



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0006933
(43) 공개일자 2025년01월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7038820
(22) 출원일자(국제) 2023년04월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년11월21일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2023/061210
(87) 국제공개번호 WO 2023/209137
국제공개일자 2023년11월02일
(30) 우선권주장
22170610.4 2022년04월28일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
타비라 테라퓨틱스 비브이
벨기에 헤버리 3001 가스통 게엔슬란 1
(72) 발명자
헨카에르츠, 엘스
벨기에 3000 루벤 버스 5105, 와아이스트라아트 6
케이유 루벤 알앤디 내
모예어르트, 벤자민
벨기에 3000 루벤 버스 5105, 와아이스트라아트 6
케이유 루벤 알앤디 내
브라운스, 티네
벨기에 3000 루벤 버스 5105, 와아이스트라아트 6
케이유 루벤 알앤디 내
(74) 대리인
윤의섭

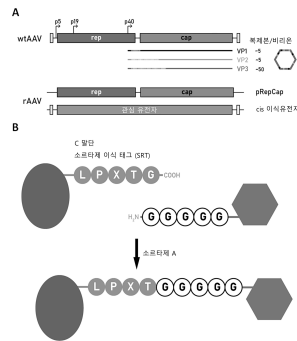
전체 청구항 수 : 총 24 항

(54) 발명의 명칭 아데노 연관 바이러스의 접합

(57) 요약

본 발명은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에서 소르타제 인식이 삽입된 것을 특징으로 하는 아데노 지원 바이러스 (AAV) VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질에 관한 것이고, 여기서 n 및 m은 0 내지 25의 범위이며, X는 임의의 천연 아미노산이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C12N 2750/14122 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2750/14145 (2013.01)

C12N 2810/85 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열은 삽입된 것을 특징으로 하는 아데노 지원 바이러스(AAV) 캡시드 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 삽입된 소르타제 인식 서열은 다음으로 이루어진 군: X_n -LPXTG- X_m [서열 번호: 10], X_n -NPXTG- X_m [서열 번호: 40], X_n -LPXTA- X_m [서열 번호: 41], X_n -LAXTG- X_m [서열 번호: 42], X_n -LPXAG- X_m [서열 번호: 48], X_n -LPXLG- X_m [서열 번호: 49], X_n -APXTG- X_m [서열 번호: 50], X_n -LPXSG- X_m [서열 번호: 51], X_n -FPXTG- X_m [서열 번호: 52], X_n -XPKTG- X_m [서열 번호: 53], 및 X_n -LPEXG- X_m [서열 번호: 54]으로부터 선택된 일반 서열 모티프를 갖는 서열이고, 여기서 n 및 m은 0 내지 25의 범위이며, X는 임의의 천연 아미노산인, AAV 캡시드 단백질.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 삽입된 소르타제 인식 서열은 일반 서열 모티프 X_n -LPXTG- X_m [서열 번호: 10]을 갖는, AAV 캡시드 단백질.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, n 및/또는 m은 0 내지 20의 범위인, AAV 캡시드 단백질.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, X는 글루타민 또는 글루탐산인, AAV 캡시드 단백질.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, VP1-VP2 전이 영역은 PVKTAP[서열 번호: 1]에 의해 정의되고, VR-I 영역은 SSQSGASN[서열 번호: 2]에 의해 정의되고, VR-IV 영역은 SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS[서열 번호: 3]에 의해 정의되고/거나 VR-VIII 영역은 AAV2 내의 QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV[서열 번호: 4] 또는 또 다른 AAV 혈청형 내의 해당 아미노산 서열에 의해 정의되는, 캡시드 단백질.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, VR-IV 영역에서의 삽입은 TPSGTTTQS[서열 번호: 5]를 갖는 단편에 존재하고/거나 VR-VIII 영역에서의 삽입은 AAV2 내의 LQRGNRQAA[서열 번호: 6] 또는 또 다른 AAV 혈청형 내의 해당 아미노산 서열을 갖는 단편에 존재하는, 캡시드 단백질.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]가 삽입된 영역에서 상기 영역의 하나 이상의 아미노산은 결실되거나 치환되는, 캡시드 단백질.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, AAV는 AAV2 또는 AAV9인, 캡시드 단백질.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, n은 5 내지 20, 바람직하게는 5 내지 15, 더 바람직하게는 10 내지 15인, 캡시드 단백질.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, m은 5 내지 20, 바람직하게는 5 내지 15, 더 바람직하게는 10 내지 15인, 캡시드 단백질.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 링커 서열 X_n 또는 X_m 은 글리신, 세린, 트레오닌 및 알라닌의 적어도 80%로 이루어지는, 캡시드 단백질.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 링커 서열 X_m 또는 X_n 은 글리신, 세린, 트레오닌 및 알라닌으로부터 선택된 아미노산으로 이루어지는, 캡시드 단백질.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, LPXTG[서열 번호: 10] 내의 X는 아스파르트산, 글루탐산, 아스파라긴 또는 글루타민이고, 바람직하게는 LPXTG[서열 번호: 10] 내의 X는 글루타민인, 캡시드 단백질.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, AAV 캡시드 단백질의 하나 이상의 라이신(K)은 글리신(Gly), 세린(Ser) 또는 알라닌(Ala), 바람직하게는 글리신(Gly)으로 돌연변이되는, 캡시드 단백질.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항의 캡시드 단백질을 인코딩하는 핵산.

청구항 17

제16항의 핵산을 포함하는 발현 벡터.

청구항 18

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 따른 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 입자.

청구항 19

VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역에서 잔여 소르타제 인식 서열을 특징으로 하는 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 접합 AAV 입자로서, 잔여 소르타제 인식 서열은 이중 접합 분자에 작동 가능하게 연결되는, 접합 AAV 입자.

청구항 20

제19항에 있어서, 비접합된 캡시드 AAV 단백질 대 접합된 AAV 캡시드 단백질의 비율은 1/59 내지 59/1, 바람직하게는 1/20 내지 20/1, 바람직하게는 1/10 내지 10/1, 더 바람직하게는 1/5 내지 5/1인, 접합 AAV 입자.

청구항 21

제19항 또는 제20항에 있어서, 말단 트리글리신 아미노산 서열의 존재를 특징으로 하는 이중 접합 분자에 잔여 소르타제 인식 서열을 통해 작동 가능하게 연결되는, 접합 AAV 입자.

청구항 22

제19항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 표적화 모이어티에 잔여 소르타제 인식 서열을 통해 작동 가능하게 연결되는, 접합 AAV 입자.

청구항 23

제19항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 약제로 사용하기 위한, 접합 AAV 입자.

청구항 24

다음 단계를 포함하는, 접합 AAV 입자를 생산하는 방법:

- AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 세포를 접촉시키는 단계로서, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상은 소르타제 인식 서열을 포함하는, 단계;
- 세포가 다수의 AAV 캡시드 단백질을 AAV 입자로 조립하도록 허용하고 이로부터 상기 AAV 입자를 수집하는 단계; 및
- AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 광범위하게 유전자 치료 분야에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 표적화 분자와 같은 이중 분자를 제어된 방식으로 AAV 캡시드에 접합시키는 기술에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 유전자 치료(GT)는 이식유전자를 첨가하여 세포 생리학을 변화시켜 질환을 치료하거나 예방하는 치료적 양상이다. 이 혁신적인 기술은 바이러스 벡터를 사용하여 질환을 일으키는 결함 있는 유전자를 교정하거나 교체한다. 유전자 치료는 현재까지 치료적 치료가 가능하지 않는 희귀하고 복잡하고 파괴적인 질환을 치료하는 데 큰 가능성을 가지고 있다.

[0003] 아데노 연관 바이러스(AAV)는 현재 유전자 치료에서 가장 중요한 유전자 전달체로 사용되는 작고 비병원성 바이러스이다. 상이 바이러스 광범위한 조직 트로피즘(tropism)을 가지고 있으며, 질환 표현형과 연관이 없으며 면역원성이 높지 않다. 더욱이, AAV는 단일 용량 투여 후 지속되는 치료 효과를 제공할 수 있는 잠재력을 가지고 있다.

[0004] 재조합 AAV(rAAV)는 바이러스 유전자를 트랜스(trans)에 넣고 약 4.5kb의 이식유전자로 대체한 바이러스의 조작된 버전이다. 일반적으로 rAAV 기반 GT 생성물은 안전하고 효과적인 것으로 나타났지만, 몇 가지 단점이 있다. 예를 들어, 표적 세포 내 표적 조직에서의 세포 진입, 바이러스 입자의 치료적 페이로드(payload)의 탈피 및 발현이라는 형질 도입의 기본 과정은 비효율적이어서 치료 효과를 얻기 위해 대량의 벡터 용량이 필요하다. 전신 투여 후에, 간에서의 축적 및 치료 벡터에 대한 면역 반응으로 이어질 수 있다. 중요한 점은 고용량의 rAAV가 간독성 및 혈전성 미세혈관병증과 같은 심각한 이상 사례와 관련이 있으며 AAV GT 시험에서 몇몇 환자의 사망을 초래했다는 것이다. 또한, AAV 혈청형에 따라, 인구의 40 내지 70%가 AAV 중화 항체를 보유하고 있다. 이러한 항체는 관찰된 면역 반응에 영향을 미쳐 효능을 감소시키고 GT 생성물의 재투여를 방해하여 많은 GT 시험에서 혈청 양성 반응이 배제 기준이 된다. 이러한 생물학적 문제 외에도, 고도로 정제된 rAAV 생성물을 대량으로 생산하는 데는 비용이 많이 들고 생산 능력도 극히 부족하다.

[0005] 이런 문제를 해결할 수 있는 가장 유망한 접근법 중 하나는 개선된 면역 회피 및 형질도입 특성을 보이는 새로운 캡시드를 설계하는 것이다. 캡시드 조작을 통해 자연 발생 AAV 벡터의 광범위한 항상을 특정 조직이나 세포 유형으로 좁히면, rAAV 생성물이 더욱 강력해져 더 낮은 용량으로도 치료가 가능해진다. 이를 통해 안전 위험과 제조 비용이 감소한다. 그러나, 캡시드 조작(예를 들어 지시 진화 캡시드 디자인 플랫폼)에 대한 상당한 노력에도 불구하고, 임상적으로 검증된 획기적인 혁신은 없다. 이는 자연에서 발견되는 AAV 혈청형이 지시 진화 라이브러리 생성을 위한 출발 물질로 사용되는 광범위한 트로피즘, 새로운 rAAV 혈청형 생산의 어려움, 설치류와 비인간 영장류(NHP)에서 캡시드 라이브러리를 스크리닝해야 할 필요성 때문인데, 후자는 인간 번역에 대한 장애물이 된다.

[0006] 제조성에 영향을 주지 않고 표적 조직에 대한 특이성을 높이고 표적의 형질도입을 낮추는 캡시드를 조작하는 유망한 방법은 제조 후 단계에서 특정 (재)표적화 그룹과 AAV 입자를 접합하는 것이다. 여러 그룹은 캡시드 단백질에 표적화 그룹을 유전적으로 통합하거나 AAV 입자가 정제된 후 공유 결합 또는 비공유 결합을 허용하는 어댑터 분자와 접합시켰다. 이러한 rAAV 접합체는 특정 조직에 대해 더 높은 형질도입 효율을 보이며, 예를 들어 간에서 표적화 효과가 더 높다. 그러나 캡시드에 필요한 변형은 종종 생산 수율에 영향을 미친다. 또한 모듈성이 낮고 복잡하며 종종 다성분 유전적 또는 화학적 디자인 셋업으로 인해 이러한 시스템은 현재의 상업적 제조 관행과 크게 호환되지 않는다. 최근에는 캡시드 단백질을 나노바디와 유전적으로 융합하여 표적화가 더욱 개선되었다. 그러나 표적화 효율성은 특정 AAV-나노바디 작제물에 크게 의존하였다. 이는 변형된 AAV 비리온(virion)의

예측할 수 없는 접합과 사차 구조 형성, 그리고 나노바디의 직접적인 유전적 통합으로 인해 발생하는 초분자 역학에 미치는 나노바디 융합의 알려지지 않은 효과로 거슬러 올라갈 수 있다. 또한, 큰 단백질 모이어티의 유전적 삽입은 상업적으로 판매되는 수지를 사용한 친화성 정제의 효율성에 부정적인 영향을 미친다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 요약하자면, AAV를 표적 그룹과 결합시키는 것은 유전자 치료를 위한 rAAV 입자의 형질도입 프로파일을 개선하는 유망한 전략이지만, 현재의 방법은 상업용 유전자 치료 제품에 필요한 설계 및/또는 성능 품질이 부족하고 가파른 제조 장애물에 직면해 있다. 임상적, 상업적 성공을 위해서는, AAV 접합에 대한 더 나은 접근법이 절실히 필요하다.

