속적인 시험이 이어진다. 9-HPT에 대한 점수는 4회의 시험의 평균이다. 각각의 손에 대한 2회의 시험을 평균 내고, 각각의 손에 대한 평균 시간의 역수로 전환하고, 이어서 2개의 역수를 평균 낸다.

[0179] 10미터 보행 시간: 10-미터 보행 시간은 10미터를 보행하는 데 필요한 시간의 측정치이다. 시험은 실내에 위치한 길고 낮은 차량 직선 복도에서 수행될 것이다. 10미터 거리는 두 단부가 주황색 콘으로 마킹될 것이다. 출발선은 밝은 색상의 테이프로 마킹될 것이다.

[0180] 4 계단 오르기: 4 계단 오르기 시험은 대상체가 4개의 계단을 올라가고 내려오는 데 필요한 시간을 평가한다. 대상체가 시험을 안전하게 완결할 수 있는지를 보증할 교육된 평가자에 의해서 시험이 수행될 것이다. 계단은 16 내지 20cm의 높이 및 핸드레일을 가져야 한다. 대상체는 안전한 방식으로 가능한 신속하게 올라가고 내려오도록 지시된다. 시험을 완결하는 데 필요한 시간뿐만 아니라 핸드레일의 사용에 대한 필요성 둘 모두가 기록될 것이다.

[0181] 전기생리학 연구를 수행하여 운동 유닛의 기능을 평가한다. CMAP: 오른쪽 팔의 연구를 회피할 설득력 있는 이유(예를 들어 발병전 중첩된 신경 손상)가 존재하지 않는 한, 오른쪽 팔 상에서 척골 신경의 운동 신경 전도 연구가 우선적으로 수행될 것이다. 이것은 신경에 전류를 제공하고, 근육에서 운동 반응을 기록하는 것을 포함한다. 이러한 반응은 복합근 활동 전위(compound muscle action potential)라고 지칭된다. CMAP의 높이 및 면적(진폭 및 AUC) 둘 모두를 측정할 수 있다.

[0182] 기능성 및 피로 등급 스케일:

- [0183] PedsQL 피로 규모, 성인 보고서: PedsQL 다차원 피로 규모는 일반적인 피로(6개 항목), 취침 및 휴식(6개 항목), 및 인지 피로(6개 항목)를 평가하는 18-항목 설문지이다.
- [0184] SMA-FRS: SMA-FRS는 일상 생활 활동의 약 10가지 양상을 기초로 쉽게 관리되는 서수 등급 스케일이다. 각각의 하위세트는 대상체 또는 간병인에 의해서 0(완전히 의존적임) 내지 5(완전히 독립적임)로 등급 매겨지며, 최대 점수는 50이다.
- [0185] 일 실시형태에서, 평가 순서는 하기와 같이 환자에 대해서 하기 순서로 수행된다: PedsQL(피로 규모), SMA-FRS(기능성 등급 스케일), 6MWT, 15-분 휴식(최소), RULM, 9-홀 팩 시험, 10미터 보행, 15-분 휴식(최소), 4 계단 오르기, PFTs* 및 척골 및 비골 CMAP*. *는 임의의 순서로 수행될 수 있다. 환자에 의해서 안전하게 수행될 수 없는 시험은 생략될 것이다.
- [0186] 치료 전에, SMA 환자는 hSMN-1 유전자를 전달하기 위해 사용되는 rAAV 벡터의 캡시드에 대한 중화 항체(Nab)에 대해 평가될 수 있다. 이러한 Nab는 형질도입 효율과 경쟁하고, 치료 효능을 감소시킬 수 있다. 1:5 이하 내지 1:20 이하, 또는 1:2.5 이하 내지 1:10 이하의 기준선 혈청 Nab 역가를 갖는 SMA 환자가 rAAV.hSMN1 유전자 요법 프로토콜로의 치료에 대한 양호한 후보자이다. 1:5 초과와 혈청 Nab의 역가를 갖는 SMA 환자의 치료는 병용 요법, 예컨대, rAAV.hSMN 벡터 전달로의 치료 이전에 그리고/또는 치료 동안 면역억제제와의 일시적인 공동 치료가 필요할 수 있다. 임의로, 면역억제 공동-요법은 AAV 벡터 캡시드 및/또는 제형의 다른 성분에 대한 중화 항체의 이전 평가 없이 예방 조치로서 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 이전 면역억제 요법이 특히, SMN 활성도 수준을 사실상 갖지 않는 환자(여기서 트랜스젠 산물은 "이물"로서 인지될 수 있음)에서, hSMN 트랜스젠 산물에 대해서 잠재적인 부정적인 면역 반응을 예방하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0187] 이러한 공동요법을 위한 면역억제제는 글루코코티코이드, 스테로이드, 항대사산물, T-세포 저해제, 마크몰라이드(예를 들어, 라파마이신 또는 라파로그), 및 알킬화제를 비롯한 세포정지제, 항-대사산물, 세포독성 항생제, 항체 또는 이뮤노필린에 대해서 활성인 작용제를 포함하지만 이들로 제한되지 않는다. 면역 억제제는 질소 머스 타드, 나이트로소유레아, 백금 화합물, 메토트렉세이트, 아자티오프린, 머캅토프린, 플루오로우라실, 닥티노마 이신, 안트라사이클린, 미토마이신 C, 블레오마이신, 미트라마이신, IL-2 수용체-(CD25-) 또는 CD3-지향된 항체, 항-IL-2 항체, 사이클로스포린, 타크롤리무스, 시롤리무스, IFN- β , IFN- γ , 오프오이드, 또는 TNF- α (종양 괴사 인자-알파) 결합제를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 면역억제 요법은 유전자 요법 투여 이전에 시작될 수 있다. 이러한 요법은 동일한 날에 2종 이상의 약물(예를 들어, 프레드니솔론, 마이코페놀레이트 모페 틸(MMF) 및/또는 시롤리무스(즉, 라파마이신))의 공동투여를 포함할 수 있다. 이들 약물 중 하나 이상은 유전자 요법 투여 이후에, 동일 용량으로 또는 조정된 용량으로 계속될 수 있다. 이러한 요법은 필요에 따라, 약 1주, 약 15일, 약 30일, 약 45일, 60일 동안, 또는 더 길 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기술된 rAAVhu68.SMA 유전자 요법이 제공된 환자는 누시너센으로의 사전 치료가 제공되었다. 다른 실시형태에서, 환자는 누시너센으로의 진행중인 치료가 제공되며, 이러한 누시너센 치료에 대한 필요를 감소 또는 제거하기 위해서 유전자 요법 이후에 모니터링된다. rAAVhu68.SMA가 제공된 환자는 퍼리도스티그민[유엿제 울트레크트사(UMC Utrecht)], RO7034067[호프만-라로슈사(Hoffman-LaRoche)], 셀레룩시브, CK-2127107[아스텔라스 파마사(Astellas Pharma)]를 포함하지만 이들로 제한되지 않는 다른 요법이 제공될 수 있다. 특정 실시형태에서, rAAVhu68.SMA의 효능은 이러한 공동 요법의 빈도 및/또는 용량의 감소에 의해서 측정된다. 특정 실시형태에서, AAVhu68-SMN1 요법은, 지속성이긴 하지만, 선택된 환자에 대해서 바람직만큼 교정되지 않을 수 있기 때문에, AAVhu68-SMN1 치료 후 6개월 이내에 누시너센(Spinraza^(상표명)) 요법에 대한 롤-오버(roll-over)가 바람직할 수 있고, 환자에 대한 누시너센(Spinraza^(상표명))의 투여는 두 작용제의 공동 투여인 것으로 간주될 수 있다(또한 문헌[Wang *et al*, Consensus Statement for Standard of Care in Spinal Muscular Atrophy, which provides a discussion of the present standard of care for SMA and www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1352/] 참고).
- [0188] 예를 들어, 영양이 SMA에서 문제인 경우, 위루관(gastrostomy tube)이 적절하다. 호흡기 기능이 악화됨에 따라서, 기관절개술 또는 비침습적 호흡기 지지가 제공된다. 수면 호흡 장애는 야간에 연속적인 양의 기도압의 사용으로 치료될 수 있다. SMA II 및 SMA III을 갖는 개체에서 척추측만증을 위한 수술은 강제 폐활량이 30% 내지 40%를 초과할 때 안전하게 수행될 수 있다. 파워 체어(power chair) 또는 다른 장비가 삶의 질을 개선시킬 수 있다(또한, 본 명세서에 참고로 포함된 미국 특허 제8211631호 참고).
- [0189] 단수 표현은 하나 이상을 지칭하는 것을 주목해야 한다. 이와 같이, 단수 표현, "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0190] 단어 "포함하다", "포함한다", 및 "포함하는"은 배타적인 것이 아니라 포괄적인 것으로 이해되어야 한다. 단어 "이루어지다", "이루어진", 및 이의 변형은, 포괄적인 것이 아니라 배타적인 것으로 이해되어야 한다. 본 명세서에서 다양한 실시형태가 다른 상황 하에서, 표현 "포함하는"을 사용하여 제시되는 경우, 관련된 실시형태는 표현 "이루어진" 또는 "본질적으로 이루어진"을 사용하여 설명 및 기술되도록 의도된다.

[0191] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한, 주어진 참조값으로부터의 10%의 변동($\pm 10\%$)을 의미한다.

[0192] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "질환", "장애" 및 "병태"는 대상체의 비정상적인 상태를 나타내기 위해 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0193] 용어 "발현"은 본 명세서에서 이의 가장 넓은 의미로 사용되고, RNA 또는 RNA 및 단백질의 생산을 포함한다. RNA와 관련하여, 용어 "발현" 또는 "번역"은 특히 펩타이드 또는 단백질의 생산에 관한 것이다. 발현은 일시적일 수 있거나 안정적일 수 있다.

[0194] 용어 "번역"은 리보솜에서의 과정에 관한 것이며, 여기서 mRNA 가닥은 아미노산 서열의 조립을 제어하여 단백질 또는 펩타이드를 생성한다.

[0195] 본 명세서에서 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에서 사용된 기술 용어 및 과학 용어는 당업자에 의해서 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 갖고, 당업자에게 본 출원에서 사용되는 용어 중 다수에 대한 일반적인 지침을 제공하는 공개된 문헌을 참고로 한다.

[0196] 하기 실시예는 단지 예시이며, 본 발명을 제한하도록 의도되지 않는다.

[0197] **실시예 1- 신규 계통군 F AAV -AAVhu68**

[0198] 조직 DNA를 하기 변형과 함께 제조사의 지시에 따라서 QIAamp 칼럼(키아젠사(Qiagen))을 사용하여 PCR 주형으로서 인간 조직 샘플로부터 추출하였다. Q5 DNA 증합효소(Q5(등록상표) Hot Start High-Fidelity 2 \times Master Mix, NEB)를 이의 상당히 높은 충실도 및 강력한 효율을 위해서 선택하여 문헌[Gao, et al [Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Sep 3, 99(18): 11854-11859 (Epub 2002 Aug 21)]]에 기술된 바와 같이 샘플에서 잠재적인 AAV의 전장 VP1 유전자를 회수하였고, 변형된 프라이머 세트는 하기와 같다: 프라이머인 AV1NS 대신에, prm504, [GCTGCGTCAACTGGACCAATGAGAAC, 서열번호 23]를 사용하였고, 역 프라이머 AV2CAS 대신에, prm505[CGCAGAGACCAAAGTTCAACTGAAACGA, 서열번호 24]를 사용하였다. PCR 조건을 하기와 같이 변형시켰다:

	μ L
물	9
prm504	1.25
prm505	1.25
주형	1
2 \times Q5	12.5

[0199]

[0200] **PCR 프로그램**

	시간(초)	사이클(들)
98	30	1
98	10	50
59	10	
72	93	
72	120	1

[0201]

[0202] PCR로부터의 약 3kb의 밴드를 겔로부터 절단하고; DNA를 QIAquick Gel Extraction Kit(키아젠사)로 추출하고, Zero Blunt(등록상표) TOPO(등록상표) PCR Cloning Kit(써모 피셔 사이언티픽사) 내에 클로닝하였다. 플라스미드를 서열결정하여 AAV VP1 유전자의 전장을 얻었다. 샘플 대부분의 경우, 적어도 3개의 플라스미드는 완전히

서열결정되었고, 공통 서열은 그 샘플에 대해서 최종 AAV 서열로서 도출되었다.

[0203] AAVhu68의 vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 획득된 핵산 서열이 서열번호 7에 제공된다(또한 도 8b 내지 도 8d 참고). AAVhu68의 vp1 아미노산 서열이 도 8a 및 서열번호 8에 제공된다. AAV9, AAVhu31 및 AAVhu32와 비교할 때, 2개의 돌연변이(A67E 및 A157V)가 AAVhu68에서 중요한 것으로 식별되었다(도 8a에서 원으로 나타냄).

[0204] 이어서, 패키징 효율, 수율 및 형질도입 특성을 평가하기 위해서 AAV9 VP1 유전자 대신에 hu68의 VP1 유전자를 pAAV2/9 골격에 적재함으로써 pAAV2/hu68 트랜스 플라스미드를 제조하였다. pAAV2/9 플라스미드는 캡시드 유전자에 측접한 AAV2 5' 및 3' ITR을 함유하고, Penn Vector Core[펜실베이니아 대학교(University of Pennsylvania), 미국 펜실베이니아 필라델피아 소재, pennvectorcore.med.upenn.edu]로부터 입수 가능하다.

[0205] **실시예 2 - AAVhu68 벡터**

[0206] 다양한 태그, 예컨대, GFP 및 LacZ를 보유하는 AAVhu68 및 AAV9 벡터를 생성시키고, 평가하였다. 벡터 각각을 문헌[Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859]]에 기술된 바와 같이, 293개 세포에서 삼중 형질주입 기술을 사용하여 생성시켰다.

[0207] **1. pAAVhu68 트랜스 플라스미드의 생산**

[0208] vp1 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산 서열이 서열번호 7에 제공된다.

[0209] 패키징 효율, 수율 및 형질도입 특성을 평가하기 위해서 AAV9 VP1 유전자 대신에 hu68의 VP1 유전자를 pAAV2/9 골격에 적재함으로써 pAAV2/hu68 트랜스 플라스미드를 제조하였다. pAAV2/9 플라스미드는 캡시드 유전자에 측접한 AAV2 5' 및 3' ITR을 함유하고, Penn Vector Core[펜실베이니아 대학교, 미국 펜실베이니아 필라델피아 소재, pennvectorcore.med.upenn.edu]로부터 입수 가능하다.

[0210] **2. AAVhu68 벡터의 수율**

[0211] 293개 세포를 배양시키고, 10%의 우태아 혈청이 보충된 4.5g/L 글루코스, L-글루타민 및 피루브산나트륨을 함유하는 DMEM, 1×(이글스 배지의 둘베코 변형) 중에서 5% CO₂를 갖는 분위기 하에서 37℃에서 유지시켰다. 벡터 플라스미드를 pAAV2/hu68 또는 pAAV2/9로 대체하여, 문헌[Gao et al [Gao, Guang-Ping, et al. "Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy." Proceedings of the National Academy of Sciences 99.18 (2002): 11854-11859]]에 기술된 바와 같이 형질주입 기술을 수행하였다. 사용된 트랜스젠 카세트는 CB7.CI.ffLuciferase.RBG였다. 형질주입된 세포를 6웰 플레이트에서 추가로 배양하였다. 세포의 총 용해물뿐만 아니라 상청액을 문헌[Gao et al [Gao, Guangping, et al. "Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance in vivo." Human gene therapy 11.15 (2000): 2079-2091]]에 기술된 바와 같이 트랜스젠 카세트의 토끼 베타-글로빈 폴리A 영역을 표적으로 하는 프라이머 및 프로브를 사용함으로써 TaqMan(어플라이드 바이오시스템즈사(Applied Biosystems)) 분석을 통한 바이러스 정량을 위해서 수집하였다. 6개의 pAAV2/9 플라스미드 및 6개의 pAAV2/hu.68 플라스미드의 수율을, 상청액 역가 및 총 용해물 역가 둘 모두와 관련하여, 6웰 플레이트에서 헤드-투-헤드로 비교하였다. 각각의 플라스미드는 개별 박테리아 집락으로부터 유래되었다.

[0212] AAVhu68의 수율은 총 용해물과 관련하여 AAV9의 것과 유사한 것을 발견하였다. 그러나, 상청액에서, AAVhu68의 수율은 AAV9의 것보다 상당히 더 높았다. 따라서, AAVhu68은 생산과 관련하여 AAV9에 비해서 더 양호한 벡터로서 입증되었는데, 그 이유는 상청액이 대규모 바이러스 생산에 바람직하기 때문이다.

[0213] **3. AAVhu68.LacZ의 생체내 형질도입**

[0214] 트랜스젠으로서 핵-국지화 박테리아 β-갈락토시다제(nLacZ)를 암호화하는 서열을 삽입하고, 이어서 상기에 기술된 바와 같이 생산함으로써 AAVhu68.CB7.nLacZ(AAVhu68.LacZ라고도 지칭됨)를 생성하였다. 생체내에서 AAVhu68의 패키징 효율, 수율, 형질도입 특성, 형질도입 효율 및 굴성(tropism)을 평가하기 위해서, 마우스에게 5×10¹¹ 개놈 카피의 AAVhu68.LacZ 벡터를 다양한 투여 방법, 예컨대, 정맥내, 근육내 및 비강내 투여를 통해서 주사하였다. 벡터 투여 2주 후에 마우스를 희생시킨 후 근육, 폐, 간 및 심장을 수집하였다. 각각의 기관의 동결된 박편을 제조하고, 가공하고, LacZ 유전자 발현을 검출하는 종래의 프로토콜로서 분석하였다[Bell, Peter, et al. "An optimized protocol for detection of E. coli β-galactosidase in lung tissue following gene transfer." Histochemistry and cell biology 124.1 (2005): 77-85.]. 이러한 결과는, AAVhu68이 높은 형질도

입 효율 및 광범위한 조직/기관 굴성을 나타내었다는 것을 보여주었다.

[0215] **4. AAV9.GFP와 비교한 AAVhu68.GFP의 생체내 형질도입**

[0216] 트랜스젠으로서 녹색 형광 단백질(GFP)을 암호화하는 유전자를 삽입하고, 상기에 기술된 바와 같이 생산함으로써 AAVhu68.GFP 및 AAV9.GFP를 생성하였다. 생체내에서 AAVhu68 및 AAV9의 패키징 효율, 수율, 형질도입 특성, 형질도입 효율 및 굴성을 평가하기 위해서, 마우스에 AAVhu68.GFP 또는 AAV9.GFP를 1×10^{10} GC 또는 1×10^{11} GC의 용량으로 투여하였다. 백터의 뇌혈관내 투여를 갖는 마우스의 다양한 뇌 영역(해마, 운동 피질 및 소뇌)으로부터의 박편을 조사하였다. 1×10^{10} GC의 AAV9.GFP가 주사된 마우스로부터의 것을 제외한 모든 시험된 해마 샘플에서 AAV 백터의 형질도입이 관찰되었다. AAV9의 것과 비교할 때 AAVhu68.GFP의 더 양호한 형질도입이 운동 피질에서 관찰되었다. 추가로, 1×10^{11} GC의 백터가 주사된 마우스의 경우에만 AAVhu68.GFP의 소뇌에서 형질도입이 관찰되었다. 이들 마우스에서, AAVhu68은 AAV9에 비해서 뇌에서 더 광범위한 굴성뿐만 아니라 더 높은 형질도입 효율을 나타내었다.

[0217] 추가 실험에서, AAVhu68.GFP가 정맥내로 투여된 마우스로부터의 다양한 기관, 예컨대, 간, 신장, 심장 및 췌장을 준비하고, 문헌[Wang et al [Wang L, Calcedo R, Bell P, Lin J, Grant RL, Siegel DL, Wilson JM, Hum Gene Ther. 2011 Nov; 22(11):1389-401; Wang L, Calcedo R, Wang H, Bell P, Grant R, Vandenberghe LH, Sanmiguel J, Morizono H, Batshaw ML, Wilson JM, Mol Ther. 2010 Jan; 18(1):126-34]]에 기술된 바와 같이 가공하였다. 강한 양성 신호가 간에서 관찰되었고, 신장, 심장 및 췌장이 마찬가지로 백터의 형질도입을 나타내었는데, 이는 AAVhu68 백터의 넓은 조직/기관 굴성을 나타낸다.

[0218] **실시예 3 - hSMN을 함유하는 AAV 백터**

[0219] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG는 외부 성분 및 내부 DNA 계놈으로 이루어진다. 외부 백터 성분은 혈청형 hu68, $T = 1$ 대략 1:1:8 내지 10의 비의 3종의 AAV 바이러스 단백질, VP1, VP2, 및 VP3의 60개 카피로 이루어진 20면체 캡시드이다. 캡시드는 2개의 AAV 반전 말단 반복부(ITR)에 의해서 축적된 인간 운동 뉴런의 생존 1(hSMN1) 트랜스젠으로 이루어진 단일 가닥 DNA 계놈을 함유한다. 인핸서, 프로모터, 인트론, hSMN1 암호 서열 및 폴리아데닐화(폴리A) 신호는 인간 SMN1 트랜스젠을 포함한다. ITR은 백터 생산 동안 계놈의 복제 및 패키징에 책임이 있는 유전 요소이고, rAAV를 생성하는 데 필요한 유일한 바이러스 시스 요소이다. hSMN1 암호 서열의 발현은 거대세포바이러스(CMV) 극 초기 인핸서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 간의 혼성체인, CB7 프로모터에 의해서 지시된다. 이러한 프로모터로부터의 전사는 닭 베타 액틴 인트론(CI)의 존재에 의해서 향상된다. 토끼 베타 글로빈 폴리A 신호는 인간 hSMN1 mRNA 전사체의 종결을 매개하기 위해서 포함된다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 백터 계놈의 개략도를 도 1a에 나타낸다.

[0220] 서열 요소의 설명:

[0221] 1. 반전 말단 반복부(ITR): AAV ITR(젠뱅크 # NC001401)은 두 단부 모두에 대해서 동일하지만, 반대 배향으로 존재하는 서열이다. AAV 및 아데노바이러스 헬퍼 기능부가 트랜스로 제공된 경우, AAV2 ITR 서열은 백터 DNA 복제점 및 백터 계놈의 패키징 신호 둘 모두로서 기능한다. 이와 같이, ITR 서열은 백터 계놈 복제 및 패키징에 필요한 유일한 시스 서열을 나타낸다.

[0222] 2. CMV 극 초기 인핸서(382bp, 젠뱅크 # K03104.1).

[0223] 3. 닭 β -액틴 프로모터(282bp; 젠뱅크 # X00182.1) 프로모터, 이것은 높은 수준의 인간 운동 뉴런의 생존 1(hSMN1) 발현을 유도하기 위해서 사용된다.

[0224] 4. 닭 β -액틴 인트론: 닭 β -액틴 유전자(젠뱅크 # X00182.1)로부터의 973bp 인트론이 백터 발현 카세트 내에 존재한다. 인트론은 전사되지만, 스플라이싱에 의해서 성숙 mRNA로부터 제거되고, 그것 중 어느 하나의 측면 상에서 서열을 함께 연결시킨다. 발현 카세트 내의 인트론의 존재는 mRNA의 핵으로부터 세포질로의 이송을 가능하게 하여, 번역을 위한 mRNA의 꾸준한 수준의 축적을 향상시킨다고 밝혀져 있다. 이것은 유전자 발현의 증가된 수준을 위해서 의도되는 유전자 백터에서의 일반적인 특징이다.

[0225] 5. 암호 서열: 인간 SMN1 서열(www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000344.3)을 코돈-최적화하고, 합성하였다 (UPenn). 척수근 위축증(SMA)은 텔로머 유전자 운동 뉴런의 생존 1(SMN1)에서의 돌연변이에 의해서 유발된다. SMN1에서의 돌연변이는 하부 운동 뉴런에 대한 선택적인 독성을 초래하는데, 이것은 점진적인 뉴런 손실 및 연관된 근육 약화 및 변성으로 이어진다. 본 발명자들이 사용한 트랜스젠은 SMN1, 아이소폼 D이다. 아이소폼 D는

가장 긴 아이소폼을 암호화하고, 이 변이체는 CNS 및 도처 둘 모두에서 SMN1에 의해서 생산된 우세한 전사체/아이소폼인 것으로 생각된다.

- [0226] 6. 폴리아데닐화 신호: 127bp 토끼 β -글로빈 폴리아데닐화 신호(젠뱅크 # V00882.1)를 항체 mRNA의 효율적인 폴리아데닐화를 위해서 시스 서열에 제공한다. 이러한 요소는 전사 종결, 초기 전사물의 3' 단부에서의 특이적 절단 사건 및 폴리아데닐 꼬리의 부가의 신호로서 기능한다.
- [0227] 문헌[Mizukami, Hiroaki, et al. A Protocol for AAV vector production and purification. Diss. Division of Genetic Therapeutics, Center for Molecular Medicine, 1998.]에 기술된 바와 같이 293개 세포에서 종래의 삼중 형질주입 기술을 사용하여 벡터를 제조하였다. 펜실베이니아 대학교에서의 Vector Core에 의해서 이미 기술된 바와 같이 모든 벡터를 생산하였다[Lock, M., et al, Hum Gene Ther, 21: 1259-1271 (2010)].
- [0228] 드랍플렛 디지털 중합효소 연쇄 반응(droplet digital Polymerase Chain Reaction: ddPCR)-기반 기술을 상기에 기술된 바와 같이(Lock, Martin, et al. "Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR." Human gene therapy methods 25.2 (2013): 115-125) AAV 벡터에 대한 게놈 카피(GC) 역가를 결정하기 위해서 수행하였다. 이 방법은 실용적이고, qPCR과 동등하거나 더 양호한 역가를 보고하고, 플라스미드 표준 곡선이 필요하지 않다. 사용된 검정은 DNase I로의 소화, 그 다음 캡슐화된 벡터 게놈 카피를 측정하기 위한 디지털 PCR 분석을 포함하였다. DNA 검출은 이러한 동일한 영역에 대한 형광 태깅된 프로브 혼성화와 조합하여 폴리A 영역을 표적화한 서열 특이적 프라이머를 사용하여 달성되었다.
- [0229] **실시예 4 - SMA의 모델에서의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN.RBG**
- [0230] 모든 동물 절차는 펜실베이니아 대학교의 실험 동물 운영 위원회(Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)에 의해서 승인된 프로토콜에 따라서 수행하였다. 모든 마우스를 펜실베이니아 대학교의 중개 연구 실험실(Translational Research Laboratories)의 동물 설비에서 유지시켰다.
- [0231] 마우스에서, 인간 SMN1(hSMN1)에 동등한 하나의 SMN 유전자가 존재한다. 이러한 유전자의 완전한 손실은 배아 치명적인 표현형을 유발한다(Monani UR, Sendtner M, Covert DD et al. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. Hum Mol Genet 2000;9:333-9; Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM et al. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. Proc Natl Acad Sci U S A 1997;94:9920-5. 웨타이드를 Acad Sci U S A 1997;94:9920-5.). 치료제를 평가하게 위한 SMA의 가장 일반적으로 사용되는 전임상 모델 중 하나는 SMN Δ 7 마우스 모델이다. SMN Δ 7 마우스 모델은 인간 SMN2(hSMN2)의 2개의 카피 및 엑손 7이 제거된 hSMN2(SMN Δ 7)의 2개의 카피를 갖는 FVB 배경 상에서 개발된 트랜스제닉 마우스이다. 야생형(WT) SMN Δ 7 마우스는 무린 SMN(mSMN)의 2개의 카피를 보유하고, 이형접합(HET) 마우스는 mSMN의 1개의 카피를 갖고, 녹아웃(KO) SMN Δ 7 마우스는 mSMN의 카피를 갖지 않는다. KO SMN Δ 7 마우스는 13 내지 15일의 평균 수명을 갖고, 척수에서 감소된 운동 뉴런 개수, 감소된 근섬유 크기, 감소된 체중, 손상된 직립 및 보행을 나타내고, 부분적인 및 비신경지배적 신경 근육 접합부의 수의 증가를 나타낸다. SMN Δ 7 마우스 모델의 주요 이점은 또한 치료 개입이 치료 감쇠에 영향을 갖는지를 빠르게 구별하기에 상당히 충분한 표현형을 나타내면서, 대략 5일의 평균 수명을 갖는 중증 SMA 모델과 비교할 때 증가된 치료창이다(문헌[TT, Pham LT, Butchbach ME et al. SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN. Hum Mol Genet 2005;14:845-57] 참고).
- [0232] 실시예 4에서, mSMN $^{-/-}$ hSMN2 $^{+/+}$ SMN Δ 7 $^{+/+}$ (KO SMN Δ 7, 하기 실시예에서 SMN Δ 7이라고도 언급됨) 마우스를 사용하였다. SMN에 대한 면역조직화학은 피질, 소뇌 및 척수에서, SMN Δ 7 새끼가 SMN1의 발현을 나타내지 않았다는 것을 입증하였다(도 2). 태어날 때 3×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG 벡터를 주사하고 23일 후, SMN Δ 7 새끼, 야생형 및 이형접합 한배새끼를 SMN의 발현 증가에 대해서 관찰하였다. 투여는 좌측뇌실 내로의 뇌혈관내 주사에 의해서 수행되었다.
- [0233] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 처리된 동물의 피질에서 코돈-최적화된 hSMN1 리보핵산(RNA)에 대한 현장 혼성화(ISH)에 의해서 시험된 벡터의 바이러스 형질도입을 추가로 평가하였다. 야생형 및 SMN Δ 7 동물을 대조군으로서 제공하였다. 도 2의 하단 패널에 나타난 결과는 시험 용량에서 높은 형질도입률을 입증한다.
- [0234] 면역조직화학을 통해서 운동 뉴런 형질도입의 백분율을 결정하기 위한 분석을 수행한다. 뇌 및 척수 둘 모두로

부터의 호모제네이트의 SMN 발현을 검출하기 위해서 웨스턴 블롯을 통한 추가 분석을 수행하였다.

[0235] **실시예 5 - AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG는 SMA의 설치류 모델에서 생존을 증가시킨다.**

[0236] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 뇌혈관내 주사의 효능을 신생아 $mSMN1^{-/-}$ $hSMN2^{+/+}$ $SMN\Delta 7^{+/+}$ (SMN $\Delta 7$), 이형접합 한 배새끼(HET) 및 야생형 C57BL/6J(WT) 새끼에서 평가하였다. 시험된 마우스에게 좌측뇌실 내로 3×10^{10} 또는 8.76×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG를 출생 24시간 이내에 인산염 완충 염수(PBS)와 함께 단일 뇌혈관 내(ICV) 주사로 제공하였다. PBS 주사된 새끼가 대조군으로서 제공되었다(도 3A). 마우스를 매일 모니터링하였다. 안락사 기준(이전 체중으로부터의 20% 체중 손실 또는 발가락 괴사)을 충족시키거나 젖떼기 전에 죽은 것으로 밝혀진 임의의 마우스를 유전자형결정하고, 젖떼기까지 살아있는 모든 마우스를 유전자형결정하였다.

[0237] 2개월 관찰 기간 동안, 야생형, PBS가 주사된 이형접합 새끼, 및 벡터가 주사된 이형접합 새끼의 생존율은 유사하였는데, 이는 벡터 또는 투여 경로와 관련된 독성이 없음을 나타낸다(도 3A). PBS 처리된 WT 동물 및 3×10^{10} GC 또는 약 9×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 처리된 WT 마우스 사이에서 정향 반사에서 어떠한 유의한 차이도 관찰되지 않았다(도 3A) PBS 단독이 주사된 SMN $\Delta 7$ 새끼(n=8)의 중위 생존은 15일이었다. 그러나, 저용량의 벡터(3×10^{10} GC/1.5g 새끼)로의 처리 시, 중위 생존은 37일로 상당히 증가하였다(n=7). 벡터의 용량이 8.76×10^{10} GC/새끼(n=10)로 증가되면, 중위 생존은 23일이었다(도 3B). 이러한 결과는, 출생 시 두 용량 모두에서의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 뇌혈관내 주사가, 최소 독성이 검출되면서, SMN $\Delta 7$ 새끼의 생존을 성공적으로 개선시켰다는 것을 나타내었다.

[0238] **실시예 6 - AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG는 SMA의 설치류 모델에서 성장을 촉진시킨다**

[0239] 생후일(PND) 3일에 시작하여, 안락사 기준이 충족되거나 또는 죽은 것으로 발견될 때까지 마우스를 2일마다 칭량하고, 결과를 도 4a에 플롯팅하였다. 모든 시간 지점에 걸친 변수의 전체 변화를 모든 2개의 군 사이에서 비교하였다.

[0240] PBS 또는 저용량 및 고용량 둘 모두에서 벡터로 처리된 야생형 및 이형접합 새끼는 유사한 성장 곡선을 나타내었는데, 이는 벡터 또는 투여 경로에 관련된 독성이 없음을 나타내었다. PBS로 처리된 SMN $\Delta 7$ 새끼는 점진적인 체중 손실 및 15일의 중위 생존을 나타내었다. 그러나, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 벡터가 주사되는 경우, 새끼의 체중은 태어난 이후에 서서히 그러나 꾸준히 증가되었다. 생후일 15일(P15)에, 모든 3개의 군으로부터의 야생형 새끼는 체중이 대등하였지만, 벡터 처리된 SMN $\Delta 7$ 새끼는 PBS 단독 군과 비교할 때 상당히 더 무거웠다(도 4B). 생후일 30일(P30)에, SMN $\Delta 7$ 새끼 및 야생형/이형접합 한배새끼 둘 모두는 고용량 벡터 처리와 고용량 벡터 처리 사이에서 체중 차이를 나타내지 않았다(도 4C).

[0241] "nlme" 패키지의 함수 "lme"를 사용하여 R 프로그램(버전 3.3.1; cran.r-project.org) 내의 선형 혼합 효과 모델을 사용하여 추가 비교를 수행하였다. 성별은 분석에서 공변량으로서 포함되었다. 선형 혼합 효과 모델은 각각의 대상체 내에서 상이한 시간 지점에 걸친 관찰의 의존성을 고려하고, 시간-과정 데이터의 분석을 위한 바람직한 방법이다. PBS 처리된 WT 동물 및 3×10^{10} GC 또는 약 9×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 처리된 WT 마우스 사이에서 체중에서 어떠한 유의한 차이도 관찰되지 않았는데(도 4D 및 도 4E), 이는 벡터 또는 투여 경로 관련된 독성이 없음을 나타낸다. 건강한 한배새끼에 비해서, SMN $\Delta 7$ 새끼는 체중의 더 느린 성장률을 나타내었지만(도 4F), SMN $\Delta 7$ 새끼에서 3×10^{10} GC/새끼 또는 8.76×10^{10} GC/새끼의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로의 처리는 체중의 이득을 상당히 증가시켰다(도 4I 및 도 4J).

[0242] 이러한 결과는, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG가 SMN $\Delta 7$ 새끼의 성장을 개선시켰음을 시사하고, 이는 체중의 증가에 의해서 나타난다.