과제의 해결 수단

[0008] 광범위한 실험을 통해, 발명자들은 소르타제 인식 서열을 AAV 입자의 캡시드 서열에 내부적으로 도입하여 표적화 분자와 AAV 캡시드의 접합을 가능하게 하고 접합 AAV 입자를 생성하며, 조직 및 세포를 보다 효율적이고 특히적으로 표적화할 수 있다는 것을 발견하였다. 놀랍게도 분자생물학 및 생명공학 분야의 일반적인 합의와는 대조적으로, 소르타제 인식 서열은 전형적으로 C 말단에 사용되지만, 발명자들은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역에 소르타제 인식 서열을 삽입하면 소르타제 반응을 거친 후에도 상기 영역(들)의 구조적 무결성이 유지된다는 것을 발견하였다. 내부 소르타제 인식 서열을 사용하면 개선된 특성(예를 들어 관심 조직 및 세포의 보다 효율적이고 구체적인 표적화)을 갖춘 맞춤형 AAV 입자의 새로운 "세대"를 생성하는 데 특히 유용하다. 또한, 발명자들이 고려한 분자 설계를 통해 적절한 모(parental) AAV 혈청형과 비교했을 때 유사한 생산 효율을 유지하면서도 AAV 생산 방법 및 플랫폼의 모듈성을 높일 수 있었다.

[0009] 따라서, 본 발명의 한 측면은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열이 삽입된 것을 특징으로 하는 아데노 연관 바이러스(AAV) 캡시드 단백질을 제공한다. 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10], Xn-NPXTG-Xm[서열 번호: 40], Xn-LPXTA-Xm[서열 번호: 41], Xn-LAXTG-Xm[서열 번호: 42], Xn-LPXAG-Xm[서열 번호: 48], Xn-LPXLG-Xm[서열 번호: 49], Xn-APXTG-Xm[서열 번호: 50], Xn-LPXSG-Xm[서열 번호: 51], Xn-FPXTG-Xm[서열 번호: 52], Xn-XPXTG-Xm[서열 번호: 53], 및 Xn-LPEXG-Xm[서열 번호: 54]으로 이루어진 군으로부터 선택된 일반 서열 모티프를 갖는 서열이고, 여기서 n 및 m은 0 내지 25의 범위이며, X는 Xn 및 Xm에 대해 독립적으로 선택된 임의의 천연 아미노산이다. 바람직하게는, (AAV) VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질은 VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에서 소르타제 인식 서열 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10]이 삽입된 것을 특징으로 하며, 여기서 n 및 m은 0 내지 25의 범위이고, X는 임의의 천연 아미노산이다. 선택적으로 n 및 m은 0 내지 20의 범위이다. 바람직하게는 X는 글루탐산(E) 또는 글루타민(Q)이다.

[0010] 특정 구현예에서, VP1-VP2 전이 영역은 서열 번호: 1 [PVKTAP]에 의해 정의되고, VR-I 영역은 서열 번호: 2 [SSQSGASN]에 의해 정의되고, VR-IV 영역은 서열 번호: 3 [SRTNTPSGTTTQSQLQFSQAGASDIRDQS]에 의해 정의되고, 그리고 VR-VIII 영역은 AAV2 내의 서열 번호: 4 [QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV] 또는 또 다른 AAV 혈청형 내의 해당 아미노산 서열에 의해 정의된다.

[0011] 특정 구현예에서, VR-IV 영역에서의 삽입은 서열 번호: 5 [TPSGTTTQS]를 갖는 단편에 존재하고/거나 VR-VIII 영역에서의 삽입은 AAV2 내의 서열 번호: 6 [LQRGNRQAA] 또는 또 다른 AAV 혈청형 내의 해당 아미노산 서열을 갖는 단편에 존재한다.

[0012] 영역에서 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]이 삽입되는 특정 구현예에서, 상기 영역의 하나 이상의 아미노산은 결실되고/거나, 상기 영역의 하나 이상의 아미노산은 치환된다.

[0013] 선택적으로, AAV는 AAV2 또는 AAV9이다.

[0014] 선택적으로, n은 15 내지 20, 또는 10 내지 15, 또는 5 내지 10, 또는 0 또는 5이거나, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1이다. 바람직하게는, n은 5 내지 20, 바람직하게는 5 내지 15, 더 바람직하게는 10 내지 15이다.

[0015] 선택적으로, m은 15 내지 20, 또는 10 내지 15, 또는 5 내지 10, 또는 0 또는 5이거나, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1이다. 바람직하게는 m은 5 내지 20, 바람직하게는 5 내지 15, 더 바람직하게는 10 내지 15이다.

- [0016] 특정 구현예에서, 링커 서열 Xn 또는 Xm은 글리신 (Gly), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr), 및 알라닌 (Ala)의 적어도 80%로 이루어진다. 바람직하게는, 링커 서열 Xm 또는 Xn는 글리신 (Gly), 세린 (Ser), 트레오닌 (Thr) 및 알라닌 (Ala)로부터 선택된 아미노산으로 이루어진다.
- [0017] 특정 구현예에서, LPXTG 내의 X는 아스파르트산 (Asp), 글루탐산 (Glu), 아스파라긴 (Asn) 또는 글루타민 (Gln), 바람직하게는 글루타민 (Gln)이다.
- [0018] 특정 구현예에서, AAV 캡시드 단백질의 하나 이상의 라이신(K)은 글리신(Gly), 세린(Ser) 또는 알라닌(Ala)으로 돌연변이된다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 관련 측면은 본원에 기재된 구현예 중 어느 하나에 따른 캡시드 단백질을 인코딩하는 핵산에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 관련 측면은 전술한 측면의 핵산을 포함하는 발현 벡터에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 추가적인 관련 측면은 AAV 입자에 관한 것이다. 특히, AAV 입자는 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 삽입된 소르타제 인식 서열을 갖는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 소르타제 접합 반응 전의 AAV 입자와 소르타제 접합 반응 후의 AAV 입자(즉, 접합 AAV 입자)가 모두 의도된 것이다. 따라서, 본 발명의 추가적인 측면은 상기 기재된 구현예 중 하나에 따른 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 입자에 관한 것이다. 또한, 본 발명의 또 다른 관련 측면은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역에서 잔여 소르타제 인식 서열(즉 접합 반응 후 존재하는 변형된 소르타제 인식 서열)을 특징으로 하는 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 접합 AAV 입자에 관한 것이고, 잔여 소르타제 인식 서열은 이중 접합 분자에 작동 가능하게 연결된다.
- [0022] 특정 구현예에서, 접합 AAV 입자는 소르타제 인식 서열을 통해 이중 접합 분자에 작동 가능하게 연결(즉, 융합)되며, 바람직하게는 상기 접합 분자는 말단 트리글리신 아미노산 서열의 존재를 특징으로 한다. 선택적으로, 이중 접합 분자는 소분자, 탄수화물, 지질 또는 폴리펩타이드이다.
- [0023] 특정 구현예에서, 접합 AAV 입자는 소르타제 인식 서열을 통해 표적화 모이어티에 작동 가능하게 연결(즉, 융합)된다. 선택적으로, 표적화 모이어티는 세포 수용체의 리간드, 또는 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질이다. 선택적으로, 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질은 항체 또는 나노바디이다. 선택적으로, 항체 또는 나노바디는 HER2에 특이적으로 결합한다.
- [0024] 본 발명의 또 다른 측면은 본원에 기재된 구현예 중 하나에 따른 접합 AAV 입자를 약제로 사용하는 것에 관한 것이다.
- [0025] 상기에 기재된 발명의 구현예의 관련된 측면은 본원에 기재된 바와 같이 접합 AAV 입자를 생산하는 방법에 관한 것이다. 특정 구현예에서, 다음 단계를 포함하는, 접합 AAV 입자를 생산하는 방법에 관한 것이다:
- [0026] - AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 세포를 접촉시키는 단계로서, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상은 소르타제 인식 서열을 포함하는, 단계;
- [0027] - 세포가 다수의 AAV 캡시드 단백질을 AAV 입자로 조립하도록 허용하고 이로부터 상기 AAV 입자를 수집하는 단계; 및
- [0028] - AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계.
- [0029] 본 발명의 상기 및 추가적인 측면과 바람직한 구현예는 다음 섹션과 첨부된 청구항에 기재되어 있다. 첨부된 청구항의 요지는 본 명세서에 구체적으로 포함되어 있다.

도면의 간단한 설명

[0030] **도 1.** (A) 야생형 AAV(wtAAV)와 재조합 AAV(rAAV)의 도식적 유전적 축적물. (B) 소르타제 A 메커니즘의 도식적 표현

도 2: (A) VP1, VP2, VP3 단백질, 및 VP1-VP2, VR-I, VR-IV, 및 VR-VIII 영역의 도식적 개요. (B) 링커 서열에 축적되는 내부 LPQTG 모티프의 일반적인 표현.

도 3: LPQTG 모티프는 링커 없이 또는 모티프 양쪽에 1개 또는 2개의 GGSGS [SEQ ID NO 47] 반복으로 축적된 AAV2-HB0 VR-IV(AA 453과 454 사이) VR-VIII(AA 587과 588 사이)에 삽입되었다. 접합된 Nb(~19 kDa)를 갖는

VP3의 N 말단 단편의 몰 질량과 일치하는 밴드는 VIII-1과 VIII-2에서 볼 수 있어 접합 반응을 입증한다. Srt-A: 소르타제 A만, Nb: 나노바디만

도 4: AAV2, VR-I, 0-1-2 L. 양쪽에 측접하는 0, 1 또는 2개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 265에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0. 화살표: 접합된 생성물.

도 5: AAV2, VR-IV, 0-1-3-4-5 L. 양쪽에 측접하는 0, 1, 3, 4 또는 5개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0. 화살표: 접합된 생성물.

도 6: AAV2, VR-VIII 0-1-2-3-4-5L. 양쪽에 측접하는 0, 2, 1, 3, 4 또는 5개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0. 화살표: 접합된 생성물.

도 7: AAV9, VR-IV 0-1-2-3L. 양쪽에 측접하는 0, 1, 2 또는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A. 화살표: 접합된 생성물.

도 8: AAV9, VR-VIII 0-1-3L. 양쪽에 측접하는 0, 1 또는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A. 화살표: 접합된 생성물.

도 9: 5가지 뚜렷한 작제물의 비교. 양쪽에 측접하는 2개 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 265에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A, 및 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A. 화살표: 접합된 생성물.

도 10: GGG-바이오틴. 양쪽에 측접하는 1개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0.

도 11: HER2 대 GFP. 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A. 화살표: 접합된 생성물.

도 12: AAV2_VR-VIII 및 AAV9_VR-IV 내의 LPQTG 대 LPETG. 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPETG 태그[서열 번호: 44]를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV9-A, 및 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 43] 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPETG 태그[서열 번호: 44]를 갖는 AAV9-A. 화살표: 접합된 생성물.

도 13: 시험관 내 표적화. 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그[서열 번호: 43]를 갖는 AAV2-HB0. (A) 형질 도입 세포 %, (B) 형질 도입 세포 %((A)에서 확대), (C) 유동 세포측정 결과.

도 14: 항-HER2 나노바디와 접합된 상이한 AAV 벡터와 비접합 벡터과의 형질도입 효율 비교. 형질도입 효율은 GFP 형광을 통해 측정된다.