[0243] **실시예 7 - 기능성 평가는 SMA의 설치류 모델에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 긍정적인 효과를 나타낸다.**

[0244] 2가지의 기능성 평가, 뒷다리 부유 시험 및 정향 반사 시험을 수행하여 본 명세서에 기술된 벡터의 처리 시 SMA의 발달 및 진행을 평가하였다.

[0245] SMA의 신생아 마우스 모델에서 근위 뒷다리 근육 강도 및 피로를 평가하기 위해서, 뒷다리 부유 시험에 대한 프로토콜을 신생아에 대한 거동 표현형으로부터 개작 및 최적화였다: 뒷다리 부유 시험(튜브 시험(Tube Test)이라고도 공지됨), TREAT-NMD로부터의 SOP#SMA_M.2.2.001(E1-Khodor et al.). 뒷다리 부유(HLS) 점수 및 떨어지는

데 걸리는 시간(Time Spent Hanging: TSH)을 뒷다리 근육 강도 및 피로를 측정하기 위한 파라미터로서 포함시켰다. 출생 후 2일마다 2회의 연속적인 시험으로 시험을 수행하였다. 각각의 시험을 최대 60초 지속하였다. HLS 및 TSH 둘 모두를 동일한 시험에서 측정하였다. 최초 15초를 사용하여 HLS 점수를 결정하였다. TSH의 경우, 동물이 떨어질 때까지 또는 시간이 60초에 도달할 때까지 어느 것이 먼저이든 시간 계수를 계속하였다. 또한, 영양 경쟁으로 인한 편향을 회피하기 위해서 10마리 초과 동물 한배새끼는 본 실험으로부터 제외시켰다. 5마리 이하의 새끼 한배새끼는 본 실험으로부터 제외시켰는데, 그 이유는 증가된 모성 보호가 더 온화한 표현형을 유발할 수 있어서, 본 실험의 편향으로 이어졌기 때문이었다.

[0246] PBS 또는 벡터로 처리된 야생형 또는 이형접합 새끼에서 관찰된 성장에 대한 증가하는 HLS 점수 대신에, PBS로 주사된 SMN Δ 7 새끼는 HLS 점수 감소를 나타내었는데, 이는 뒷다리 근육 강도의 약화를 나타내었다(도 5B). 그러나, 3×10^{10} GC/새끼의 용량에서의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 단일 주사를 사용하면, HLS 점수는 SMN Δ 7 새끼의 발달 동안 안정적으로 유지되었다. 추가로, 용량이 8.76×10^{10} GC/새끼로 증가되면, 시간에 따라서 HLS 점수의 약간의 증가가 관찰되었다. 이러한 결과는, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 벡터가 SMN Δ 7 새끼의 기능성 발달을 개선시켰음을 나타내었다.

[0247] 떨어지는 데 걸리는 시간(TSH)을 상기에 기술된 바와 같이 기록하였고, 떨어질 때의 지연에 대한 지시자로서 제공하였는데, SMN Δ 7 새끼와 이의 건강한 한배새끼 사이에서 어떠한 차이도 관찰되지 않았다. 이러한 결과는, TSH가 SMN Δ 7 모델에서 손상된 근육 기능을 설명하는 데 실패하였다는 것을 나타내었고, 따라서 추가 평가로부터 제외되었다.

[0248] SMA의 신생아 마우스 모델에서 운동성(locomotor) 능력을 시험하고, 근육 강도를 평가하기 위해서, 정향 반사 시험의 프로토콜을 신생아의 거동 표현형: 정향 반사, TREAT-NMD로부터의 SOP#MD_M.2.2.002(Didonato et al.)로부터 개작 및 최적화하였다. 그것은, 정상적인 곧게 선 자세를 취할 때 신체의 자세를 수정하는 마우스의 능력을 측정함으로써 근육 약화 및/또는 일반적인 약한 건강에 의해서 영향을 받을 수 있는 일반적인 신체 강도를 조사하였다. 개별 동물을 홈 케이지에서 꺼내고, 모든 4개의 발이 위로 향하도록 반듯이 누운 자세로 놓았다. 반전된 자세에서 동물을 안정화시키기 위해서 손가락을 가슴 위에 놓았다. 이어서 손가락을 제거하고, 타이머를 시작하였다. 동물이 배를 뒤집고, 4개의 발바닥 모두가 그것이 서있는 표면에 평평해지면 타이머를 중단하였다. 각각의 시험 후에 동물을 그의 홈 케이지에 다시 넣었고, 5분 동안 휴식하게 하였다.

[0249] SMN Δ 7 새끼를 생후일 7일에서 생후일 17까지 2일마다 시험하였다. 각각의 시험은 최대 60초였다. 동물이 이 시간 기간 이내에 본래 자세로 되돌아가는 데 걸린 시간을 사용하여 근육 강도를 정량하였다. 동물이 주어진 시간 이내에 똑바로 될 수 없으면, 시험을 중단하고, 똑바로 된 시간을 60초로서 기록하였다.

[0250] 또한, 영양 경쟁으로 인한 편향을 회피하기 위해서 10마리 초과 동물 한배새끼는 본 실험으로부터 제외시켰다. 5마리 이하의 새끼 한배새끼는 본 실험으로부터 제외시켰는데, 그 이유는 증가된 모성 보호가 더 온화한 표현형을 유발할 수 있어서, 본 실험의 편향으로 이어졌기 때문이었다. 같은 날에 정향 반사 시험이 뒷다리 부유 시험과 함께 사용된 경우, 동물의 근육 피로를 예방하기 위해서 이것이 항상 먼저 수행되었다.

[0251] 추가 분석을 수행하여 군 간의 상세한 비교를 제공하였고, 성별에 의해서 유발되는 변동을 감소시켰다. 모든 시간 지점에 걸친 변수의 전체 변화를 모든 2개의 군 사이에서 비교하였다. "nlme" 패키지의 함수 "lme"를 사용하여 R 프로그램(버전 3.3.1; cran.r-project.org) 내의 선형 혼합 효과 모델링을 사용하여 비교를 수행하였다. 성별은 분석에서 공변량으로서 포함되었다. 동물이 곧게 선 자세로 복귀하는 데 걸린 기록된 시간을 성별에 의해서 정규화하고, 데이터를 도 6d 내지 도 6j에 플롯팅한다. PBS 처리된 WT 동물 및 3×10^{10} GC 또는 약 9×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 처리된 WT 마우스 사이에서 정향 반사에서 어떠한 유의한 차이도 관찰되지 않았다(도 6d 및 도 6e).

[0252] 결과는, 야생형 또는 이형접합 새끼는 곧게 선 자세로 복귀하는 데 제한된 시간이 걸렸고, 이러한 시간 기간은 성장 시에 감소되었다는 것을 입증하였지만, SMN Δ 7 새끼는 주어진 시간 동안 이의 자세를 고칠 수 없었다(도 6). 출생 시 3×10^{10} GC/새끼 또는 8.76×10^{10} GC/새끼에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 주사를 사용하여, 자세를 고치는 데 소모되는 시간이 SMN Δ 7 새끼에서 상당히 감소되었고, 생후일 17일에 야생형 및 이형접합 새끼가 나타난 정상 수준으로 복귀되었는데, 이는 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG가 SMA의 설치류 모델에서 기능성 발달을 성공적으로 개선시켰음을 나타낸다.

[0253] 흥미롭게도, KO에서, 중위 생존 및 중량 이득은 용량 의존적인 방식으로 개선되지 않았지만, 정향 반사는 용량

의존적인 방식으로 개선되었다. 이러한 데이터를 기반으로, 3×10^{10} GC 및 약 9×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG는 SMN Δ 7 KO에서 최소 유효 용량(MED)을 초과한다고 결론지어졌다.

[0254] 결론적으로, 신생아 SMN Δ 7 마우스에서 척추강내(두개내) 투여되는 경우 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG 벡터의 단일 뇌혈관내 주사는 상당한 운동 뉴런 형질도입 및 수반된 기능성 수정을 초래하였다.

[0255] **실시예 8 - 조직학적 분석은 SMA의 설치류 모델에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 긍정적인 효과를 나타낸다**

[0256] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 주사로 인한 SMA 모델에서의 근섬유의 조직학적 및 형태학적 손상 및 회수를 평가하기 위해서 추가 연구를 수행하였다. 전경골근, 사두근, 가로막, 늑간근, 두최장근(longissimus capitis) 및 허에서의 근섬유를 헤마톡실린 및 에오신 염색 및 α -디스트로핀에 대한 면역조직화학적 염색을 통해서 드러내었다. 단면적(CSA), 섬유 직경 및 중심핵 섬유(centronucleated fiber: CNF)를 파라미터로서 사용하였다. CSA 결정을 위해서, 원형 또는 다각형 섬유 만을 고려하였다.

[0257] **실시예 9 - 야생형 및 SMN Δ 7 마우스에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 용량-범위 및 형질도입 효율**

[0258] SMN Δ 7 마우스에서 최대 용량의 잠재적인 독성, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 용량 의존적인 발현을 결정하기 위해서 그리고 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 최소 유효 용량(MED)을 결정하기 위해서, HET/HET 교배로부터 생성된 전체 한배새끼에게 좌측뇌실(뇌혈관내)(ICV) 내에 출생 24시간 이내에 마우스당 인산염 완충 염수(PBS), 1×10^9 GC, 3×10^9 GC, 1×10^{10} GC, 3×10^{10} GC, 또는 7×10^{10} GC의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG를 주사하였다. 연구 전체에 걸쳐서 매일 마우스를 모니터링하였다. 안락사 기준(이전 체중으로부터의 15% 체중 손실 또는 간호 무능력)을 충족한 임의의 마우스를 안락사시켰다. 연구일 13일 이전에 죽은 것으로 발견되거나 또는 안락사시킨 어떤 마우스도 부검하지 않았다.

[0259] 연구일 3, 5, 7, 9, 11 및 13일에, 마우스를 칭량하였다. 연구일 3일에, 마우스에게 문신하였고, 유전자형결정 하였다. 연구일 7 및 13일에, 마우스에게 3라운드 정향 반사 시험을 수행하였다. 연구일 9일에, 한배새끼를 도태시켜 균일한 한배새끼 크기를 유지하였다. 한배새끼 크기가 4마리의 동물에 대해서 동등하도록 한배새끼를 도태시켜 모든 KO 및 상응하는 수의 HET 및 WT에 포함시켰다. 직립 시간연구일 13일에, 동물을 안락사시켰고, 운동 뉴런 형질도입 및 근섬유 크기의 분석을 위해서 부검하였다.

[0260] 모든 용량의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG는 HET/WT 및 KO SMN Δ 7 마우스 둘 모두에서 양호하게 용인되었다. 도 9A 및 도 9B에서의 데이터는 용량당 단지 2마리 한배새끼를 나타내어, 1×10^9 GC로 처리된 HET/WT 동물에서의 상당히 감소된 체중은 어미 및 한배새끼 크기에서의 가변성으로 인한 것이라고 생각되었다(도 9B). 또한, 1×10^9 GC 군에 포함된 단일 KO를 연구일 9일에 15%를 초과하는 체중 손실로 인해서 안락사시켰다. 더 높은 용량의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG는 HET/WT 동물에서 중량 이득을 변경하지 않았고, PBS 처리된 KO 대조군에 비해서 KO 동물에서 중량 이득을 개선시켰다(도 9A 및 도 9B). 이러한 데이터를 기반으로, 1×10^{10} GC는 SMN Δ 7 마우스에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 MED를 나타낸다고 결론지어졌다.

[0261] 정향 반사의 경우, 연구일 7일에, 다양한 용량군에서 HET/WT 동물 사이에서 인지 가능한 변동이 존재하였다(도 10A). 그러나, 연구일 13일까지, 모든 용량군에서의 HET/WT 동물은 약 1초의 평균 직립 시간(righting time)을 가졌다(도 10A). 연구일 7일에서의 이러한 변동은 어미 및 한배새끼 크기에서의 변동성으로 인한 것으로 생각되었다. 중량 모니터링 데이터와 유사하게, 1×10^{10} GC 및 그 초과 용량에서, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 처리된 KO는 PBS 처리된 KO 대조군에 비해서 연구일 13일에 직립 시간에서 상당한 개선을 나타내었다(도 10B).

[0262] 따라서, 중량 모니터링 및 정향 반사의 생존 측정치를 기준으로, SMN Δ 7 마우스에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 현재 MED는 1×10^{10} GC인 것으로 결론지어졌다.

[0263] 운동 뉴런 형질도입 및 근섬유 크기의 조직학적 측정을 평가하였다. 추가의 한배새끼를 실시예 9에서 상기에 기술된 실험에 참여시킨다.

[0264] 또한, 참여된 한배새끼에서, 임의의 용량의 벡터와 관련된 급성 독성의 어떠한 징후도 관찰되지 않았고, 13일의 연구 기간에 걸쳐서, 벡터 관련된 독성의 어떠한 징후도 존재하지 않았다.

[0265] ICV 투여 이후에 성체 마우스에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 잠재적인 독성 및 내약성을 추가로 평가하기 위해서, 성체 C57BL/6J 수컷 및 암컷에게 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG를 척추강내로 주사하였다. 본 연구에서

사용된 총 용량은 상기에 기술된 신생아 실험에서 사용된 것과 동등하였지만, 용량/그램 뇌 질량은, 신생아 마우스의 경우 0.2g의 예측된 뇌 질량과 비교할 때, 성체의 경우 0.4g의 예측된 뇌 질량으로 인해서, 2배 상이하였다. 모든 용량이 연구일 14일 시간-지점에 대해서 포함되지만, 비히클 단독 및 7×10^{10} GC는 연구일 28일 시간-지점에 대해서 반복되었다.

[0266] 적합한 경우 체중을 연구일 0, 7, 14, 21 및 28일에 모니터링하였다. 임상 화학을 부검 시에 수집된 혈청 상에서 수행하였다(적합한 경우 연구일 14 또는 연구일 28일). 뇌, 척수, 심장, 폐, 간, 비장, 신장, 좌골 신경, 및 사두근 대퇴골을 현미경적 조직병리학적 평가를 위해서 수집하였다. 모든 파라미터를 비히클 처리된 동물과 비교하였다.

[0267] 연구일 14일 전체에서, 임의의 군에서 질병 또는 사망이 존재하지 않았다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 모든 용량은 성별-매칭된 비히클 처리된 대조군과 비교할 때 중량 범위에 영향이 없었다(도 14A 및 도 14B).

[0268] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1.RBG의 주사로 인한 실시예 9에서 상기에 기술된 모델에서의 조직학적 및 형태학적 근섬유의 손상 및 회수를 평가하기 위해서 추가 연구를 수행하였다. 전경골근, 사두근, 가로막, 늑간근, 두최장근(longissimus capitis) 및 혀에서의 근섬유를 헤마톡실린 및 에오신 염색 및 α -디스트로핀에 대한 면역조직화학적 염색을 통해서 드러내었다. 단면적(CSA), 섬유 직경 및 중심핵 섬유(centronucleated fiber: CNF)를 파라미터로서 사용하였다. CSA 결정을 위해서, 원형 또는 다각형 섬유 만을 고려하였다.

[0269] **실시예 10 - 레서스 마카크에서 hSMN1을 함유하는 AAV 벡터**

[0270] 본 연구의 목적은 어느 경로가 가장 강력한 척수 운동 뉴런 형질도입을 초래하는지를 결정하기 위해서 그리고 레서스 마카크에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 약동학 프로파일 및 안정성을 평가하기 위해서 레서스 마카크에서 상이한 척추강내 투여 경로를 평가하는 것이었다. 레서스 마카크를 본 연구에서 사용하였는데, 그 이유는 그의 크기 및 중추 신경계 해부학이 마우스보다 인간에 훨씬 더 양호하게 근접하기 때문이다.

[0271] 형광투시 유도 조영제를 사용하여 대조(대조내)(ICM) 또는 요수조(요추 천자)(LP)에서 L4와 L5 사이의 추간 공간 내로의 니들 배치를 확인하였다. 군은 1.0ml ICM(n=3), 2.5ml LP(n=4), 및 5.0ml LP(n=4)였다. 각각의 군은 검출 가능하지 않은 것부터 1:20 초과까지의 AAV9에 대한 다양한 중화 항체(NAb) 역가를 갖는 동물을 함유하였다. 모든 군에게 3.3×10^{11} GC/g 뇌(총 3×10^{13} GC)의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG를 제공하였다. 본 연구에 포함된 비히클 대조군은 존재하지 않았다.

[0272] 동물을 연구 동안 전용 인원에 의해서 비정상적인 거동 및 고통의 징후에 대해서 매일 관찰하였다. 임상 병리학을 기준선에서, AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 투여일(연구일 0일), 연구일 3일, 연구일 7일, 및 그 후 연구 완결 시까지 주단위로 수행하였다. CSF 화학 및 세포학을 연구일 0일, 연구일 7일, 및 그 후 연구 완결 시까지 주단위로 수행하였다. 연구일 28에 동물을 안락사시켰고, 척수에서의 운동 뉴런 형질도입의 조직학적 평가, 생체 내 분포, 및 예비 조직병리학적 평가를 위해서 부검하였다.

[0273] 본 연구의 기간 전체에서 어떠한 동물도 비정상적인 징후 또는 고통의 징후를 나타내지 않았다. 1마리의 동물(RA1871)은 연구일 0일 내지 연구일 21일 사이에 ALT 수준이 55U/L로부터 약 80U/L까지 증가되었지만, 이것은 어떠한 임상적 징후와도 관련되지 않았다(도 11B). 어떠한 다른 동물도 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 투여 이후에 ALT(도 11B), AST(도 11A), 림프구(도 11C), 또는 단핵구(도 11D)의 증가 경향을 나타내지 않았다.

[0274] 본 연구 전체에서 어떠한 동물에서도 변경된 CSF 단백질 또는 글루코스의 어떠한 경향도 보이지 않았다(도 11E 내지 도 11H). 연구일 28일에, 1마리의 동물(RA1327)은 CSF에서 17 백혈구/ μ l를 가졌다(도 11E). 육안 검사에서, CSF는 혈액 오염을 갖는 것으로 보이지 않았지만, 250 적혈구/ μ l를 함유하였다. 이것이 실제 플레토사이토시스인지 또는 깨끗하지 않은 CSF 탭인지는 불명확하다. 이전 척추강내 연구로부터의 CSF 세포학은 수 주의 기간에 걸쳐서 한 자리 수에서 두 자리 수로의 CSF 백혈구 계수치의 점진적인 증가를 나타내었는데(데이터 나타내지 않음), 이는 (연구일 21일에 0 백혈구/ μ l로부터) 연구일 28일에 17 백혈구/ μ l의 이러한 단일 발생이 실제 플레토사이토시스와 상반되는 바와 같이, 깨끗하지 않은 CSF 탭으로 인한 것일 수 있다는 결론으로 이어졌다.

[0275] 부검 시에, 각각의 척수를 경추, 흉추 및 요추 박편으로 나누었다. 그 다음 각각의 척수 수준을 4 조각으로 나누었다. 1개의 조각은 생체내 분포를 위해서 스냅 동결시켰고, 1개의 조각은 조직병리학적 평가를 위해서 폼알린에 넣었고, 나머지 2개의 조각은 운동 뉴런 형질도입의 평가를 위해서 폼알린에 넣었다.

- [0276] 운동 뉴런 형질도입을 코돈-최적화된 hSMN1 리보핵산(RNA)의 경우 ISH(3개의 슬라이드/척수 수준 조각/동물은 6개의 슬라이드/척수 수준/동물과 동일함)에 의해서, 그리고 hSMN1 단백질의 경우 IHC (2개의 슬라이드/척수 수준 조각/동물은 4개의 슬라이드/척수 수준/동물과 동일함)에 의해서 측정하였다. 운동 뉴런을 니슬(Nissl) 염색으로 표지하여 형질도입된 운동 뉴런의 백분율을 결정하였다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 ICM 투여는 모든 척수 수준에서 ISH 및 IHC 둘 모두에 의해서 측정된 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 LP 투여보다 상당히 더 높은 운동 뉴런 형질도입을 초래하였다(도 12A 및 도 12B). 각각의 군 내에서 ISH와 IHC 간에 형질도입 효율은 일치하였지만, 형질도입된 운동 뉴런의 백분율은 IHC에 의해서 측정되는 경우 더 높았다(도 12A 및 도 12B). 항체와 레서스 SMN 단백질의 교차 반응성이 발생할 수 있지만, ISH를 위해서 사용된 RNA 프로브는 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로부터 생산된 코돈-최적화된 hSMN1 RNA에 특이적이었는데, 이것은 레서스 SMN RNA와의 교차 반응성의 가능성을 제거하였다. 공개된 데이터와 일치하게, 형질도입된 운동 뉴런의 백분율은 모든 군에서 하부(caudal)에서 상부(rostral)(경추에서 요추) 패턴으로 증가하였다(Hinderer C, Bell P, Vite CH et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Molecular therapy Methods & clinical development 2014;1:14051)(도 12A 및 도 12B).
- [0277] CSF 접근을 위한 다양한 경로를 사용하여 척추강내 AAV 전달을 수행할 수 있다. 요추 천자는 CSF 접근을 위한 가장 일반적인 방법이며, 따라서 비인간 영장류에서 AAV 투여를 위한 경로로서 평가되었다. 놀랍게도, 요추 천자를 통한 CSF 내로의 AAV9 벡터의 전달은, 대조의 수준에서 보다 우수하게 벡터의 주사와 비교할 때 뇌 및 척수의 세포를 형질도입하는 데 있어서 적어도 10배 더 효율적인 것을 발견하였다[Hinderer C, et al. (2014) Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Mol Ther Methods Clin Dev 1:14051]. 이러한 발견은 AAVhu68-SMN1 벡터를 사용한 NHP 연구에서 확인되었다. 대조 내로 후두하 천자를 통해서 임상 후보물질 벡터가 주사된 성체 레서스 마카크(n=3)는 트랜스젠 mRNA의 경우 현장 혼성화(ISH)에 의해서, 그리고 인간 SMN 단백질의 경우 면역조직화학적 염색(IHC)에 의해서 나타난 바와 같이 척수의 모든 수준에서 운동 뉴런 형질도입을 나타내었다. 이에 반해서, 요추 천자를 통해서 벡터 주사가 제공된 동물은, 상부 분포를 촉진시키기 위해서 주사 부피가 5ml - 동물의 CSF 부피의 대략 40% -까지 증가되었을 때조차도, 척수의 모든 수준에서 상당히 더 낮은 형질도입을 나타내었다. 본 연구는, 대조의 수준에서 벡터의 전달 필요성을 설명하며, 이는 임상적 투여 경로로서 후두하 천자의 선택을 뒷받침하였다.
- [0278] 생체내 분포를 연구로부터의 선택된 조직 상에서 수행하여 척추강내 투여 경로 이후에 형질도입을 결정하였다. 이전 연구에서 벡터의 ICM 및 LP 투여 이후에 뇌 및 척수 형질도입에서의 상당한 차이는 LP에 대해서 사용된 낮은 부피로 인한 것일 수 있다(Hinderer C, Bell P, Vite CH et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Molecular therapy Methods & clinical development 2014;1:14051). 본 연구에서, 뇌 및 척수의 형질도입은 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 ICM 및 LP 투여 이후에 동등하였다(도 13).
- [0279] 놀랍게도, NAb는 말초 기관의 형질도입에 영향을 갖는 것으로 보였다. 각각의 군에서, 1:20 초과 NAb를 갖는 동물은 심장, 간 및 비장에서 가장 낮은 형질도입을 가졌다(도 13).
- [0280] 예비 조직병리학적 평가를 뇌, 척수, 후근 신경절(DRG), 좌골 신경 및 간에서 수행하였다. 뇌에서, 일차 소견은 미세 내지 경증의 단핵구 세포 침윤 및 신경아교증이였다. 이러한 소견은 모든 군에서 동등하게 분포하였다. 척수에서, 소견은 ICM 군에 주로 존재하였는데, 요추 척수에서 소견의 빈도가 증가하였다. 가장 일반적인 소견은 등쪽 섬유단(dorsal funiculi)에서의 미세 내지 경증의 축삭 변성 및 미세 내지 경증의 단핵구 세포 및 조직구 침윤이었다. 경추, 흉추, 및 요추 DRG에서, 일차 소견은 미세 내지 경증의 단핵구 세포 침윤, 미세 내지 경증 뉴런 공포형성, 및 미세 내지 중등도의 축삭 변성이었다. 이러한 소견은 두 LP 군과 비교할 때 ICM 군에서 보다 더 우세하게 존재하였다. 좌골 신경에서, 경증 내지 중등도의 축삭 변성 및 미세 대식세포 침윤이 존재하였다. 이러한 소견은 주로 ICM 군에서 존재하였다. 간에서, 모든 군에서 미세 내지 경증의 단핵구 세포 침윤 및 미세 마이크로-육아종이 존재하였다.
- [0281] 또한, 부신, 상행대동맥, 골수, 뇌, 맹장, 부고환 경추(cervix epididimides), 식도, 눈, 쓸개, 심장, 신장, 대장, 폐, 눈물샘, 림프절, 근육, 난소, 췌장, 전립선, 직장, 타액선, 정낭, 피부, 소장, 척수, 비장, 위, 고환, 방광, 자궁, 뇌하수체, 흉선, 갑상선, 기관, 질, 및 중대한 병변(존재할 경우)을 조직병리학적 분석을 위해서 수집하였다. 조직을 헤마톡실린 및 에오신(H&E) 및/또는 다른 면역조직화학적 염색으로 염색하여 조직학적

특징부를 식별/명확하게 한다.

[0282] **실시예 11 - 레서스 마카크에서 hSMN1을 함유하는 AAV 벡터의 독성 및 생체내 분포 연구**

[0283] 180일 GLP 연구를 레서스 마카크에서 수행하여 ICM 투여 이후 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 약리학 및 독성학을 조사하였다. 레서스 마카크에게 3종의 용량 중 하나, 1.85×10^{10} GC/g 뇌, 5.56×10^{10} GC/g 뇌, 또는 1.85×10^{11} GC/g 뇌(n=3/군/시간 지점 - 두 성별 모두) 또는 비히클(엘리엇 제형 완충액, EFB)(n=1/군/시간 지점 - 두 성별 중 하나)을 제공하였다. 기준선 임상 병리학(차등이 있는 세포 계수치, 임상 화학, 및 응고 패널), CSF 화학, 및 CSF 세포학을 수행한다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 또는 비히클 투여 후에, 동물을 고통의 징후 및 비정상적인 거동에 대해서 매일 모니터링하였다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 또는 비히클 투여 후에 임상 병리학을 주 단위 기준으로 수행한다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 또는 비히클 투여 후 CSF 화학 및 세포학을 최초 30일 동안 주 단위 기준으로 수행하고, 그 후 월 단위로 수행한다. 기준선에서, 그리고 그 후 월 단위 기준으로, AAVhu68에 대한 중화 항체 및 AAVhu68 및 hSMN1 트랜스젠에 대한 세포독성 T 림프구(CTL) 반응을 IFN- γ ELISPOT 검정에 의해서 평가한다.

[0284] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG 또는 비히클 투여 14일, 90일, 및 180일 후에, 동물을 안락사시키고, 종합적인 현미경적 조직병리학적 검사를 위해서 조직을 수거한다. 조직병리학적 검사는 중추 신경계 조직(뇌, 척수, 및 후근 신경절)에 특히 초점을 맞췄는데, 그 이유는 이것이 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 척추강내 투여 이후에 가장 많이 형질도입되기 때문이다. 또한, 림프구를 간, 비장, 및 골수로부터 수거하여 부검 시기에 이들 기관에서 CTL의 존재를 조사한다.

[0285] 30마리의 비인간 영장류에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 ICM 투여를 사용하여 수행된 GLP 독성학 연구는, 벡터 투여 후 1/30 동물에서 일시적인 신경학적 결손을 식별하였는데, 이것은 마취 상태에서 동물의 자발적인 움직임에 의해서 유발되는 수술 동안의 뇌졸중의 직접 천자에 기인되었다. 180일 추적 기간 전체에서 본 연구에서 어떠한 다른 임상적 이상 반응도 존재하지 않았고, 본 연구 전체에서 수행된 표준화된 신경학적 조사는 어떠한 이상도 식별하지 못했다. 조직병리학은 임상 후유증과 연관되지 않은 용량-의존적 감각 뉴런 축삭병을 나타내었다. 척추 운동 뉴런 형질도입의 정량은, XGC의 용량이 척추 운동 뉴런의 X%의 형질도입, 즉 SMN $\Delta 7$ 마우스 모델에서 개선된 운동 기능과 연관된 형질도입의 수준을 달성하였음을 나타내었다. 따라서 이러한 용량을 MED(최종 tox 결과로 업데이트)로서 선택하였다.

[0286] 어린 레서스 마카크에서의 비임상 연구에서, 상당히 높은 용량(2×10^{14} GC/kg)의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 정맥내 투여는 3/3 동물에서 급성 간독성을 초래하였고, 한 마리의 동물은 벡터 투여 5일 후에 안락사가 필요하였다. 이러한 투여 경로를 사용하여 평가된 최고 용량인 3×10^{13} GC 이하의 용량으로 척추강내 주사에 의해서 처리된 9마리의 성체 및 5마리의 어린 레서스 마카크에서, 그리고 GLP 독성 연구에서 ICM 주사에 의해서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG로 처리된 27마리의 성체 레서스 마카크에서는 유사한 독성이 관찰되지 않았다.

[0287] **실시예 12 - 임상 연구**

[0288] **A. 신생아**


[0289] 최초 인간 시험은 5×10^{10} GC/g 뇌 질량의 MED 용량에서 시작되는데, 이것은 인간의 경우 총 약 5×10^{13} GC로 번역되고, 실시예 11에 나타난 독성학 연구에 대해서 제안된 저용량을 3배 초과하지만, 고용량보다 여전히 3배 더 낮다(Dekaban AS. Changes in brain weights during the span of human life: relation of brain weights to body heights and body weights. Ann Neurol 1978;4:345-56.). 최초 인간 시험에서 투여되는 최대 용량은 실시예 11에 기술된 독성학 연구에서의 최고 용량, 총 1.85×10^{14} GC에 해당하는 1.85×10^{11} GC/g 뇌와 동일할 것이다.










[0290] DNA-검증된 척수근 위축증(SMA)을 갖는 참여자에서 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.RBG의 2회 용량의 안전성을 결정하기 위해서, 약제학적 적합한 담체/용액 중의 2종의 상이한 단일 용량 투여를 조사한다.

[0291] 후속 진행은 효능이 있는 용량을 확립하기 위한 확장된 집단 군 및 용량을 포함한다.

[0292] 일차 목적은 임의의 연구 관련 등급 III 또는 그 초과 치료 관련 독성에 의해서 평가된다.

[0293] 이차 목적은 하기를 포함한다:

[0294]  이상 반응(AE) 및/또는 중증 이상 반응(SAE)의 발생률

- [0295]  해머스미쓰 영아 신경학 검사(Hammersmith Infant Neurological Examination: HINE) 발달 운동 마일스톤의 달성 평가
- [0296]  필라델피아 소아 병원 신경근 이상 영아 시험(Children's Hospital of Philadelphia Infant Test of Neuromuscular Disorders: CHOP-INTEND) 운동 기능 스케일에서의 기준선으로부터의 변화
- [0297]  임상적으로 나타난 척수근 위축증이 발달한 참여자의 백분율
- [0298]  언급된 시간 지점에 살아있는 참여자의 백분율
- [0299]  물리적 측정에서 기준선으로부터의 변화:
- [0300] 연령 중량/신장; 두부, 흉부, 및 팔 둘레, 두부 대 흉부 둘레 비
- [0301]  휴식기 활력 징후에서 기준선으로부터의 변화:
- [0302] 펄스, 혈압, 호흡, 체온, 맥박산소 측정, 및 경피 이산화탄소
- [0303]  임상 실험실 파라미터에서 기준선으로부터의 변화:
- [0304] 하기 실험실 시험에 의해서 평가됨: 혈액학: 적혈구, 헤모글로빈, 헤마토크리트, 혈소판, 백혈구, 백혈구 감별, 혈액 화학: 총 단백질, 알부민, 크레아티닌, 시스타틴 C, 크레아틴 포스포카이나제, 혈액 요소 질소, 총 빌리루빈(직접 및 간접), 알칼리 포스포타제, 알라닌 아미노트랜스퍼라제, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제, 글루코스, 칼슘, 인, 염소, 나트륨, 칼륨. 요검사: 비중, pH, 단백질, 글루코스, 케톤, 빌리루빈, 적혈구, 백혈구, 상피 세포, 박테리아, 캐스트(cast), 결정
- [0305]  척골 복합근 활동 전위(CMAP)에서 기준선에서의 변화
- [0306]  뇌척수액(CSF) 및 혈장 SMN 단백질 농도
- [0307] 표적 집단은 증상 전이고, 유전적으로 기록된 SMA 및 생존 운동 뉴런 2(SMN2) 유전자의 2개의 카피를 갖는 6주 미만의 영아이다.
- [0308] 포함 기준을 하기에 열거한다:
- [0309] 1. 출생 연령: 6주 미만, 단생아 출생의 경우 37 내지 42주의 재태기간; 쌍생아의 경우 34 내지 42주의 재태기간.
- [0310] 2. 5q 척추 운동 뉴런 1(SMN1) 동형접합 유전자 결실 또는 돌연변이 또는 복합 이형접합 돌연변이의 유전자 문서를 갖는 증상 전 SMA.
- [0311] 3. 생존 운동 뉴런 2(SMN2)의 2개의 카피의 유전자 문서.
- [0312] 4. SMA 시험 경험을 갖는 신경과 전문의에 의한 처치 후(post-procedure) 추적
- [0313] 제외 기준은 하기에 열거한다:
- [0314] 1. 유전자 요법, 사전 안티센스 올리고뉴클레오타이드(ASO) 치료 또는 세포 이식의 이력을 비롯한, SMA를 위해서 제공된 임의의 시판 또는 연구 약물, 생물제 또는 장치로의 치료.
- [0315] 2. 연구자의 견해에서 SMA를 강력하게 암시하는, 스크리닝 시 또는 제1 투여(1일) 직전의 임의의 임상 징후 또는 증상.
- [0316] 3. 임상적으로 유의한 것으로 고려되는 비정상적인 실험실 값($3 \times \text{ULN}$ 초과 GGT, $[X] \text{mg/dL}$ 이상의 빌리루빈, $[Y] \text{mg/dL}$ 이상의 크레아티닌, $[Z]$ 미만 또는 $[A] \text{g/dL}$ 초과 Hgb; $[B] / \text{cmm}$ 초과 WBC)
- [0317] 4. 주요 의학적 병증
- [0318] 5. 조사자의 견해에서 유전자 전달에 대한 불필요한 위험을 초래하는 수반되는 병증
- [0319] 6. 가족이 주치의 및 다른 의료 제공자와 함께 환자의 연구 참여를 공개하는 것을 원치 않는 경우.

- [0320] AAV 벡터의 2가지의 용량을 시험하는데, 각각의 용량 코호트는 6명의 참여자를 포함한다.
- [0321] ● 코호트 1: 저용량: 3×10^{13} GC
- [0322] ● 코호트 2: 고용량: 1×10^{14} GC
- [0323] 6명의 참여자가 저용량 코호트에 등록된다(3×10^{13} GC). 참여자 투여는 각각의 참여자의 등록 사이에서 4주 안정성 관찰 기간과 함께 연속적인 방식으로 수행된다. 안전성은 내부 안전성 위원회(Internal Safety Committee: ISC)에 의해서 평가된다. 안정성 검토 기폭인자(safety review trigger: SRT)가 관찰되지 않으면, 이어서 투여 4주 후에, 저용량 코호트에서의 제6 참여자는, 고용량 코호트 2의 등록 이전에 독립적 데이터 모니터링 위원회(Independent Data Monitoring Committee: IDMC)에 의해서 모든 입수 가능한 안전성 데이터가 평가된다.
- [0324] 일 실시형태에서, 적절한 농도의 5.6mL의 벡터를 함유하는 주사기가 처치실에 전달될 것이다. 하기 개인이 연구 약물 투여를 위해서 존재한다: 처치를 수행하는 중재자; 마취과의사 및 호흡 테크니션(들); 간호사 및 보조 의사; CT(또는 수술실) 테크니션; 신경생리학 테크니션; 및 현장 코디네이터.
- [0325] 연구 약물 투여 이전에, 요추 천자를 수행하여 미리 결정된 부피의 CSF를 제거하고, 그 다음 아이오딘화된 조영제를 척추강내로(IC) 주사하여 대조의 관련 해부학의 시각화를 돕는다. 척추강내 조영제에 대한 대안으로서 니들 삽입 이전에 또는 니들 삽입 동안에 정맥내(IV) 조영제가 투여될 수 있다. 사용되는 IV 또는 IC 조영제에 대한 결정은 의사의 재량이다. 환자는 수술 테이블에서 마취되고, 삽관되고, 배치된다. 수술중 신경생리학적 모니터링(IONM) 장비를 참여자에게 부착한다. 주사 부위를 멸균 기술을 사용하여 수술준비시키고, 가린다. 척추 니들(22 내지 25G)을 형광투시 유도 하에서 대조 내로 전진시킨다. 더 큰 도입기 니들을 사용하여 니들 배치를 도울 수 있다. 니들 위치를 확인한 후, 연장 세트를 척추 니들에 부착하여, 환자 CSF의 충진을 가능하게 한다. 의사의 재량으로, 조영제를 함유하는 주사기를 연장 세트에 연결하고, 소량을 주사하여 대조 내의 니들 배치를 확인할 수 있다. CT 유도 +/- 조영제 주사에 의해서 니들 배치를 확인한 후, 5.6mL의 GTP-201을 함유하는 주사기를 연장 세트에 연결한다. 주사기 내용물을 1 내지 2분에 걸쳐서 서서히 주사하여, 5.0mL의 부피를 전달한다. 니들을 환자로부터 서서히 제거한다.
- [0326] 연구 약물 투여 후, 제도적 가이드라인에 따라서 참여자를 적합한 마취 후 케어 유닛으로 옮긴다. 대상체가 의식을 적절하게 회복하고, 안정적인 상태가 된 후, 그/그녀를 프로토콜 위임 평가를 위해서 적절한 유닛으로 이동시킨다. 활력 징후 및 신경학적 기능을, 처치 직후 3시간 동안 15분마다 그 다음 24시간 동안 매 시간마다 포함하여, 자주 모니터링한다. 초기 24시간 처치 후 기간 이후에, 평가는 참여자가 퇴원한 후 2일 동안 매일, 4주 동안 주 단위의 방문, 그 다음 추가 2회 방문 동안 4주마다, 그 다음 24주에 주 평가변수 평가 방문으로 수행된다.
- [0327] 안정성 시험을 위해서 채혈하고, 참여자를 임상적으로 평가한다. 투여 시, 4주, 12주 및 24주에 염증의 징후를 모니터링하고, 바이오마커를 측정하기 위해서 참여자를 요추 천자하여 CSF를 수집한다. 추적 기간 동안, 참여자를 처치 후 1년까지 3개월마다 평가한다. 참여자는 그 다음 총 5년 동안 연단위로 방문한다. 벡터 투여 후 3개월 및 6개월에, 참여자를 반복 MRI 및 CSF 수집에 적용한다.
- [0328] AAV 벡터 투여 이후 CNS 염증의 증거는 핵화 세포 계수치 및 차이 및 총 단백질을 비롯한 표준 기술을 사용하여 CSF 샘플에서 평가된다. 치료 연관된 염증의 검사 측정은 염증성 마커에 대한 CSF의 멀티플렉스 사이토카인 분석을 포함한다.
- [0329] AAV hSMN1 벡터의 성공적인 형질도입에 대한 바이오마커로서 CSF SMN 단백질 수준을 검증하기 위해서, 제안된 1/2 상 중재 연구를 위한 검정이 개발 중이다.
- [0330] 복합근 활동 전위(CMAP)는 말초 신경의 최대초과 자극 이후에 근육으로부터의 전기생리학적 결과를 나타내고, 운동 뉴런의 건강의 객관적이고 매우 민감한 지시인자로서 제공된다.(García A, Calleja J, Antolín FM, Berciano J. Peripheral motor and sensory nerve conduction studies in normal infants and children. Clin Neurophysiol 2000;111:513-20). 특히, 타입 I SMA를 갖는 환자 중에서의 자연 이력(natural history) 연구는, 증상 발병 이후에 CMAP 진폭이 비정상적으로 낮고, 개선되지 않음을 입증한다(Finkel RS, McDermott MP, Kaufmann P et al. Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. Neurology 2014;83:810-7; Swoboda KJ, Prior TW, Scott CB et al. Natural history of denervation in SMA: relation to age, SMN2 copy number, and function. Ann Neurol 2005;57:704-12 and Finkel RS.

Electrophysiological and motor function scale association in a pre-symptomatic infant with spinal muscular atrophy type I. Neuromuscul Disord 2013;23:112-5). 추가로, SMA 환자와 유사한 전기생리학적 소견을 나타내는 돼지 뇌아웃 모델에서 SMA의 연구는, 증상전 동물에서 SMN의 조기 복원이 CMAP 수정을 초래하였다는 것을 나타내었다(Duque SI, Arnold WD, Odermatt P et al. A large animal model of spinal muscular atrophy and correction of phenotype. Ann Neurol 2015;77:399-414). 상기에 언급된 이유로 인해서, CMAP는 탐색 바이오마커로서 조사된다.

[0331] 연구 중단 기준을 한정하는 사례는 하기를 포함한다:

[0332] • 조사 제품과 가능하게, 가능성 있게 또는 분명히 관련된 임의의 사망

[0333] • 증가된 간 기능 시험:

[0334] • 정상의 상한보다 $3\times$ 더 높은 ALT 또는 AST

[0335] • 하기의 수준으로서 정의된(본 연구의 경우 연령 군에서) 총 혈청 빌리루빈의 연관된 증가

[0336] • 1명 초과와 참여자가 주사 제품 또는 주사 절차와 가능하게, 가능성 있게 또는 분명히 관련된 3 등급 또는 그 초과와 AE를 경험함

[0337] • 조사 제품과 가능하게, 가능성 있게 또는 분명히 관련된 CNS 출혈, 뇌졸중, 또는 급성 마비.

[0338] 간 기능 이상은 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT) 또는 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제(AST)가 $3\times$ 정상의 상한(ULN) 보다 높게 임의로 증가되는 것으로 정의된다. 동시 소견은 채취된 단일 혈액으로부터 또는 서로 8일 이내에 채취된 별개의 혈액으로부터 도출된 것이다. 추적 조사 및 문진은 조사 부위에 의해서 신속하게 시작되어 소견이 재현 가능한지의 여부 그리고/또는 질환 또는 조사 작용제가 아닌 작용제에 의한 원인을 명백하게 뒷받침하는 객관적인 증거(예를 들어, 담석증 및 담낭이 팽창된 담관 폐색)가 존재하는지의 여부를 결정한다.

[0339] **B. 성인**























[0340] 개방 표지 단계 1/2 용량-증가 임상 시험은 유전자 확인된 5q SMA 및 타입 3 SMA의 임상 이력을 갖는 성인에서 AAVhu68.SMA의 단일 투여의 안정성을 평가한다. 본 연구는 비보행 환자 및 보행 환자 둘 모두가 참여한다. 대상체에게 ICM(대조제) 주사에 의해서 단일 용량의 AAVhu68.SMA를 제공한다. 코호트 1($n=3$, 저용량, 3×10^{13} GC) 또는 코호트 2($n=6$; 고용량, 1×10^{14} GC). 본 연구에서 평가된 2종의 용량은 비임상적 약리학 및 독성학 연구를 기초로 선택되었다. 본 연구에서 평가될 두 용량 모두는 비인간 영장류에게 양호하게 용인되었고, 무린 질환 모델에서 운동 결핍을 개선시키기에 충분한 척추 운동 뉴런 SMN 발현의 수준을 달성하였고, 따라서 인간에서 안전한 것으로 예측되었다. 또한, 이 용량은 연구 참여자에게 이점을 제공할 가능성을 갖는다. 첫 번째 3명의 자격이 있는 대상체를 코호트 1에 등록시킬 것이다. 각각의 대상체의 투여 이후에, 4주 관찰 기간이 존재하며, 그 동안 내부 안전성 위원회가 다음 대상체의 투여 이전에 안정성 데이터를 검토한다. 안정성 검토 기폭인자(SRT)가 코호트 1에서 제3 참여자에 대해서 4주 관찰 기간 이내에 관찰되지 않으면, 코호트 2의 등록 이전에 데이터 안전성 모니터링 기관(Data Safety Monitoring Board: DSMB)에 의해서 모든 입수 가능한 데이터를 평가한다. 안정성 SRT가 관찰되지 않으면, 코호트 2 내의 제3 참여자에게 투여한 후 4주에, 코호트 2내의 나머지 3명의 환자의 등록 이전에 DSMB에 의해서 모든 입수 가능한 데이터를 평가한다.

[0341] 투여 전 -35 내지 -1일에 대상체를 스크리닝한다. 선택 기준을 충족한 사람은 주사일(1일)에 병원에 방문한다. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 ICM 주사를 제공한 후, 대상체를 2일 동안 병원에서 모니터링한다. 한 지점에서, 외래환자 추적 및 전화 평가를 52주 일차 평가 기간의 나머지 동안 명시된 시간 지점으로서 수행한다.

[0342] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 안전성 및 내약성을 AE 및 SAE의 발생률, 임상 및 실험실 평가, 신체 검사 및 활력 징후를 기초로 평가한다. 백터 및 트랜스젠 산물의 면역원성을 또한 평가한다.

[0343] 효능 평가는 6MWT, 10미터 보행 시간, RULM 점수, 4 계단 오르기, 9홀 펙 시험, 폐 기능의 측정, PedsQL(피로 규모), SMA-FRS(기능성 등급 스케일), 및 척골 및 비골 CMAP 진폭을 포함한다. SMN 단백질 농도 및 기타 탐색 바이오마커를 CSF에서 평가한다.

[0344] 포함 기준


- [0345]  18세 이상의 남성 또는 여성.
- [0346]  스크리닝 시 5q SMN 동형접합 유전자 결실 또는 돌연변이 또는 복합 이형접합 돌연변이 및 SMN2의 적어도 2 개의 카피의 유전자 문서.
- [0347]  타입3 SMA의 임상 이력.
- [0348]  서면으로 서명한 사전 동의를 자발적으로 제공할 수 있어야 함
- [0349]  대상체의 해부학적 상태 및 물리적 상태가 조사 제품의 투여를 방해하지 않을 것이라는 신경중재자 및 총괄 연구 책임자(Site Principal Investigator)의 평가.
- [0350] 비보행 대상체
- [0351]  도움 없이 15보 이상을 걸을 수 없음.
- [0352]  스크리닝 시 5 내지 30의 RULM 점수.
- [0353] 보행 대상체
- [0354]  보행(도움 없이 15보 이상을 걸을 수 있음).
- [0355]  530m 이하의 6MWT 거리를 갖는 6MWT를 안전하게 수행할 수 있음.
- [0356] 제외 기준
- [0357]  ICM 주사에 대한 금기를 가짐.
- [0358]  천자에 대한 임의의 금기를 가짐.
- [0359]  유전자 요법, ASO 치료 또는 세포 이식의 이력을 비롯한, SMA를 위해서 제공된 임의의 시판 또는 연구 약물, 또는 생물제조의 치료가 제공됨 (또는) 스크리닝 전 3개월 이내에 임의의 다른 연구 약물 또는 요법 연구의 참여.
- [0360]  스크리닝 시 24시간 기간 동안 8시간 초과 동안 침습적 또는 비침습적 환기에 대한 의학적 필요성에 의해서 정의되는, 호흡 부전.
- [0361]  조사자에 따라서, 연구의 수행 및 평가를 방해하거나 또는 유전자 전달에 대한 불필요한 위험을 생성할 수반되는 병증.
- [0362]  비정상적인 응고 상태($1.5 \times$ 정상치 초과인 프로트롬빈 시간(PT), $1.5 \times$ 정상치 초과인 부분적인 트롬보플라스틴 시간(aPTT))를 가짐.
- [0363]  혈소판감소증을 가짐(예를 들어, 150 미만의 혈소판 수치)
- [0364]  간 이상을 가짐($1.5 \times$ ULN 초과인 빌리루빈, $2.0 \times$ ULN 초과인 ALT, AST, 및 알칼리 포스파타제).
- [0365]  제어되지 않는 고혈압(180mmHg 초과인 수축기 혈압[SBP], 100mmHg 초과인 확장기 혈압[DBP]).
- [0366]  조사자의 판단으로, 대상체의 안전성을 손상시킬 임상적으로 유의한 ECG 이상을 가짐.
- [0367]  실질 기관 이식 또는 만성 면역억제의 이력
- [0368]  조사자의 판단으로, 연구에서의 대상체의 안정성 또는 성공적인 참여 또는 연구 결과의 해석을 손상시킬 중증 또는 불안정적인 의학적 또는 정신의학적 병태를 가짐.
- [0369]  스크리닝 전 30일 이내에, 리루졸, 발프로산, 하이드록시유레아, 소듐 페닐부티레이트, 부티레이트 유도체,

크레아틴, 카니틴, 성장 호르몬, 아나볼릭 스테로이드, 프로베네시드, 참여시 코티코스테로이드의 경구 또는 비경구 사용, 근육 강도를 증가 또는 감소시키는 것으로 예상되는 작용제 또는 공지된 또는 추정된 히스톤 데아세틸라제(HDAC) 저해를 갖는 작용제를 비롯한, SMA의 치료를 위해서 의도된 의약의 사용. 네블라이저를 사용하거나 스테로이드용 흡입기가 필요한 대상체는 본 연구에 허용되었지만; 스테로이드의 경구 사용은 금지된다. 살투타몰의 경구 사용은 하기의 제한이 허용된다: 대상체는 양호한 내약성과 함께, 시험에 포함되기 전 적어도 6개월 동안 살투타몰을 복용해야 한다. 살투타몰의 용량은 시험 기간 동안 일정하게 유지되어야 한다. 흡입되는 베타-효능제(예를 들어 천식 위기(asthma crisis)의 치료용)는 허용된다.


[0370] **주 연구 평가변수**


[0371] 본 연구의 주 평가변수는 52주 전체에서의 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 안전성 및 내약성이다. 이러한 평가변수는 연구 약물 투여 후 52주에 걸쳐서 임상적으로 중요하다고 여겨지는 AE 및 SAE의 빈도, 및 활력 징후의 임의의 변화, 신체 검사 또는 임상적 실험실 평가를 기초로 평가될 것이다.

[0372] **부 연구 평가변수**


[0373]  RULM 비보행 대상체에 의해서 측정된 운동 기능에 대한 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 영향을 평가하기 위함.


[0374]  RULM 점수를 연구 약물 투여 후 52주에 걸쳐서 기준선 점수와 비교할 것이다.


[0375]  보행 대상체에서 6MWT 시험 및 10미터 보행 시간에 의해서 측정된 운동 기능에 대한 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 영향을 평가하기 위함.

[0376]  6MWT 및 10미터 보행 시간을 연구 약물 투여 후 52주에 걸쳐서 기준선 점수와 비교할 것이다.


[0377] **탐색적 평가변수**

[0378]  9홀 펙 시험(보행 및 비보행) 및 4 계단 오르기 시험(보행 단독)에 의해서 측정된 운동 기능에 대한 AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG의 영향을 평가하기 위함


[0379]  9홀 펙 시험 및 4 계단 오르기 시험 점수를 연구 약물 투여 후 52주에 걸쳐서 기준선 점수와 비교할 것이다.

[0380]  강제 폐활량(FVC), 최대 호기압(MEP), 최대 흡기압(MIP)에 의해서 측정된 폐 기능에 대한 제품의 영향을 평가하기 위함.

[0381]  척골 및 비골 CMAP 진폭에서의 기준선으로부터의 변화

[0382]  PedQLVersion 3.0 다차원 피로 규모, 성인 보고 모듈

[0383]  SMA-FRS(기능성 순위 규모)

[0384]  CSF, 혈청 및 소변에서 DNA 및 기타 AAV-기반 약물 성분 중의 벡터의 약동력학.

[0385] **실시예 13 - 제조**

[0386] AAVhu68.SMN 벡터를 하기를 사용한 인간 HEK293 세포의 삼중 플라스미드 형질주입에 의해서 생산한다: 1) 벡터 게놈 플라스미드, 2) AAV rep2 및 cap hu68 야생형(WT) 유전자를 함유하는 pAAVhu68.KanR이라 지칭되는 AAV 헬퍼 플라스미드, 및 3) pAdΔF6(Kan)이라 지칭되는 헬퍼 아데노바이러스 플라스미드. AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG 패키징된 벡터 게놈의 크기는 3257bp이다.

[0387] **1. AAV 벡터 게놈 플라스미드: pENN.AAV.CB7.CI.hSMNco.rBG.KanR(p4342)**

[0388] AAV-hSMN1 벡터 게놈 플라스미드 pENN.AAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG(p3246)는 6077bp 크기이다. 이러한 플라스미드로부터 유래된 벡터 게놈은 hSMN1 발현 카세트에 직접한 AAV2 유래된 ITR을 갖는 단일-가닥 DNA 게놈이다. 트랜스젠 카세트로부터의 발현은 CB7 프로모터, CMV 급초기 인핸서(C4)와 닭 베타 액틴 프로모터 사이의 혼성체에 의해 유도되는 한편, 이 프로모터로부터의 전사는 CI의 존재에 의해 향상된다. 발현 카세트를 위한 폴리A 신호는 rBG 폴리A이다. hSMN1 서열(젠아트사(GeneArt))을 코돈-최적화 및 합성함으로써 플라스미드를 작제하고, 이

어서 생성된 작제물을 CB7, CI, 및 rBG 발현 요소를 함유하는 AAV2 ITR-측점 발현 카세트인 플라스미드 pENN.AAV.CB7.CI.rBG(p1044) 내에 클로닝하여 pAAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG(p3246)을 제공하였다. KanR 플라스미드는 pENN.AAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG.KanR(p4342)이다. 2개의 PacI 부위에서 pAAV.CB7.CI.hSMN1co.rBG(p3246) 내의 암피실린 내성 골격을 pENN.AAV.TBG.PI.hLDLr.rBG.KanR(p2017)로부터의 카나마이신 내성 골격과 교체함으로써 P4342를 작제하였다.

[0389] 서열 요소의 설명:

[0390] ITR: AAV ITR(젠뱅크 # NC001401)은 두 단부 모두에 대해서 동일하지만, 반대 배향으로 존재하는 서열이다. AAV 및 아데노바이러스 헬퍼 기능이 도중에 제공될 때, AAV2 ITR 서열은 벡터 DNA 복제 기점과 벡터 게놈의 패키징 신호 둘 다로서 작용한다. 이와 같이, ITR 서열은 벡터 게놈 복제 및 패키징에 필요한 유일한 시스 서열을 나타낸다.

[0391] CMV 극 초기 인핸서(382bp, 젠뱅크 # K03104.1).

[0392] 답 β-액틴 프로모터(282bp; 젠뱅크 # X00182.1)을 사용하여 고-수준 hSMN1 발현을 지시한다.

[0393] 답 β-액틴 인트론: 답 β-액틴 유전자(젠뱅크 # X00182.1)로부터의 973bp 인트론이 벡터 발현 카세트 내에 존재한다. 인트론은 전사되지만, 스플라이싱에 의해서 성숙 mRNA로부터 제거되고, 그것 중 어느 하나의 측면 상에서 서열을 함께 연결시킨다. 발현 카세트 내의 인트론의 존재는 mRNA의 핵으로부터 세포질로의 이송을 가능하게 하여, 번역을 위한 mRNA의 꾸준한 수준의 축적을 향상시킨다고 밝혀져 있다.

[0394] 암호 서열: hSMN1 서열: (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000344.3)을 코돈-최적화하고, 합성하였다. SMA는 텔로머 유전자 SMN1에서의 돌연변이에 의해서 유발된다. SMN1에서의 돌연변이는 하부 운동 뉴런에 대한 선택적인 독성을 초래하는데, 이것은 점진적인 뉴런 손실 및 연관된 근육 약화 및 변성으로 이어진다. 트랜스젠은 SMN1, 아이소폼 D이다. 아이소폼 D는 가장 긴 아이소폼을 암호화하고, 이 변이체는 CNS 및 도처 둘 모두에서 SMN1에 의해서 생산된 우세한 전사체/아이소폼인 것으로 생각된다.

[0395] 폴리아데닐화 신호: 127bp 토끼 β-글로빈 폴리아데닐화 신호(젠뱅크 # V00882.1)를 항체 mRNA의 효율적인 폴리아데닐화를 위해서 시스 서열에 제공한다. 이러한 요소는 전사 종결, 초기 전사물의 3' 단부에서의 특이적 절단 사건 및 폴리아데닐 꼬리의 부가의 신호로서 기능한다.

[0396] 2. AAVhu68 헬퍼 플라스미드: pAAV2/hu68n.KanR(p0068)

[0397] AAV2/hu68 헬퍼 플라스미드 pAAV2/hu.68(Lot # p0065; 7329bp)는 AAV 혈청형 hu68로부터의 4 WT AAV2 rep 단백질 및 3 WT AAV VP 캡시드 단백질을 암호화하는 AAV 헬퍼 플라스미드이다. 신규 AAV 서열을 인간 심장 조직 DNA 및 지정된 AAV 혈청형 hu68로부터 수득하였다. 키메라 패키징 작제물을 생성하기 위해서, 야생형 AAV2 rep 및 AAV9 cap 유전자를 함유하는, 플라스미드 pAAV2/9n(p0061-2)로부터의 AAV2 cap 유전자를 제거하고, AAVhu68 cap 유전자 플라스미드 pAAV2/hu68(p0065)의 단편으로 대체하였다. rep 발현을 정상적으로 유도하는 AAV p5 프로모터가 rep의 5' 단부로부터 cap의 3' 단부까지 이 작제물 내에서 이동된다. 이러한 배열은 프로모터와 rep 유전자(즉 플라스미드 골격) 사이에 스페이서를 도입하고, rep의 발현을 하향조절하고, 벡터 생산을 지지하는 능력을 증가시키기 위해서 제공된다. pAAV2/9n 내의 플라스미드 골격은 pBluescript KS로부터 유래된다. 플라스미드의 모든 성분 부분을 직접 서열결정에 의해서 검증하였다. 암피실린 내성 유전자를 카나마이신 내성 유전자에 의해서 교체하여 pAAV2/hu68n.KanR (p0068)을 제공하였다.

[0398] 3. pAdDeltaF6(Kan) 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드

[0399] 플라스미드 pAdDeltaF6(Kan)는 15,774bp 크기이다. 플라스미드는 AAV 복제에 중요한 아데노바이러스 게놈의 영역, 즉 E2A, E4, 및 VA RNA(아데노바이러스 E1 기능부는 293개 세포에 의해서 제공됨)를 함유하지만, 다른 아데노바이러스 복제 또는 구조적 유전자를 함유하지 않는다. 플라스미드는 복제에 중요한 시스 요소, 예컨대, 아데노바이러스 반전 말단 반복부를 함유하지 않고, 따라서 어떠한 감염성 아데노바이러스도 생성되지 않는다고 예상된다. 그것은 Ad5(pBHG10, pBR322 기반 플라스미드)의 E1, E3 결실된 분자 클론으로부터 유래되었다. 결실을 Ad5 DNA 내에 도입하여 불필요한 아데노바이러스 유전자의 발현을 제거하고, 32Kb 내지 12kb의 아데노바이러스 DNA의 양을 제거하였다. 마지막으로, 암피실린 내성 유전자를 카나마이신 내성 유전자에 의해서 교체하여 pAdeltaF6(Kan)을 제공하였다. HEK293 세포 내에 존재하는 E1과 함께 이 플라스미드에 남아있는 E2, E4 및 VAI

아데노바이러스 유전자는 AAV 벡터 생산에 필수적이다.

[0400] 4. 마스터 세포 은행

[0401] HEK293 세포는 본래 [Graham FL, et al, (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol 36(1):59-74]에 기술된 바와 같이 HEK 세포를 잘린 아데노바이러스 타입 5 DNA로 형질전환함으로써 생성되었다. 세포는 고역가 rAAV 생산에 필요한 E1A 및 E1B 유전자 산물을 발현한다. HEK293 세포는 부착성이고, 고도로 형질주입성이어서, DNA 플라스미드 형질주입 시 rAAV의 고역가를 산출한다. 플라스미드 DNA 증폭을 위해서 사용된 1L의 밤새 박테리아 배양물로부터의 1ml를 동일 부피의 멸균 50% 글리세롤과 혼합함으로써 박테리아 마스터 세포 은행(BMCB) 글리세롤 스톱을 제조한다. 작제물당 BMCB 글리세롤 스톱의 2개의 0.5ml 분취물을 혼합물로부터 제조하고, Nalgene 저온 바이알 내에 -80℃에서 저장한다. BMCB 글리세롤 스톱을 검증하기 위해서, 증폭된 플라스미드 DNA를 제한 효소 소화, 그 다음 젤 전기영동법, 및 퀴아젬사에서의 생어 서열결정에 의한 전체-플라스미드 서열을 포함하는 인하우스 구조 분석에 적용한다. 플라스미드 DNA 제조사(퓨어신사(Puresyn Inc.))로의 이송을 위해서 박테리아 작업 세포 은행(BWCB) 글리세롤 스톱 분취물을 제조하기 위해서, 3ml의 배양물을 BMCB 글리세롤 스톱으로부터 접종하고, 밤새 성장시킨다. 1ml의 밤새 배양물을 사용하여 상기에 기술된 바와 같은 BWCB 글리세롤 스톱 분취물을 제조한다.

[0402] 5. 제조 공정의 개요

[0403] AAVhu68.CB7.CI.hSMN1co.rBG 벡터 생산 공정을 도 15b 및 도 15b의 제조 공정 흐름도로 도시한다. 산물의 제조에 도입되는 주요 시약을 다이어그램의 좌측에 나타내고, 공정 내 품질 평가를 다이어그램의 우측에 도시한다. 각각의 생산 및 정제 단계의 설명을 또한 제공한다. 산물 제조는 달리 명시되지 않는 한 유닛 조작의 선형 흐름을 따르고, 일회용의 폐쇄 생물가공 시스템을 사용한다. 세포 시딩에서 상청액 수집까지의 세포 배양을 비롯한 생산 공정의 모든 단계는 멸균 단회 사용 일회용 튜빙 및 백 어셈블리를 사용하여 무균적으로 수행한다. 세포를 Corning 10층 CellSTACKs(등록상표)(CS-10) 및 HS-36에서 배양하고, 모두 개방 조작이다. 정제 공정은 가능한 경우 폐쇄 시스템에서 수행하지만; 칼럼 크로마토그래피 조작은 위생적인 작동인 것으로 간주되고, 완전히 폐쇄된 시스템으로서 간주되지 않는다.

[0404] 6. 제조 공정의 설명

[0405] a. 세포 시딩

[0406] 자격이 있는 HEK293 세포주를 생산 공정에 사용한다. WCB는 5.2.6에 기술된 MCB-2로부터 찰스 리버 래보러토리스사(Charles River Laboratories)에서 제조되었고, IND 신청서에서 특징규명될 것이다. 벡터 생산을 위해서 사용된 세포 배양은 단일 해동된 WCB 바이알로부터 시작될 것이며, 마스터 배취 기록 문서(Master Batch Record Document: MBR)에 따라서 확장될 것이다. 코닝 T-플라스크 및 CS-10을 사용하여 세포를 5×10^9 내지 5×10^{10} 세포까지 확장시키는데, 이것은 BDS 배취당 벡터 생산을 위해서 48 HS-36까지 시딩하기에 충분한 세포 덩어리가 생성되도록 할 것이다. 세포를 10% 감마 조사된, US-공급 또는 NZ-공급 우태아 혈청(FBS)이 보충된 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle Medium: DMEM)로 구성된 배지에서 배양한다. 세포는 앵커리지 의존적이고, 세포 해리는 동물 산물-무함유 세포 해리제인 TryPLE(상표명) Select를 사용하여 달성될 것이다. 세포 시딩은 멸균, 단회-사용 일회용 생물공정 백 및 튜빙 시험기를 사용하여 달성할 것이다. 세포를 37℃(± 2℃)로 5% (± 0.5%) CO₂ 대기에서 유지할 것이다.

[0407] b. 일시적인 형질주입

[0408] 성장(DMEM 배지 + 10% FBS) 대략 3일 이후에, HS-36 세포 배양 배지를 신선한 무혈청 DMEM 배지로 대체하고, 최적화된 폴리에틸렌이민(PEI)-기반 형질주입 방법을 사용하여 3종의 생산 플라스미드로 형질주입한다. 48 HS-36(BDS 배취당) 형질감염시키기 위해 충분한 플라스미드 DNA 형질감염 복합체를 BSC에서 제조할 것이다. 먼저, 0.1:1:2 비의 시스(벡터 계놈) 플라스미드, 트랜스(캡시드 및 rep 유전자) 플라스미드 및 헬퍼(Ad) 플라스미드 및 GMP 등급 PEI(PEIPro, 폴리플러스 트랜스펙션 에스에이사(PolyPlus Transfection SA))를 함유하는 DNA/PEI 혼합물을 제조할 것이다. 이러한 플라스미드 비는 소규모 최적화 연구에서 AAV 생산에 최적의 것으로 결정되었다. 잘 혼합한 후, 용액을 실온에서 25분 동안 정치시킬 것이고, 이어서 무혈청 배지를 첨가하여 반응을 켜고, 마지막으로 HS-36에 첨가할 것이다. 형질주입 혼합물을 HS-36의 모든 36개층 사이에서 평형화시키고, 세포를 37℃(±2℃)에서 5%(± 0.5%) CO₂ 분위기에서 5일 동안 인큐베이션시킬 것이다.

c. 세포 배지 수거

형질주입된 세포 및 배지를 일회용 생물공정 백을 사용하여 유닛으로부터 배지를 무균방식으로 배출함으로써 각각의 HS-36으로부터 수거할 것이다. 배지의 채취 후에, 대략 200리터 부피를 $MgCl_2$ 를 이용하여 2mM의 최종 농도까지(벤조나제에 대한 보조인자) 보충할 것이고, 벤조나제 뉴클레아제를 최종 농도 25유닛/ml로 첨가할 것이다. (일회용 생물공정 백 내) 생성물을 인큐베이터에서 37°C로 2시간 동안 인큐베이션시켜 형질감염 절차의 결과로서 채취물 중에 존재하는 잔류 세포 및 플라스미드 DNA의 효소 분해를 위한 충분한 시간을 제공할 것이다. 이러한 단계는 최종 배터 내에 잔류하는 DNA의 양을 최소화하기 위해서 수행된다. 인큐베이션 후에, NaCl을 500mM의 최종 농도로 첨가하여 여과 동안 그리고 하류 접선 유동 여과 동안 산물의 회수를 도울 것이다.

d. 정화

세포 및 세포 잔해물을 연동 펌프에 의해서 구동되는 백 세트 및 멸균 폐쇄 튜빙으로서 직렬로 연결된 텡스 필터 캡슐(1.2/0.22 μ m)을 사용하여 산물로부터 제거할 것이다. 정화는 하류 필터 및 크로마토그래피 칼럼이 파울링으로부터 보호되는 것을 보장할 것이고, 생균수(bioburden) 감소 여과는 필터 트레이의 마지막에, 상류 생산 공정 동안 잠재적으로 도입된 임의의 생균수가 하류 정제 전에 제거되는 것을 보장할 것이다. 수거 물질을 Sartorius Sartoguard PES 캡슐 필터(1.2/0.22 μ m)(사토리우스 스테딤 바이오테크사(Sartorius Stedim Biotech Inc.))를 통과시킬 것이다.

e. 대규모 접선 유동 여과

종래의 멸균 폐쇄 생물가공 튜빙, 백 및 막 세트를 사용하여 접선 유동 여과(TFF)에 의해서 정화된 산물의 부피 감소(10-배)를 달성할 것이다. TFF의 원리는 용액을 적합한 공극율(100kDa)의 막에 평행한 압력 하에서 용액을 유동시키는 것이다. 압력차는 막 기공보다 더 큰 분자를 보유하면서 더 작은 크기의 분자가 막을 통해서 그리고 페 스트림으로 효과적으로 이동하게 한다. 용액을 재순환시킴으로써, 평행한 유동은 막 표면을 스위핑하여 막 기공 파울링 및 막에 대한 결함을 통한 산물 손실을 예방한다. 적절한 막 기공 크기 및 표면적을 선택함으로써, 목적하는 분자를 보유 및 농축시키면서, 액체 샘플은 부피가 급속하게 감소될 수 있다. TFF 응용에서의 투석여과는 새로운 완충액을, 액체가 막을 통해서 페 스트림으로 통과하는 것과 동일한 속도로 재순환 샘플에 새로운 완충액을 첨가하는 것을 포함한다. 투석여과의 부피의 증가로 인해서, 증가된 양의 작은 분자는 재순환 샘플로부터 제거된다. 이것은 정화된 산물의 가장 온화한 정제를 초래하지만, 또한 후속 친화도 칼럼 크로마토그래피 단계와 상용성인 완충액 교환을 달성한다. 따라서, 본 발명자들은 농축을 위해서 100kDa, PES 막을 사용하고, 이어서 이것을 20mM 트리스 pH 7.5 및 400mM NaCl로 구성된 완충액의 최소 4배 투석 부피로 투석여과시킨다. 투석여과된 산물을 밤새 4°C에서 저장하고, 이어서 1.2/0.22 μ m 텡스 필터 캡슐로 추가로 정화하여 임의의 침전된 물질을 제거한다.

f. 친화도 크로마토그래피

투석여과된 산물을 AAVhu68 항원형을 효율적으로 포획하는 Poros TM Capture Select(상표명) AAV9 친화도 수지(라이프 테크놀로지스사)에 적용할 것이다. 이러한 이온 조건 하에서, 상당한 백분율의 잔류하는 세포 DNA 및 단백질이 칼럼을 통해서 유동하면서, AAV 입자가 효율적으로 포획된다. 적용 후, 칼럼을 5배 부피의 저염 벤조나제 용액(2500U/ml 벤조나제, 20mM Tris pH 7.5 및 40mM NaCl, 1.5mM $MgCl_2$)으로 처리하여 임의의 남아있는 숙주 세포 및 플라스미드 핵산을 제거한다. 칼럼을 세척하여 추가적인 공급물 불순물을 제거하고, 그 다음 1/10 부피의 중화 완충액(200mM 비스 트리스 프로판, pH 10.2) 중에서의 수집에 의해서 즉시 중화된 낮은 pH 단계 용리(400mM NaCl, 20mM 시트르산나트륨; pH 2.5)를 수행한다.

g. 음이온 교환 크로마토그래피

중공 AAV 입자를 비롯한 공정내 불순물의 추가 감소를 달성하기 위해서, Poros-AAV9 용리 풀을 50-배(20mM 비스 트리스 프로판, 0.001% 플루로닉 F68; pH 10.2)로 희석시켜 이온 강도를 감소시키고, CIMultus^(상표명) QA 모노리쓰 매트릭스(비아 세퍼레이션즈사(BIA Separations))에 대한 결함을 가능하게 한다. 저염 세척 이후에, 배터 산물을 60배 칼럼 부피(CV) NaCl 선형 염 구배(10 내지 180mM NaCl)를 사용하여 용리시킨다. 이러한 얇은 염 구배는 배터 게놈을 함유하는 입자(전입자(full particle))로부터 배터 게놈이 없는 캡시드 입자(중공 입자)를 효과적으로 분리하고, 완전 캡시드가 풍부한 제제를 초래한다. 1/100 부피의 0.1% 플루로닉 F68 및 1/27 부피의 비스 트리스 pH 6.3을 함유하는 튜브에 분획을 수집하여 각각 튜브 및 고 pH에 대한 노출의 길이에 대한 비-특이적 결함을 최소화할 것이다. 풀링된 완입자 피크 분획을 20mM 비스 트리스 프로판, 0.001% 플루로닉 F68, pH

10.2 중에서 20배로 희석시키고, 제자리에서 세척된 동일한 칼럼에 재적용한다. 10에서 180mM의 NaCl 염 구배를 재적용하고, 적절한 전입자 피크 분획을 수집할 것이다. 피크 면적을 평가하고, 대략적인 벡터 수율의 결정을 위해서 이전 데이터와 비교한다.