도 15: 상이한 작제물의 생산 수율 비교. (A) 생산자 세포 배양물의 용해물 내 평균 바이러스 게놈("Vg") 수율(왼쪽 Y축) 및 전체 바이러스 입자 % (오른쪽 Y축; 검은색 점). (B) 생산자 세포 배양물의 상청액 내 평균 바이러스 게놈("Vg") 수율(왼쪽 Y축; 검은색 점) 및 전체 바이러스 입자 % (오른쪽 Y축).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥이 명백하게 달리 지시하지 않는 한 단수 및 복수 지시 대상체를 포함한다.

[0032] 본원에 사용되는 용어 "포함하는(comprising)", "포함한다(comprise)" 및 "로 포함된(comprised of)"은 "포함하는(including)", "포함한다(include)" 또는 "함유하는(containing)", "함유한다(contain)"와 동의어이며 포괄적이거나 개방형이며 추가적인, 비-인용된 구성원, 요소 또는 방법 단계를 배제하지 않는다. 이 용어는 특허 전문용어에서 잘 확립된 의미를 가지고 있는 "구성되는" 및 "본질적으로 구성되는"도 포괄한다.

- [0033] 수치 범위를 끝점에 따라 인용하는 것에는 각 범위에 포함된 모든 숫자와 분수, 인용된 끝점이 포함된다. 이는 "로부터...로" 또는 "... 사이" 또는 다른 표현으로 시작되는지 여부와 무관하게 숫자 범위에 적용된다.
- [0034] 매개변수, 양, 시간적 지속 기간 등과 같은 측정 가능한 값을 언급할 때 본원에 사용되는 용어 "약" 또는 "대략"은 명시된 값의 변동, 예를 들어 명시된 값의 $\pm 10\%$ 이하, 바람직하게는 $\pm 5\%$ 이하, 더 바람직하게는 $\pm 1\%$ 이하, 그리고 훨씬 더 바람직하게는 지정된 값의 $\pm 0.1\%$ 이하의 변동을 포괄하는 것으로 의미되며, 이러한 변동은 개시된 발명에서 수행하기에 적절한 범위 내에 있다. 수식어 "약" 또는 "대략"이 참조하는 값 자체도 구체적으로, 바람직하게는 개시된다는 점을 이해해야 한다.
- [0035] "하나 이상" 또는 "적어도 하나"라는 용어, 예를 들어 하나 이상의 구성원 또는 구성원 그룹의 적어도 한 구성원은 그 자체로 명확하지만, 추가 예시를 통해 이 용어는 특히 상기 구성원 중 하나 또는 상기 구성원 중 2개 이상, 예를 들어 상기 구성원의 ≥ 3 , ≥ 4 , ≥ 5 , ≥ 6 또는 ≥ 7 등에 대한 참조와 상기 구성원 전체에 대한 참조를 포괄한다. 또 다른 예로, "하나 이상" 또는 "적어도 하나"는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 또는 그 이상을 지칭할 수 있다.
- [0036] 본원에서 발명의 배경에 대한 논의는 발명의 문맥을 설명하기 위해 포함되었다. 이는 언급된 자료가 해당 청구항의 우선일 당시 어느 국가에서든 공개되었거나 알려졌거나 일반적으로 알려져 있다는 것을 인정하는 것으로 간주되어서는 안 된다.
- [0037] 본 개시 내용 전체에 걸쳐, 다양한 간행물, 특허 및 공개된 명세서에는 식별 인용을 통해 참조된다. 본 명세서에 인용된 모든 문서는 본원에 전체적으로 참고로 포함된다. 특히, 본 문서에서 구체적으로 언급한 교시 또는 섹션은 참조로 포함된다.
- [0038] 달리 정의되지 않는 기술적 및 과학적 용어들을 포함하는 본 발명의 개시에 사용되는 모든 용어는 본 발명이 속하는 당업계에서 통상의 지식을 가진 자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 추가 지침을 통해, 용어 정의를 포함하여 발명의 교시를 더 잘 이해할 수 있도록 하였다. 발명의 특정한 측면 또는 발명의 특정한 구현예와 관련하여 구체적인 용어가 정의되는 경우, 그러한 함축적 의미 또는 의미는 본 명세서 전체에 걸쳐 적용되며, 달리 정의되지 않는 한 발명의 다른 측면 또는 구현예의 문맥에서도 적용된다. 예를 들어, 생성물에 관한 구현예는 방법 및 용도의 해당 특징에도 적용 가능하다.
- [0039] 다음의 단락에서, 본 발명의 구현예의 상이한 측면을 더 상세히 정의한다. 이렇게 정의된 각각의 측면/구현예는 명백히 반대로 나타내지 않는 한 임의의 다른 측면(들) 또는 구현예(들)과 조합될 수 있다. 특히, 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 바와 같은 임의의 특징은 바람직하거나 유리한 것으로 나타낸 바와 같은 임의의 다른 특징 또는 특징들과 조합될 수 있다.
- [0040] 본 명세서 전반에 걸쳐 "일 구현예", 및 "구현예"에 대한 언급은 구현예와 관련하여 설명된 특정한 특징, 구조 또는 특성이 본 발명의 적어도 하나의 구현예에 포함된다는 것을 의미한다. 따라서, 본 명세서의 다양한 곳에서 "한 구현예에서" 또는 "구현예에서"라는 문구가 나타난다고 해서 반드시 모두 동일한 구현예를 참조하는 것은 아니다. 더욱이, 특정한 특징, 구조 또는 특성은 본 개시내용을 통해 당업자에게 명백할 것처럼 하나 이상의 구현예에서 임의의 적절한 방식으로 조합될 수 있다. 또한, 본원에 기재된 일부 구현예는 다른 구현예에 포함된 일부 특징을 포함하지만 다른 특징은 포함하지 않는 반면, 상이한 구현예의 특징을 조합하는 것도 발명의 범위 내에 있으며, 상이한 구현예를 형성한다는 것은 당업자라면 누구나 이해할 수 있는 사실이다. 예를 들어, 첨부된 청구항에서, 청구된 구현예의 대체 조합이 포괄되며, 이는 당업자라면 누구나 이해할 수 있을 것이다.
- [0041] 달리 나타내지 않는 한, 구체적으로 자세히 기재되지 않은 모든 방법, 단계, 기술 및 조작은 그 자체로 알려진 방식으로 수행될 수 있으며, 이는 당업자에게 명백하다. 예를 들어, 표준 핸드북과 여기에 언급된 일반적인 배경 기술, 그리고 본원에 인용된 추가 참고 문헌(예를 들어 Sambrook et al., Molecular cloning: a laboratory manual, ISBN 0879693096, 1989 및 이에 상응하는 업데이트된 4판, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)을 참조한다.
- [0042] 일반적으로, 본 발명의 아미노산 서열 및 그 번호는 서열 번호: 7에 묘사된 AAV2 VP1 캡시드 서열을 참조한다. 짧은 VP2와 VP3 단백질에도 동일한 넘버링이 유지된다. 또한, 소르타제 인식 서열의 삽입, 링커 서열의 선택적 삽입, 그리고 캡시드 단백질 백본 내의 아미노산 결실은 상이한 길이의 폴리펩타이드를 생성한다는 점이 주목된다. 또한 캡시드 단백질 백본 내의 이러한 폴리펩타이드 아미노산은 서열 번호: 7에 의해 정의된다. AAV2 캡시드 단백질과 다른 AAV 혈청형의 캡시드 단백질 간의 서열 유사성을 통해 서열 번호: 7을 참조하여 서열 정렬에서 해당 아미노산을 식별할 수 있다. 실제로, 해당 AAV9 위치에 대한 참조도 본 설명 전체에 걸쳐 이루어진다.

- [0043] 본 발명은 자연 발생 혈청형 변이체 및 트로피즘을 변경하기 위한 인공적 변형과 같이 서열 번호: 7, 8 또는 9와 다른 AAV 캡시드 서열에도 동일하게 적용될 수 있다. 그러한 변이체는 R585A, R588A 돌연변이체의 경우처럼 VR 영역 내에서도 발생할 수 있다. 따라서, 실제로 본원에 개시된 AAV2 위치는 다른 AAV 혈청형 변이체(자연 발생 및 인공 생성)의 해당 아미노산 위치도 포함하는 것으로 의도된다.
- [0044] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "단백질"은 일반적으로 하나 이상의 폴리펩타이드 사슬, 즉 펩타이드 결합으로 연결된 아미노산 잔기의 폴리머 사슬을 포함하는 거대 분자를 포괄한다. 이 용어는 자연적으로, 재조합적으로, 반합성적으로 또는 합성적으로 생산된 단백질을 모두 포괄할 수 있다. 이 용어는 폴리펩타이드 사슬(들)의 하나 이상의 공동 발현 또는 후발현 유형 변형, 예컨대, 제한 없이, 글리코실화, 아세틸화, 구아니디닐화, 인산화, 설포화, 메틸화, 유비퀴틴화, 신호 펩타이드 제거, N 말단 Met 제거 등을 수반하는 단백질도 포괄한다. 이 용어는 또한 해당 천연 단백질에 비해 아미노산 서열 변동을 수반하는 단백질 변이체 또는 돌연변이체, 예컨대, 예를 들어 아미노산 결실, 부가 및/또는 치환을 포함한다. 이 용어는 전장 단백질과 단백질 일부 또는 단편, 예를 들어 그러한 전장 단백질을 처리하여 자연 발생 단백질 일부를 모두 포괄한다.
- [0045] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "폴리펩타이드"는 일반적으로 펩타이드 결합으로 연결된 아미노산 잔기의 폴리머 사슬을 포괄한다. 따라서 특히 단백질이 단일 폴리펩타이드 사슬로만 구성된 경우, 이러한 단백질을 나타내기 위해 본원에서 용어들 "단백질" 및 "폴리펩타이드"는 상호 교환 가능하게 사용될 수 있다. 이 용어는 폴리펩타이드 사슬의 임의의 최소 길이에 제한되지 않는다. 이 용어는 자연적으로, 재조합적으로, 반합성적으로 또는 합성적으로 생산된 폴리펩타이드를 모두 포괄할 수 있다. 이 용어는 전장 폴리펩타이드 및 폴리펩타이드 일부 또는 단편, 예를 들어 그러한 전장 단백질을 처리하여 자연 발생 폴리펩타이드 일부를 모두 포괄한다.
- [0046] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "펩타이드"는 바람직하게는 50개 이하의 아미노산, 예를 들어 45개 이하의 아미노산, 바람직하게는 40개 이하의 아미노산, 예를 들어 35개 이하의 아미노산, 더 바람직하게는 30개 이하의 아미노산, 예를 들어 25개 이하, 20개 이하, 15개 이하 또는 10개 이하의 아미노산을 포함하는 펩타이드 결합으로 연결된 아미노산 잔기의 단쇄를 지칭한다. 펩타이드를 펩타이드로 간주하기 위해서는 엄격한 최대 길이가 정해져 있지 않다. 펩타이드라는 용어는 상기 폴리펩타이드에 대해 논의한 것과 같은 자연적으로, 재조합적으로, 반합성적으로 또는 합성적으로 생산된 펩타이드를 포괄할 수 있다.
- [0047] "아미노산"이라는 용어는 자연적으로 발생하는 아미노산, 자연적으로 인코딩된 아미노산 또는 단백질원성 아미노산, 비자연적으로 인코딩된 아미노산, 비자연적으로 발생하는 아미노산, 자연 발생 아미노산과 유사한 방식으로 기능하는 아미노산 유사체 및 아미노산 모방체를 포괄하며, 이들 모두는 D 및 L 입체이성질체이고, 그의 구조는 이러한 입체이성질체 형태를 허용한다. 아미노산은 그의 명칭, IUPAC-IUB 생화학 명명법 위원회에서 권장하는, 일반적으로 알려진 세 글자 코드 또는 한 글자 코드로 본원에서 지칭된다. "자연적으로 인코딩된 아미노산"은 20가지의 일반적인 아미노산 또는 피롤리신, 피롤린-카복시-라이신 또는 셀레노시스테인 중 하나인 아미노산을 지칭한다. 20가지의 일반적인 아미노산은 다음과 같습니다: 알라닌 (A 또는 Ala), 시스테인 (C 또는 Cys), 아스파르트산 (D 또는 Asp), 글루탐산 (E 또는 Glu), 페닐알라닌 (F 또는 Phe), 글리신 (G 또는 Gly), 히스티딘 (H 또는 His), 이소류신 (I 또는 Ile), 라이신 (K 또는 Lys), 류신 (L 또는 Leu), 메티오닌 (M 또는 Met), 아스파라긴 (N 또는 Asn), 프롤린 (P 또는 Pro), 글루타민 (Q 또는 Gln), 아르기닌 (R 또는 Arg), 세린 (S 또는 Ser), 트레오닌 (T 또는 Thr), 발린 (V 또는 Val), 트립토판 (W 또는 Trp), 및 티로신 (Y 또는 Tyr). 또한, 아미노산 유사체도 포함되는데, 여기서 하나 이상의 개별 원자는 상이한 원자, 동일한 원자의 동위 원소 또는 상이한 작용기로 대체된 것이다.
- [0048] "인코딩"은 당업계의 일반적인 해석에 따라 해석되어야 하며, 따라서 핵산 서열 또는 그 일부(들)가 특정 아미노산 서열, 예를 들어 하나 이상의 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드의 아미노산 서열에 해당 유기체의 유전 코드에 의해 대응하거나 템플릿-전사 산물(예를 들어 RNA 또는 RNA 유사체) 관계의 다른 핵산 서열에 대응한다는 것을 나타낸다. 본 설명 전체에 걸쳐 아미노산 위치 및/또는 아미노산 서열의 변형에 대한 수많은 참조가 이루어지고 있지만, AAV 캡시드 단백질이 핵산 서열로부터 번역되는 구현예에서, 상기 변형은 인코딩 핵산 서열에 도입되어야 함이 분명하다.
- [0049] 본 명세서 전체에서 사용되는 용어 "핵산"은 전형적으로 본질적으로 뉴클레오사이드 단위로 구성된 임의의 길이의 폴리머(바람직하게는 선형 폴리머)를 지칭한다. 뉴클레오사이드 단위는 일반적으로 헤테로사이클릭 염기 및 당 그룹을 포함한다. 헤테로사이클릭 염기는 특히 퓨린 및 피리미딘 염기 예컨대 아데닌 (A), 구아닌 (G), 시토신 (C), 티민 (T) 및 우라실 (U)을 포함하고, 이러한 염기는 자연 발생 핵산, 다른 자연 발생 염기 (예를 들어 크산틴, 이노신, 하이포잔틴) 뿐만 아니라 화학적으로 또는 생화학적으로 변형된 (예를 들어 메틸화), 비-자연