[0419] **h. BDS를 산출하기 위한 최종 제형 및 생균수 감소 여과**

[0420] TFF를 사용하여 100kDa 막을 갖는 폴링된 음이온 교환(AEX) 분획 상에서 최종 제형을 달성한다. 이것은 최종 제형 완충액을 투석여과하고, 이를 농축시켜 목적하는 목표 농도에서 BDS를 산출함으로써 달성될 것이다. 샘플을 BDS 시험을 위해서 제거할 것이다(하기 섹션에 기술됨). BDS를 멸균 여과시키고(0.22 μ m), 멸균 폴리프로필렌 튜브에 저장하고, 최종 충전을 위한 방출 시까지 격리 위치에서 -60 $^{\circ}$ C 이하에서 동결시킨다.

[0421] **i. 최종 충전**

[0422] 동결된 BDS를 해동시키고, 폴링시키고, 최종 제형 완충액을 사용하여 목표 농도로 조정할 것이다(TFF를 통한 희석 또는 농축 단계). 이어서 산물을 마지막으로 0.22 μ m 필터를 통해서 여과시키고, 결정될 충전 부피에서 멸균 West Pharmaceutical's Crystal Zenith(중합체) 바이알 및 크림프 시일(crimp seal)을 갖는 마개에 충전시킨다. 바이알을 하기 사항에 따라 표지할 것이다. 표지된 바이알을 -60 $^{\circ}$ C 이하에서 저장한다.

[0423] **j. 벡터 게놈 아이덴티티: DNA 및 NGS 서열결정**

[0424] 바이러스 벡터 게놈 DNA를 단리시키고, 서열을 프라이머 워킹을 사용하여 2-배 서열결정 커버리지에 의해서 결정한다. 서열 정렬을 수행하고, 예측된 서열과 비교한다. 특정 실시형태에서, 예를 들어, Illumina(등록상표) 기기를 사용하여, 차세대 서열결정(고 처리율 서열결정이라고도 공지됨)을 수행한다.

[0425] **k. 벡터 캡시드 아이덴티티: VP1의 AAV 캡시드 질량 분석법**

[0426] 벡터의 AAVhu68 혈청형의 확인은 AAV 캡시드 단백질의 펩타이드의 분석을 기반으로 개발된 검정에 의해서 달성된다. 방법은 VP의 트립신 소화, 그 다음 캡시드 단백질 펩타이드를 서열결정하기 위한 Q-Exactive Orbitrap 질량 분광계 상에서의 탠덤 질량 분석법 특징규명을 포함한다. 탠덤 질량 스펙트럼 서열결정되고 표적화된 질량 분석법 방법으로부터의 스펙트럼 라이브러리를 사용하여 특이적 AAV 바이러스 입자 혈청형을 고유하게 식별할 수 있는 시그니처 펩타이드에 대해서 검정한다. 8종의 AAV(AAVhu68, AAV1, AAV2, AAV6, AAV8, AAV9, AAVrh10, AAVhu37)에 특이적인 시그니처 펩타이드의 은행을 시험품의 소화에 의해서 생성된 탠덤 질량 스펙트럼에 대해서 스크리닝한다. 양성 식별을 위해서, 단일 혈청형으로부터의 시그니처 펩타이드(들)만을 검출할 것이다.

[0427] **l. 게놈 카피 역가**

[0428] AAV 벡터에 대한 GC 역가를 결정하기 위한 디지털 드랍플렛 중합효소 연쇄 반응(ddPCR)-기반 기술이 최근 개발되었다[Lock M, Alvira MR, Chen SJ, & Wilson JM (2014) Absolute determination of single-stranded and self-complementary adeno-associated viral vector genome titers by droplet digital PCR. Hum Gene Ther Methods 25(2):115-125.]. 이 방법은 실용적이고, qPCR과 동등하거나 더 양호한 역가를 보고하고, 플라스미드 표준 곡선이 필요하지 않다. 사용된 검정은 DNase I로의 소화, 그 다음 캡슐화된 벡터 게놈 카피를 측정하기 위한 디지털 PCR 분석을 포함한다. DNA 검출은 이러한 동일한 영역에 대한 형광 태깅된 프로브 혼성화와 조합하여 폴리A 영역을 표적화한 서열 특이적 프라이머를 사용하여 달성된다. 다수의 표준품, 검증 샘플 및 대조군(배경 및 DNA 오염을 위한 것임)을 검정에 도입하였다.

[0429] **m. 감염 단위 역가**

[0430] 감염 단위(IU) 검정을 사용하여 RC32 세포(rep2 발현 HeLa 세포)에서 rAAV 벡터의 생산적인 흡수 및 복제를 결정한다. 96-웰 종점 포맷을 이전에 공개된 것과 유사하게 사용하였다. 간략하면, RC32 세포를 rAAV BDS의 연속 희석 및 rAAV의 각각의 희석에서 12개 복제물로의 Ad5의 균일 희석에 의해 공동 감염시킨다. 감염 72시간 후에, 세포를 용해시키고, qPCR을 수행하여 투입에 대한 rAAV 벡터 증폭을 측정한다. 종점 희석 50% 조직 배양 감염 용량(TCID50) 계산(스피어만-카버(Spearman-Kärber))을 수행하여 IU/ml 단위로 표현된 복제 역가를 결정한다. "감염성" 값은 세포와 접촉한 입자, 수용체 결합, 내재화, 핵으로의 이송 및 게놈 복제에 의존적이기 때문에, 이것은 검정 기하학적 형상 및 적절한 수용체의 존재 및 사용된 세포주에서의 결합 후 경로에 의해서 영향을 받는다. 수용체 및 결합 후 경로는 통상적으로 불멸화된 세포주에서 유지되지 않고, 따라서 감염성 검정 역가는 존재하는 "감염성" 입자의 수의 절대적 척도가 아니다. 그러나, 캡시드화된 GC 대 "감염성 단위"의 비(GC/IU 비로서 기술됨)는 로트 대 로트의 산물 일관성의 척도로서 사용될 수 있다.

[0431]

n. 중공 입자 대 전입자 비

[0432]

분석용 초원심분리(AUC)에 의해서 측정된 바와 같은 침강 속도는 응집물, 기타 미량 성분을 검출할 수 있을 뿐만 아니라 이의 상이한 침강 계수를 기반으로 상이한 입자 종의 상대적인 양의 양호한 정량을 제공할 수 있다. 이것은 길이 및 시간의 기본 단위를 기반으로 하는 절대적인 방법이며, 기준으로서 표준 분자가 필요하지 않다. 벡터 샘플을 12mm 광 경로 길이를 갖는 2-채널 차콜-에폰 센터피스(charcoal-epon centerpiece)를 사용하여 세포 내에 적재시킨다. 공급된 희석 완충액을 각각의 세포의 기준 채널 내에 적재한다. 이어서 적재된 세포를 AN-60Ti 분석 회전자에 넣고, 흡광도 및 RI 검출기 둘 모두가 구비된 Beckman-Coulter ProteomeLab XL-I 분석용 초원심분리기에 적재한다. 20℃에서의 완전 온도 평형화 후, 회전자에게 12,000rpm의 최종 주회 속도를 제공한다. 280nm 스캔에서의 흡광도를 대략 5.5시간 동안 대략 3분마다 기록한다(각각의 샘플에 대해서 110회의 총 스캔). 원시 데이터를 c(s) 방법을 사용하여 분석하고, 분석 프로그램 SEDFIT에서 구현한다. 생성된 크기 분포를 그래프로 나타내고, 피크를 적분한다. 각각의 피크와 연관된 백분율 값을 모든 피크 하 총 면적의 피크 면적 분율을 나타내고, 280nm에서 생성된 원시 데이터를 기초로 하며; 다수의 랩은 이 값을 사용하여 중공 입자: 전입자 입자 비를 계산한다. 그러나, 중공 입자 및 전입자는 이러한 과정에서 상이한 흡광 계수를 갖기 때문에, 원시 데이터가 이에 따라서 조정될 수 있다. 흡광 계수 조정 전 및 후 둘 모두에서 중공 입자 및 전입자 피크 값의 비를 사용하여 중공 입자-전입자 비를 결정하고, 두 비를 분석 증명서에 기록한다.

[0433]

o. 숙주 세포 DNA

[0434]

qPCR 검정을 사용하여 잔류하는 인간 293 DNA를 검출한다. "미관련 DNA"와의 스파이킹 후, 총 DNA(미관련, 벡터 및 잔류 계통)를 대략 1ml의 산물로부터 추출한다. 숙주 세포 DNA를 18S rDNA 유전자를 표적으로 하는 qPCR을 사용하여 정량한다. 검출된 DNA의 정량을 스파이킹된 미관련 DNA의 회수를 기초로 정규화한다. 3개의 상이한 앰플리콘 크기를 시험하여 잔류하는 숙주 세포 DNA의 크기 스펙트럼을 확립한다.

[0435]

p. 숙주 세포 단백질

[0436]

ELISA를 수행하여 숙주 HEK293 세포 단백질의 오염 수준을 측정한다. Cygnus Technologies HEK293 숙주 세포 단백질 2세대 ELISA 키트를 공급사에 의해서 제공된 설명서에 따라서 사용한다.

[0437]

q. 복제-적격 AAV 검정

[0438]

샘플을 생산 공정 동안 잠재적으로 발생할 수 있는 복제 적격 AAV2/hu68(rcAAV)의 존재에 대해서 분석한다. 세포-기반 증폭 및 계대, 그 다음 실시간 qPCR(caphu68 표적)에 의한 rcAAV DNA의 검출로 이루어진 3 계대 검정을 개발하였다. 세포-기반 성분은 HEK293 세포(P1)의 단층을 시험 샘플 및 야생형 인간 아데노바이러스 타입 5(Ad5)의 희석물로 접종시키는 것으로 이루어진다. 시험된 산물의 최대량은 1×10^{10} GC의 벡터 산물일 것이다. 아데노바이러스의 존재로 인해서, rcAAV는 세포 배양물 중에서 증폭할 것이다. 2일 후, 세포 용해물을 생성하고, Ad5를 열 불활성화시킨다. 이어서, 정화된 용해물을 제2 라운드의 세포(P2)에 통과시켜 민감성을 향상시킨다(다시 Ad5의 존재 하에서). 2일 후, 세포 용해물을 생성하고, Ad5를 열 불활성화시킨다. 이어서, 정화된 용해물을 제3 라운드의 세포(P3)에 계대시켜 민감성을 최대화시킨다(다시 Ad5의 존재 하에서). 2일 후, 세포를 용해시켜 DNA를 방출하고, 이어서 이것을 qPCR에 적용하여 AAVhu68 cap 서열을 검출한다. Ad5 의존적 방식에서의 AAVu68 cap 서열의 증폭은 rcAAV의 존재를 나타낸다. AAV2 rep 및 AAVhu68 cap 유전자를 함유하는 AAV2/hu68 대용 양성 대조군의 사용은 검정의 검출 한계치(LOD)가 결정되는 것을 가능하게 하고(0.1, 1, 10 및 100IU), rAAV의 연속 희석물(1×10^{10} , 1×10^9 , 1×10^8 및 1×10^7 GC)을 사용하여 시험 샘플에 존재하는 rcAAV의 대략적인 수준을 정량할 수 있다.

[0439]

r. 시험관내 효력

[0440]

qPCRGC 역가를 유전자 발현에 관련시키기 위해서, 시험관내 생물검정을 수행한다. 간략하면, 세포를 96웰 플레이트에 웰마다 플레이팅하고, 37℃/5% CO₂에서 밤새 인큐베이션시킨다. 다음 날, 세포를 연속 희석된 AAV 벡터로 감염시키고, 37℃/5% CO₂에서 2일 동안 인큐베이션시킨다. 이어서, 세포를 4% 파라폼알데하이드로 고정시키고, 그 다음 0.1% Triton-100 함유 PBS로 세척하고, 이어서 차단 완충액과 함께 인큐베이션시킨다. 차단 후, 세포를 일차 항체(GenTex monoclonal α-Smn1, CAT # GTX60451)의 1:200 희석물과 함께 인큐베이션시키고, 세척하고, 1:500 α-마우스-488(써모 피셔사)와 함께 인큐베이션시킨다. 영상화 이전에, 세포를 DAPI 함유 PBS로 처리하여 핵을 가시화한다. 플레이트를 Cell Insight Cx5 하이 컨텐트 이미저(high content imager)(써모 피셔사)를 사용하여 영상화한다. 데이터 캡처를 위한 현재 방법은 웰마다 2,500개의 대상(즉, 세포)을 스크리닝

하고, 변형된 Spot ID 프로토콜을 사용하여 핵당 카잘 몸체의 쌍(Gemini of Cajal bodies)의 수를 계수한다. 카잘 몸체의 핵 쌍 형성은 기능성 Smn1 단백질에 좌우된다. Log 벡터 MOI를 x-축에 장비 판독치를 y-축에 플롯팅한다. 검정의 최적화가 계속된다.

[0441] **s. 총 단백질, 캡시드 단백질, 단백질 순도 및 캡시드 단백질 비**

[0442] 벡터 샘플을 먼저 바이신코닌산(BCA) 검정을 사용하여 소 혈청 알부민(BSA) 단백질 표준 곡선에 대한 총 단백질에 대해서 정량한다. 동일 부의 샘플과 키트 내에 제공된 마이크로-BCA 시약을 혼합함으로써 결정을 수행한다. 동일한 절차를 BSA 표준품의 희석물에 적용한다. 혼합물을 60℃에서 인큐베이션시키고, 흡광도를 562nm에서 측정한다. 4-파라미터 피트를 사용하여 알고 있는 농도의 표준 흡광도로부터 표준 곡선을 생성한다. 미지의 샘플을 4-파라미터 회귀에 따라서 정량화한다. AAV 순도의 반-정량적 결정을 제공하기 위해서, 샘플을 계능 역가에 대해서 정규화하고, 환원 조건 하에서 소듐 도데실 설페이트 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동(SDS-PAGE) 젤 상에서 5×10^9 GC를 분리시킨다. 이어서 젤을 SYPRO 루비 염료로 염색한다. 임의의 불순물 밴드를 농도계에 의해서 정량한다. 3종의 AAV 특이적 단백질 VP1, VP2 및 VP3 이외에 나타난 염색된 밴드를 단백질 불순물이라 간주한다. 불순물 질량 백분율뿐만 아니라 오염물 밴드의 대략적인 분자량을 기록한다. 또한 SDS-PAGE 젤을 사용하여 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 정량하고, 이의 비를 결정한다.

[0443] **t. BSA 단백질**

[0444] 검정 키트와 함께 제공된 프로토콜에 따라서 베틸 레보리토리즈사(Bethyl Laboratories)로부터 입수된 소 알부민 ELISA 키트를 사용하여 본 검정을 수행한다.

[0445] **u. 벤조나제 엔도뉴클레아제**

[0446] 핵산을 열화시켜 벡터 정제를 용이하게 하고, 이에 따라서 공정 불순물을 나타내기 위해서 벤조나제를 생산 공정에서 사용한다. 상업적인 ELISA(밀리포어사(Millipore))를 사용하여 잔류하는 벤조나제의 농도를 측정한다. 벤조나제의 양은 존재하더라도 미량일 것이기 때문에, 1ng/ml 미만의 농도를 포함하는 다양한 표준품을 사용하여 ELISA를 수행하는 것이 필요하다.

[0447] **v. GC 대 IU의 비**

[0448] GC/IU 비는 산물 일관성의 척도이다. DdPCR 역가(GC/ml)를 "감염성 단위(IU/ml)"로 나누어 계산된 GC/IU 비를 제공한다.

[0449] **w. 오스몰농도, pH 및 외관 시험**

[0450] 오스몰농도 및 pH는 각각 USP <785> 및 USP <791>에 따라서 결정한다. 산물의 외관을 투명도, 색상 및 외부 입자의 부재/존재에 대한 육안 검사에 의해서 결정한다. 산물을 백색 배경 및 흑색 배경에 대해서 관찰한다.

[0451] **실시예 14 - 인간 SMN 발현 AAV 벡터의 고용량 정맥내 투여 이후의 비인간 영장류 및 새끼 돼지에서의 중증 독성**

[0452] 향신경성 AAV 혈청형, 예컨대, AAV9는 고용량으로 정맥내로 투여되는 경우 척추 알과 운동 뉴런을 형질도입시키는 것으로 입증되었다. 이러한 관찰은 척수근 위축증(SMA), 하부 운동 뉴런의 선택적인 사멸을 특징으로 하는 운동 뉴런의 생존(SMN) 단백질의 유전된 결핍을 갖는 영아를 치료하기 위한 정맥내 AAV9 전달의 최근 성공적인 적용으로 이어졌다.

[0453] 이러한 접근법을 사용한 운동 뉴런 형질도입의 효율을 평가하기 위해서, 3마리의 어린 비인간 영장류(NHP; 13 내지 14개월령) 및 3마리의 신생아 새끼 돼지(7 내지 30일령)를 SMA 임상 시험에서 사용되는 것과 유사한 용량으로, 인간 SMN 발현 카세트를 보유하는 AAV 혈청형 9(AAVhu68)와 밀접하게 관련된 인간 SMN 트랜스젠을 보유하는 AAV 벡터의 정맥내 주사로 처리하였다. 척추 운동 뉴런의 형질도입뿐만 아니라 독성의 증거에 대해서 동물을 평가하였다. 2×10^{14} 게놈 카피/킬로그램 체중의 투여는 두 종 모두에서 척추 운동 뉴런의 광범위한 형질도입을 초래하였다. 그러나, NHP 및 새끼 돼지 둘 모두에서 중증 독성이 발생하였다. 모든 3마리의 NHP는 뚜렷한 트랜스아미나제 상승을 나타내었고, 급성 간부전 및 쇼크의 임상적 및 조직학적 징후로 인해서 한 마리의 동물을 주사 5일 후에 안락사시켰다. 후근 신경절의 변성(DRG) 감각 뉴런이 또한 관찰되었지만, NHP는 임상적으로 명백한 감각 결핍을 나타내지 않았다. NHP에서 임상 소견과 벡터 캡시드 또는 트랜스젠 산물에 대한 T-세포 반응 간에는 상관관계가 없었다. 새끼 돼지는 간 독성의 증거를 나타내지 않았지만, 벡터 주사 14일 이내에, 모든 3마리의 동물은 이동성을 극심하게 손상시키고 안락사가 필요한 고유감각 결핍(proprioceptive deficit) 및 운동실조

를 나타내었다. 이러한 임상적 소견은 NHP에서 관찰된 것보다 더 중증의 DRG 감각 뉴런 병변과 상관관계가 있었다. 이러한 종에서의 간 및 감각 뉴런 소견은 캡시드 또는 트랜스젠 산물에 대한 면역 반응과 독립적인 AAV 형질도입의 직접적인 결과인 것으로 보인다. AAV 벡터에 대한 높은 전신 노출을 포함하는 전임상 및 임상 연구는 유사한 독성에 대한 주의 깊은 모니터링을 포함해야 한다.

A. 결과:

1. 비인간 영장류 연구:

3마리의 13 내지 14개월령 레서스 마카크에게 거대세포바이러스 극 초기 인헨서를 갖는 닭 베타 액틴 프로모터의 제어 하에서 인간 SMN을 발현하는 AAVhu68 벡터 2×10^{14} GC/kg의 정맥내(IV) 용량을 투여하였다(표 1).

표 1

실시예 14에 포함된 AAVhu68.CB7.hSMN1로 처리된 레서스 마카크

동물 ID	연령(개월)	중량(kg)	기준선 AAVhu68 nAb 역가	용량	투여 경로
16C116	13	2.52	< 1:5	2×10^{14} GC/kg	IV
16C176	14	2.22	< 1:5	2×10^{14} GC/kg	IV
16C215	14	2.40	< 1:5	2×10^{14} GC/kg	IV

모든 동물은 벡터 주입 동안 안정적인 활력 징후를 나타내었고, 마취로부터 무사히 회복되었다. 연구일 5일에, 동물 16C176은 상당히 비반응성이 되었다. 신체 검사는 창백한 점막, 벡터 투여 시기로부터 대략 15%의 체중 감소, 간비대 및 감지할 수 있는 복수 유동을 확인해주었다. 혈액검사에 대한 이상은 22%의 압축 세포 파괴, 20mg/dL 미만의 글루코스, 75mg/dL의 BUN 및 2mg/dL의 크레아티닌을 포함하였다. 이러한 동물의 상태는 신속하게 악화되었고, 그 다음 안락사시켰다. 완전한 부검을 수행하였다.

혈액을 안락사 시기에 수집하고, 완전 혈청 화학 패널을 수행하였다. 주목할 만한 소견은 저단백혈증, 상당히 증가된 간 효소(AST, ALT, GGTP, ALP), 고빌리루빈혈증, 증가된 혈액 요소 질소(BUN), 증가된 BUN/크레아티닌 비, 고인산혈증, 저혈당증, 저칼슘혈증, 저염소혈증, 저콜레스테롤혈증, 고트라이글리세리드혈증 및 증가된 크레아티닌 포스포카이나제(CPK)를 포함하였다(도 16A 내지 도 16E). 이러한 소견은 관류저하 다음에 예상되는 신장 기능부전과 함께 간부전을 시사하였다. 부검 시에 수집된 샘플은 심하게 용혈되었기 때문에, 온혈구 수치(CBC) 및 응고 패널을 기록하지 않았다.

부검 시에 복강은 대략 44mL의 적색의 장액성 혈액 유체(serosanguineous fluid)를 함유하였다. 복수의 세포학적 평가는 급성 출혈로 인한 누출액과 일치하였다. 간은 넓게 퍼져있고, 단단하고, 황갈색 내지 적색이었는데, 이는 간 실질의 약 95%에 영향을 미치는 조직학적으로 광범위한 간세포 괴사 및 변성에 해당하고, 비교적 정상적인 간 세포 무리는 거의 남아있지 않았다(도 17A 내지 도 17D). 중심소엽에서 중간 영역은 간세포 손실, 변성 및 괴사로 인해서 심한 출혈이 있었다. 추가로, 때때로 사인과 내에 플러그를 형성하고, 간문맥의 내강을 채운 작은 피브린 병소가 존재하였다(급성 피브린 혈전). 피브리노겐에 대한 면역조직화학(IHC)은 사인괴형 피브린 플러그의 존재를 확인해주었다. 피브리노겐 염색은 남아있는 간 실질에서 활성 간세포 괴사의 면적인 문맥주위에서 중간 영역 내에서 강하게 양성이었다. 피브리노겐 염색은 이러한 영역에서 사인괴를 빈번하게 강조하였다. 괴사성 간세포 및 관련 잔해는 또한 강하게 양성이었다.

비장은 넓게 퍼져있고, 단단하고, 출혈이 있었다. 충혈은 조직학적으로 확인되었고, 백비수 내의 배중심은 대규모의 세포 잔해와 함께 림프구가 고갈되었고(림포사이톨리시스(lymphocytolysis)), 두드러지고, 때로는 유리질화된(hyalinized), 높은 키 큰 내피 세정맥(high endothelial venule: HEV)을 가졌다. 유사하게, 흉선의 피질은 두드러진 가염소체 대식세포(tingible body macrophage)와 함께 경증 림포사이톨리시스를 나타내었다. 종합적으로, 장간막 림프절이 넓게 퍼져있었고, 출혈이 있었다. 조직학적으로 여포는 림포사이톨리시스와 함께 배중심 고갈을 나타내었다. 유사한 조직학적 소견이 기타 림프절(턱밑, 직장), 폐 내의 기관지 연관 림프 조직(BALT) 및 결장 및 맹장 내의 장 연관 림프 조직(GALT)을 비롯한, 기타 림프 조직에서 관찰되었다. 직장 간 림프절(mesorectal lymph node)인 것으로 추측되는, 직장과 연관된 림프절은 적혈구의 배출과 일치하는, 피막하

및 수질동(medullary sinus) 적혈구증가증을 가졌다. 림프여포 내의 조직학적 소견은 중증 전신 스트레스를 시사하였다. 조직학적으로, 폐, 쓸개의 외막, 심장, 직장주변(perirectal) 지방 조직 및 유선 부근의 피하 조직에서 급성 출혈 및 부종이 눈에 띄었다. 소장, 맹장 및 직장의 피상 점막은 간헐적인 출혈 및 헤모시데린-보유 대식세포의 피상 응집체와 함께 출혈이 있었다. 폐, 위장관 및 간 내의 출혈 및 부종의 존재는, 이것이 비인간 영장류에서 쇼크 기관으로 공지되어 있기 때문에 쇼크를 시사한다. 췌장 내의 세엽 세포 변성이 관찰되었는데, 이것은 비인간 영장류에서 쇼크의 사례로 또한 보고되어 있다(Khan, N.A., *et al.* Mitigation of septic shock in mice and rhesus monkeys by human chorionic gonadotrophin-related oligopeptides. *Clinical and Experimental Immunology* 160, 466-478 (2010).). 최소 부신피질 단일 세포 변성 및 피사가 부신의 다발충에 존재하였는데, 이것은 전신 질환, 예컨대, 전신 스트레스, 허혈, 출혈 및 염증으로 인한 것일 가능성이 있다. 이 동물의 뇌, 척수, 뇌신경 및 말초 신경에서는 전체 또는 조직학적 소견이 없었다. 어떠한 유의한 소견도 신장에서 관찰되지 않았다.

[0462] 나머지 2마리의 영장류(16C116 및 16C215)는 연구 전체에서 임상적으로 정상이었으며, 28일에 부검이 계획되었다. 연구 전체에서 명시된 시간 지점에 수행된 혈액검사는 5일에 극적인 트랜스아미나제 증가를 나타내었는데, 이것은 7일에 감소되었고, 14일에 정규화되었다(도 16A 내지 도 16E). 2마리의 나머지 영장류 중 하나는 5일에 일시적인 혈소판감소증(혈소판 수치 $24,000/\mu\text{l}$)을 나타내었고; 혈소판은 클럼핑(clumping)으로 인해서 다른 동물에서 정량될 수 없었지만, 말초 도말 상에서 수는 정상적인 것으로 보였다. 혈액검사는 연구 전체에서 달리 주목할 만하지 않았다. 부검 시에, 한 마리의 동물(16C116)의 간은 강조된 소엽 패턴으로 갈색 내지 적색으로 얼룩져있었고; 2마리의 영장류 중 어느 것에서도 다른 어떠한 유의한 이상이 관찰되지 않았다.

[0463] 조직학적으로, 두 영장류 모두의 간은 문맥주위 영역에서 가장 두드러진 최소 다병소성 단일 간세포 피사를 나타내었다(도 17A 내지 도 17D). 추가로, 동물 16C215는 세포질 호염기구증가증, 수포핵 및 간헐적인 분열상(mitotic figure)(재생을 나타냄)과 함께 불규칙적으로 배열된 간세포의 다병소성 응집물을 가졌다. 이러한 간세포 클러스터는 일반적으로 산재된 단핵구 세포 침윤물 및 증식성 섬유모세포(섬유증식증)로 문맥부를 둘러쌌다.

[0464] 2마리의 마지막으로 부검된 영장류(16C215 및 16C116)에서의 조직학적 소견은 신경계, 주로 척수, 차신경절 및 후근 신경절뿐만 아니라 말초 신경, 예컨대, 정중 신경, 요골 신경, 좌골 신경, 경골 신경 및 비골 신경에서 관찰되었다(도 18A 내지 도 18D, 표 2 내지 표 4). 중추 및 말초 신경계 내에서의 조직학적 병변은 보통 가변적이었는데, 동일한 분절 내에서 조직 박편 사이에서 중증도가 상이하였고, 동일한 동물에서 척수 신경의 분절과 말초 신경의 분절 사이에서 중증도가 상이하였다. 후근 신경절(DRG)은 중앙 염색질용해 및 뉴런 세포체를 둘러싸고(위성증) 침윤한(신경세포식현상) 단핵구 세포 침윤물을 특징으로 하는 미세 내지 경증 뉴런 세포체 변성을 나타내었다. 면역조직화학(IHC)을 기초로, 단핵구 세포 침윤물은 CD3-양성 T 세포와 몇몇 CD20-양성 B 세포로 구성되었다. 두 영장류 모두에서, 경추, 흉추 및 요추 척수의 등 백질 신경로는 축삭 변성을 나타내는 골수성대식세포가 있거나 없는 확장성 미엘린초를 특징으로 하는 양측성 미세 내지 중증도의 축삭병을 나타내었다. 때때로, 미세 내지 현저한 축삭병이 척수의 등 신경근에서 관찰되었다. 말초 신경(정중, 요골, 좌골, 비골 및 경골)은 가변적인 단핵구 세포 침윤물 및 축삭주위 섬유증과 함께 경증 내지 현저한 범위의 유사한 축삭병을 나타내었다. 말초 축삭병이 양측성으로 관찰되었지만; 중증도는 박편 마다 그리고 심지어는 일부 신경 박편 내에서 달라졌다.

표 2

인간 SMN 을 발현하는 AAVhu68 이 경맥내로 제공된 영아 비인간 영장류 및 새끼 돼지에서 척수의 등 백질 신경로에서의 축삭병의 발생률 및 중증도 5 일에 부검된 NHP 를 제외하고, 척수에서 등 축삭병의 발생률 및 중증도는 NHP 와 새끼 돼지 사이에서 비교적 유사하였다.

종	영아 NHP	새끼 돼지
군당 평가된 동물의 수	3	3
조사된 수	3	3
척수, 경 추 (C2)		
축삭병, 등 백질 신경로		
존재 하지 않음	1*	-
1 등급	1	1
2 등급	-	1
3 등급	1	1
척수, 흉 추 (T2)		
축삭병, 등 백질 신경로		
존재 하지 않음	1*	-
1 등급	1	1
2 등급	1	2
척수, 요 추 (L2)		
축삭병, 등 백질 신경로		
존재 하지 않음	1*	-
1 등급	1	2
2 등급	-	1
3 등급	1	-

*비계획적 부검 동물 16C176(5 일)을 나타냄

[0465]

표 3

인간 SMN을 발현하는 AAVhu68이 정맥내로 제공된 영아 비인간 영장류 및 새끼 돼지에서 후근 및 차신경절에서의 뉴런 변성의 발생률 및 중증도, 5일에 부검된 NHP를 제외하고, 뉴런 세포체 변성의 발생률은 NHP와 새끼 돼지 사이에서 유사하였지만, 중증도는 NHP에 비해서 새끼 돼지에서 약간 증가되었다.

종	영아 NHP	새끼 돼지
군당 평가된 동물의 수	3	3
후근 신경절, 경추		
조사된 수	3	3
단핵구 세포 침윤물을 갖는 뉴런 세포체 변성		
존재하지 않음	1*	-
1 등급	2	-
2 등급	-	1
4 등급	-	2
후근 신경절, 흉추		
조사된 수	2	3
단핵구 세포 침윤물을 갖는 뉴런 세포체 변성		
존재하지 않음	-	-
1 등급	1	-
2 등급	1	3
후근 신경절, 요추		
조사된 수	3	3
단핵구 세포 침윤물을 갖는 뉴런 세포체 변성		
존재하지 않음	1*	-
1 등급	1	-
2 등급	1	1

[0466]

3 등급	-	2
차신경절		
조사된 수	2	3
단핵구 세포 침윤물을 갖는 뉴런 세포체 변성		
존재하지 않음	-	-
1 등급	2	1
2 등급	-	1
3 등급	-	1

*비계획적 부검 동물 16C176(5일)을 나타냄

[0467]

표 4

인간 SMN을 발현하는 AAVhu68이 정맥내로 제공된 영아 비인간 영장류 및 새끼 돼지에서 말초 신경의 축삭병의 발생률 및 중증도 5일에 부검된 NHP를 제외하고, 말초 축삭병의 발생률은 NHP와 새끼 돼지 사이에서 유사하였지만; 중증도는 새끼 돼지에 비해서 NHP에서 약간 증가되었다.

종	영아 NHP	새끼 돼지
군당 평가된 동물의 수	3	3
조사된 수	3	3
정중 신경		
축삭병		
존재하지 않음	1*	1
1 등급	-	1
2 등급	1	1
3 등급	1	-
비골 신경		
축삭병		
존재하지 않음	1*	2
1 등급	-	-
2 등급	1	-
4 등급	1	1
요골 신경		
축삭병		
존재하지 않음	2*	1
1 등급	-	1
2 등급	-	1
3 등급	1	-
작골 신경		

[0468]

축삭병		
존재하지 않음	1*	1
1 등급	-	1
3 등급	1	1
4 등급	1	-
경골 신경		
축삭병		
존재하지 않음	1*	1
1 등급	-	1
3 등급	1	1
4 등급	1	-

*비계획적 부검 동물 16C176(5일)을 나타냄

[0469]

[0470]

백터 생체내 분포의 분석은 뇌 및 척수를 비롯한, 평가된 모든 조직에서 유전자 전달을 입증하였다(도 19). 특히, 후근 신경절(DRG)은 다수의 샘플에서 10 백터 게놈/세포 초과로 상당히 표적화되었다. 상당히 높은 간 형질 도입은 또한 1000 백터 게놈 카피(GC)/세포 초과로 자명하였다. 백터 게놈 카피는 28일에 부검된 것보다 5일에 부검된 동물에서 더 높은 수준으로 검출되었는데, 이는 주사 후에 초기에 조직에서 검출된 백터 게놈의 일부가 안정적인 형질도입을 나타내지 않음을 시사한다.