또는 유도체화된 염기에 널리 분포되어 있다. 핵산은 이중 가닥, 부분적으로 이중 가닥, 또는 단일 가닥일 수 있다. 단일 가닥인 경우, 핵산은 센스 가닥이거나 안티센스 가닥일 수 있다. 또한 핵산은 원형이거나 선형일 수 있다.

[0050] 당업자라면 서열 간의 서열 동일성을 평가할 수 있다는 것이 인정된다. 상이한 아미노산이나 핵산 서열 간의 서열 동일성을 검증하는 방법과 도구는 잘 알려져 있다. 이러한 도구에는 (단백질) BLAST, ClustalW2, SIM 정렬 도구, TranslatorX, T-COFFEE가 포함된다. 두 서열 간의 동일성 백분율은 알고리즘 선택과 매개변수에 따라 다소한 차이를 보일 수 있다. 본원에 사용되는 용어 "서열 동일성"은 뉴클레오타이드 (또는 아미노산) 수준에서의 서열 간의 관계를 지칭한다. "동일성 %"라는 표현은 예를 들어 2개 이상의 최적으로 정렬된 서열을 비교 창에 걸쳐 비교하여 결정되며, 비교 창에 있는 서열의 일부는 서열의 최적 정렬을 위해 참조 서열과 비교했을 때 삽입 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 참조 서열에는 삽입 또는 결실이 포함되지 않는다. 참조 창을 선택한 다음, 창에 있는 서열 간에 동일한 뉴클레오타이드 (또는 아미노산)의 수를 결정하고, 동일한 뉴클레오타이드 (또는 아미노산)의 수를 창에 있는 뉴클레오타이드 (또는 아미노산)의 수로 나눈 다음 100을 곱하여 "동일성 %"를 계산한다. 달리 나타내지 않는 한, 서열 동일성은 참조 서열의 전체 길이에 걸쳐 계산된다. 특정 아미노산 서열과 퀴리 폴리펩타이드의 아미노산 서열 간의 백분율 동일성을 결정하는 예시적 절차는 적합한 알고리즘 매개변수를 사용하여 NCBI 웹사이트(www.ncbi.nlm.nih.gov)에서 웹 애플리케이션이나 독립 실행형 프로그램(BLAST 버전 2.2.31+)으로 이용 가능한 Blast 2 서열(BI2seq) 알고리즘을 사용하여 두 아미노산 서열을 정렬하는 것을 수반한다. 적합한 알고리즘 매개변수의 예는 다음을 포함한다: 행렬 = Blosum62, 갭을 개방하는 비용 = 11, 갭을 확장하는 비용 = 1, 기대값 = 10.0, 단어 크기 = 3). 서열 데이터베이스나 본 명세서에 표시된 임의의 서열이 펩타이드, 폴리펩타이드, 단백질 또는 핵산의 전구체일 수 있으며, 성숙한 분자로부터 처리되어 분리된 부분을 포함할 수 있다는 점을 당업자이라면 쉽게 알 수 있을 것이다.

[0051] "아데노 연관 바이러스"는 일반적으로 "AAV"로 약칭되며, 비외피 이십면체 캡시드 내에 4.7 kb 단일 가닥 DNA 게놈으로 구성된 비병원성 파코바이러스를 지칭한다. 전장 용어와 그 약어는 모두 바이러스 자체 또는 이의 유도체를 지칭하는 데 사용될 수 있다. AAV 게놈에는 3개의 AAV 프로모터(즉, p5, p19, p40; 명칭은 상대적인 맵 위치를 지칭함)가 포함되어 있으며, 이는 rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 2개의 열린 해독틀의 발현을 담당한다. 2개의 rep 프로모터(p5 및 p19)는 단일 AAV 인트론의 차등적 스플라이싱과 커플링하여 rep 유전자로부터 4개의 Rep 단백질(Rep 78, Rep 68, Rep 52 및 Rep 40)을 생산한다. 별개의 Rep 단백질은 바이러스 복제의 다양한 측면에 관여하는 상이한 효소적 특성을 가지고 있다. cap 유전자는 p40 프로모터에서 발현되며 대체 스플라이싱 및 비공통 번역 출발 부위를 통해 세 가지 캡시드 단백질 바이러스 단백질 1 (VP1), 바이러스 단백질 2 (VP2), 및 바이러스 단백질 3 (VP3)을 인코딩한다. VP1, VP2 및 VP3는 AAV의 캡슐화에 관여한다(즉, VP1, VP2 및 VP3는 AAV 캡시드 단백질이다). 따라서 VP1, VP2 및 VP3는 중첩 서열을 가지고 있으며, VP3는 VP2 서열 내에 완전히 포함되어 있고, VP2는 다시 VP1 내에 포함되어 있다. 가장 높은 구조적 변동(VR)을 보이는 영역은 해당 분야에서 VR-I 내지 VR-IX로 주석이 달려 있다. 본 발명은 VR-I, VR-IV 및 VR-VIII 영역 내에서의 서열 조작에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 VP1-VP2 전이 영역(즉, 각 VP 단백질에 고유한 N 말단 VP1 부분 및 VP2 단백질 서열의 N 말단의 끝을 표시하는 영역) 내에서의 서열 조작을 포괄한다. AAV 게놈의 맵 위치 95에 단일 공통 폴리아데닐화 부위가 위치해 있다. 또한, cap 유전자 내에 대체 해독틀로 존재하는 열린 해독틀은 AAV 캡시드 단백질을 핵소체에 위치시키고 캡시드 조립 과정에서 기능하는 바이러스 단백질인 조립 활성화 단백질(AAP)을 생산한다. AAV 게놈은 양쪽 끝에 역위 말단 반복부를 포함한다.

[0052] 본원에 사용되는 "AAV"라는 용어는 요구되거나 명확하게 달리 표시된 경우를 제외하고 모든 하위 유형 및/또는 혈청형(자연 발생 및 재조합 형태; rAAV)을 포괄하는 것으로 이해되어야 한다. 따라서 "AAV"라는 용어는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, 조류 AAV, 쏫과 AAV, 개과 AAV, 말과 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV, 및 양 AAV, 또는 이의 임의의 조합을 포괄한다. 당업자는 상기 표시가 상기 AAV에 의해 감염될 수 있는 대상체를 지칭하는 것을 이해한다. 예를 들어, 영장류 AAV는 영장류를 감염시킬 수 있는 AAV를 지칭한다. 다양한 AAV 혈청형의 게놈 서열, 고유한 역위 말단 반복부(ITR), Rep 단백질 및 캡시드 서브유닛이 당업계에 기재되어 있다. 이러한 서열은 문헌이나 GenBank, UniProt 등의 공개 저장소에 찾아볼 수 있다. "AAV"라는 용어는 자연에서 자연적으로 발생하지 않는 맞춤형 설계된 AAV 캡시드 단백질을 함유하는 모자이크 AAV와 키메라 AAV를 모두 포괄한다(예를 들어, 지시 진화를 통해 얻은 AAV 포함). 상이한 혈청형 중에서 게놈 다양성은 바이러스 캡시드의 초가변 영역(HVR)에 가장 집중되어 있으며, 이는 AAV의 조직 트로피즘에 영향을 미친다는 것이 당업계에 기재되어 있다. 당업자라면 AAV 벡터의 조직 트로피즘이 세포 표면 수용체, 세포 흡수, AAV의 세포 내 처리, AAV 게놈의 핵 전달, AAV의 탈피 및 두 번째 가닥 DNA 전환과 같은 다른 요소(즉, 매개변수)에 따라 달라진다는 사실을 알고 있다. 본 발명의 문맥에서 바람직한 AAV 혈청형은 AAV2 및 AAV9

이지만, 본원에 기재된 임의의 구현에는 모자이크 AAV 및 키메라 AAV를 포함한 임의의 AAV 혈청형에 동등하게 적용 가능한 것으로 구상된다.

[0053] 본원에 사용되는 용어 "트로피즘"은 바이러스(본 문맥에서는 AAV)가 특정 숙주 종이나 숙주 종 내의 특정 세포 유형의 바람직한 표적화를 지칭한다. 특정 바이러스의 경우, 바이러스의 트로피즘은 바이러스의 상대적인 선호도를 설명한다. 절대적인 형질도입 효율이 비슷하지 않더라도, 바이러스가 동일한 특성을 선호하는 경우 다른 바이러스와 비교했을 때 유사한(또는 동일한) 트로피즘을 갖는 것으로 간주될 수 있다(예를 들어 제2 바이러스도 동일한 세포(즉, 동일한 세포 유형)를 감염시키는 데 더 성공적임). 제2 바이러스가 테스트된 모든 세포 유형을 감염시키는 데 제1 바이러스보다 효율적인 수도 있지만, 상대적인 선호도가 유사하거나 동일하다면, 일반적으로 제2 바이러스는 제1 바이러스와 유사하거나 동일한 트로피즘을 갖는 것으로 간주된다.

[0054] "AAV(바이러스) 입자", "AAV 비리온" 또는 "AAV(벡터) 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질 및 캡시드화된 단일 가닥 핵산 가닥으로 구성된 바이러스 입자를 지칭한다. 특정 구현예에서, AAV 입자는 이중 핵산 서열(즉, 포유류 세포 또는 곤충 세포로 제한되지 않는 것과 같은 진핵 세포에 전달되는 이식유전자와 같은 야생형 AAV 게놈이 아닌 핵산)을 포함한다. 일반적으로 관련 용어인 "AAV 캡시드"는 AAV 입자의 외부 표면(즉, 캡시드)을 지칭한다. AAV 캡시드는 3개의 VP가 총 60개 (복제본)를 함유하고, 캡시드에 1:1:10의 VP1:VP2:VP3 비율로 존재할 것으로 예측된다. 따라서 본 명세서 전체에서 "AAV 캡시드 단백질"에 대한 언급은 VP1, VP2 및 VP3 단백질 각각을 포괄하거나, 표시된 경우 이들 중 어느 하나를 선택한다. 본 명세서 전체에서 "접합 AAV 입자"라는 용어가 사용된 경우, 이는 소르타제 접합 반응을 거친 AAV 입자를 나타낸다는 점을 인식해야 한다.