[0471]

SMN 발현을 현장 혼성화에 의해서 평가하였다(도 20A 내지 도 20G). 5일에 부검된 동물의 간에서는 인간 SMN mRNA의 현저한 발현이 존재하였지만, 척수 또는 뇌에서는 발현이 검출되지 않았다. 백터 주사 후 28일에 부검된 2마리의 동물은 척수 운동 뉴런에서 강력한 SMN 발현을 나타내었는데, 세포의 대략 30 내지 90%가 평가된 척수의 각각의 수준에서 평균적으로 형질도입되었다. 뇌에서 형질도입된 뉴런 및 상의 세포의 산발적인 패치가 또한 존재하였다.

[0472]

백터 캡시드 및 인간 SMN 트랜스젠 산물에 대한 T 세포 반응을 인터페론 감마 ELISPOT에 의해서 평가하였다(표 5). 3마리의 모든 동물에 대해서 백터 투여 이전 및 부검 시에 말초 혈액 단핵구 세포를 ELISPOT 분석을 위해서 수집하였다. 단핵구 세포를 또한 부검 시에 간으로부터 수거하였다. 동물 16C215로부터 수집된 간 림프구(이것은 PHA 자극에 반응을 나타내지 않아서, 후속 분석으로부터 제외되었음)를 제외하고는, 모든 샘플은 PHA를 사용한 양성 대조군 자극에 대해서 강력한 인터페론 감마 반응을 나타내었다. 동물 16C176 또는 16C215에 대해서 어느 시점에서도 AAVhu68 캡시드 또는 hSMN에 대한 T 세포 반응이 검출되지 않았다. 동물 16C116은 어느 시점에서도 PBMC에서 T 세포 반응을 나타내지 않았지만, 부검 시에 백터 캡시드 및 트랜스젠 산물 둘 모두에 대해서 검출 가능한 인터페론 감마 반응을 가졌다.

표 5

말초 혈액 및 간 림프구에서 AAVhu68 캡시드 및 hSMN 트랜스젠에 대한 T 세포 반응의 IFN 감마 ELISPOT 검출, AAVhu68 VP1 서열(3 개의 펩타이드 풀) 또는 인간 SMN 서열(2 개의 펩타이드 풀)을 포함하는 풀링된 중첩 15량체 펩타이드에 대해서 T 세포 반응을 측정하였다. 값을 스팟 형성 단위(spot forming unit: SFU)/백만개 PBMC로 표현하였다. 별표는 검출 가능한 T 세포 반응을 나타낸다(50SFU 초과 및 비자극된 대조군보다 3배 더 큼). 16C215로부터 단리된 간 림프구는 PHA 자극에 대한 부적절한 반응을 나타내어 분석으로부터 제외시켰다. PHA: 파이토헤마글루티닌, TNTC: 계수하기에 너무 많음.

동물 ID	림프구 공급원	시간 지점	비자극됨	PHA	AAVhu68			hSMN	
					풀 A	풀 B	풀 C	풀 A	풀 B
16C116	말초 혈액	기준선	8	TNTC	5	8	8	8	5
	말초 혈액	부검	3	TNTC	13	8	8	13	3
	간	부검	0	TNTC	28	40	80*	123*	48
16C215	말초 혈액	기준선	0	TNTC	30	13	8	23	15
	말초 혈액	부검	10	TNTC	8	23	18	13	18
16C176	말초 혈액	기준선	25	TNTC	8	18	8	28	18
	말초 혈액	부검	13	1043	8	5	0	20	0
	간	부검	5	1023	5	5	0	3	0

[0473]

[0474]

2. 새끼 돼지 연구

[0475]

7(n=1; 새끼 돼지 A) 또는 30(n=2; 새끼 돼지 B 및 C)일령에서 3마리의 마이크로 유카탄(micro Yucatan) 새끼 돼지에게 2×10^{14} GC/kg AAVhu68.hSMN의 정맥내 용량을 투여하였다(표 6). 모든 동물은 백터 투여 후 사건 없이 회복되었다. 백터 투여 후 연구일 14일에, 새끼 돼지 A에서 뒷다리 운동실조가 발생하였다. 운동실조는 뒷다리의 간헐적인 너클링(knuckling) 및 교차가 동반된 흔들 걸음(swaying gait)을 특징으로 하였다. 뒷발을 배면에 놓았을 때, 새끼 돼지는 발굽을 정확하게 배치시키지 못했는데(배치 시험), 이는 의식적 고유 수용성 감각(conscious proprioception)의 결핍을 나타낸다. 이러한 운동실조는 6시간의 기간에 걸쳐서 앞다리로 진행되었다. 이러한 새끼 돼지는 또한 호흡곤란이 발생하였지만, 모든 폐 부분의 청진은 정상 한계치 이내였다. 임상 징후의 진행을 고려하여, 새끼 돼지를 백터 투여 후 14일에 안락사시키고, 전체 부검을 수행하였다.

표 6

본 연구에 포함된 AAVhu68.CB7.hSMN1로 처리된 마이크로 유카탄 새끼 돼지

동물 ID	연령 (일)	중량(kg)	용량	투여 경로
새끼 돼지 A	7	1.56	2×10^{14} GC/kg	IV
새끼 돼지 B	30	3.35	2×10^{14} GC/kg	IV
새끼 돼지 C	30	4.30	2×10^{14} GC/kg	IV

[0476]

- [0477] 벡터 투여 후 13일에, 30일령 시에 주사된 새끼 돼지는 덜 중증이지만 유사한 신경학적 징후가 발생하였다. 이러한 동물에서 호흡 곤란이 관찰되지 않았다. 새끼 돼지를 안락사시키고, 전체 부검을 수행하였다.
- [0478] 어느 연령군의 새끼 돼지에서도 유의한 중대한 이상이 관찰되지 않았다. 7일령에 주사된 새끼 돼지는 품평에서 부검 시 영양 상태가 불량하였고, 연구일 7일에 설사의 임상 이력을 가졌는데, 이는 근육내(IM) 세프트오포로의 치료 이후에 9일에 해결되었다. 30일령에 주사된 새끼 돼지는 적절한 영양 상태였다. 7일령에 주사된 새끼 돼지(새끼 돼지 A)에게서 안락사 이전에 채취한 혈액으로부터의 온혈구 수치(CBC)는 현저한 호중구증가증($22,468/\mu\text{l}$; 표준 범위: 2,300 내지 11,900/ μl)을 나타내었다. 어떠한 다른 이상도 혈액검사 상에서 주목되지 않았다. 호중구증가증은 가능하게는 박테리아 기관지폐렴의 조직학적 증거에 상응하였다. 30일령에 주사된 새끼 돼지에서 어떠한 유의한 혈액검사 이상도 주목되지 않았다.
- [0479] 모든 동물로부터의 경추, 흉추 및 요추 후근 신경절(DRG)은 단핵구 세포 침윤물과 함께 경증 내지 현저한 뉴런 세포체 변성을 나타내었다(도 21A 내지 도 21D, 표 2 내지 표 4). 뉴런 변성의 조직학적 병변은 밝은 호산구 세포질 구상체 및 중앙 염색질용해를 갖는 세포질 호산구 증가증에서 침윤 단핵구 세포를 갖는 완전 소멸(신경세포식현상)의 범위였다. 유사하게, 덜 심각한 하지만, 모든 동물의 차신경절에서 병변이 관찰되었고, 그 범위는 미세 내지 중등도였다. 모든 새끼 돼지에서, 경추, 흉추 및 요추 척수의 등 백질 신경로는 축삭 변성과 일치하는, 골수성대식세포가 있거나 없는 확장성 미엘린초를 특징으로 하는 미세 내지 중등도의 축삭병을 나타내었다. 이러한 병변의 발생률은 모든 동물에서 동일하였지만; 중증도는 30일령에 주사된 새끼 돼지(새끼 돼지 C) 중 하나에서 약간 감소되었다.
- [0480] 7일령에 주사된 새끼 돼지(새끼 돼지 A)에서, 말초 신경(정중, 요골, 좌골, 비골 및 경골)은 양측성으로 경증 내지 중증의 범위인 척수에 대한 유사한 축삭병을 보유하였다. 놀랍게도, 뒷다리의 말초 신경에서의 축삭병(중증도 내지 현저함)은 앞다리(경증)보다 더 심각하였다. 30일령에 주사된 새끼 돼지에서, 단지 1마리의 동물(새끼 돼지 B)이 비골 신경을 제외한 대부분의 신경에서 미세 말초 축삭병을 가졌다. 다른 30일령에 주사된 새끼 돼지(새끼 돼지 C)의 말초 신경은 조직학적으로 주목할 만하지 않았다. 중추 및 말초 신경계 내에서의 조직학적 병변은 보통 가변적이었는데, 중증도는 보통 동일한 동물의 조직 박편 사이에서 그리고 그 내에서 뿐만 아니라 척수의 상이한 분절 사이에서 상이하였다. 어떠한 조직학적 이상도 뇌 또는 간에서 주목되지 않았다.
- [0481] 일반적으로, 말초 신경 병변의 발생률 및 중증도는 7일령에 주사된 새끼 돼지와 비교할 때 30일령에 주사된 새끼 돼지에서 감소되었는데, 이는 더 늙은 동물에서 관찰되는 덜 심각한 신경학적 징후와 일치하였다. 추가로, 척수 병변의 중증도 및 말초 신경 병변의 발생률은 30일령에 주사된 새끼 돼지 중 하나(새끼 돼지 C)에서 가장 낮았는데, 이것은 또한 두 연령 군 모두에서 새끼 돼지의 적어도 중증 신경학적 징후를 가졌다.
- [0482] 벡터 계놈은 뇌 및 척수를 비롯하여 분석된 모든 조직에서 검출 가능하였다(도 22). DRG에 대한 유전자 전달은 척수에 대한 것보다 일반적으로 더 높고, 보통 숙주 이배체 계놈(dg)당 1백터 GC를 초과한다. 최고 벡터 계놈 카피 수는 간에서 발견되었는데, 모든 3마리의 동물로부터의 간 샘플에서 대략 200GC/dg였다. 평가된 조직에 대한 유전자 전달의 효율의 주사 시 연령 영향은 명백하지 않았다.
- [0483] 인간 SMN mRNA의 발현은 모든 3마리의 동물의 척수 전체에서 운동 뉴런에서 ISH에 의해서 검출되었다(도 23A 및 도 23). 대부분의 운동 뉴런은 모든 동물에서 형질도입된 것으로 보였고, 7일령 새끼 돼지와 30일령 새끼 돼지 사이에서의 형질도입 차이는 명백하지 않았다.
- [0484] B. 논의:
- [0485] 본 실시예에서, 고용량의 인간 SMN을 발현하는 AAV 벡터의 정맥내 투여는 새끼 돼지 및 어린 NHP에서 예상치 못한 독성을 초래하였다. 간 독성은 NHP에 제한된 반면, 감각 뉴런 변성은 두 종 모두에서 발생하였다. 동일한 벡터 용량으로 처리된 새끼 돼지에서 간에 대한 대략 5배 더 낮은 유전자 전달은, 이러한 종에서의 AAV의 더 낮은 간 굴성이 NHP에서 관찰된 간 독성의 부재를 설명할 수 있다는 것을 시사한다. 3마리 모두의 NHP는 벡터 투여 이후에 간 효소 및 빌리루빈의 신속한 증가가 발생하였다. 가장 두드러진 트랜스아미나제 증가를 갖는 동물은 또한 간에서의 대규모의 피브린 침착, 광범위한 출혈 및 명백한 자발적인 복강내출혈과 함께 응고장애의 증거를 나타내었지만, 응고 연구는 부검 시에 수행될 수 없어서, 이러한 소견의 해석을 제한한다. 광범위한 출혈과 연관된 간에서의 피브린 침착의 존재는 파종성 혈관내 응고(disseminated intravascular coagulation: DIC)를 시사하였다. 그러나, 피브린 침착은 실제 DIC와 일치하지 않는, 간 외부에서 주목되지 않았다. 소견은 아세트아미노펜 독성에 의해서 유발되는 급성 간부전에서 기술된 것과 유사한 것으로 보이는데, 이것은 간내 응고로 이어지는 간에서의 신속한 간세포 변성 및 조직 인자 제시를 특징으로 한다(예를 들어, 문헌[Ganey, P.E., et al.

Role of the coagulation system in acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. *Hepatology* 46, 1177-1186 (2007); Kerr, R. New insights into haemostasis in liver failure. *Blood coagulation & fibrinolysis: an international journal in haemostasis and thrombosis* 14 Suppl 1, S43-45 (2003); Payen, C., Dachraoui, A., Pulce, C. & Descotes, J. Prothrombin time prolongation in paracetamol poisoning: a relevant marker of hepatic failure? *Human & experimental toxicology* 22, 617-621 (2003); 및 James, L.P., Wells, E., Beard, R.H. & Farrar, H.C. Predictors of outcome after acetaminophen poisoning in children and adolescents. *The Journal of pediatrics* 140, 522-526 (2002)] 참고). 이것은 보통 간내 응고에 의해서 유발되는 응혈 인자 소모에 관련될 수 있는 응고장애, 간부전으로 인한 응혈 인자 합성의 감소 또는 이들의 조합과 연관된다(예를 들어, 상기에 인용된 문헌[Ganey et al, 2007 및 Kerr, 2003] 참고). 1마리의 동물에서 5일에 일시적인 혈소판감소증은 또한 간내 응고에 관련될 수 있다. 또 다른 가능한 설명은 부수적인 결과로서 혈소판 활성화, 혈관내 응고, 쇼크 및 간 기능장애와 함께 고용량 AAV에 의한 전신 염증 반응의 활성화일 수 있다. 간 손상이 이러한 캐스케이드의 초기 원인인지 또는 부수적인 결과인지의 여부를 결정하기 위해서 연구를 수행하는데, 그 이유는 AAV 벡터의 간 굴성을 감소시키기 위한 시도는 전자의 경우에는 유리할 수 있지만, 후자에서는 유리하지 않기 때문이다. 이러한 가능성을 구별하기에 불충분한 데이터가 본 실시예로부터 입수 가능하여, AAV 벡터에 대한 높은 전신 노출 후 간 독성의 병태생리학을 완전히 설명하기 위해서 추가 연구가 조사되고 있다.

[0486] AAV 투여 이후의 DRG 변성은 보고되지 않았지만, DRG에 대한 강한 굴성이 일부 연구에서 주목되었다(문헌[Gray, S.J., Kalburgi, S.N., McCown, T.J. & Samulski, R.J. Global CNS gene delivery and evasion of anti-AAV-neutralizing antibodies by intrathecal AAV administration in non-human primates. *Gene therapy* 20, 450-459 (2013)] 참고). 본 실시예에서 관찰된 병변은 DRG 감각 뉴런 세포체뿐만 아니라 이의 중추 및 말초 축삭 돌기의 변성으로 이루어졌다. 이들 병변은 유전자 전달 5일 초과 이후에 나타나는 것 같은데, 그 이유는 이것이 처리 5일 후에 회생시킨 NHP에서는 존재하지 않았고, 임상적 징후는 먼저 벡터 투여 13 내지 14일 후에 새끼 돼지에서 나타났기 때문이었다. DRG 병변은 NHP보다 돼지에서 약간 더 중증인 반면, 척수 및 말초 신경에서 감각 축삭 돌기의 변성은 NHP와 비교할 때 유사하거나 또는 돼지에서 훨씬 더 경증이었는데, 이의 관찰은 죽어가는 세포와 연관된 모든 축삭 돌기의 변성을 허용하지 않았을 수 있는 돼지에서 초기 부검 시점에 의해서 설명될 수 있다. 감각 결핍은 돼지에서는 자명하였지만, NHP에서는 자명하지 않았는데, 이는 NHP에서 DRG 병변의 정도가 임상적인 징후가 나타나는 역치 미만으로 낮아진다는 것을 시사한다. 두 종에서 영향을 미치는 감각 섬유 유형은 특징규명되지 않았다. 새끼 돼지에서 주목된 결핍을 기초로 고유 수용성 감각은 영향을 받는 것으로 보였으며; 다른 감각 섬유에 대한 영향은 명확하지 않았고, 후속 연구에서 추가로 특징규명된다.

[0487] 신생 항원에 대한 T 세포 반응은 동물 모델에 대한 이중 인간 트랜스젠의 전달을 평가하는 임의의 연구에서 또는 열성 질환에 대한 유전자 요법의 임상 연구에서 독성의 이론적인 원인이다. 또한, 형질도입된 세포에 의해서 MHC 클래스 I 상에 교차 제시된 캡시드 유래된 펩타이드는 AAV-매개된 유전자 전달 이후에 세포독성 T 세포 반응에 대한 잠재적인 표적으로서 식별되었다(예를 들어, 문헌[Manno, C.S., et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* 12, 342-347 (2006); and Martino, A.T., et al. Engineered AAV vector minimizes in vivo targeting of transduced hepatocytes by capsid-specific CD8+ T cells. *Blood* 121, 2224-2233 (2013)] 참고). 이러한 후자 기전은 전신 AAV 전달의 일부 임상 시험에서 관찰된 트랜스아미나제 증가에 책임이 있는 것으로 제안되었고, T 세포 반응을 억제하기 위한 글루코코티코이드의 투여가 이러한 위험을 완화시키기 위해서 사용되었다(예를 들어, 문헌[Manno et al, 2006 as cited above and George, L.A., et al. Hemophilia B Gene Therapy with a High-Specific-Activity Factor IX Variant. *New England Journal of Medicine* 377, 2215-2227 (2017)] 참고). 본 실시예에서, NHP에서 트랜스아미나제 증가는 캡시드 또는 트랜스젠 산물에 대한 T 세포 반응과 상관관계가 없는 것으로 보였다. 벡터 캡시드 및 트랜스젠 산물에 대한 T 세포 반응은 간에서 수거된 림프구에서는 검출되었지만, 하나의 동물의 말초 혈액에서는 검출되지 않았는데, 이는 반응이 두 항원 모두에서 일어날 수 있지만 말초 혈액에서 측정된 반응은 표적 기관 내에서 발생한 것을 항상 반영할 수 있는 것은 아닐 수 있음을 입증한다. 그러나, 가장 중증 독성을 갖는 동물은 말초 혈액 또는 간 림프구 중 어느 것에서도 검출 가능한 T 세포 반응을 갖지 않았고, 현저한 트랜스아미나제 증가를 나타낸 또 다른 동물은 말초 혈액에서 T 세포 반응을 나타내지 않았다. 또한, 간 독성의 신속한 발병(5일 이내)은 미경험 숙주에서 T 세포 반응과 일치하지 않는다. T 세포 반응의 부재 하에서의 간 독성의 소견은 대안적인 기전이 간 손상에 대한 책임이 있음을 시사한다. 가능성은 엔도솜 경로 내의 벡터 캡시드의 대규모 축적에 의해서 유발되는 독성, 다수의 벡터 게놈의 전달에 의한 DNA 손상 반응의 유도, 극히 높은 수준으로 발현되는 트랜스젠 산물의 독성 또는 높은 수준의 트랜스젠 발현에 의해서

유발되는 숙주 유전자의 정상적인 전사 및 번역의 손상을 포함할 수 있다. 이러한 독성이 SMN 트랜스젠에 대해서 특이적인지의 여부는 전임상 연구에서 쉽게 시험될 수 있고; 다른 가능성을 평가하는 것은 보다 광범위한 연구가 필요하다. 녹색 형광 단백질 트랜스젠을 보유하는 동일한 용량의 상이한 AAV 혈청형으로 처리된 성체 NHP에서 중증 간 독성, 응고 이상, 혈소판감소증 및 쇼크가 관찰되었는데, 이는 이러한 소견이 AAVhu68 벡터 또는 SMN 트랜스젠에 고유하지 않음을 입증한다(데이터 나타내지 않음). 중요하게는, 인간에서 발생하는 간 독성의 비면역 매개 기전이 존재하는 경우, 현재 임상 시험에 도입되고 있는 글루코코티코이드 투여 프로토콜은 이러한 위험을 완화시키는 데 효과적이지 않을 수 있다.

[0488] AAV 유전자 요법의 분야에 대한 중요한 질문은 이 연구에서 관찰된 독성이 인간에 대해서 번역되는지, 그렇다면, 어느 동물 모델이 유익한 전임상 안전성 연구를 허용하기에 충분하게 독성을 예측하는지에 관한 것이다. 유사한 용량의 밀접하게 관련된 AAV9 벡터로 처리된 일부 SMA 환자는 현저한 간 독성을 나타내었는데, 이는 본 연구에서 간 소견이 인간에게 적용 가능할 수 있고, 마카크가 예측 모델일 수 있다는 것을 시사한다. 본 실시예에서 관찰된 DRG 독성이 인간에 대해서 번역되는지의 여부를 결정하기는 더 어렵다. SMA 임상 시험에서 감각 증상은 보고되어 있지 않지만, 일상적인 평가에서 NHP에서의 것과 유사한 임상발현(subclinical) 병변이 주목되지 않을 수 있다.

[0489] 현재 소견은 매우 높은 용량의 AAV 벡터의 전신 투여의 안전성에 대한 중요한 질문을 제기한다. 본 실시예에 나타난 결과는 고용량의 AAV가 중요한 표적 세포, 예컨대, 하부 운동 뉴런을 효과적으로 형질도입할 가능성을 뒷받침하지만, 필요한 용량이 상당한 독성과 연관될 수 있음을 입증한다. 10배 더 낮은 용량의 AAV9 벡터를 갖는 성체 NHP는 이전에 치료되었고, 상당한 운동 뉴런 형질도입 및 독성이 관찰되지 않았는데, 이는 운동 뉴런을 표적으로 하는 전신 AAV의 치료 지수는 매우 좁을 수 있음을 입증한다(예를 들어, 문헌[Hinderer, C., et al. Widespread gene transfer in the central nervous system of cynomolgus macaques following delivery of AAV9 into the cisterna magna. Molecular therapy. Methods & clinical development 1, 14051 (2014)] 참고). SMA 임상 시험에서 보고된 트랜스아미나제 증가와 유사하게, 본 연구에서 동일한 벡터 용량으로 처리된 NHP는 간 독성의 중증도에서 대상체간 변동을 나타내었고, 2/3의 NHP는 무증상 실험실 이상만을 갖는 효과적인 유전자 전달을 나타내었다. 이는, 고 용량 전신 AAV가 일부 환자에서 안전하고 효과적일 수 있지만, 이상점(outlier)에서 좁은 치료 지수 및 소견의 중증도는 다수의 환자가 치료될 때 중증 독성의 사례가 출현한다는 것을 의미할 수 있다.

[0490] 본 실시예에서 관찰된 간 및 감각 뉴런 독성의 기전 및 인간 각각의 관련성을 이해하기 위해서 연구가 진행되고 있다. 현재, 비인간 영장류 실험은 고용량 전신 AAV 투여와 연관된 간 및 신경 독성을 평가하는 데 유익할 수 있고, 이러한 연구는 임상이 진행되기 이전에 수행되어야 한다. 임상 시험에서, 감각 신경병증의 증상에서와 같이, 간 독성은 주의 깊게 평가되어야 한다. 체성 감각 유발 전위 및 신경 전도 연구를 비롯한 감각 뉴런에 대한 독성의 객관적인 평가가 또한 중요할 수 있다. 트랜스아미나제 증가 또는 독성의 다른 징후가 AAV 임상 시험에서 발견되는 경우, 면역 기전 및 비면역 기전 둘 모두가 책임이 있을 수 있기 때문에, 연구자들은 광범위한 개별 진단을 유지해야 한다.

[0491] C. 물질 및 방법:

[0492] 동물 절차: 펜실베이니아 대학교의 실험 동물 운영 위원회에 의해서 모든 동물 절차를 승인받았다. 정맥내 벡터 투여의 경우, 벡터를 멸균 인산염 완충 염수 중에 희석시키고, 복재 정맥(saphenous vein)(NHP) 또는 귀 정맥(새끼 돼지)을 통해서 10분에 걸쳐서 주입하였다. 펜토바르비탈 과용량으로 안락사를 수행하였다.

[0493] 조직학: 조직을 프로토콜에 따라서 폼알린 중에서 고정시키고, 파라핀 포매시키고, 박편화하고, 헤마톡실린 및 에오신으로 염색하였다. 피브리노젠 IHC를 또한 종래의 방법에 따라서 수행하였다.

[0494] 현장 혼성화(ISH)를 폼알린-고정된 파라핀-포매된 조직 상에서 24시간의 고정 시간을 초과하지 않은 시간 동안 ViewRNA ISH 조직 검정 키트(써모 피셔사)를 사용하여 제조사의 프로토콜에 따라서 수행하였다. Z 형상의 프로브 쌍으로 이루어진 프로브를 키트 제조사에 의해서 합성하였다. 코돈-최적화된 인간 SMN에 대해서 특이적인 프로브를 단독으로 또는 운동 뉴런을 위한 마커로서의 레서스 또는 돼지 CHAT에 대한 프로브와 조합하여 사용하였다. 결합된 SMN 프로브를 로다민 필터 세트와 영상화된 Fast Red 침전물의 형성에 의해서 검출하였다. 키트 제조사의 설명서에 따라서 제조된 커스텀 필터 세트(에이브이알 옵틱스사(AVR Optics), 미국 뉴욕주 로체스터 소재)로 영상화된 Fast Blue 침착물을 통해서 CHAT 프로브를 검출하였다. 박편을 DAPI로 대비염색하여 핵을 나타낸다.

- [0495] 벡터 생산: AAVhu68 벡터를 부착성 HEK293 세포의 삼중 형질주입에 의해서 생산하였다. 벡터를 *POROS*^(상표명) CaptureSelect^(상표명) AAV9 수지를 사용하는 친화도 크로마토그래피에 의해서, 그 다음 음이온 교환 크로마토그래피에 의해서 세포 상청액으로부터 정제하여 중공 캡시드 및 기타 불순물을 제거하였다.
- [0496] 벡터 생체내 분포: 부검 시에 조직을 벡터 생체내 분포 분석을 위해서 드라이아이스 상에서 동결시켰다. DNA를 추출하였고, 벡터 게놈을 이미 기술된 바와 같이 TaqMan PCR에 의해서 정량하였다(문헌[Wang, L., et al. Impact of pre-existing immunity on gene transfer to nonhuman primate liver with adeno-associated virus 8 vectors. Human gene therapy 22, 1389-1401 (2011)] 참고).
- [0497] ELISPOT: 인터페론 감마 ELISPOT를 이미 기술된 바와 같이 수행하였다(문헌[Brantly, M.L., et al. Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106, 16363-16368 (2009)] 참고). 인간 SMN 및 AAVhu68 VP1 펩타이드 라이브러리는 2개(SMN) 또는 3개(AAVhu68) 폴로 분할된 5개의 아미노산에 의해서 중첩된 15량체 펩타이드로 이루어졌다.
- [0498] 본 명세서에 인용된 모든 공개 문헌은 미국 가특허 출원 제62/618,437호(출원일 2018년 1월 17일), 미국 가특허 출원 제62/515,902호(출원일 2017년 6월 6일) 및 미국 가특허 출원 제62/464,756호(출원일 2017년 2월 28일)와 같이 본 명세서에 참고로 포함된다. 유사하게, 본 명세서에 언급되고, 첨부된 서열 목록 서열번호(파일명 17-7988PCT_ST25.txt)는 참고로 포함된다. 본 발명이 특정 실시형태를 참고로 기술되어 있지만, 본 발명의 사상을 벗어나지 않으면서 변형이 행해질 수 있음이 인식될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구범위의 범주 내에 포함 되도록 의도된다.
- [0499] (서열 목록 프리 텍스트)

[0500] 하기 정보는 번호 식별인자 <223> 하의 서열 함유 프리 텍스트를 제공한다.

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
1	<223>engineered sequence encoding human SMN variant D protein <220> <221> CDS <222> (1)..(882)
2	<223>Synthetic Construct
4	<223>Engineered hSMN transgene G2
5	<223> Engineered SMN transgene G3
6	<223> Engineered SMN transgene G4
7	<223> AAVhu68 vp1 coding sequence <220> <221> CDS <222> (1)..(2211) <223> AAVhu68 vp1
8	<223>Synthetic Construct
9	<223> AAVhu68 rep coding sequence <220>

[0501]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<221> CDS <222> (1)..(1866)
10	<223>Synthetic Construct
15	<223> AAV.CB7.CI.hSMN vector genome <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> AAV2- 5'ITR <220> <221> promoter <222> (197)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> promoter <222> (582)..(863) <223> CB promoter <220> <221> Intron <222> (958)..(1930) <223> CMV IE promoter <220> <221> misc_feature <222> (1948)..(2829) <220> hSMN coding sequence <221> polyA_signal <222> (2914)..(3040) <220>

[0502]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<221> repeat_region <222> (3129)..(3258) <223> AAV2- 3'ITR
16	<223> Encoded AAV9 vp1 amino acid sequence <220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(137) <223> encoded vp1-unique region <220> <221> MISC_FEATURE <222> (1)..(736) <223> encoded vp1 amino acid sequence <220> <221> MISC_FEATURE <222> (138)..(736) <223> encoded amino acid sequence of alternative splice variant vp2 protein <220> <221> MISC_FEATURE <222> (203)..(736) <223> encoded amino acid sequence of alternative splice variant vp3 protein
17	<223> Encoded AAVrh10 vp1 amino acid sequence
18	<223> Encoded AAVhu31 vp1 amino acid sequence
19	<223> Encoded AAVhu32 vp1 amino acid sequence
20	<223> AAVhu31 vp1 coding sequence

[0503]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
21	<223> AAVhu32 vp1 coding sequence
22	<223> AAV9 vp1 coding sequence
23	<223> Primer prm504
24	<223> Primer prm505
25	<223> AAV.CB7.CI.hSMN vector genome <220> <221> repeat_region <222> (1)..(130) <223> 5'TTR <220> <221> promoter <222> (198)..(579) <223> CMV IE promoter <220> <221> promoter <222> (582)..(862) <223> CB promoter <220> <221> TATA_signal <222> (836)..(839) <220>

[0504]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<221> Intron <222> (956)..(1928) <223> Chicken beta-actin intron <220> <221> misc_feature <222> (1946)..(2827) <223> hSMN coding sequence <220> <221> polyA_signal <222> (2912)..(3038) <223> Rabbit globin polyA <220> <221> repeat_region <222> (3127)..(3256) <223> 3'ITR
26	<223> modified hu68vp1 <220> <221> MISC_FEATURE <222> (23)..(23) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (35)..(35)

[0505]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (57)..(57) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (66)..(66) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (94)..(94) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (97)..(97) <223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (107)..(107)

[0506]

서열 번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p><223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.</p> <p><220></p> <p><221> misc_feature</p> <p><222> (113)..(113)</p> <p><223> Xaa can be any naturally occurring amino acid</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (149)..(149)</p> <p><223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorilated S</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (149)..(149)</p> <p><223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (247)..(247)</p> <p><223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (253)..(253)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p>

[0507]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (259)..(259)</p> <p><223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid (alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of alpha- and gamma-glutamic acid</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (270)..(270)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (297)..(297)</p> <p><223> Xaa represents D (Asp, aspartic acid) or amidated D to N (Asn, asparagine)</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (304)..(304)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p>

[0508]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<222> (306)..(306) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine). <220> <221> MISC_FEATURE <222> (314)..(314) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (319)..(319) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (329)..(329) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (332)..(332) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K <220> <221> MISC_FEATURE

[0509]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p><222> (336)..(336)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (384)..(384)</p> <p><223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (404)..(404)</p> <p><223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (409)..(409)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (436)..(436)</p> <p><223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (452)..(452)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or</p>

[0510]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p>Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (477)..(477)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (499)..(499)</p> <p><223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (512)..(512)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (515)..(515)</p> <p><223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (518)..(518)</p> <p><223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M</p>

[0511]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (524)..(524)</p> <p><223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (559)..(559)</p> <p><223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (569)..(569)</p> <p><223> Xaa may be T (Thr, threonine), or Phosphorylated T</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (586)..(586)</p> <p><223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S</p> <p><220></p> <p><221> MISC_FEATURE</p> <p><222> (599)..(599)</p> <p><223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid (alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of alpha- and gamma-glutamic acid</p>

[0512]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<220> <221> MISC_FEATURE <222> (605)..(605) <223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (619)..(619) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine). <220> <221> MISC_FEATURE <222> (628)..(628) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (640)..(640) <223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (651)..(651) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220>

[0513]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	<221> MISC_FEATURE <222> (663)..(663) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (666)..(666) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K <220> <221> MISC_FEATURE <222> (689)..(689) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K <220> <221> MISC_FEATURE <222> (693)..(693) <223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K <220> <221> MISC_FEATURE <222> (695)..(695) <223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W. <220> <221> MISC_FEATURE <222> (709)..(709) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or

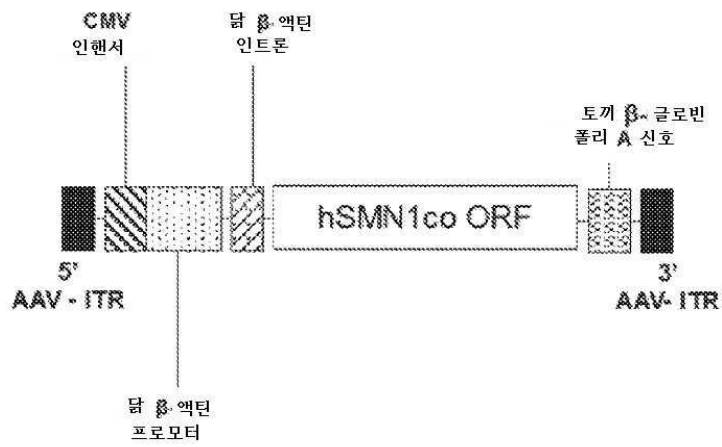
[0514]

서열번호(프리 텍스트 함유)	Free text under <223>
	Asp/isoAsp <220> <221> MISC_FEATURE <222> (735)..(735) <223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

[0515]

도면

도면 1a



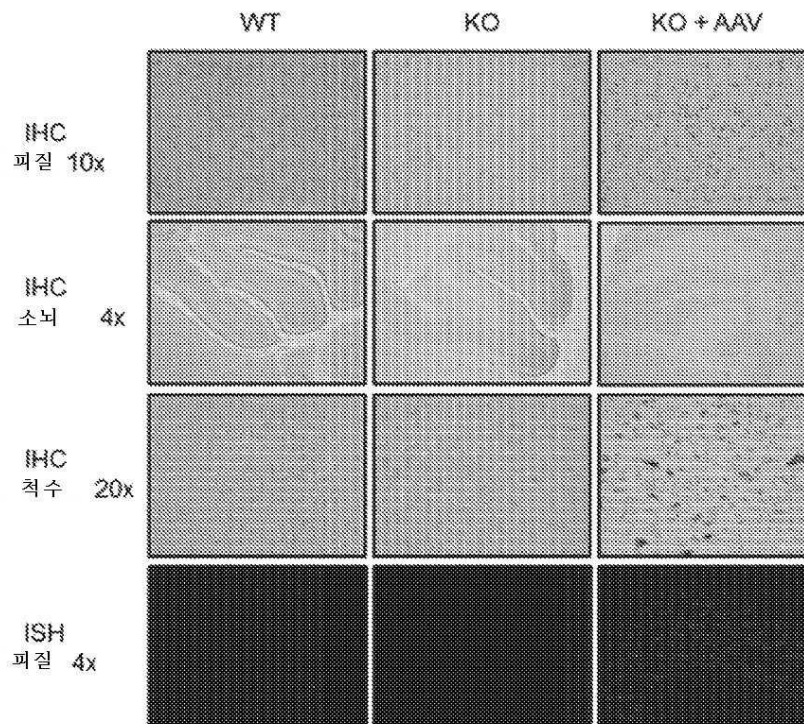
도면 1b

의문	1	ATGCCGATAGACAGCGCGGCAGTGGTGCGCCGTCCCAGGACAGGAGGATTCCCTGCTG	60
대상	1	ATGCCCATGTGAGAGTGGGGCAGTGGAGGGGAGTGCCAGAACAGGAAGATTCCCTGCTG	60
의문	61	TTCGGCGCGCGCACAGGCCAGAGCGATGATTCTGACATTTCGGGATGATACAGCACTGATA	120
대상	61	TTCAGGCGAGGAACCGGGCAGAGTGACGACAGTGCACATTTCGGGACGACACGGCCCTGATC	120
의문	121	AAAGCATATGATAAAGCTGTGGCTTCATTTAAGCATGCTCTAAAGAAATGGTGACATTGT	180
대상	121	AAGGCCATATGACA AAGCCGTGGCCTCCTTCAAGCACCGCGTGAAGAACGGCGACATTGC	180
의문	181	GAAACTTCGGGTTAACCCBBSBBBCBCCCBGBABBBBBAACCTGCTGAGGAGGATBAAGG	240
대상	181	GAAACCAGCGGCAGCCCTAAGACCACCCCTAAACGGAAGCCCGCCAAGAAAAATAAGTCC	240

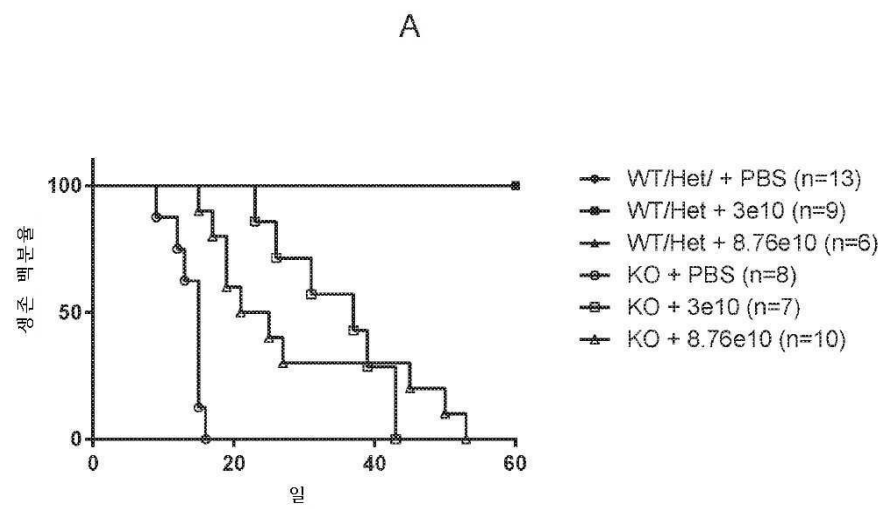
도면1c

의문	241	csaaagagaggaatTACTGCAGCTTCCTTACAAACAGTGGAAGTTGGGGACAAATGTTCTGCGC	300
대상	241	CAGAAAAGAGAACACAGCCCGCAAGTCTTCAGCAATGGAAGGTGGGGGATAAGTGCTCCGCG	300
의문	301	ATTTGGTGAGAAGACGGTTGCATTACCCAGCTACCATTTGCTTCAATTGATTTTAAGAGA	360
대상	301	ATATGGAGTGAAGACGGGTGCATCTATCCTGCCACCATCGCCAGCATAACTTCAAGCGC	360
의문	361	GAAACCTGTGTTGTGTTTACACTGGATATGGAAATAGAGAAGGCAAAATCTGTCCGAT	420
대상	361	GAAACCTGCTGTGTGTGTACACTGGATACGGGAACCGGGAAGAGCAGAACCTGAGCGAC	420
의문	421	CTACTTTCCCAATCTGTGAAGTAGCTAATAATATAGAACAAAATGCTCAAGAGAAATGAA	480
대상	421	CTGTTTAGCCCTATTTTGTGAGGTGGCCAACAACATCGAGCAGAAATGCGCAAGAAAATGAA	480
의문	481	AATGAAAGCCAAAGTTTCAACAGATGAAAGTGAGAACTCCAGGTCTCCTGGAAATAAATCA	540
대상	481	AACGAGAGTCAAGGTGTCCACCGATGAGAGTGAAACAGTAGGAGCCCGGCAACAAATCC	540
의문	541	GATAACATCAAGCCCAAAATCTGCTCCATGGAACTCTTTCTCCCTCCACCCGCCCAATG	600
대상	541	GACAATATCAAGCCCAAAAGCGCACCTCGGAATAGCTTCCTTCCACCCGCCGCCCAATG	600
의문	601	CCAGGGCCCAAGACTGGGACCAAGGAAAG	627
대상	601	CCCGGACCTCGACTGGGCCCCCGGAAAG	627

도면2



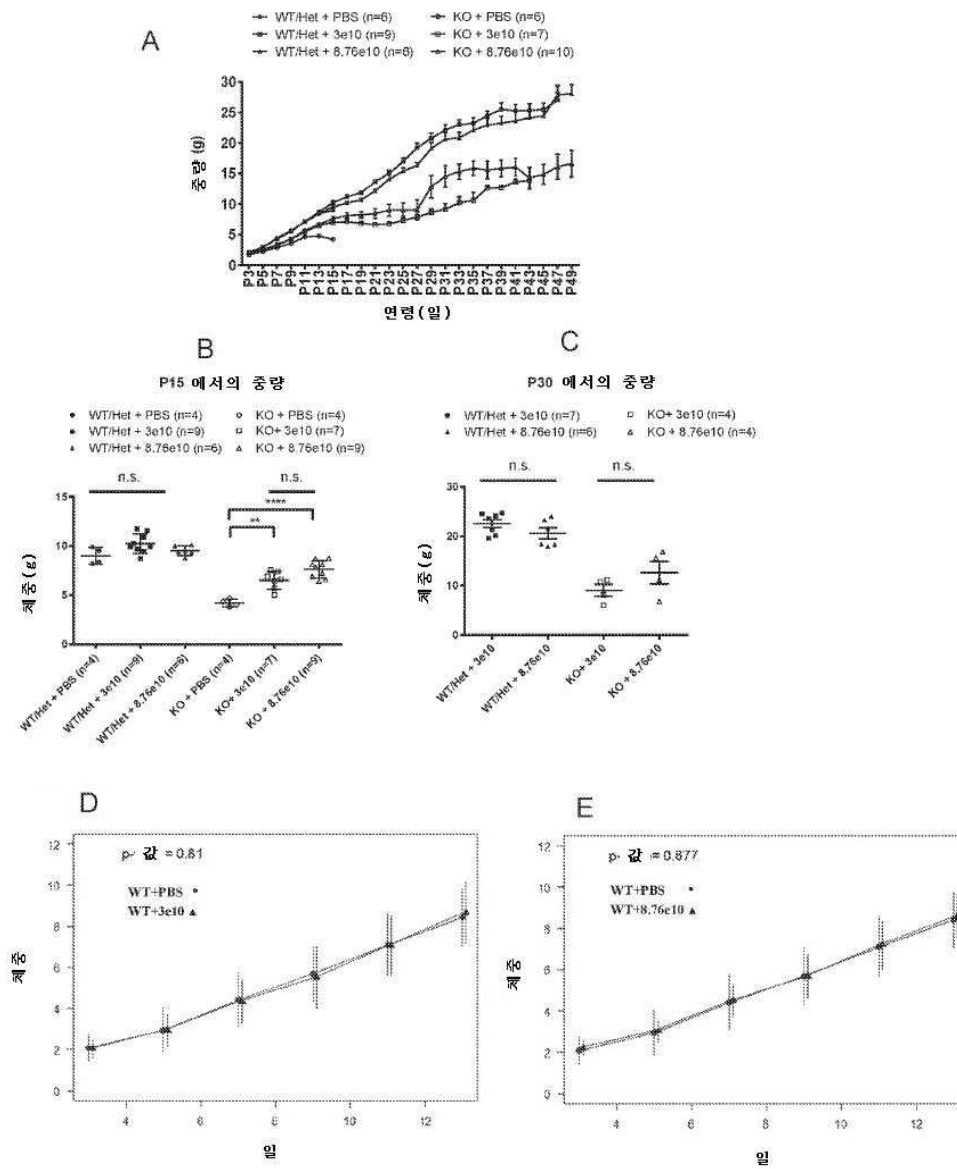
도면3



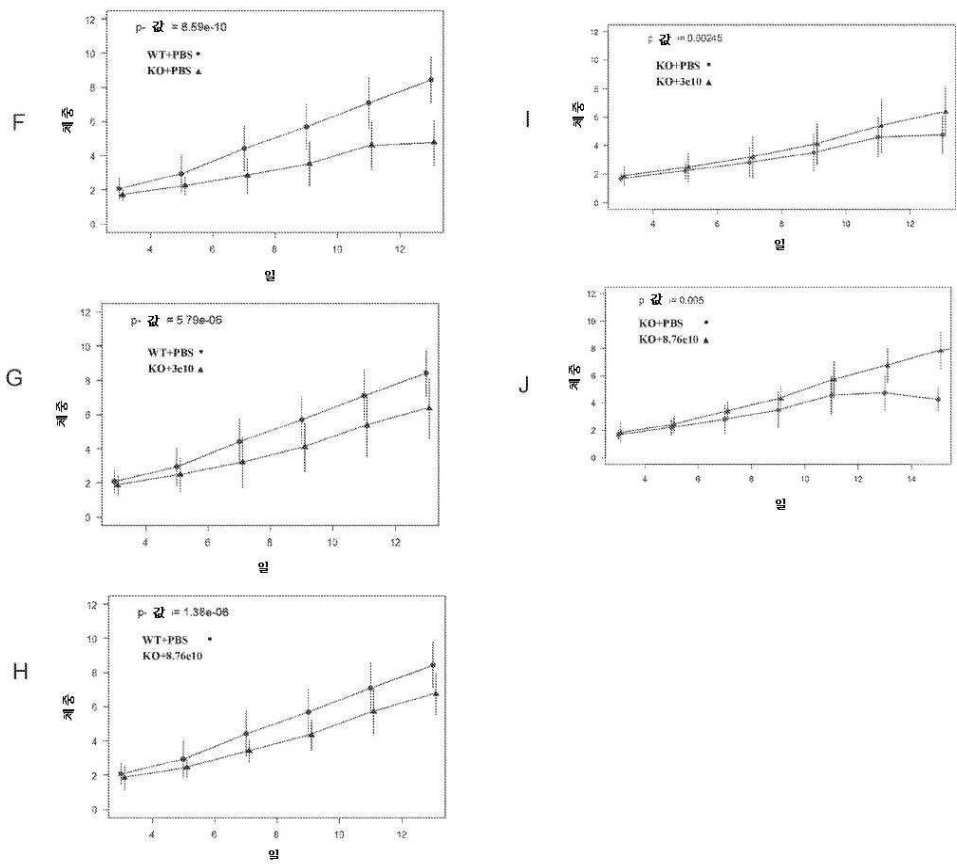
B

GC/ 새끼 (1.5g 새끼)		KO + PBS (n=8)	KO + 3e10 (n=7)	KO + 8.76e10 (n=10)
hu68.CB.hSMN	중위 생존 (일)	15	37	23

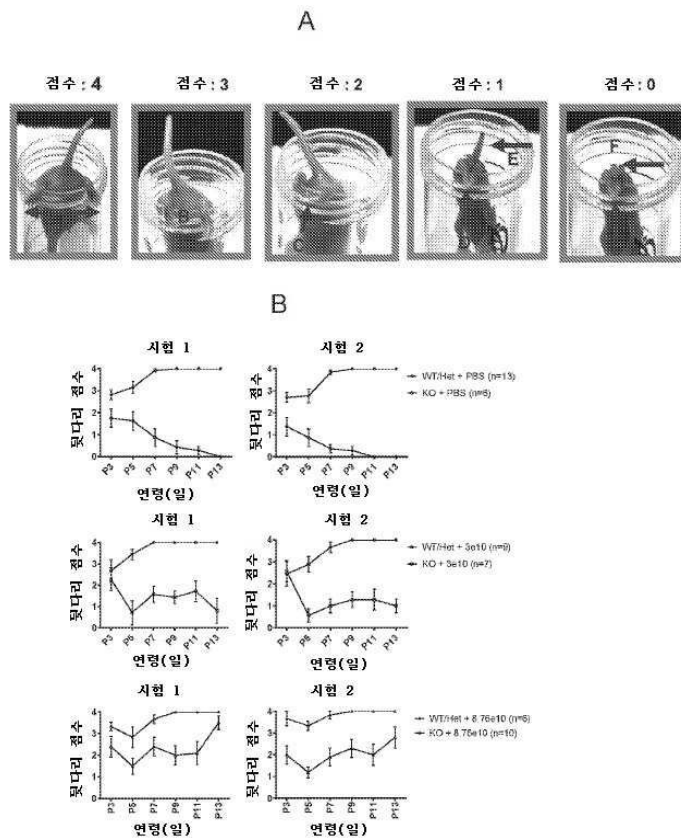
도면4ae



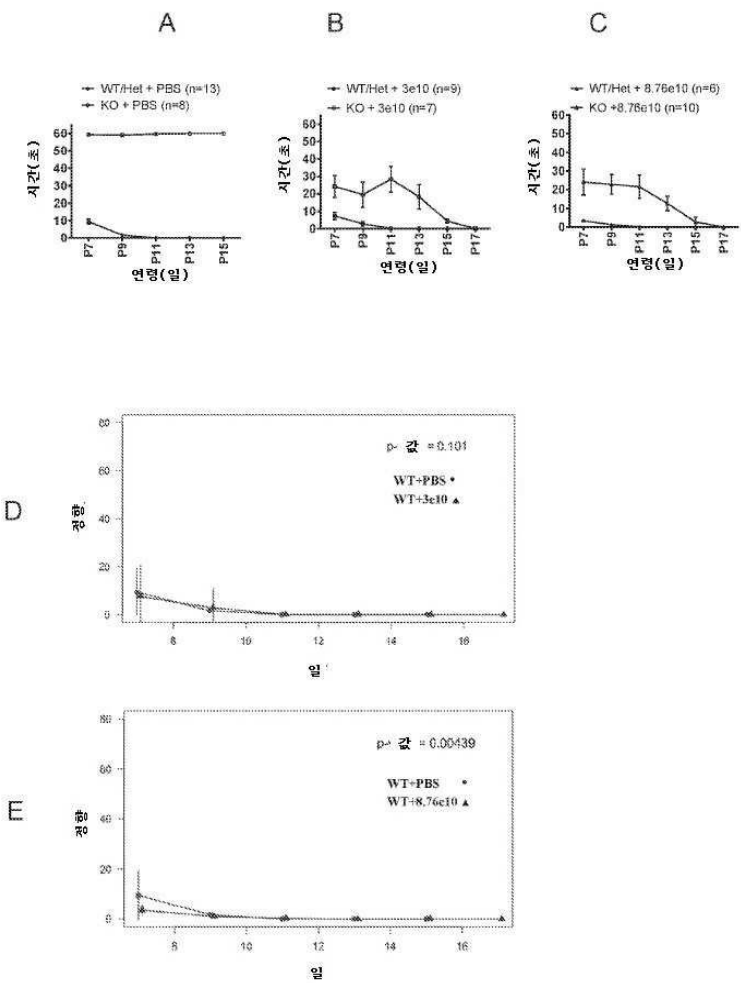
도면4fj



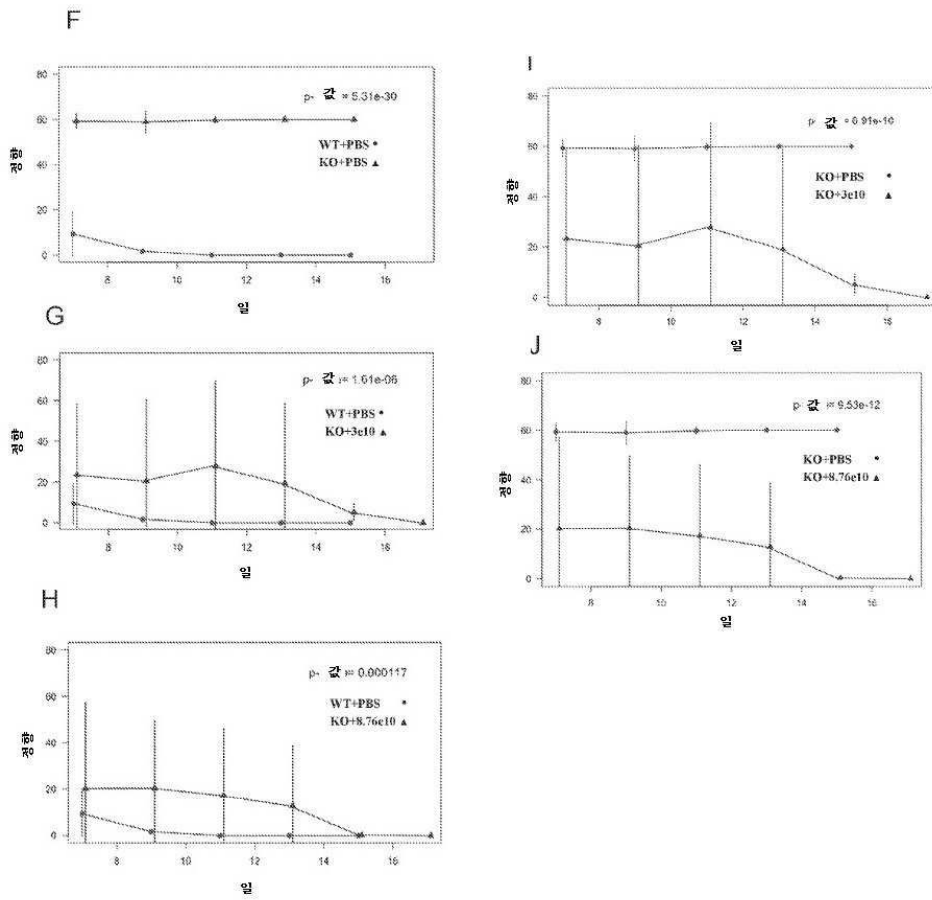
도면5



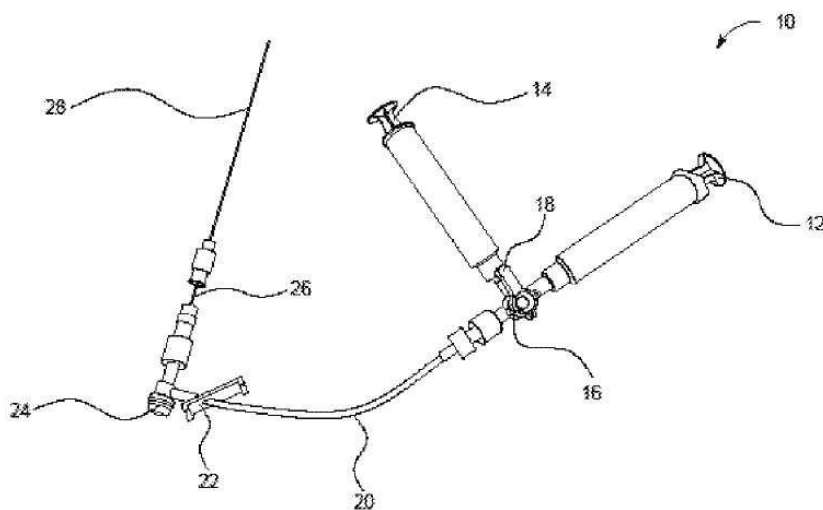
도면6ae



도면6fj



도면7



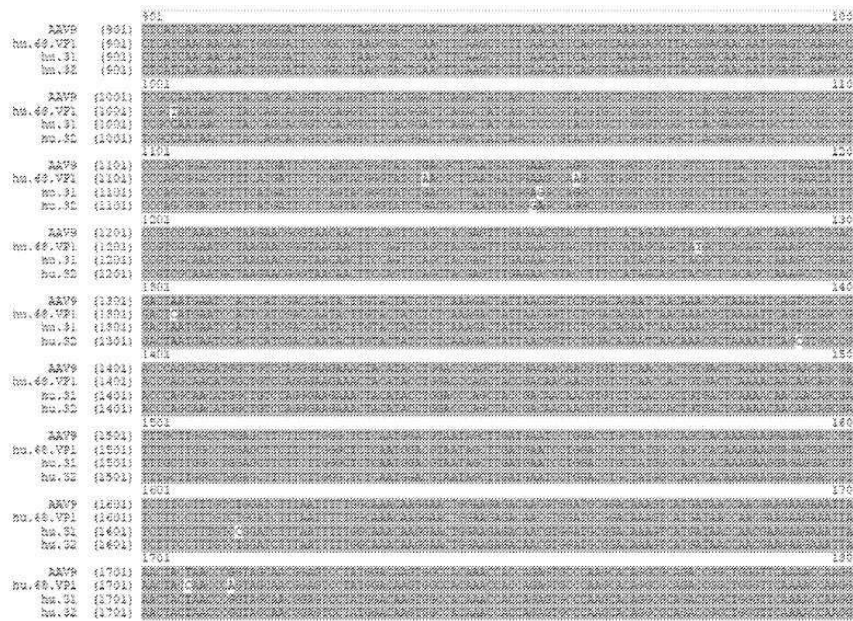
도면 8a

[illegible]

도면 8b

[illegible]