[0055] "소르타제 효소"와 상호 교환적으로 사용되는 "소르타제"는 자연에서 특정 표면 단백질을 펩티도글리칸에 공유 결합함으로써 박테리아 세포벽 형성에 역할을 하는 효소 계열을 지칭한다. 가장 넓은 해석에서, 소르타제는 아미노산 스트레치(stretch)를 인식하고, 그 아미노산의 스트레치 내에서 부위 특이적으로 절단하고, 마지막으로 수용체 모이어티의 N 말단 잔기와의 펩타이드 결합을 통해 절단 부위의 C 말단 바로 옆에 기질 모이어티를 부착하는 효소로 정의할 수 있다. 달리 표현하면, 소르타제 효소는 기질 단백질 내의 소르타제 인식 모티프를 인식하고 펩타이드 전이 반응을 수행한다. 제1 반응 단계에서, 소르타제는 소르타제 인식 모티프의 펩타이드 결합을 절단하여, 절단된 소르타제 인식 모티프와 아실 중간체를 형성한다. 제2 반응 단계에서, 소르타제는 소르타제 수용체 모티프(일반적으로 하나 이상의 글리신 또는 글리신의 스트레치)를 갖는 수용체 모이어티에 결합하여 아실 중간체를 전달한다. 반응의 결과 기질 단백질과 수용체 모이어티 사이에 새로운 펩타이드 결합이 형성된다. "소르타제 인식 모티프"를 지칭하기 위해 본원에서 그리고 당해 기술에서 상호 교환적으로 사용되는 대체 용어는 "소르타제 인식 서열"과 "소르타제 인식 태그"를 포함한다.

[0056] 상이한 소르타제가 해당 기술에 기재되어 있다. 이에 대한 비제한적 예로는 그램 양성 효소에서 자연 발생 소르타제 효소가 포함된다. 바람직한 소르타제 효소는 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D, 소르타제 E, 및 소르타제 F를 포함한다. 더 구체적인 소르타제 하위 패밀리가 기재되었으며, 이는 또한 "소르타제"라는 용어에 포괄된다. 식별된 소르타제를 그 서열이나 기능적 특성(예를 들어, 펩타이드 전이 활성)에 기초하여 올바른 클래스 및/또는 하위 패밀리에 배정하는 것은 당업자의 역량 내에 있다. 본 설명 전체에서 "소르타제"에 대한 일반적인 언급이 이루어지면, 달리 구체적으로 명시되지 않는 한 자연적으로 발생하거나 인공적으로 조작된 모든 소르타제 유형 및 하위 유형이 고려된다는 것이 분명하다.

[0057] 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질은 AAV 캡시드 단백질 및 이중 접합체(분자) 사이의 물리적 연결을 수용하는 것을 목표로 한다. 해당 분야에서 용어 "외인성"과 상호 교환적으로 사용된 "이중"이라는 용어는 특정 모이어티(본 발명의 문맥에서 접합 분자)는 AAV의 자연적이고 변형되지 않은 버전에서는 발생하지 않는다는 것을 나타낸다. 따라서 분자생물학 및 생명공학 분야에서 일반적으로 허용되는 명명법에 따라, "이중 접합체" 및 "이중 접합 분자"는 자연적으로 해당 분자를 함유하거나 발현하지 않는 숙주 유기체에 존재하는 분자를 지칭한다.

[0058] 발명자들은 예상외로 소르타제 인식 서열을 AAV 입자의 캡시드 서열 내 특정 내부 위치에 도입하여 표적화 분자를 AAV 캡시드와 접합시켜(접합된 AAV 입자를 생산) 조직 및 세포를 보다 효율적이고 특이적으로 표적화할 수 있고, 적절한 모 AAV 혈청형과 비교했을 때 유사한 생산 효율을 유지할 수 있다는 것을 발견하였다. 이 발견은 여러 가지 이유에서 주목할 만하다.

[0059] - 생명공학 적용의 경우, 소르타제 인식 서열은 기능을 하기 위해서는 단백질의 C 말단에 위치하거나 적어도 그 근처에 위치해야 한다는 것이 당업계에서 일반적으로 교시되고 있다. AAV 캡시드 단백질 내의 내부에 위치한 소르타제 인식 서열은 기능적이고 접근이 가능하다는 개념은 예상치 못한 일이다.

- [0060] - 특히, 소르타제 반응을 수행한 후에도, (접합된) AAV 캡시드를 형성하는 (분할된) 캡시드 단백질의 구조적, 기능적 무결성이 유지된다. 연장된 링커 서열을 도입한 후에도, AAV 캡시드 단백질은 소르타제 효소에 의해 결합될 가능성이 여전히 있었다. 게다가 놀랍게도 (당업계에서 최대 삽입 길이로 지정된 34개 아미노산 길이를 초과하는) 상대적으로 긴 링커 서열과 조합하여 소르타제 인식 서열을 표면에 노출된 영역에 삽입해도 바이러스 캡시드 단백질의 구조적 또는 기능적 특성에 부정적인 영향을 미치지 않는 것을 발견하였다.
- [0061] - VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역이 소르타제와 수용체 모이어티가 모두 가까이에 위치하여 소르타제 반응을 완료할 수 있을 정도로 접근 가능하다는 것은 구상될 수 없었다.
- [0062] - 예상외로, 발명자들의 조사 결과는 상이한 AAV 혈청형에서도 쉽게 재현(또는 외삽)될 수 있다. 혈청형 중 AAV 캡시드 단백질의 서열 다양성은 내부 소르타제 인식 서열을 삽입하고 사용하는 데 장벽을 형성하지 않는다.
- [0063] 따라서 본 발명은 소르타제 인식 서열이 단백질 서열, 특히 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질 내에 삽입된 것을 특징으로 하는 아데노 지원 바이러스(AAV) 캡시드 단백질을 제공한다. 보다 특히 본 발명은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열이 삽입된 것을 특징으로 하는 아데노 지원 바이러스(AAV) 캡시드 단백질에 관한 것이다. 선택적으로, AAV 캡시드 단백질은 VP1이고, 소르타제 인식 서열은 VP1-VP2, VR-I, VR-IV, VR-VIII, 또는 이의 임의의 조합에 삽입된다. 바람직하게는, AAV 캡시드 단백질은 VP1이고, 소르타제 인식 서열은 VR-I, VR-IV, VR-VIII 또는 이의 임의의 조합에 삽입된다. 대안적으로, AAV 캡시드 단백질은 VP2이고, 소르타제 인식 서열은 VR-I, VR-IV, VR-VIII 또는 이의 임의의 조합에 삽입된다. 대안적으로, AAV 캡시드 단백질은 VP3이고, 소르타제 인식 서열은 VR-I, VR-IV, VR-VIII 또는 이의 임의의 조합에 삽입된다. VP3의 서열이 VP2의 서열에 완전히 포괄되고, VP2는 다시 VP1의 서열에 완전히 포괄된다는 점을 고려할 때, AAV 캡시드 단백질은 본원에서 정의한 VP3 단백질의 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 대안적으로 또는 추가로, AAV 캡시드 단백질은 본원에서 정의된 VP2 단백질의 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 그러나 대안적으로 또는 추가로, AAV 캡시드 단백질은 본원에서 기재된 VP3 단백질의 서열을 포함하는 단백질일 수 있다. 구상되는 측면에서는 VP1, VP2 또는 VP3 서열이 하나 이상의 소르타제 인식 모티프의 존재로 인해 이들 단백질의 정규 서열과 다르다는 것이 분명하다. 따라서, 본 발명의 요지인 AAV 캡시드 단백질은 자연 발생 VP1, VP2 또는 VP3 단백질 또는 그의 인코딩 서열과 100% 서열 동일성을 공유하지 않는다. 따라서, 특정 구현예에서 AAV 캡시드 단백질은 자연 발생 (즉 야생형) AAV 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 동일한, 바람직하게는 적어도 약 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 또는 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함하며, 여기서 캡시드 단백질은 적어도 하나의 소르타제 인식 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, AAV 캡시드 단백질은 자연 발생 (즉 야생형) AAV2 또는 AAV9, 바람직하게는 AAV2 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 동일한, 바람직하게는 적어도 약 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 또는 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.
- [0064] 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 N 말단 링커(즉, 소르타제 인식 모티프의 N 말단에 있는 링커 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 대안적인 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 C 말단 링커(즉, 소르타제 인식 모티프의 C 말단에 있는 링커 서열)에 작동 가능하게 연결된다. 더욱 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 N 말단 및 C 말단 링커 서열에 의해 측정된다. 선택적으로, 링커 서열은 GGGGS[서열 번호: 39] 서열 또는 이들의 복수이거나, GGSGS[서열 번호: 47] 서열 또는 이들의 복수이다. 선택적으로, 링커 서열은 GGGGS[서열 번호: 39] 서열을 포함하거나, GGSGS[서열 번호: 47] 서열을 포함하거나, 이들의 임의의 조합을 포함한다.
- [0065] 본원에 기재된 임의의 소르타제 인식 서열 및 선택적인 링커 서열의 경우, 각 서열은 AAV 캡시드 단백질의 N 말단 및 C 말단 부분에 작동 가능하게 연결되어야 함이 분명하다. "작동 가능하게 연결된"이라는 용어는 분자 생물학에 당업자에게 잘 알려져 있고, 구성요소가 일반적인 기능을 수행하도록 구성된 요소의 배열을 지칭한다. 따라서 AAV 캡시드 단백질 서열 내의 내부 위치에 작동 가능하게 연결된 소르타제 인식 서열은 상기 AAV 캡시드 단백질의 번역을 방해하지 않는다. 제어 서열은 발현을 지시하는 기능을 하는 한 코딩 서열과 인접할 필요가 없다.
- [0066] 선택적으로, 소르타제 인식 서열은 자연 발생 소르타제 효소의 소르타제 인식 서열에 상응하는 서열이며, 이는 예를 들어 그람 양성 박테리아에서 자연 발생 소르타제 효소를 포함하되 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D, 소르타제 E 및 소르타제 F로 이루어진 군에서 선택된 소르타제의 일반적인 소르타제 인식 서열에 상응하는 서열이다. 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 소르타제 A의 일반적인 소르타제 인식 서열에 상응하는 서열이다.