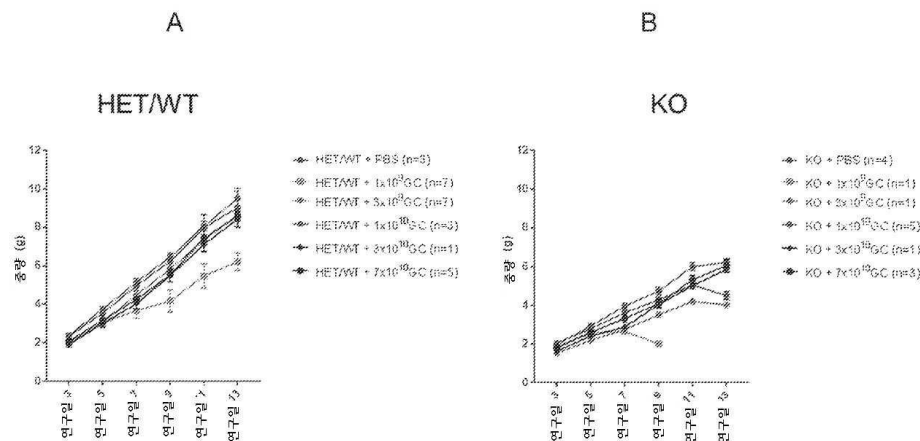
도면8c



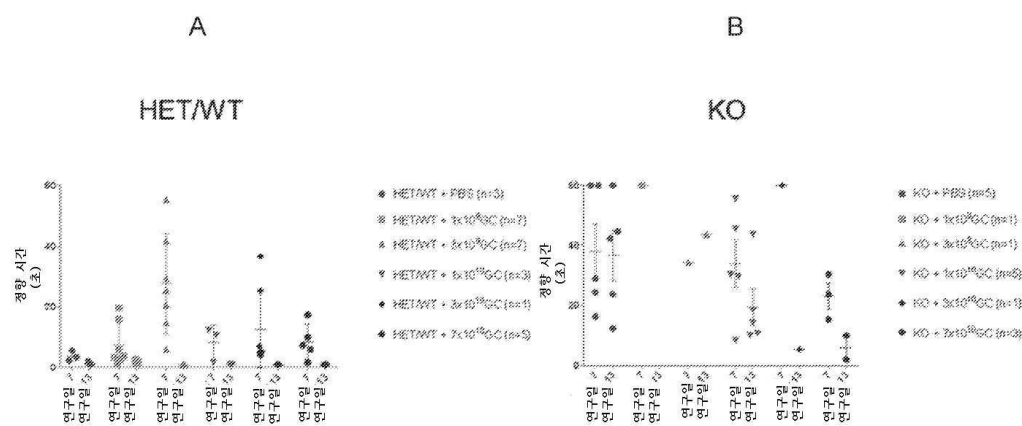
도면8d



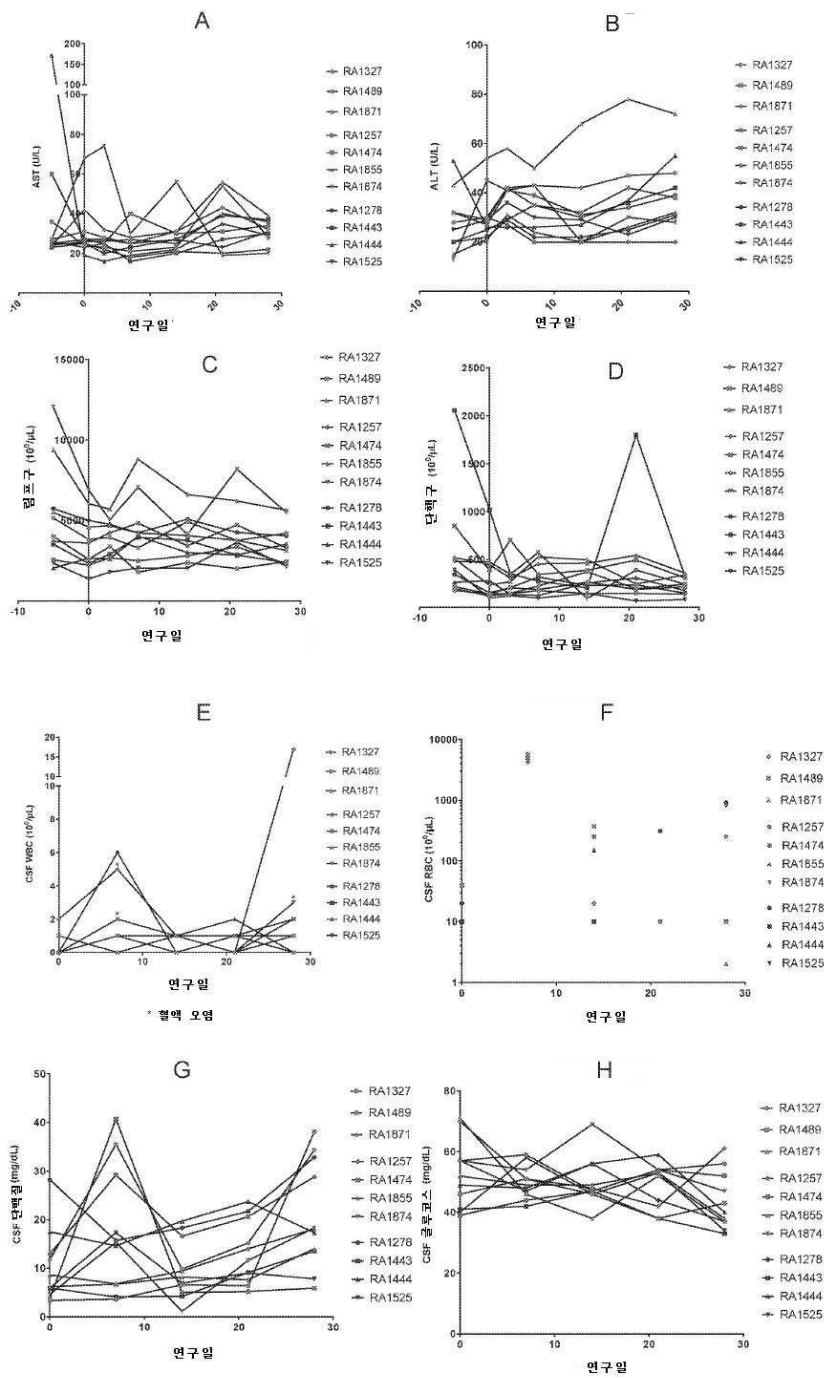
도면9



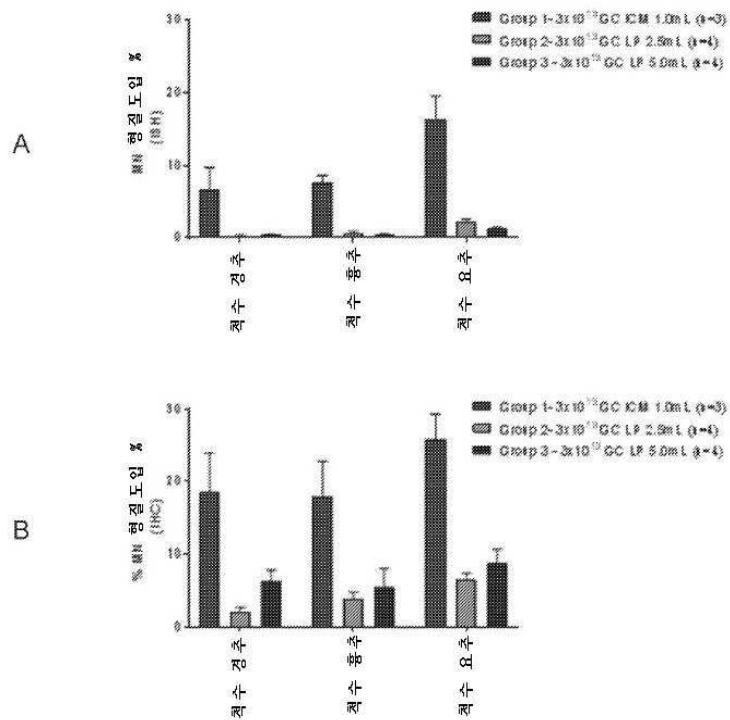
도면10



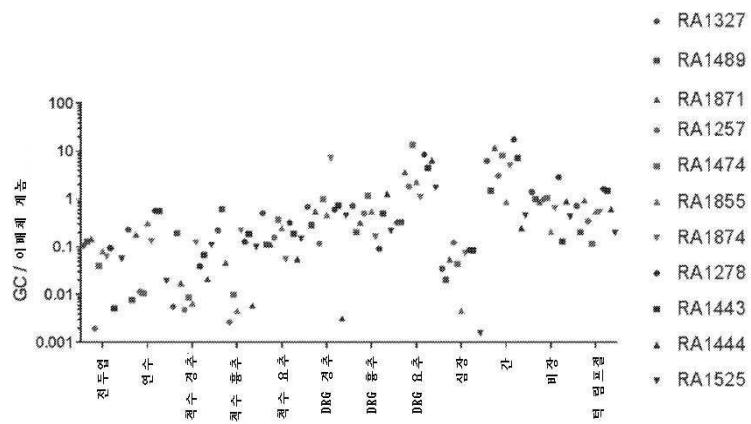
도면11



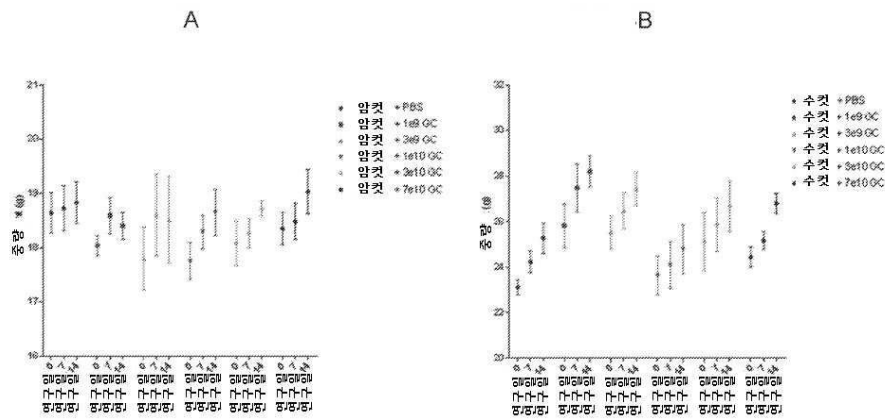
도면12



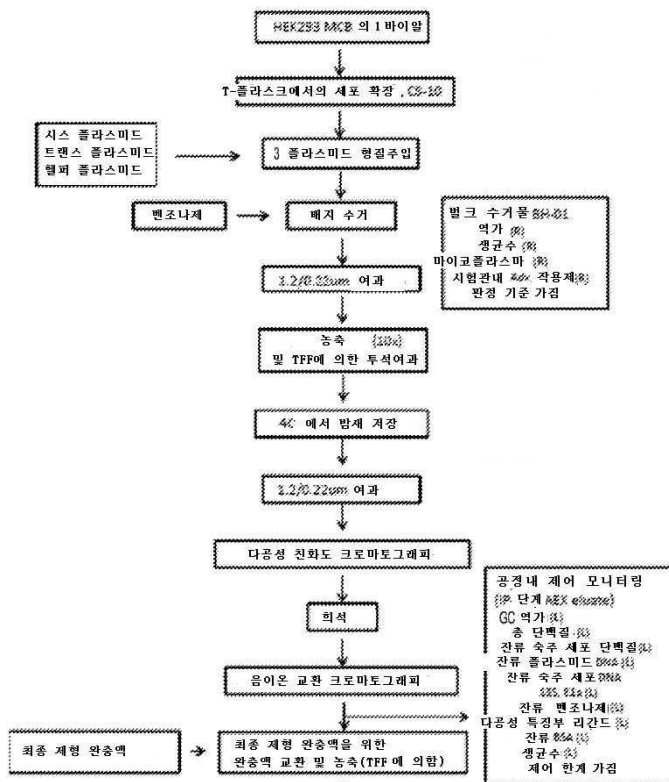
도면 13



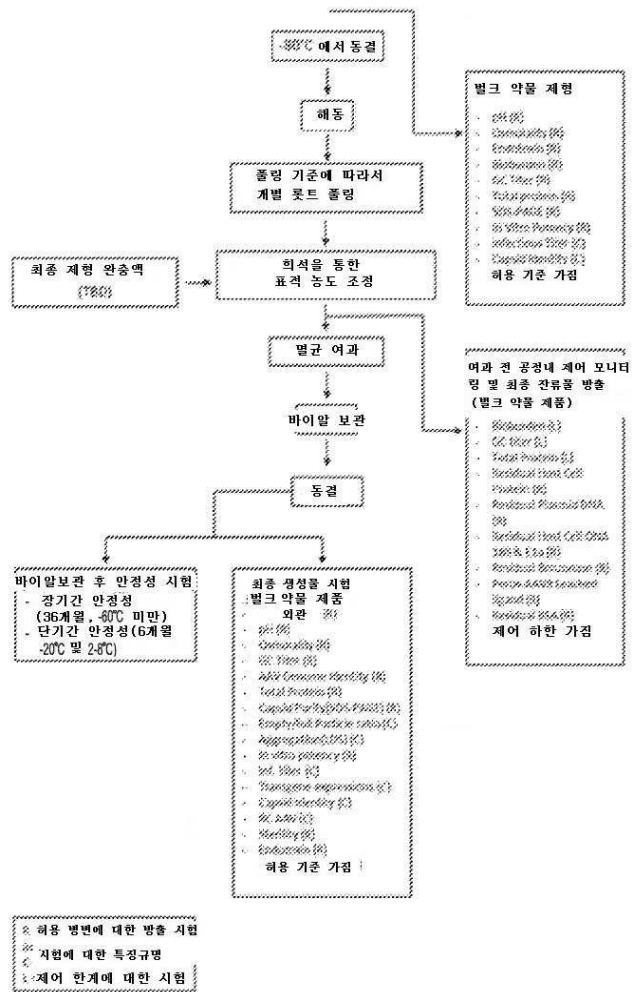
도면14



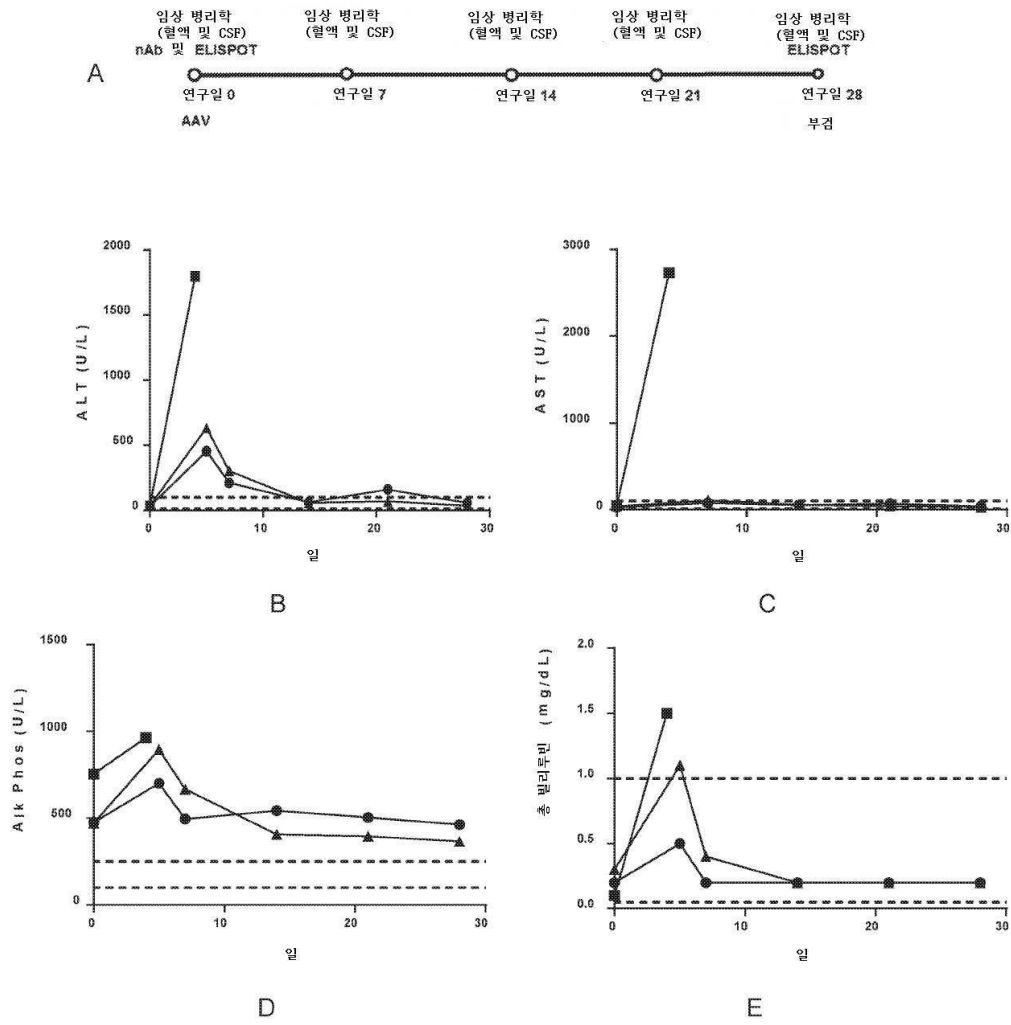
도면15a



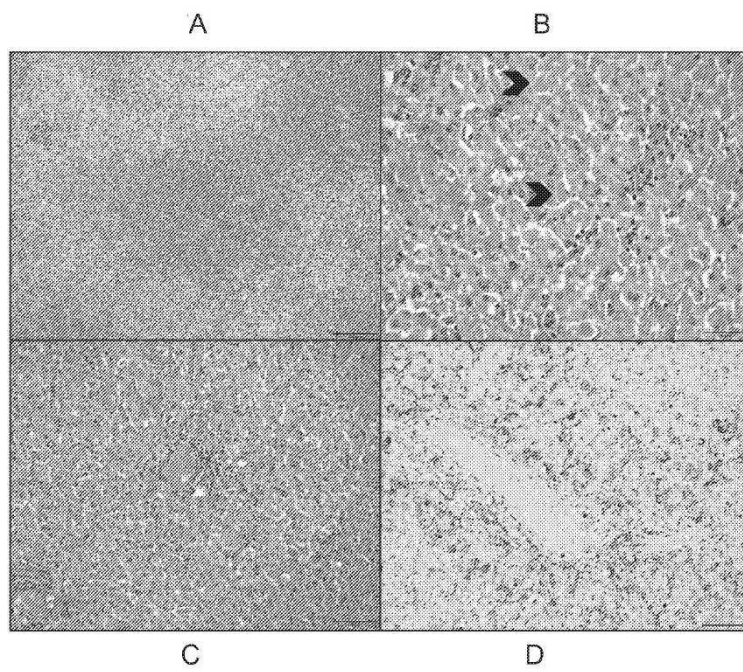
도면 15b



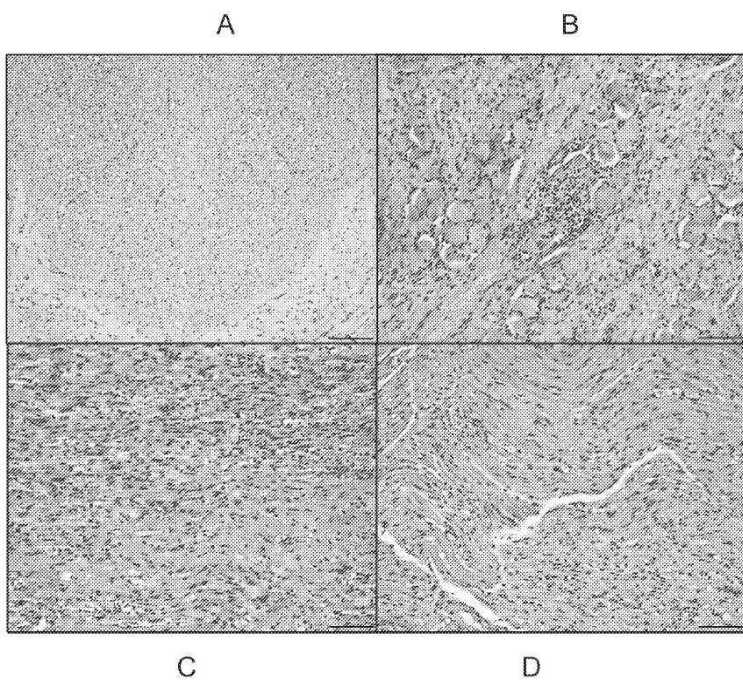
도면16



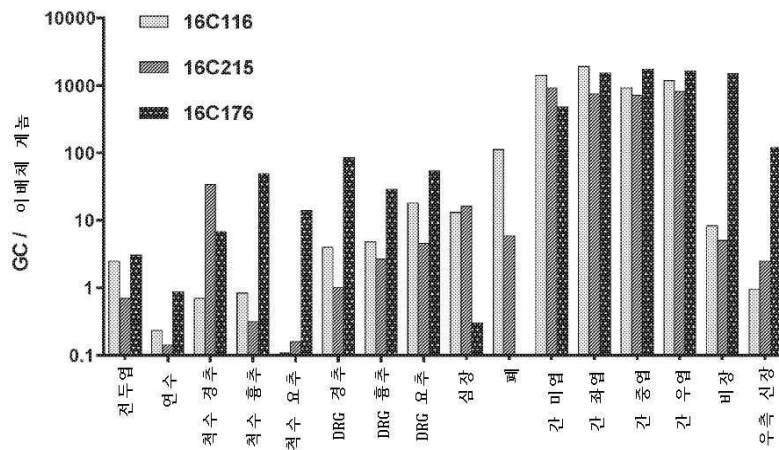
도면17



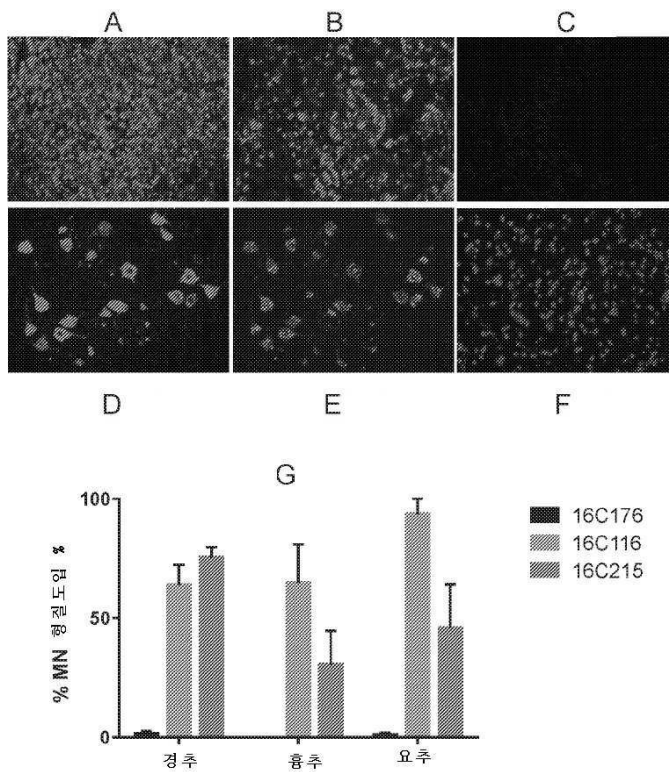
도면18



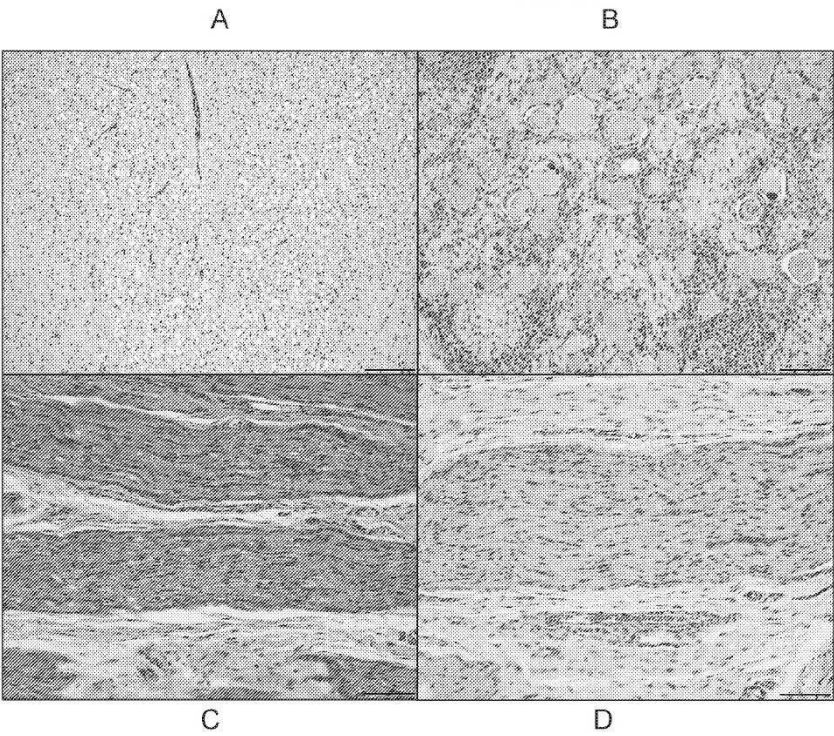
도면19



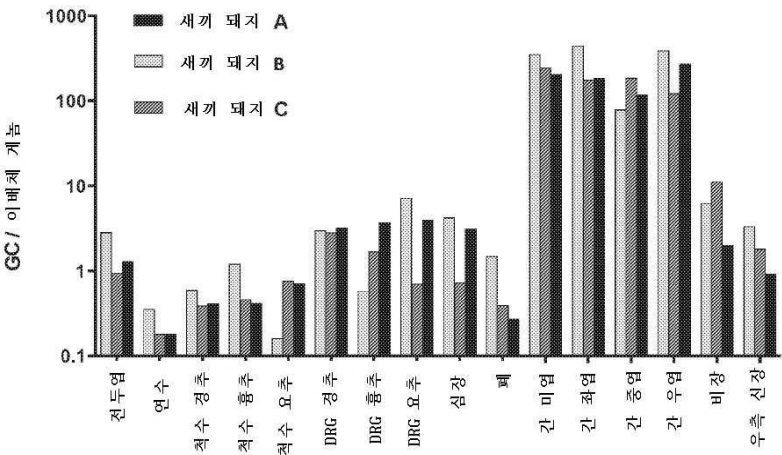
도면20



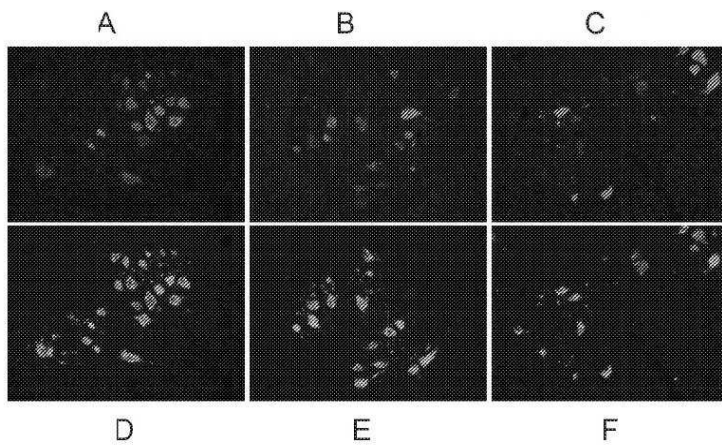
도면21



도면22



도면23



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> COMPOSITIONS USEFUL IN TREATMENT OF SPINAL MUSCULAR ATROPHY

<130> WO/2018/160585

<140> PCT/US2018/019996

<141> 2018-02-27

<150> US 62/464756

<151> 2017-02-28

<150> US 62/515902

<151> 2017-06-06

<150> US 62/618437

<151> 2018-01-17

<160> 26

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 882

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> engineered sequence encoding human SMN variant D protein

<220><221> CDS

<222> (1)..(882)

<400> 1

atg gcc atg tcg agt ggg ggc agt gga ggg gga gtg cca gaa cag gaa 48

Met Ala Met Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Pro Glu Gln Glu

1 5 10 15

gat tcc gtg ctg ttc agg cga gga acc ggg cag agt gac gac agt gac 96

Asp Ser Val Leu Phe Arg Arg Gly Thr Gly Gln Ser Asp Asp Ser Asp

20 25 30

att tgg gac gac acg gcc ctg atc aag gcc tat gac aaa gcc gtg gcc 144

Ile Trp Asp Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Tyr Asp Lys Ala Val Ala

35 40 45

tcc ttc aag cac gcg ctg aag aac ggc gac att tgc gaa acc agc ggc 192

Ser Phe Lys His Ala Leu Lys Asn Gly Asp Ile Cys Glu Thr Ser Gly

50 55 60

aag cct aag acc acc cct aaa cgg aag ccc gcc aag aaa aat aag tcc 240

Lys Pro Lys Thr Thr Pro Lys Arg Lys Pro Ala Lys Lys Asn Lys Ser

65 70 75 80

cag aaa aag aac aca gcc gca agt ctt cag caa tgg aag gtg ggg gat 288

Gln Lys Lys Asn Thr Ala Ala Ser Leu Gln Gln Trp Lys Val Gly Asp

85 90 95

aag tgc tcc gcg ata tgg agt gaa gac ggg tgc atc tat cct gcc acc 336

Lys Cys Ser Ala Ile Trp Ser Glu Asp Gly Cys Ile Tyr Pro Ala Thr

100 105 110

atc gcc agc ata gac ttc aag cgc gaa acc tgc gtg gtg gtg tac act 384

Ile Ala Ser Ile Asp Phe Lys Arg Glu Thr Cys Val Val Val Tyr Thr

115 120 125

gga tac ggg aac cgg gag gag cag aac ctg agc gac ctg ttg agc cct 432

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

130 135 140

att tgt gag gtg gcc aac aac atc gag cag aat gcg caa gaa aat gaa 480

Ile Cys Glu Val Ala Asn Asn Ile Glu Gln Asn Ala Gln Glu Asn Glu

145 150 155 160

aac gag agt cag gtg tcc acc gat gag agt gaa aac agt agg agc ccc 528
 Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro
 165 170 175
 ggc aac aaa tcc gac aat atc aag ccc aaa agc gca ccc tgg aat agc 576
 Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser
 180 185 190
 ttc ctt cca ccc ccc ccc cca atg ccc gga cct cga ctg ggc ccc gga 624
 Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly
 195 200 205
 aag cct ggc ctg aag ttc aac ggc ccc cct cct cct cct ccc cct cct 672
 Lys Pro Gly Leu Lys Phe Asn Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro
 210 215 220
 ccc ccc cac ctg ctg agc tgc tgg ttg ccc cct ttc cct tcg gga ccc 720
 Pro Pro His Leu Leu Ser Cys Trp Leu Pro Pro Phe Pro Ser Gly Pro
 225 230 235 240
 cct atc ata cct ccc ccc ccc cct att tgc cct gac tcc ctg gac gac 768
 Pro Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp
 245 250 255
 gcg gac gcg ctg ggc agt atg ctc atc tcg tgg tac atg tca gga tac 816
 Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr
 260 265 270
 cac acc ggg tac tac atg ggc ttc aga caa aat cag aag gaa gga cga 864
 His Thr Gly Tyr Tyr Met Gly Phe Arg Gln Asn Gln Lys Glu Gly Arg
 275 280 285
 tgt agt cac tcc ctg aat 882
 Cys Ser His Ser Leu Asn

290

<210> 2

<211> 294

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 2

Met Ala Met Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Pro Glu Gln Glu

1 5 10 15

Asp Ser Val Leu Phe Arg Arg Gly Thr Gly Gln Ser Asp Asp Ser Asp

20 25 30

Ile Trp Asp Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Tyr Asp Lys Ala Val Ala

35 40 45

Ser Phe Lys His Ala Leu Lys Asn Gly Asp Ile Cys Glu Thr Ser Gly

50 55 60

Lys Pro Lys Thr Thr Pro Lys Arg Lys Pro Ala Lys Lys Asn Lys Ser

65 70 75 80

Gln Lys Lys Asn Thr Ala Ala Ser Leu Gln Gln Trp Lys Val Gly Asp

85 90 95

Lys Cys Ser Ala Ile Trp Ser Glu Asp Gly Cys Ile Tyr Pro Ala Thr

100 105 110

Ile Ala Ser Ile Asp Phe Lys Arg Glu Thr Cys Val Val Val Tyr Thr

115 120 125

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

130 135 140

Ile Cys Glu Val Ala Asn Asn Ile Glu Gln Asn Ala Gln Glu Asn Glu

145 150 155 160

Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro

165 170 175

Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser

180 185 190

Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly

195 200 205

Lys Pro Gly Leu Lys Phe Asn Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

210 215 220

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

225 230 235 240
Pro Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp
 245 250 255
Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr
 260 265 270
His Thr Gly Tyr Tyr Met Gly Phe Arg Gln Asn Gln Lys Glu Gly Arg
 275 280 285
Cys Ser His Ser Leu Asn
 290

<210> 3

<211> 874

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

cagcggcggc agtgggtggcg gcgtcccgga gcaggaggat tccgtgctgt tccggcgcgg 60
cacaggccag agcgatgatt ctgacatttg ggatgataca gcactgataa aagcatatga 120
taaagctgtg gcttcattta agcatgctct aaagaatggg gacatttttg aaacttcggg 180
taaaccaaaa accacaccta aaagaaaacc tgctaagaag aataaaagcc aaaagaagaa 240
tactgcagct tccttacaac agtggaaagt tggggacaaa tgttctgcca ttggtcaga 300
agacggttgc atttaccag ctaccattgc ttcaattgat ttttaagagag aaacctgtgt 360

tgtggtttac actggatatg gaaatagaga ggagcaaat ctgtccgac tactttcccc 420
aatctgtgaa gtagctaata atatagaaca gaatgctcaa gagaatgaaa atgaaagcca 480
agtttcaaca gatgaaagtg agaactccag gtctcctgga aataaatcag ataacatcaa 540
gccccaatct gtcctatgga actcttttct cctccacca ccccccattgc cagggccaaag 600
actgggacca ggaaagccag gtctaaaatt caatggccca ccaccgccac cgccaccacc 660
accacccac ttactatcat gctggctgcc tcatttctct tctggaccac caataattcc 720
cccaccacct cccatatgtc cagattctct tgatgatgct gatgctttgg gaagtatgtt 780

aatttcatgg tacatgagtg gctatcatac tggctattat atgggtttca gacaaaatca 840
aaaagaagga aggtgctcac attccttaaa ttaa 874

<210> 4

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered hSMN transgene G2

<400> 4

atggcgatga gcagcggcgg cagtgggtggc ggcgtcccgg agcaggagga ttccgtgctg	60
ttccggcgcg gcacaggcca gagcgatgat tctgacattt gggatgatac agcactgata	120
aaagcatatg ataaagctgt ggcttcattt aagcatgctc taaagaatgg tgacatttgt	180
gaaacttcgg gtaaaccaaa aaccacacct aaaagaaaac ctgctaagaa gaataaaagc	240
caaaagaaga atactgcagc ttcccttaca cagtggaaag ttggggacaa atgttctgcc	300
atttggctcag aagacgggtg catttaccba gctaccattg cttcaattga ttttaagaga	360
gaaacctgtg ttgtgggtta cactggatat ggaatagag aggagcaaaa tctgtccgat	420
ctactttccc caatctgtga agtagcta ataatagaac agaagctca agagaatgaa	480
aatgaaagcc aagtttcaac agatgaaagt gagaactcca ggtctcctgg aaataaatca	540
gataacatca agcccaaatc tgctccatgg aactcttttc tccctccacc acccccatg	600
ccagggccaa gactgggacc aggaaagcca ggtctaaaat tcaatggccc accaccgcca	660
ccgccaccac caccaccca cttactatca tgctggctgc ctccatttcc ttctggacca	720
ccaataattc cccaccacc tcccatatgt ccagattctc ttgatgatgc tgatgctttg	780
ggaagtatgt taatttcatg gtacatgagt ggctatcata ctggctatta tatgggtttc	840
agacaaaatc aaaaagaagg aaggctctca cattcctaa attaa	885

<210> 5

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered SMN transgene G3

<400> 5

atggctatga gcagtggcgg ctctggcggc ggagtgcctg agcaggaaga tagcgtgctg	60
ttcagacggg gcaccggcca gagcgacgac agcgacatct gggatgacac cgccctgatc	120
aaggcctacg acaaggccgt ggccagcttc aagcacgccc tgaagaacgg cgatatctgc	180
gagacaagcg gcaagcccaa gaccaccccc aagagaaagc ccgccaagaa gaacaagagc	240
cagaagaaga ataccgccgc ctccctgcag cagtggaaag tgggcgataa gtgcagcgcc	300
atttggagcg aggacggctg catctacccc gccacaatcg ccagcatcga cttcaagcgg	360
gaaacctgcg tgggtggtga cacaggctac ggcaacagag aggaacagaa cctgagcgac	420
ctgctgagcc ccatctgcga ggtggccaac aacatcgagc agaacgcca ggaaaacgag	480

aacgagtgccc aggtgtccac cgacgagagc gagaacagca gaagccccgg caacaagagc 540

gacaacatca agcctaagag cgccccctgg aacagcttcc tgcctcccc tccaccaatg 600

cctggcccta gactgggacc tggcaagccc ggctgaagt tcaatggccc tctccccca 660

cctccaccac caccacctca tctgtgagc tgttggctgc cccattccc tagcgccct 720

cccatcattc ctccacccc cccaatctgc ccgacagcc tggatgatgc tgatgcctg 780

ggctccatgc tgatctcttg gtacatgagc ggctaccaca ccggtacta catgggcttc 840

cggcagaacc agaaagaggg ccgctgtagc cacagcctga actga 885

<210> 6

<211> 885

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Engineered SMN transgene G4

<400> 6

atggcgatga gcagcggtgg ttccggagga ggggtgccgg agcaggagga ttccgtcctt 60

ttcagacggg gaaccggcca gtcggacgac tcggacatct gggatgacac cgcactgac 120

aaagcatagc ataaagcagt ggcatcgctt aagcacgccc ttaagaatgg agacatttgc 180

gaaaccagcg ggaagccaaa aactactccg aagcgcaagc ccgccaagaa gaataagtca 240

cagaagaaaa acaccgccc ttctgtgcaa cagtggaaag tggcgacaaa gtgtccgcg 300

atctggtcag aggatggctg catctaccg gccacgatcg cctccatcga cttcaagcgg 360

gaaacttgtg tggctgtcta cactggctac ggaaccgcg aggaacagaa tctcagcgat 420

ctctcagcc cgatttgtga ggtggccaac aatatcgaac agaacgcga agaaaacgag 480

aacgagtgccc aagtgtcgac tgacgaatcg gaaaattcgc gctcaccagg aaacaagtea 540

gataacatca agcccaaaag cgcgcatgg aacagctttt tgccgccacc accacctatg 600

cctggaccga ggctgggacc gggaaagccg ggactcaa tcaacggccc accgcctccg 660

ccacctccgc ctccaccca cttgtgtgcc tgttggtgc cgccatttcc gtcgggtccg 720

cctatcatcc ctctccacc gccgatttgc ccgactcac tcgacgatgc tgacgcctg 780

gggtcaatgc tgatctcctg gtatatgtcc ggctaccata ccgatacta catgggattc 840

cggcagaacc aaaaggaagg gagatgctcc cattcgctga attga 885

<210> 7

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVhu68 vp1 coding sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(2211)

<223> AAVhu68 vp1

<400> 7

atg gct gcc gat ggt tat ctt cca gat tgg ctc gag gac aac ctc agt	48
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser	
1 5 10 15	

gaa ggc att cgc gag tgg tgg gct ttg aaa cct gga gcc cct caa ccc	96
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro	
20 25 30	

aag gca aat caa caa cat caa gac aac gct cgg ggt ctt gtg ctt ccg	144
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro	
35 40 45	

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

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

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

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

85 90 95	
gac gcc gag ttc cag gag cgg ctc aaa gaa gat acg tct ttt ggg ggc	336
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly	
100 105 110	

aac ctc ggg cga gca gtc ttc cag gcc aaa aag agg ctt ctt gaa cct	384
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro	
115 120 125	

ctt ggt ctg gtt gag gaa gcg gct aag acg gct cct gga aag aag agg	432
---	-----

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

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

 195 200 205
 gca cca gtg gca gac aat aac gaa ggt gcc gat gga gtg ggt agt tcc 672
 Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
 210 215 220
 tcg gga aat tgg cat tgc gat tcc caa tgg ctg ggg gac aga gtc atc 720
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
 225 230 235 240

 acc acc agc acc cga acc tgg gcc ctg ccc acc tac aac aat cac ctc 768
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 tac aag caa atc tcc aac agc aca tct gga gga tct tca aat gac aac 816
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 gcc tac ttc ggc tac agc acc ccc tgg ggg tat ttt gac ttc aac aga 864

 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 ttc cac tgc cac ttc tca cca cgt gac tgg caa aga ctc atc aac aac 912
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn

290	295	300	
aac tgg gga ttc cgg cct aag cga ctc aac ttc aag ctc ttc aac att			960
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
305	310	315	320
cag gtc aaa gag gtt acg gac aac aat gga gtc aag acc atc gct aat			1008
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
	325	330	335
aac ctt acc agc acg gtc cag gtc ttc acg gac tca gac tat cag ctc			1056
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
	340	345	350
ccg tac gtg ctc ggg tcg gct cac gag ggc tgc ctc ccg ccg ttc cca			1104
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro			
	355	360	365
gcg gac gtt ttc atg att cct cag tac ggg tat cta acg ctt aat gat			1152
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp			
	370	375	380
gga agc caa gcc gtg ggt cgt tcg tcc ttt tac tgc ctg gaa tat ttc			1200
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe			
385	390	395	400
ccg tcg caa atg cta aga acg ggt aac aac ttc cag ttc agc tac gag			1248
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu			
	405	410	415
ttt gag aac gta cct ttc cat agc agc tat gct cac agc caa agc ctg			1296
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu			
	420	425	430
gac cga ctc atg aat cca ctc atc gac caa tac ttg tac tat ctc tca			1344
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser			
	435	440	445
aag act att aac ggt tct gga cag aat caa caa acg cta aaa ttc agt			1392
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser			

450	455	460	
gtg gcc gga ccc agc aac atg gct gtc cag gga aga aac tac ata cct			1440
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro			
465	470	475	480
gga ccc agc tac cga caa caa cgt gtc tca acc act gtg act caa aac			1488
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn			
	485	490	495
aac aac agc gaa ttt gct tgg cct gga gct tct tct tgg gct ctc aat			1536
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn			
	500	505	510
gga cgt aat agc ttg atg aat cct gga cct gct atg gcc agc cac aaa			1584
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys			
	515	520	525
gaa gga gag gac cgt ttc ttt cct ttg tct gga tct tta att ttt ggc			1632
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly			
530	535	540	
aaa caa gga act gga aga gac aac gtg gat gcg gac aaa gtc atg ata			1680
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile			
545	550	555	560
acc aac gaa gaa gaa att aaa act acc aac cca gta gca acg gag tcc			1728
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser			
	565	570	575
tat gga caa gtg gcc aca aac cac cag agt gcc caa gca cag gcg cag			1776
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln			
	580	585	590
acc ggc tgg gtt caa aac caa gga ata ctt ccg ggt atg gtt tgg cag			1824
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln			
	595	600	605
gac aga gat gtg tac ctg caa gga ccc att tgg gcc aaa att cct cac			1872

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
acg gac ggc aac ttt cac cct tct ccg ctg atg gga ggg ttt gga atg 1920
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
aag cac ccg cct cct cag atc ctc atc aaa aac aca cct gta cct gcg 1968
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
gat cct cca acg gct ttc aac aag gac aag ctg aac tct ttc atc acc 2016
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
cag tat tct act ggc caa gtc agc gtg gag att gag tgg gag ctg cag 2064
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln
675 680 685
aag gaa aac agc aag cgc tgg aac ccg gag atc cag tac act tcc aac 2112
Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700
tat tac aag tct aat aat gtt gaa ttt gct gtt aat act gaa ggt gtt 2160
Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720
tat tct gaa ccc cgc ccc att ggc acc aga tac ctg act cgt aat ctg 2208
Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
725 730 735
taa 2211
<210> 8
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> Synthetic Construct
<400> 8
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg

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

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

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

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

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 9

<211> 1866

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAVhu68 rep coding sequence

<220><221> CDS

<222> (1)..(1866)

<400> 9

atg ccg ggg ttt tac gag att gtg att aag gtc ccc agc gac ctt gac 48

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp

1 5 10 15

gag cat ctg ccc ggc att tct gac agc ttt gtg aac tgg gtg gcc gag 96

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu

20 25 30

aag gaa tgg gag ttg ccg cca gat tct gac atg gat ctg aat ctg att 144

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile

35 40 45

gag cag gca ccc ctg acc gtg gcc gag aag ctg cag cgc gac ttt ctg 192

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu

50 55 60

acg gaa tgg cgc cgt gtg agt aag gcc ccg gag gct ctt ttc ttt gtg 240

Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val

65 70 75 80

caa ttt gag aag gga gag agc tac ttc cac atg cac gtg ctc gtg gaa 288

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu

85 90 95

acc acc ggg gtg aaa tcc atg gtt ttg gga cgt ttc ctg agt cag att 336

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile

100 105 110

cgc gaa aaa ctg att cag aga att tac cgc ggg atc gag ccg act ttg 384

Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu

115 120 125

cca aac tgg ttc gcg gtc aca aag acc aga aat ggc gcc gga ggc ggg 432

Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly

130	135	140	
aac aag gtg gtg gat gag tgc tac atc ccc aat tac ttg ctc ccc aaa			480
Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys			
145	150	155	160
acc cag cct gag ctc cag tgg gcg tgg act aat atg gaa cag tat tta			528
Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu			
	165	170	175
agc gcc tgt ttg aat ctc acg gag cgt aaa cgg ttg gtg gcg cag cat			576
Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His			
	180	185	190
ctg acg cac gtg tcg cag acg cag gag cag aac aaa gag aat cag aat			624
Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn			
	195	200	205
ccc aat tet gat gcg ccg gtg atc aga tca aaa act tca gcc agg tac			672
Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr			
	210	215	220
atg gag ctg gtc ggg tgg ctc gtg gac aag ggg att acc tcg gag aag			720
Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys			
225	230	235	240
cag tgg atc cag gag gac cag gcc tca tac atc tcc ttc aat gcg gcc			768
Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala			
	245	250	255
tcc aac tcg cgg tcc caa atc aag gtc gcc ttg gac aat gcg gga aag			816
Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Val Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys			
	260	265	270
att atg agc ctg act aaa acc gcc ccc gac tac ctg gtg ggc cag cag			864
Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln			
	275	280	285
ccc gtg gag gac att tcc agc aat cgg att tat aaa att ttg gaa cta			912
Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu			
290	295	300	

aac ggg tac gat ccc caa tat gcg gct tcc gtc ttt ctg gga tgg gcc	960
Asn Gly Tyr Asp Pro Gln Tyr Ala Ala Ser Val Phe Leu Gly Trp Ala	
305 310 315 320	
acg aaa aag ttc ggc aag agg aac acc atc tgg ctg ttt ggg cct gca	1008
Thr Lys Lys Phe Gly Lys Arg Asn Thr Ile Trp Leu Phe Gly Pro Ala	
325 330 335	
act acc ggg aag acc aac atc gcg gag gcc ata gcc cac act gtg ccc	1056
Thr Thr Gly Lys Thr Asn Ile Ala Glu Ala Ile Ala His Thr Val Pro	
340 345 350	
ttc tac ggg tgc gta aac tgg acc aat gag aac ttt ccc ttc aac gac	1104
Phe Tyr Gly Cys Val Asn Trp Thr Asn Glu Asn Phe Pro Phe Asn Asp	
355 360 365	
tgt gtc gac aag atg gtg atc tgg tgg gag gag ggg aag atg acc gcc	1152
Cys Val Asp Lys Met Val Ile Trp Trp Glu Glu Gly Lys Met Thr Ala	
370 375 380	
aag gtc gtg gag tcg gcc aaa gcc att ctc gga gga agc aag gtg cgc	1200
Lys Val Val Glu Ser Ala Lys Ala Ile Leu Gly Gly Ser Lys Val Arg	
385 390 395 400	
gtg gac cag aaa tgc aag tcc tcg gcc cag ata gac ccg act ccc gtg	1248
Val Asp Gln Lys Cys Lys Ser Ser Ala Gln Ile Asp Pro Thr Pro Val	
405 410 415	
atc gtc acc tcc aac acc aac atg tgc gcc gtg att gac ggg aac tca	1296
Ile Val Thr Ser Asn Thr Asn Met Cys Ala Val Ile Asp Gly Asn Ser	
420 425 430	
acg acc ttc gaa cac cag cag ccg ttg caa gac cgg atg ttc aaa ttt	1344
Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe	
435 440 445	
gaa ctc acc cgc cgt ctg gat cat gac ttt ggg aag gtc acc aag cag	1392
Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln	
450 455 460	

gaa gtc aaa gac ttt ttc cgg tgg gca aag gat cac gtg gtt gag gtg															1440					
Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val																				
465			470			475			480											
gag cat gaa ttc tac gtc aaa aag ggt gga gcc aag aaa aga ccc gcc															1488					
Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala																				
485					490					495										
ccc agt gac gca gat ata agt gag ccc aaa cgg gtg cgc gag tca gtt															1536					
Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val																				
500					505					510										
gcg cag cca tcg acg tca gac gcg gaa gct tcg atc aac tac gcg gac															1584					
Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp																				
515			520			525														
agg tac caa aac aaa tgt tct cgt cac gtg ggc atg aat ctg atg ctg															1632					
Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu																				
530			535			540														
ttt ccc tgc aga caa tgc gag aga ctg aat cag aat tca aat atc tgc															1680					
Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Leu Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys																				
545			550			555			560											
ttc act cac ggt gtc aaa gac tgt tta gag tgc ttt ccc gtg tca gaa															1728					
Phe Thr His Gly Val Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu																				
565					570					575										
tct caa ccc gtt tct gtc gtc aaa aag gcg tat cag aaa ctg tgc tac															1776					
Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr																				
580			585			590														
att cat cac atc atg gga aag gtg cca gac gct tgc act gct tgc gac															1824					
Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp																				
595			600			605														
ctg gtc aat gtg gac ttg gat gac tgt gtt tct gaa caa taa															1866					
Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu Gln																				