- [0067] 특정 구현예에서, AAV 캡시드 단백질은 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D, 소르타제 E, 및 소르타제 F로 이루어진 군에서 선택된 소르타제의 2개 이상의 소르타제 인식 서열을 포함한다. 다수의 소르타제 인식 서열이 삽입되는 구현예에서, 상기 소르타제 인식 서열은 AAV 캡시드 단백질의 별개의 위치에 삽입되는 것이 바람직하다. 이러한 구현예의 소르타제 인식 서열은 동일한 소르타제 인식 서열 또는 소르타제 A, 소르타제 B, 소르타제 C, 소르타제 D, 소르타제 E 및 소르타제 F로 이루어진 군에서 선택된 소르타제의 소르타제 인식 서열의 임의의 조합일 수 있다. 바람직하게는, AAV 캡시드 단백질은 적어도 소르타제 A 인식 서열을 포함한다.
- [0068] 선택적으로, 소르타제 인식 서열은 LPXTG[서열 번호: 10], NPXTG[서열 번호: 40], LPXTA[서열 번호: 41], LAXTG[서열 번호: 42], LPXAG[서열 번호: 48], LPXLG[서열 번호: 49], APXTG[서열 번호: 50], LPXSG[서열 번호: 51], FPXTG[서열 번호: 52], XPKTG[서열 번호: 53] 및 LPEXG[서열 번호: 54]로 이루어진 군에서 선택된 일반적인 서열 모티프를 갖는 서열이고, 여기서 X는 임의의 아미노산이다. 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 X가 임의의 아미노산이고 X가 X_n 및 X_m에 대해 독립적으로 정의되는 일반 서열 모티프 LPXTG[서열 번호: 10]를 갖는 서열이다. 더욱 추가 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 LPQTG[서열 번호: 43], LPETG[서열 번호: 44], LPNTG[서열 번호: 45], LPDTG[서열 번호: 46], NPQTN[서열 번호: 55], QVPTG[서열 번호: 56], LPNTA[서열 번호: 57], LPLTG[서열 번호: 58], APKTG[서열 번호: 59], DPKTG[서열 번호: 60], SPKTG[서열 번호: 61], APATG[서열 번호: 62], LAETG[서열 번호: 63], LPEAG[서열 번호: 64], LPECG[서열 번호: 65], LPESG[서열 번호: 66] 또는 LMVGG[서열 번호: 67]이다. 가장 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 LPQTG[서열 번호: 43] 또는 LPETG[서열 번호: 44]이다. 본원에 기재된 바와 같이 소르타제 인식 서열을 설명하는 적절한 대체 방식은 "X_n-소르타제 인식 서열-X_m" 형식에 의한 것이다. 따라서 이 형식은 링커 서열의 선택적 존재를 나타내며, 여기서 "X"는 임의의 아미노산을 나타내고 "n"과 "m"은 링커 서열의 길이(즉, 아미노산의 양)를 나타내는 정수이다. 분명하게, X는 X_n과 X_m에 대해 서로 독립적으로 정의될 수 있다. 따라서, 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 서열 X_n 바로 앞에 오고, 서열 X_m 바로 뒤에 온다. 따라서, 본원에서 기술하는 소르타제 인식 서열은 대안적으로 X_n-LPXTG-X_m[서열 번호: 10], X_n-NPXTG-X_m[서열 번호: 40], X_n-LPXTA-X_m[서열 번호: 40], X_n-LAXTG-X_m[서열 번호: 42], X_n-LPXAG-X_m[서열 번호: 48], X_n-LPXLG-X_m[서열 번호: 49], X_n-APXTG-X_m[서열 번호: 50], X_n-LPXSG-X_m[서열 번호: 51], X_n-FPXTG-X_m[서열 번호: 52], X_n-XPKTG-X_m[서열 번호: 53], 및 X_n-LPEXG-X_m[서열 번호: 54]에 의해 나타낼 수 있고, 여기서 X는 임의의 아미노산이고, n 및 m은 0 내지 25의 범위이다. 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 X_n-LPXTG-X_m[서열 번호: 10]의 일반 서열 모티프를 갖는 서열이며, 여기서 X는 임의의 아미노산이고 n 및 m은 0 내지 25의 범위이다. 더욱 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 X_n-LPQTG-X_m[서열 번호: 43], X_n-LPETG-X_m[서열 번호: 44], X_n-LPNTG-X_m[서열 번호: 45], X_n-LPDTG-X_m[서열 번호: 46], X_n-NPQTN-X_m[서열 번호: 55], X_n-QVPTG-X_m[서열 번호: 56], X_n-LPNTA-X_m[서열 번호: 57], X_n-LPLTG-X_m[서열 번호: 58], X_n-APKTG-X_m[서열 번호: 59], X_n-DPKTG-X_m[서열 번호: 60], X_n-SPKTG-X_m[서열 번호: 61], X_n-APATG-X_m[서열 번호: 62], X_n-LAETG-X_m[서열 번호: 63], X_n-LPEAG-X_m[서열 번호: 64], X_n-LPECG-X_m[서열 번호: 65], X_n-LPESG-X_m[서열 번호: 66], 또는 X_n-LMVGG-X_m[서열 번호: 67]이다. 가장 바람직하게는, 소르타제 인식 서열은 X_n-LPQTG-X_m[서열 번호: 43] 또는 X_n-LPETG-X_m[서열 번호: 44]이다.
- [0069] 상기에 기재된 바와 같이, 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 링커 서열 앞에 오거나 뒤에 온다(즉, 소르타제 인식 서열은 X_n 및/또는 X_m 서열 앞에 오거나 뒤에 오고, 여기서 n 및/또는 m은 적어도 1이고, X_n 및 X_m에 대한 X는 서로 독립적으로 정의될 수 있는 구현예). 따라서, 본 발명은 n 및/또는 m이 0인 구현예를 구상하지만, n 및/또는 m이 적어도 1인 구현예도 마찬가지로 구상한다. 따라서, 특정 구현예에서 n 및/또는 m은 0 내지 25의 정수, 예컨대 적어도 2, 적어도 3, 적어도 4 또는 적어도 5, 바람직하게는 5 내지 20, 예를 들어 10 내지 15이다.
- [0070] 선택적으로 n 및/또는 m은 15 내지 20, 또는 15 내지 20의 정수이다. 선택적으로 n 및/또는 m은 10 내지 15, 또는 10 내지 15의 정수이다. 선택적으로 n 및/또는 m은 5 내지 10, 또는 0 내지 5의 정수이다. 선택적으로 n 및/또는 m은 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 또는 0이다. 또한, n이 0이고 m이 0 내지 25, 바람직하게는 0 내지 20의 정수인 구현예가 구상된다. 마찬가지로 m이 0이고, n이 0 내지 25, 바람직하게는 0 내지 20의 정수인 구현예도 구상된다.
- [0071] 링커 서열 X_n 및 X_m의 정확한 서열은 본 발명에 특별히 제한적이지 않다. 그러나, 바람직한 X_n 및 X_m 서열(또는 그 특성)은 다음 단락에서 기재된다. 바람직하게는, 링커 서열 X_n, X_m, 또는 X_n과 X_m 둘 다는 글리신, 세린, 트레오닌 및 알라닌의 적어도 65%, 바람직하게는 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%로 구성된다. 더욱 바람직하게는, 링커 서열 X_n, X_m, 또는 X_n과 X_m 둘 다는 글리신, 세린, 트레오닌 및 알라닌으로 구성된다. 또는,

링커 서열 Xn, Xm, 또는 Xn과 Xm 둘 다는 글리신 및 세린의 적어도 65%, 바람직하게는 적어도 75%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 85%, 바람직하게는 적어도 85%, 더 바람직하게는 적어도 90%, 더 바람직하게는 적어도 95%로 구성된다. 다른 대체 구현예에서, 링커 서열 Xn, Xm, 또는 Xn과 Xm 둘 다는 글리신과 세린으로 구성된다. 특정 구현예에서, 링커 서열은 GGSGS[서열 번호: 47]이다.

[0072] 소르타제 인식 서열이 삽입될 수 있는 본원에 기재된 각 영역은 당업계 전반에 걸쳐 수차례 기재되었으며, 따라서 당업자의 능력내에서 이러한 영역을 식별할 수 있다. 선택적으로 VP1-VP2 전이 영역은 서열 번호: 1[PVKTA P]에 의해 정의된다. 선택적으로 VR-I 영역은 서열 번호: 2[SSQSGASN]에 의해 정의된다. 선택적으로 VR-IV 영역은 서열 번호: 3 [SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]에 의해 정의된다. 선택적으로 VR-VIII 영역은 서열 번호: 4[QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]에 의해 정의된다. 바람직한 구현예에서, VR-I 영역은 서열 번호: 2 [SSQSGASN]에 의해 정의되고, VR-IV 영역은 서열 번호: 3 [SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]에 의해 정의되고, VR-VIII 영역은 서열 번호: 4 [QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]에 의해 정의된다. 추가적으로 바람직한 구현예에서, VP1-VP2 전이 영역은 서열 번호: 1 [PVKTAP]에 의해 정의되고, VR-I 영역은 서열 번호: 2 [SSQSGASN]에 의해 정의되고, VR-IV 영역은 서열 번호: 3 [SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]에 의해 정의되고, VR-VIII 영역은 서열 번호: 4 [QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]에 의해 정의된다. 서열 번호: 1 내지 서열 번호: 4는 소타아제 인식 모티프가 삽입되지 않은 서열, 즉 발명자들이 선택적으로 하나 이상의 링커에 의해 측정되는 하나 이상의 소타아제 인식 모티프에 수용 가능한 것으로 발견한 서열에 해당한다는 것을 이해해야 한다. AAV2가 아닌 AAV 혈청형의 해당 아미노산 서열도 마찬가지로 구상된다.

[0073] 소르타제 인식 서열이 VR-IV 영역에 삽입되는 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 바람직하게는 서열 번호: 5 [TPSGTTTQS]를 갖는 단편에 삽입될 수 있고/있거나 VR-VIII 영역에 대한 삽입은 서열 번호: 6 [LQRGNRQAA]를 갖는 단편에 삽입될 수 있다. 이러한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 서열 번호: 5의 1번째, 2번째, 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째 또는 9번째 아미노산 뒤에 삽입될 수 있다. 이러한 대체 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 서열 번호: 6의 1번째, 2번째, 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째 또는 9번째 아미노산 뒤에 삽입될 수 있다. 또 다른 대체 구현예에서, 제1 소르타제 인식 서열은 서열 번호: 5의 1번째, 2번째, 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째 또는 9번째 아미노산 뒤에 삽입될 수 있고, 제2 소르타제 인식 서열은 서열 번호: 6의 1번째, 2번째, 3번째, 4번째, 5번째, 6번째, 7번째, 8번째 또는 9번째 아미노산 뒤에 삽입될 수 있다.

[0074] 본원에 기재된 소르타제 인식 서열은 소르타제 인식 서열을 영역(들)의 게놈 서열에 삽입함으로써 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역에 삽입될 수 있다. 삽입은 상기 영역(들)의 정규 아미노산을 제거하지 않고 삽입하는 것일 수 있다. 이러한 구현예에서, 원래 서열에 더하여 소르타제 인식 서열이 도입된다. 또는, 본원에 기재된 소르타제 인식 서열은 영역(들)의 게놈 서열에 삽입 및 결실(치환 또는 교체로 이어짐)에 의해 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역에 삽입될 수 있다.

[0075] 결실 또는 치환은, 상기 영역 (및 결과적으로 AAV 캡시드 단백질)의 구조적 무결성이 유지되는 한, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역의 임의의 수의 아미노산에 상응할 수 있다. 일부 구현예에서, AAV 단백질의 기능적 무결성이 영향을 받을 수 있는데, 이는 삽입 부위가 특정 기능(예를 들어 AAV2에서 VR-VIII의 HSPG 결합 부위)을 방해하기 때문이지만, 이러한 기능은 접합된 단백질의 추가 사용에는 중요하지 않다. 그러나 추가적인 구현예에서, 영역 (및 결과적으로 AAV 캡시드 단백질)의 구조적, 기능적 무결성이 모두 유지된다.

[0076] 이론에 얽매이지 않고, 발명자들은 표면 노출된 라이신이 소르타제 매개 펩타이드전이의 반응 효율을 감소시킬 수 있고, 선택적으로 허용되지 않는 부산물의 생성을 허용할 수 있다는 점을 언급했다. 따라서, 본 발명의 구현예에서, 하나 또는 다중의 표면 노출된 라이신이 돌연변이되는데, 예를 들어 글리신, 세린 또는 알라닌이 돌연변이된다. 표적화되는 어떤 라이신의 선택은 삽입 부위(예를 들어 LPXTG 태그가 추가되는 루프)로부터의 거리를 기반으로 한다.

[0077] 당업자는 AAV2가 아닌 AAV 혈청형에 대해 본원에서 개시된 것과 상응하는 아미노산을 식별할 수 있다. 일반적으로, 소르타제 인식 서열이 삽입된 영역과 매우 근접한 라이신 돌연변이가 구상된다.

[0078] 예시적으로, AAV2의 VR-I 영역의 30 옹스트롬 근처의 라이신은 K258, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K692, K706에 해당하고; AAV2의 VR-IV 영역의 30 옹스트롬 근처의 라이신은 K258, K309, K313, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K688, K692, K706에 해당하고; 그리고 AAV2의 VR-VIII 영역의 30 옹스트롬 근처의 라이신은 K309, K490, K507, K527,

K532, K544, K549, K556, K620, K640, K688, K706에 해당한다.

- [0079] 예를 들어, AAV2의 VR-I 영역의 15 옹스트롬 근처의 라이신은 K258, K507, K527, K549 및 K706에 해당하고; AAV2의 VR-IV 영역의 15 옹스트롬 근처의 라이신은 K258, K490, K507, K532, K544, K549, K556 및 K665에 해당하고; 그리고 VR-VIII 영역의 15 옹스트롬 근처의 라이신은 K490, K507, K527 및 K532에 해당한다.
- [0080] 예를 들어, AAV2의 VR-IV 영역의 5 옹스트롬 근처의 라이신은 K549이고; 그리고 AAV2의 VR-VIII 영역의 5 옹스트롬 근처의 라이신은 K507이다.
- [0081] 선택적으로, 소르타제 인식 서열은 VR-I 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K258, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K692, K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 VR-I 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K258, K507, K527, K549 및 K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 VR-I 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K258, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K692, K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10]이다.
- [0082] 선택적으로, 본원에서 구상된 구현예에서 소르타제 인식 서열은 VR-IV 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K258, K309, K313, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K688, K692 및 K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 VR-IV에 삽입되고, AAV2의 위치 K258, K490, K507, K532, K544, K549, K556 및 K665의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 VR-IV 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K258, K309, K313, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K688, K692 및 K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10]이다. 추가의 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]가 VR-IV 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K549에 있는 라이신 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 바람직하게는 글리신 또는 알라닌으로 돌연변이된다.
- [0083] 선택적으로, 소르타제 인식 서열은 VR-III 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K309, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K688 및 K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 VR-III 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K490, K507, K527 및 K532의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 VR-III 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K309, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K688 및 K706의 라이신 중 하나 이상 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 돌연변이된다. 선택적으로, 소르타제 A 인식 서열은 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10]이다.
- [0084] 추가의 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]가 VR-VIII 영역에 삽입되고 AAV2의 위치 K507에 있는 라이신 또는 다른 혈청형의 해당 아미노산이 바람직하게는 글리신 또는 알라닌으로 돌연변이된다.
- [0085] 본 발명의 추가적인 측면은 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질 중 임의의 것을 인코딩하는 핵산(즉, 핵산 서열) 및 AAV 입자를 생산하는 방법에서의 그 용도에 관한 것이다. 따라서, 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질 중 임의의 것을 인코딩하는 핵산 서열이 포괄되며, 이는 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열을 갖는다. 핵산은 DNA, RNA, 변이체 또는 DNA와 RNA의 임의의 조합일 수 있다. 본 개시내용의 핵산 작제물을 구축하는 방법은 잘 알려져 있다. 핵산은 프로모터 서열을 추가로 포함하는 핵산일 수 있다. 본원에서 정의한 "프로모터"라는 용어는 특정 유전자의 전사를 개시하여 유전자가 전사될 수 있도록 하는 DNA 영역이다. 프로모터는 RNA 중합효소에 의해 인식되고 전사를 시작한다. 따라서, 프로모터에는 RNA 중합효소에 의해 직접 결합되거나 RNA 중합효소의 동원에 관여하는 DNA 서열이 포함되어 있다. 프로모터 서열에는 또한 "인핸서 영역"이 포함될 수 있고, 이는 유전자 클러스터 내 유전자의 전사 수준을 향상시키기 위해 단백질(즉, 트랜스 작용 인자)과 결합할 수 있는 하나 이상의 DNA 영역이다. 인핸서는 전형적으로 코딩 영역의 5' 말단에 위치하지만, 프로모터 서열과 분리될 수 있고, 예를 들어, 유전자의 인트론 영역 내에 위치하거나 유전자의 코딩 영역의 3'에 위치할 수 있다. 프로모터는 유전자의 시작 코돈과 매우 근접한 곳에 위치할 수 있으며, 바람직한 구현예에서는 동일한 가닥에 위치하며 전형적으로 유전자의 상류(5')에 위치한다. 프로모터의 크기는 다양하지만, 바람직하게는 약 100 내지 1000개 뉴클레오타이드 길이를 갖는다.

- [0086] 따라서, 핵산이라는 용어는 (재조합) 핵산 벡터와 (재조합) 핵산 발현 벡터를 포괄하며, 이는 발명의 추가적인 측면이다. 핵산 (발현) 벡터는 본 발명의 핵산을 환경 내의 세포로 운반하는 데 적합하다는 것이 당업자에게 알려져 있으며, 이러한 환경은 예를 들어 유기체, 조직 또는 세포 배양물을 포함하되 이에 제한되지 않는다. 이러한 벡터는 본 설명의 요지인 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 열린 해독틀을 생성하는 데 유용하다. 이러한 구현예에서, 본 발명의 요지인 AAV 캡시드 단백질은 시험관 내 또는 생체 내 조건에서 핵산에 의해 발현될 수 있다(즉, 핵산은 적어도 AAV 캡시드 단백질의 아미노산 서열을 인코딩함). 따라서, 본원에 기재된 핵산은 AAV 입자 및 궁극적으로 접합 AAV 입자를 생산하거나, 생산을 돕는데 데 적합하고, 상기 (선택적으로 접합된) AAV 입자는 본 명세서의 전반에 걸쳐 자세히 기재되어 있다. 재조합 발현 벡터란 단백질을 인코딩하는 핵산을 지칭하고, 여기서 핵산은 인코딩된 단백질, 본 문맥에서는 AAV 캡시드 단백질을 발현할 수 있다. 이러한 벡터의 예는 플라스미드, 핵산 바이러스 벡터 및 바이러스 계놈(DNA와 RNA 계놈 모두 포함)을 포함한다. 따라서, 재조합 AAV 벡터는 본 개시내용에 의해 구상된다.
- [0087] "재조합 AAV", "재조합 AAV 바이러스" 및 "재조합 AAV 바이러스 입자"와 같은 용어와 상호 교환적으로 사용되는 "재조합 AAV 벡터"라는 용어는 AAV 바이러스 캡시드에 캡슐화된 계놈 DNA가 이중 핵산을 함유하고 있음을 나타낸다. 본 발명의 재조합 AAV 벡터에서, 적어도 AAV 캡시드 단백질은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 하나 이상의 소르타제 인식 서열을 특징으로 하는 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 이중 핵산으로 대체된다. 벡터에 함유된 인코딩된 서열 및 요소는 벡터를 상기 세포 내부로 도입하는 데 적절한 임의의 수단을 통해 적합한 숙주 세포에서 발현될 수 있다. 적합한 방법에는 예시로 감염, 형질전환, 형질도입 및 형질감염이 포함되지만 이에 제한되지 않는다. 치료적 유전자 및/또는 리포터 유전자(즉, 표적 세포에 전달되는 것으로 구상되는 "페이로드") 외에, 벡터는 프로모터 서열, 전사 개시 서열, 인핸서 서열, 인트론, 코작 서열, polyA 서열, 선택 요소 또는 복제 기원을 포함하되 이에 제한되지 않는, 발현 조절 기능을 갖는 복수의 성분(즉, 요소, 특징)를 포함할 수 있다.
- [0088] 특정 구현예에서, 핵산은 자연 발생 (즉 야생형) AAV 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 동일한, 바람직하게는 적어도 약 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 또는 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 서열을 포함하며, 여기서 캡시드 단백질은 적어도 하나의 소르타제 인식 서열을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 핵산은 자연 발생 (즉 야생형) AAV2 또는 AAV9, 바람직하게는 AAV2 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 약 80% 동일한, 바람직하게는 적어도 약 85% 동일한, 적어도 약 90% 동일한, 적어도 약 95% 동일한, 또는 적어도 약 98% 동일한 아미노산 서열을 갖는 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 서열을 포함한다.
- [0089] 본 발명은 이중 접합 분자를 AAV 입자(접합 AAV 입자 생성)에 커플링시키고, 더 구체적으로는 AAV 캡시드 단백질에 커플링시키는 견고하고 효율적인 수단을 제공하는 것을 목표로 한다. 따라서, 본 발명의 또 다른 측면은 AAV 캡시드 단백질의 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열을 포함하는 AAV 입자에 관한 것이다. 소타아제 접합 반응을 수행한 후 C 말단 글리신 잔기가 "절단"되고 소르타제 인식 서열의 나머지 부분이 접합 분자의 별도의 글리신에 결합되기 때문에 소르타제 인식 서열은 변형된다는 것을 당업자가 인식한다. 따라서, 당업자는 접합을 위한 출발 물질(즉, "입력" 물질)로 사용되는 AAV 입자가 모두 구상되지만, 소르타제 접합 반응을 수행하여 얻은 AAV 입자(즉, "출력" 물질; 접합 AAV 입자)도 동등하게 구상된다는 것을 인식한다. 일반적으로, 본 개시내용 전체에서 소타아제 접합 반응 후 AAV 캡시드 단백질의 소르타제 인식 서열 일부는 "변형된 소르타제 인식 서열" 또는 대안적으로 "잔여 소르타제 인식 서열"로 표시된다. 따라서 본원에서 언급되는 잔여 소르타제 인식 서열은 접합된 AAV 캡시드 단백질을 이중 접합 분자(예를 들어 이하에서 더 자세히 설명하는 접합 분자에 제한되지 않음)와 물리적으로 연결하고, 바람직하게는 작동 가능하게 연결한다는 것을 인식해야 한다.
- [0090] 달리 표현하면, 본 발명은 유전적으로 변형된 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 입자를 제공하며, 여기서 계놈 변형은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열은 존재하는 것이다. 따라서 계놈 변형은 AAV 캡시드 단백질이 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열을 갖지 않는 임의의 AAV 입자에 대해 간주되어야 한다.
- [0091] 따라서, 특정 구현예에서, AAV 입자는 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열의 존재를 특징으로 하는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 대체 구현예에서, 접합 AAV 입자는 이중 접합 분자에 작동 가능하게 연결된 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및/또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 잔여 소르타제 인식 서열의 존재를 특징으로 하는 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 소르타제 인식 서열의 내부 위치와 소타아제 접합 반응의 세부 사항을 고려할 때, 접합 반응 후의 AAV 캡시드 단

백질(VP1, VP2 또는 VP3 단백질일 수 있음)은 2개의 별도 단백질; 잔여 소타아제 인식 서열의 N 말단 VP 부분, 잔여 소타아제 인식 서열 및 접합 분자를 포함하는 제1 N 말단 단백질; 및 (초기) 소타아제 인식 서열의 C 말단 VP 부분을 포함하는 제2 C 말단 단백질로 AAV 캡시드에 효과적으로 존재할 것이다. 소르타제 인식 서열은 AAV 캡시드 단백질 서열에 삽입되어 접합 반응을 수행한 후에도 두 부분 모두 구조적 무결성을 유지한다.

[0092] 접합 AAV 입자와 관련하여, 발명자들은 예상외로 AAV 캡시드 단백질의 비교적 낮은 부분이 접합 AAV 입자가 AAV 캡시드 단백질의 비교적 높은 부분이 접합 AAV 입자와 비교했을 때 형질도입 효율에서 더 현저한 개선을 보인다는 것을 관찰하였다. 접합 AAV 입자 내의 접합된 AAV 캡시드 단백질의 적은 양이 소르타제 인식 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질의 적은 양의 결과 또는 (선택적으로 의도적으로) 접합 반응을 수행하기 위한 최적이하 매개변수의 결과일 수 있는 것이 분명하다. 두 가지 구현에 모두 본 개시내용에 의해 구상된다.

[0093] 따라서, 선택적으로, 접합 AAV 입자에서 비접합된 캡시드 단백질(즉, 비변형된 캡시드 단백질 또는 비접합된 캡시드 단백질) 대 접합된 캡시드 단백질(즉, 변형된 캡시드 단백질)의 비율은 약 1/59 내지 약 59/1, 바람직하게는 약 1/20 내지 약 20/1, 바람직하게는 약 1/15 내지 약 15/1, 바람직하게는 약 1/10 내지 약 10/1, 더 바람직하게는 약 1/9 내지 약 9/1, 더 바람직하게는 약 1/8 내지 약 8/1, 더 바람직하게는 약 1/7 내지 약 7/1, 더 바람직하게는 약 1/6 내지 약 6/1, 더 바람직하게는 약 1/5 내지 약 5/1이다. 바람직한 구현예에서, 접합 AAV 입자에서 비접합된 캡시드 단백질(즉, 비변형된 캡시드 단백질) 대 접합된 캡시드 단백질(즉, 변형된 캡시드 단백질)의 비율은 약 1/5 미만, 바람직하게는 약 1/10 미만, 바람직하게는 약 1/15 미만, 바람직하게는 약 1/20 미만이다. 바람직한 구현예에서, 접합 AAV 입자는 적어도 1개의 접합된 캡시드 단백질(즉, 최대 59개의 비접합된 캡시드 단백질)을 포함한다. 바람직한 구현예에서, 접합 AAV 입자는 1 내지 20개의 접합된 캡시드 단백질, 바람직하게는 1 내지 15개의 접합된 캡시드 단백질, 바람직하게는 1 내지 10개의 접합된 캡시드 단백질, 더 바람직하게는 1 내지 5개의 접합된 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 구현예에서, 접합 AAV 입자는 1개의 접합된 캡시드 단백질을 포함한다. 바람직하게는, 접합 AAV 입자는 적어도 5%의 접합된 AAV 캡시드 단백질을 포함한다. 다른 한편으로는, 본 발명자들은 원하는 경우, 본 발명이 관심 대상인 캡시드 단백질의 효율적인 접합을 허용한다는 것을 발견하였다. 따라서 특정 구현예에서, 접합 AAV 입자는 적어도 20개, 바람직하게는 적어도 30개, 더 바람직하게는 적어도 40개, 예를 들어 적어도 50개의 접합된 캡시드 단백질을 포함한다.