610 615 620

<210> 10

<211> 621

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic Construct

<400> 10

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp

1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu

20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile

35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu

50 55 60

Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val

65 70 75 80

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu

85 90 95

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile

100 105 110

Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu

115 120 125

Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly

130 135 140

Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys

145 150 155 160

Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu

165 170 175

Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His

180 185 190

Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn

195 200 205
 Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr
 210 215 220
 Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys

 225 230 235 240
 Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala
 245 250 255
 Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Val Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys
 260 265 270
 Ile Met Ser Leu Thr Lys Thr Ala Pro Asp Tyr Leu Val Gly Gln Gln
 275 280 285
 Pro Val Glu Asp Ile Ser Ser Asn Arg Ile Tyr Lys Ile Leu Glu Leu

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

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

 420 425 430
 Thr Thr Phe Glu His Gln Gln Pro Leu Gln Asp Arg Met Phe Lys Phe
 435 440 445

Glu Leu Thr Arg Arg Leu Asp His Asp Phe Gly Lys Val Thr Lys Gln
450 455 460

Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val
465 470 475 480

Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala

485 490 495

Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val

500 505 510

Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp

515 520 525

Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu

530 535 540

Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Leu Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys

545 550 555 560

Phe Thr His Gly Val Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu

565 570 575

Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr

580 585 590

Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp

595 600 605

Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Val Ser Glu Gln

610 615 620

<210> 11

<211> 1545

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 11

ccacaaatgt gggagggcga taaccactcg tagaaagcgt gagaagttac tacaagcggg 60

cctcccgccc accgtactgt tccgtccca gaagccccgg gcggcggaag tcgtcactct 120

taagaaggga cggggcccca cgctgcgcac ccgcgggttt gctatggcga tgagcagcgg 180

cggcagtggg ggcggcgtcc cggagcagga ggattccgtg ctgttccggc gcggcacagg 240

ccagagcgat gattctgaca ttgaggatga tacagcactg ataaaagcat atgataaagc 300

tgtggcttca ttttaagcatg ctctaaagaa tggtgacatt tgtgaaactt cgggtaaacc 360

aaaaaccaca cctaaaagaa aacctgctaa gaagaataaa agccaaaaga agaatactgc 420

agcttcccta caacagtgga aagtgggga caaatgttct gccatttggc cagaagacgg 480

ttgcatttac ccagctacca ttgcttcaat tgattttaag agagaaacct gtgttgggt 540

ttacactgga tatggaaata gagaggagca aaatctgtcc gatctacttt cccaatctg 600

tgaagtagct aataatatag aacaaaatgc tcaagagaat gaaaatgaaa gccaaatttc 660

aacagatgaa agtgagaact ccaggtctcc tggaaataaa tcagataaca tcaagcccaa 720

atctgtccca tggaactctt ttctccctcc accaccccc atgccagggc caagactggg 780

accaggaaag ataattcccc caccacctcc catatgtcca gattctcttg atgatctga 840

tgctttggga agtatgttaa ttctatggta catgagtggc tatcatactg gctattatat 900

gggtttcaga caaatcaaa aagaaggaag gtgctcacat tccttaaatt aaggagaaat 960

gctggcatag agcagcacta aatgacacca ctaaagaaac gatcagacag atctggaatg 1020

tgaagcgta tagaagataa ctggcctcat ttcttcaaaa tatcaagtgt tgggaaagaa 1080

aaaaggaagt ggaatgggta actcttcttg attaaaagtt atgtaataac caaatgcaat 1140

gtgaaatatt ttactggact ctattttgaa aaaccatctg taaaagactg ggggtgggggt 1200

gggaggccag cacggtgggtg aggcagtga gaaaattga atgtggatta gattttgaat 1260

gatattggat aattattggt aattttatga gctgtgagaa ggggtgttga gtttataaaa 1320

gactgtctta atttgcatac ttaagcattt aggaatgaag tgttagagtg tcttaaaatg 1380

tttcaaatgg tttaacaaaa tgtatgtgag gcgtatgtgg caaatgtta cagaatctaa 1440

ctggtggaca tgctgttca ttgtactgtt ttttctatc ttctatatgt ttaaaagtat 1500

ataataaaaa tatttaattt ttttttaaaa aaaaaaaaa aaaaa 1545

<210> 12

<211> 262

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Met Ala Met Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Pro Glu Gln Glu

1 5 10 15

Asp Ser Val Leu Phe Arg Arg Gly Thr Gly Gln Ser Asp Asp Ser Asp

20

25

30

Ile Trp Asp Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Tyr Asp Lys Ala Val Ala
35 40 45
Ser Phe Lys His Ala Leu Lys Asn Gly Asp Ile Cys Glu Thr Ser Gly
50 55 60
Lys Pro Lys Thr Thr Pro Lys Arg Lys Pro Ala Lys Lys Asn Lys Ser
65 70 75 80
Gln Lys Lys Asn Thr Ala Ala Ser Leu Gln Gln Trp Lys Val Gly Asp
85 90 95
Lys Cys Ser Ala Ile Trp Ser Glu Asp Gly Cys Ile Tyr Pro Ala Thr
100 105 110
Ile Ala Ser Ile Asp Phe Lys Arg Glu Thr Cys Val Val Val Tyr Thr
115 120 125
Gly Tyr Gly Asn Arg Glu Glu Gln Asn Leu Ser Asp Leu Leu Ser Pro
130 135 140
Ile Cys Glu Val Ala Asn Asn Ile Glu Gln Asn Ala Gln Glu Asn Glu
145 150 155 160
Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro
165 170 175
Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser
180 185 190
Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly
195 200 205
Lys Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp
210 215 220
Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr
225 230 235 240
His Thr Gly Tyr Tyr Met Gly Phe Arg Gln Asn Gln Lys Glu Gly Arg
245 250 255
Cys Ser His Ser Leu Asn
260

<210> 13

<211> 1571

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 13

```

ccacaaatgt gggagggcga taaccactcg tagaaagcgt gagaagttac tacaagcgg      60
cctcccgcc accgtactgt tccgtccca gaagccccgg gcggcggaag tcgtcactct      120
taagaaggga cggggcccca cgctgcgcac ccgcgggttt gctatggcga tgagcagcgg      180
cggcagtggt ggcggcgctc cggagcagga ggattccgtg ctgttccggc gcggcacagg      240
ccagagcgat gattctgaca tttgggatga tacagcactg ataaaagcat atgataaagc      300

tgtggcttca ttaagcatg ctctaaagaa tggtagacatt tgtgaaactt cgggtaaacc      360
aaaaaccaca ctaaaaagaa aacctgctaa gaagaataaa agccaaaaga agaatactgc      420
agcttcctta caacagtgga aagtigggga caaatgttct gccatttggc cagaagacgg      480
ttgcatttac ccagctacca ttgcttcaat tgattttaag agagaaacct gtgttgttgt      540
ttacactgga tatggaaata gagaggagca aaatctgtcc gatctacttt cccaatctg      600
tgaagtagct aataatatag aacaaaatgc tcaagagaat gaaaatgaaa gccaagtttc      660
aacagatgaa agtgagaact ccaggtctcc tggaaataaa tcagataaca tcaagcccaa      720

atctgtccca tggaactctt ttctccctcc accaccccc atgccagggc caagactggg      780
accaggaaag ccaggtctaa aattcaatgg ccaccaccg ccaccgccac caccaccacc      840
ccacttacta tcatgtctgc tgcctccatt tccttctgga ccaccaataa ttccccacc      900
acctccata tgtccagatt ctcttgatga tgtgatgct ttgggaagta tgtaatttc      960
atggtacatg agtggctatc atactggcta ttatatggaa atgctggcat agagcagcac      1020
taaatgacac cactaaagaa acgatcagac agatctggaa tgtgaagcgt tatagaagat      1080
aactggcctc atttcttcaa aatatcaagt gttgggaaag aaaaaaggaa gtggaatggg      1140

taactcttct tgattaaaag ttatgtaata accaaatgca atgtgaaata ttttactgga      1200
ctctattttg aaaaaccatc tgtaaaagac tggggtgggg gtgggaggcc agcacggtgg      1260
tgaggcagtt gagaaaattt gaatgtggat tagattttga atgatattgg ataattattg      1320
gtaattttat gagctgtgag aagggtgttg tagtttataa aagactgtct taatttgcatt      1380
acttaagcat ttaggaatga agtgtagag tgccttaaaa tgtttcaaat ggtttaacaa      1440
aatgtatgtg aggcgtatgt ggcaaatgt tacagaatct aactggtgga catggctgtt      1500
cattgtactg ttttttcta tcttctatat gtttaaaagt atataataaa aatatttaat      1560

ttttttttaa a                                                    1571

```

<210> 14

<211> 282

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Ala Met Ser Ser Gly Gly Ser Gly Gly Gly Val Pro Glu Gln Glu

1 5 10 15

Asp Ser Val Leu Phe Arg Arg Gly Thr Gly Gln Ser Asp Asp Ser Asp

20 25 30

Ile Trp Asp Asp Thr Ala Leu Ile Lys Ala Tyr Asp Lys Ala Val Ala

35 40 45

Ser Phe Lys His Ala Leu Lys Asn Gly Asp Ile Cys Glu Thr Ser Gly

50 55 60

Lys Pro Lys Thr Thr Pro Lys Arg Lys Pro Ala Lys Lys Asn Lys Ser

65 70 75 80

Gln Lys Lys Asn Thr Ala Ala Ser Leu Gln Gln Trp Lys Val Gly Asp

85 90 95

Lys Cys Ser Ala Ile Trp Ser Glu Asp Gly Cys Ile Tyr Pro Ala Thr

100 105 110

Ile Ala Ser Ile Asp Phe Lys Arg Glu Thr Cys Val Val Val Tyr Thr

115 120 125

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

130 135 140

Ile Cys Glu Val Ala Asn Asn Ile Glu Gln Asn Ala Gln Glu Asn Glu

145 150 155 160

Asn Glu Ser Gln Val Ser Thr Asp Glu Ser Glu Asn Ser Arg Ser Pro

165 170 175

Gly Asn Lys Ser Asp Asn Ile Lys Pro Lys Ser Ala Pro Trp Asn Ser

180 185 190

Phe Leu Pro Pro Pro Pro Pro Met Pro Gly Pro Arg Leu Gly Pro Gly

195 200 205

Lys Pro Gly Leu Lys Phe Asn Gly Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro Pro

210 215 220
 Pro Pro His Leu Leu Ser Cys Trp Leu Pro Pro Phe Pro Ser Gly Pro
 225 230 235 240

Pro Ile Ile Pro Pro Pro Pro Pro Ile Cys Pro Asp Ser Leu Asp Asp
 245 250 255
 Ala Asp Ala Leu Gly Ser Met Leu Ile Ser Trp Tyr Met Ser Gly Tyr
 260 265 270

His Thr Gly Tyr Tyr Met Glu Met Leu Ala
 275 280

<210> 15

<211> 3258

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV.CB7.CI.hSMN vector genome

<220><221> repeat_region

<222> (1)..(130)

<223>

> AAV2- 5' ITR

<220><221> promoter

<222> (197)..(579)

<223> CMV IE promoter

<220><221> promoter

<222> (582)..(863)

<223> CB promoter

<220><221> Intron

<222> (958)..(1930)

<223> CMV IE promoter

<220><221> misc_feature

<222> (1948)..(2829)

<223> hSMN coding sequence

<220><221> polyA_signal

<222> (2914)..(3040)

<220><221> repeat_region

<222> (3129)..(3258)

<223> AAV2- 3' ITR

<400> 15

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg cgagagagg gaggggcaa ctccatcact	120
aggggttccct ttagttaaat gattaaccgc ccatgtact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	240
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360
tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggact atttacggt	420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc atggtcgagg tgagcccccac	600
gttctgttc actctccca tctcccccc cccccaccc ccaattttgt atttatttat	660
tttttaatta ttttgtcag cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780
gagcggcgcg ctccgaaagt ttctttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggcctataa	840
aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgt gccttcgccc cgtgccccgc	900
tccgccgcg cctcgcgcg cccgccccgg ctctgactga ccgcgttact cccacaggtg	960
agcgggcggg acggcccttc tcctccgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt	1020
gtttcttttc tgggtcgcg tgaaagcctt gaggggctcc gggaggggccc tttgtcggg	1080
gggagcggt cggggggcgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcgcgc gtgcggtcc	1140
gcgctgcccc gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgagt	1200
gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcgt gcgggggggg ctgcgagggg	1260
aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg	1320
gtcgggctgc aacccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggttcg	1380
ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggtctgccg tgccgggcgg ggggtggcgg	1440
caggtggggg tgccgggcgg ggcggggcgc cctcgggcgc gggagggtc gggggagggg	1500
cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt	1560
ttatggtaat cgtgcgagag ggcgcaggga ctctctttgt cccaaatctg tgcggagccg	1620
aaatctggga ggcgcgcgcg caccctctet agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgc	1680

ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgccgccg tccccctctc 1740

cctctccagc ctccgggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acggggcagg 1800

gcgggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggtcttagag cctctgctaa ccatgttcat 1860

gccttcttct ttttcttaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920

tttggaagaa aattctagct tgccaccatg gccatgtcga gtgggggcag tggaggggga 1980

gtgccagaac aggaagattc cgtgctgttc aggcgaggaa ccgggcagag tgacgacagt 2040

gacatttggg acgacacggc cctgatcaag gcctatgaca aagccgtggc ctcttcaag 2100

cacgcgtga agaacggcga catttgcgaa accagcggca agcctaagac caccctaaa 2160

cggaagcccc ccaagaaaaa taagtcccag aaaaagaaca cagccgcaag tcttcagcaa 2220

tggaaggttg gggataagtg ctccgcgata tggagtgaag acgggtgcat ctatcctgcc 2280

accatcgcca gcatagactt caagcgcgaa acctgcgtgg tgggtgtacac tggatacggg 2340

aaccgggagg agcagaacct gagcgacctg ttgagcccta tttgtgaggt ggccaacaac 2400

atcgagcaga atgcgcaaga aaatgaaaac gagagtcagg tgtccaccga tgagagtga 2460

aacagtagga gccccggcaa caaatccgac aatatcaagc ccaaaaagcg accctggaat 2520

agcttcttc cccccccc cccaatgcc ggacctcgac tgggccccgg aaagcctggc 2580

ctgaagtcca acggccccc tctctctct cccctctc cccccacct gctgagctgc 2640

tgggtgcccc ctctccctc gggacccct atcatactc cccccccc tatttgcct 2700

gactccctgg acgacgcgga cgcgtgggc agtatgtca tctctgtgta catgtcagga 2760

taccacaccg ggtactacat gggcttcaga caaaatcaga aggaaggacg atgtagtac 2820

tccctgaatt aatgatatct agaattcacg cgtggtacct ctagagtcga cccgggcggc 2880

ctcgaggacg gggatgaacta cgcctgagga tccgatctt ttcctctgc caaaaattat 2940

ggggacatca tgaagccct tgagcatctg acttctggct aataaaggaa atttatcttc 3000

attgcaatag tgtgttgga tttttgtgt ctctactcg gaagcaattc gttgatctga 3060

atttcgacca ccataatac ccattacct ggtagataag tagcatggcg ggttaatcat 3120

taactacaag gaacccttag tgatggagt ggccactccc tctctgcgcg ctgcctcgt 3180

cactgaggcc gggcgaccaa aggtcgccc acgcccgggc tttgcccggg cggcctcagt 3240

gagcgagcga gcgcgcag 3258

<210> 16

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Encoded AAV9 vp1 amino acid sequence

<220><221>

MISC_FEATURE

<222> (1)..(137)

<223> encoded vp1-unique region

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(736)

<223> encoded vp1 amino acid sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(736)

<223> encoded vp1 amino acid sequence

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (138)..(736)

<223> encoded amino acid sequence of alternative splice variant vp2
protein

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (203)..(736)

<223> encoded amino acid sequence of alternative splice variant vp3
protein

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
145	150	155	160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
165	170	175	
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg			
275	280	285	
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn			
290	295	300	
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile			
305	310	315	320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn			
325	330	335	
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu			
340	345	350	

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

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

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

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

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

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

 Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
 705 710 715 720
 Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 725 730 735

 <210> 17
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Encoded AAVrh10 vpl amino acid sequence
 <400> 17
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
 1 5 10 15

 Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
 20 25 30
 Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asp Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
 35 40 45
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65	70	75	80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala			
	85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
	100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro			
	115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Gly Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
	130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile			
	145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln			
	165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro			
	180	185	190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly			
	195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser			
	210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val			
	225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His			
	245	250	255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp			
	260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn			
	275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn			
	290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn			
	305	310	315
			320

Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala
325 330 335

Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
340 345 350

Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
355 360 365

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380

Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400

Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
405 410 415

Gln Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430

Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
485 490 495

Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525

His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560

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

565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605

Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
 625 630 635 640

Gly Leu Lys His Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655

Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Ser Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 665 670

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

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 695 700

Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Asp
 705 710 715 720

Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg
 725 730 735

Asn Leu

<210> 18

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Encoded AAVhu31 vp1 amino acid sequence

<400> 18

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

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

20	25	30	
Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35	40	45	
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp			
65	70	75	80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly			
145	150	155	160
Lys Ser Gly Ser Gln Pro Ala Lys Lys Lys Leu Asn Phe Gly Gln Thr			
165	170	175	
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro			
180	185	190	
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly			
195	200	205	
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser			
210	215	220	
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile			
225	230	235	240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu			
245	250	255	
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn			
260	265	270	

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

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

Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335

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

Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365

Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

Gly Gly Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400

Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460

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

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525
 Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
 530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
 545 550 555 560
 Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
 565 570 575
 Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
 580 585 590
 Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
 595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
 610 615 620
 Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
 625 630 635 640
 Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
 645 650 655
 Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
 660 665 670

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

<210> 19

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Encoded AAVhu32 vp1 amino acid sequence

<400> 19

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
 245 250 255
 Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
 260 265 270
 Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
 275 280 285
 Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
 290 295 300

 Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
 305 310 315 320
 Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
 325 330 335
 Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
 340 345 350
 Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
 355 360 365

 Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
 370 375 380
 Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
 405 410 415
 Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
 420 425 430

 Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
 435 440 445
 Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
 450 455 460
 Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
 465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605

Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620

Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670

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

Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn
690 695 700

Tyr Tyr Lys Ser Asn Asn Val Glu Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Val
705 710 715 720

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

725	730	735	
<210>	20		
<211>	2211		
<212>	DNA		
<213>	Artificial Sequence		
<220><223>	AAVhu31 vp1 coding sequence		
<400>			
20			
atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc		60	
gagtgggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac		120	
aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gaccgcgcaa cggactcgac		180	
aagggggagc cggtaaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac		240	
cagcagctca aggccggaga caacccttac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc		300	
caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag		360	
gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggttaa gacggctcct		420	
ggaaagaaga ggcctgtaga gcagctctct caggaaccgg actcctccgc gggatattggc		480	
aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag		540	
tcagtccag accctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct		600	
cttacaatgg cttcaggatgg tggcgaccca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga		660	
gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcac		720	
accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc		780	
tccaacagca catctggagg atcttcaa atgacaacgcct acttcggcta cagcaccccc		840	
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga		900	
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt		960	
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc		1020	
acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctccgt acgtgctcgg gtcggtcac		1080	
gagggtgcc tccgcggtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg		1140	
acgttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc		1200	
ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagtta gctacagatt tgagaacgta		1260	
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc		1320	
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg		1380	
ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc aggggaagaaa ctacatacct		1440	

ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500
 ttgtcttgcc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560
 ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620
 ttaatttttg gcaaacaaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac cggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740
 gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800
 atacttcggg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860
 aaaattcctc acacggacgg caactttcac cttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920
 aagcaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980
 gccttcaaca aggacaagct gaactcttc atcaccagt attctactgg ccaagtcagc 2040
 gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaagggtga 2160
 tatagtgaac ccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 21
 <211> 2211
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> AAVhu32 vp1 coding sequence
 <400> 21

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca ctctctctga aggaataaga 60
 cagtgttgga agtcaaacc tggccacca ccaccaaacg ccgcagagcg gcataaggac 120
 gacagcaggg gtcttgtgt tcttgggtac aagtacctcg gaccggcaa cggactcgac 180
 aagggggagc cggtaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300
 caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttcag 360
 gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420
 ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctct caggaaccgg actcctccgc gggatattggc 480
 aaatcgggtt cacagccgc taaaaagaaa ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540
 tcagtccccg acctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600
 cttacaatgg cttcagtggt tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaadc 780
tccaacagca catctggagg atcttcaa at gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840
tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900
ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960
caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc 1020
acgttccagg tcttcacgga ctacagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggtgccc tcccgcgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140
acgtttaatg atgggagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatctc 1200
ccgtcgaaca tgctaagaac gggtaacaac ttccagtcca gctacagatt tgagaacgta 1260
cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320
gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380
ctaaaattca gcgtggccgg acccagcaac atggctgtcc aggggaagaaa ctacatacct 1440
ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaaca caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggt ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560
ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620
ttaatttttg gcaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggaca agtcatgata 1680
accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740
gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800
atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860
aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc taatgggagg gtttggaatg 1920

aagcaccgc ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tctccaacg 1980
gctttcaata aggacaagct gaactctttc atcaccagct attctactgg ccaagtcagc 2040
gtggagattg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100
tacatttcca actattaca gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160
tatagtgaac ccgcceccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 22

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV9 vp1 coding sequence

<400> 22

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtgtggg ctttgaacc tggagcccct caaccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcgag gtcttgtgt tccgggttac aaataccttg gaccggcaa cggactcgac 180

aagggggagc cgttcaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgaca ggcttacgac 240

cagcagctca aggccggaga caaccgtac ctcaagtaca accacgccga cggcagttc 300

caggagcggc tcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggc ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagcccgc taaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtcccag acctcaacc aatcggagaa cctcccgag cccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtagg tggcgacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattccaat ggctggggga cagagtcac 720

accaccagca ccgaacctg ggccctgcc acctacaaca atcacctcta caagcaaac 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca attcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa cttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctacagactat cagctcccg acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggtgcc tcccgcgtt cccagcggac gttttcatga ttctcagta cgggtatctg 1140

acgttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct ttactgcct ggaatatttc 1200

ccgtcgaaa tgctaagaac gggttaacaac ttccagtca gctacagatt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcac 1320

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaaaaacg 1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc aggaagaaa ctacatacct 1440

ggaccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggt ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggactgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tcttctctt gtctggatct 1620

ttaatttttg gcaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atcgcgaca agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740

gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800
 atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860
 aaaattcttc acacggacgg caactttcac ctttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920
 aagcaccgcg ctctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980
 gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcaccagct attctactgg ccaagtcagc 2040
 gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaacct ggagatccag 2100
 tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160

tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 23

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer prm504

<400> 23

gctgctcaa ctggaccaat gagaac 26

<210> 24

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer prm505

<400> 24

cgagagacc aaagttcaac tgaaacga 28

<210> 25

<211> 3256

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

><223> AAV.CB7.CI.hSMN vector genome

<220><221> repeat_region

<222> (1)..(130)

<223> 5' ITR

<220><221> promoter

<222> (198)..(579)

<223> CMV IE promoter

<220><221> promoter

<222> (582)..(862)

<223> CB promoter

<220><221> TATA_signal

<222> (836)..(839)

<220><221> Intron

<222> (956)..(1928)

<223> Chicken beta-actin intron

<220><221> misc_feature

<222> (1946)..(2827)

<223> hSMN coding sequence

<220><221> polyA_signal

<222> (2912)..(3038)

<223> Rabbit globin polyA

<220><221> repeat_region

<222> (3127)..(3256)

<223> 3' ITR

<400> 25

ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt	60
ggtcgcccgg cctcagtgag cgagcgagcg cgagagagg gagtggccaa ctccatcact	120
aggggttcct tgiagttaat gattaaccgc ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg	180
atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat	240
tacgggggtca ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa	300
tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt	360

tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggt	420
aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt	480
caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc	540
tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgtattacc atggtcgagg tgagcccccac	600
gttctgcttc actctccca tctcccccc ctccccacc ccaattttgt atttatttat	660
tttttaatta ttttgtgcg cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg	720
ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca	780

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgaggcgg cggcggcggc ggcctataa	840
--	-----

aaagcgaagc gcgcggcggg cgggagtcgc tgcgcgtgc cttcgccccg tgccccgctc 900
 cgcccgccgc tcgcgccgc cgccccggct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag 960
 cgggcgggac ggcccttctc ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt 1020
 ttcttttctg tggctgcgtg aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg 1080
 gagcgctcgc ggggggtgcgt gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcgcgcgt gcggctccgc 1140
 gctgccccgc ggcgtgtgagc gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt 1200

 gcgcgagggg agcgcggccg ggggcgggtgc cccgcggtgc ggggggggct gcgaggggaa 1260
 caaagctgc gtgcggggtg tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcgg 1320
 cgggctgcaa cccccctgc acccccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg 1380
 tgcggggctc cgtacggggc gtggcgcggg gctcgcctg ccgggcgggg ggtggcggca 1440
 ggtgggggtg ccgggcgggg cggggccgcc tcgggcccgg gagggctcgg gggaggggcg 1500
 cggcgccccc cggagcgcgc gcggtgtcgc agcgcggcg agccgcagcc attgcctttt 1560
 atggtaatcg tgcgagaggc cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa 1620

 atctgggagg cgccgccga cccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcgcgg 1680
 caggaaggaa atgggcgggg agggccttcg tgcgtcggc cgccgccgtc cctttctccc 1740
 tctccagcct cggggctgtc cgcgggggga cggtgcctt cgggggggac ggggcagggc 1800
 ggggttcggc ttctggcgtg tgaccggcgg ctctagagcc tctgctaacc atgttcatgc 1860
 cttcttcttt ttctacagc tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcacattt 1920
 tggcaaagaa ttctagcttg ccacatggc catgtcagat gggggcagtg gagggggagt 1980
 gccagaacag gaagattccg tgctgttcag gcgaggaacc gggcagagtg acgacagtga 2040

 catttgggac gacacggccc tgatcaaggc ctatgacaaa gccgtggcct cttcaagca 2100
 cgcgctgaag aacgcgcaca ttgcgaaac cagcggcaag cctaagacca cccctaaacg 2160
 gaagcccgcc aagaaaaata agtcccagaa aaagaacaca gccgcaagtc ttcagcaatg 2220
 gaaggtgggg gataagtgt ccgcgatatg gagtgaagac ggggtcatct atcctgccac 2280
 catcgccagc atagacttca agcgcgaaac ctgcgtgggt gtgtacactg gatacgggaa 2340
 ccgggaggag cagaacctga gcgacctgt gagccctatt tgtgaggtgg ccaacaacat 2400
 cgagcagaat gcgcaagaaa atgaaaacga ggtcaggtg tccaccgatg agagtgaaaa 2460

 cagtaggagc cccggcaaca aatccgacaa tatcaagccc aaaagcgac cctggaatag 2520
 cttctttcca ccccccccc caatgcccgg acctcgactg ggccccggaa agcctggcct 2580
 gaagttaac ggccccctc ctctctctcc cctctctccc cccacactgc tgagctgctg 2640
 gttgccccct ttcccttcgg gacccctat catacctccc cccccctta ttgcctga 2700

ctccctggac gacgcggacg cgctgggcag tatgtcatc tcgtggtaca tgtcaggata	2760
ccacaccggg tactacatgg gcttcagaca aaatcagaag gaaggacgat gtagtcactc	2820
cctgaattaa tgatagctag aattcacgcg tggtagctct agagtcgacc cgggcggcct	2880
cgaggacggg gtgaactacg cctgaggatc cgatcttttt ccctctgcca aaaattatgg	2940
ggacatcatg aagccccttg agcatctgac ttctggctaa taaaggaaat ttattttcat	3000
tgcaatagtg tgttggaatt ttttgtgtct ctcaactcgga agcaattcgt tgatctgaat	3060
ttcgaccacc cataataccc attaccctgg tagataagta gcatggcggg ttaatcatta	3120
actacaagga acccctagtg atggagttgg ccactccctc tctgcgcgct cgctcgtca	3180
ctgaggccgg gcgaccaaag gtgcgccgac gcccgggctt tgcccgggcg gcctcagtga	3240
gcgagcgagc gcgcag	3256

<210> 26

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> modified hu68vp1

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (23)..(23)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (35)..(35)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (57)..(57)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (66)..(66)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (94)..(94)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (97)..(97)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (107)..(107)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> misc_feature

<222> (113)..(113)

<223> Xaa can be any naturally occurring amino acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorilated S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (149)..(149)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (247)..(247)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (253)..(253)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (259)..(259)

<223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid
(alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of

alpha- and gamma-glutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (270)..(270)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (297)..(297)

<223> Xaa represents D (Asp, aspartic acid) or amindated D to N (Asn,
asparagine)

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (304)..(304)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (306)..(306)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (314)..(314)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (319)..(319)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (329)..(329)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (332)..(332)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (336)..(336)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (384)..(384)

<223> Xaa may be D (asp, aspartic acid), or isomerized D.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (404)..(404)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (409)..(409)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (436)..(436)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (452)..(452)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (477)..(477)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (499)..(499)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (512)..(512)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (515)..(515)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (518)..(518)

<223>

> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (524)..(524)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (559)..(559)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (569)..(569)

<223> Xaa may be T (Thr, threonine), or Phosphorylated T

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (586)..(586)

<223> Xaa may be S (Ser, serine), or Phosphorylated S

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (599)..(599)

<223> Xaa represents Q, or Q deamidated to glutamic acid

(alpha-glutamic acid), gamma-glutamic acid (Glu), or a blend of

alpha- and gamma-glutamic acid

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (605)..(605)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (619)..(619)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W (e.g., kynurenine).

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (628)..(628)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (640)..(640)

<223> Xaa may be M (Met, Methionine), or oxidated M.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (651)..(651)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (663)..(663)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (666)..(666)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (689)..(689)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (693)..(693)

<223> Xaa may be K (lys, lysine), or acetylated K

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (695)..(695)

<223> Xaa may be W (Trp, tryptophan), or oxidated W.

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (709)..(709)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (735)..(735)

<223> Xaa may be Asn, or deamidated to Asp, isoAsp, or Asp/isoAsp

<400> 26

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

1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Xaa Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30
Lys Ala Xaa Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Xaa Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60
Val Xaa Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Xaa His Ala

85 90 95
Xaa Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Xaa Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110
Xaa Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg

130 135 140
Pro Val Glu Gln Xaa Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Val Gly Ile Gly

145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr

165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro

180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly

195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Xaa Ala Leu Pro Thr Tyr Xaa Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Xaa Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Xaa Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Xaa Trp Gln Arg Leu Ile Asn Xaa
290 295 300
Asn Xaa Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Xaa Phe Lys Leu Phe Xaa Ile
305 310 315 320
Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Xaa Gly Val Xaa Thr Ile Ala Xaa
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Xaa
370 375 380
Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Xaa Leu Arg Thr Gly Xaa Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Xaa Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Xaa Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

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

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

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

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

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

705 710 715 720

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

725 730 735

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 1

【변경전】

재조합 아데노-연관 바이러스(recombinant adeno-associated viral: rAAV) 벡터로서, AAVhu68 캡시드 및 세포에서 SMN 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 적어도 하나의 발현 카세트를 포함하며,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 1 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하고,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 잔기 위치를 기준으로, 위치 157에서 발린을 가지는 AAVhu68 vp1 및 AAVhu68 vp2 단백질과 위치 67에서 글루탐산을 가지는 AAVhu68 vp1 단백질을 가지는 것을 더 특징으로 하는 rAAV 벡터.

【변경후】

재조합 아데노-연관 바이러스(recombinant adeno-associated viral: rAAV) 벡터로서, AAVhu68 캡시드 및 세포에서 SMN 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 기능성 SMN 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 포함하는 적어도 하나의 발현 카세트를 포함하며,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 1 내지 736의 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열로부터의 발현에 의해서 생산된 AAVhu68 vp1 단백질, AAVhu68 vp2 단백질, 및 AAVhu68 vp3 단백질의 이중 집단을 포함하고,

AAVhu68 캡시드는 서열번호 8의 잔기 위치를 기준으로, 위치 157에서 발린을 가지는 AAVhu68 vp1 및 AAVhu68 vp2 단백질과 위치 67에서 글루탐산을 가지는 AAVhu68 vp1 단백질을 가지는 것을 더 특징으로 하는 rAAV 벡터.