[0094] 일반적으로 각 AAV 입자가 적어도 하나의 VP1과 적어도 하나의 VP2를 이론적으로는 VP1:2:3 또는 5:5:50의 비율로 포함하는 것을 가정한다. 따라서, 캡시드 단백질의 하나 이상의 영역에 소르타제 인식 서열을 도입함으로써 입자 내의 접합된 단백질의 수가 영향을 받을 수 있다는 것이 이해될 것이다.

[0095] 선택적으로, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에서 소르타제 인식 서열을 포함하는 (선택적으로 접합된) AAV 입자 내의 VP1, VP2, 또는 VP3 단백질은 동일한 아미노산 서열을 갖는다.

[0096] (즉, 서로 다른 서열을 가지고 있는 단일 조립 AAV 입자에 포함된 VP1 캡시드 단백질은 없고; 서로 다른 서열을 가지고 있는 단일 조립 AAV 입자에 포함된 VP2 캡시드 단백질이 없고/거나 서로 다른 서열을 가지고 있는 단일 조립 AAV 입자에 포함된 VP3 캡시드 단백질이 없다). 이러한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 다를 수 있고/거나 소르타제 인식 서열(들)은 AAV 캡시드 단백질의 상이한 영역에 삽입될 수 있다.

[0097] 이종 접합 분자의 세부 사항은 소르타제 매개 접합 분자에 수용 가능하다는 조건 하에 본 발명에 특별히 제한적이지 않다. 일반적으로 이는 N 말단 트리글리신 서열(즉, GGG)의 존재를 수반한다. 제한이 아닌 설명을 통해, 적합한 이종 접합 분자는 소분자, 탄수화물, 지질 또는 단백질일 수 있다.

[0098] 바람직한 구현예에서, 이종 접합 분자는 표적화 모이어티이다. 본원에 사용되는 용어 "표적화 모이어티"는 다른 조직, 표적 및/또는 장기보다 특정 조직, 세포 유형 및/또는 장기에 우선적으로 결합할 수 있는 임의의 분자를 포괄한다. 표적화 모이어티의 세부 사항은 본 발명에 대해 특별히 제한적이지 않으므로, 예시로서 세포 수용체의 리간드 및 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질을 포함하며 이에 제한되지 않는다. 따라서 바람직한 이종 접합 분자에는 항체 및 항체 단편이 포함되며, 이에 제한되지는 않지만 나노바디가 있다. 선택적으로, 이종 접합 분자가 항체 또는 항체 단편 예컨대 항체인 구현예에서, 이종 접합 분자는 인간 상피 성장 인자 수용체 2(HER2)에 특이적으로 결합한다.

[0099] 본 발명의 관련 측면은 약제로 사용하기 위한 본원에서 기재된 바와 같은 접합 AAV 입자에 관한 것이다. 따라서 본 발명은 치료를 필요로 하는 대상체를 치료하는 방법을 포괄하며, 상기 방법은 대상체에게 접합 AAV 입자를 투여하는 단계를 포함한다. 또한, 본원에서 기재된 바와 같이, 접합 AAV 입자를 사용하여 약물을 제조하는 것도 구상된다. 본 발명의 목적이 사용될 수 있는 특정한 의학적 상태는 증식성 질환(즉, 암) 및 조직 특정 질환(예

를 들어, 간 질환)을 포함한다. 본원에 기재된, 접합 AAV 입자와 상호 관련된 생성물(예컨대 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질, 본원에 기재된 핵산 및 본원에 기재된 핵산 벡터)도 의료 목적으로 사용될 수 있음은 분명하다.

- [0100] "대상체", "환자" 및 "필요한 대상체"라는 용어는 상호 교환적으로 사용될 수 있고, 동물, 바람직하게는 온혈 동물, 더 바람직하게는 척추동물, 및 더욱 더 바람직하게는 인간 및 비-인간 포유동물을 구체적으로 포함하는 포유동물을 지칭한다. "포유동물", 또는 "포유류 대상체"라는 용어는 그렇게 분류된 임의의 동물을 지칭하며, 따라서 인간, 가축, 상업용 동물, 농장 동물, 동물원 동물, 스포츠 동물, 애완동물 및 실험 동물 예컨대 개, 고양이, 기니피그, 토끼, 랫트, 마우스, 말, 소, 암소; 영장류 예컨대 유인원, 원숭이, 오랑우탄, 및 침팬지; 개과 동물 예컨대 개 및 늑대; 고양이과 동물 예컨대 고양이, 사자, 및 호랑이; 말과 동물 예컨대 말, 당나귀, 및 얼룩말; 식용 동물 예컨대 소, 돼지, 및 양; 유제류 예컨대 사슴 및 기린; 설치류 예컨대 마우스, 랫트, 햄스터 및 기니피그 등을 포함하되 이에 제한되지 않는다. 바람직한 환자는 인간 대상체이다. 특히 바람직한 대상체는 모든 성별과 연령대를 포함한 인간 대상체이다.
- [0101] 본 발명의 관련 측면은 접합 AAV 입자를 생산하는 방법에 관한 것으로, 방법은 본원에 기재된 캡시드 단백질을 인코딩하는 핵산을 세포에서 발현시키는 단계, 세포가 AAV 입자를 형성하도록 하는 단계, AAV 입자를 회수하는 단계 및 이를 관심 분자와 접합시키는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 방법은 다음 단계를 포함한다:
- [0102] - AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산과 세포를 접촉시키는 단계로서, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상은 소르타제 인식 서열을 포함하는, 단계;
- [0103] - 세포가 다수의 AAV 캡시드 단백질을 AAV 입자로 조립하도록 허용하고 상기 세포로부터 AAV 입자를 수집하는 단계; 및
- [0104] - AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계.
- [0105] 당업자는, 세포에 복수의 AAV 캡시드 단백질을 인코딩하는 하나 이상의 핵산을 제공하는 단계 및 AAV 입자를 수집하는 단계 사이에, 상기 세포를 배양하는 단계는 AAV 캡시드 단백질의 전사 및 번역과 AAV 입자로의 조립을 허용하기 위해 일어남을 인식한다. 선택적으로, 방법에서 언급된 하나 이상의 핵산 서열은 3개의 핵산 서열에 대응한다: rep 및 cap 유전자를 인코딩하는 제1 핵산, 이식유전자 및 ITR 영역을 포함하는 제2 핵산, 및 AAV 입자의 조립을 위한 임의의 헬퍼 단백질을 인코딩하는 제3 핵산. 특정 구현예에서, AAV 입자를 수집하는 단계는 세포 배양액에 함유된 세포의 용해 단계에 선행한다 선행된다. AAV 입자의 생산 방법은 당업계에서 여러 차례 기재되었으므로 당업자에게 알려져 있다.
- [0106] 바람직한 구현예에서, 소르타제 인식 서열은 소타아제 A 인식 서열, 더욱 바람직하게는 Xn-LPXTG-Xm[서열 번호: 10] 서열이다.
- [0107] 바람직한 구현예에서, AAV 캡시드 단백질은 VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열을 포함한다.
- [0108] 선택적으로, AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계 전에, 방법은 조립된 AAV 입자를 농축, 정제 및/또는 분리하는 추가 단계를 더 포함한다. 상기 구현예에 대한 대안으로 및/또는 추가적으로, AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계 전에, 방법은 조립된 AAV 입자의 일부가 아닌 AAV 캡시드 단백질을 고갈시키거나 제거하는 단계를 추가로 포함한다.
- [0109] 특정 구현예에서, 본원에서 구상하는 방법의 접합 단계에서, AAV 캡시드 단백질, 소르타제 및 이중 접합 분자는 1:1:1 비율로 제공된다. 대체 구현예에서는, 소르타제와 이중 접합 분자의 과잉이 제공되어 1:>1:>1의 분자 비율이 유지된다. 또 다른 구현예에서는, 이중 접합 분자의 과잉이 제공되어 1:1:>1 비율, 바람직하게는 1:1:>5 비율, 더 바람직하게는 1:1>10 비율이 유지된다. 바람직한 구현예에서 AAV 캡시드 단백질, 소르타제 및 이중 접합 분자는 약 1:0.1:1의 비율로 제공된다.
- [0110] 선택적으로, AAV 입자를 소르타제와 이중 접합 분자와 접촉시키는 단계 후, 방법은 적어도 하나의 접합된 AAV 캡시드 단백질을 함유하는 조립된 접합 AAV 입자를 농축, 정제 및/또는 분리하는 추가 단계를 포함한다. 추가 구현예에서, 방법은 적어도 10%, 바람직하게는 적어도 20%, 바람직하게는 적어도 30%, 바람직하게는 적어도 40%, 바람직하게는 적어도 50%, 바람직하게는 적어도 60%, 바람직하게는 적어도 70%, 바람직하게는 적어도 80%, 바람직하게는 적어도 90%, 또는 심지어 100%의 접합된 AAV 캡시드 단백질을 함유하는 조립된 접합 AAV 입자를 농축, 정제 및/또는 분리하는 추가 단계를 포함한다.
- [0111] 선택적으로, AAV 캡시드 단백질은 복수의 별도의 소르타제 인식 서열을 포함하고, AAV 입자는 순차적으로 상이

한 소르타제 및 접합 분자와 접촉한다. 복수의 별도의 소르타제 인식 서열은 단일 AAV 캡시드 단백질에 제공될 수도 있거나, 선택적으로 AAV 캡시드 단백질의 별도의 위치에 각각 다른 소르타제 인식 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질의 컬렉션을 사용하여 제공될 수도 있다. 바람직하게는 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질이 제공된다. 특정 구현예에서, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 또는 VR-VIII 영역 중 하나 이상에서 자연 발생 AAV 캡시드 단백질과 소르타제 인식 서열을 포함하는 AAV 캡시드 단백질의 조합이 제공된다.

[0112] AAV 캡시드 단백질 자체와 관련하여 본원에 기재된 임의의 구현예는 (단리된) AAV 캡시드 단백질 자체뿐만 아니라 핵산이나 핵산 벡터에 의해 인코딩된 AAV 캡시드 단백질 및 (조립된) AAV 입자 및 그 반대에도 동일하게 적용 가능하다는 것은 분명하다.

[0113] 상기 본원에 기재된 구현예 외에도, 본 발명은 또한 아데노 연관 바이러스(AAV) VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질에 관한 것으로, VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에서 소르타제 인식 서열 X_n -LPXTG- X_m [서열 번호: 10]이 삽입된 것을 특징으로 하며, 여기서 n 및 m 은 0 내지 20의 범위이고, X 는 임의의 천연 아미노산이다. 특정 구현예에서, 아데노 연관 바이러스(AAV) VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질은 VP1-VP2 전이 영역, VR-I 영역, VR-IV 영역 및 VR-VIII 영역 중 하나 이상에 소르타제 인식 서열 X_n -LPXTG- X_m [서열 번호: 10]이 삽입되는 것을 특징으로 하며, 여기서 n 및 m 은 0 내지 20의 범위이고, X 는 임의의 천연 아미노산이고, 여기서 VP1-VP2 전이 영역은 서열 번호:1 [PVKTAP]에 의해 정의되고, VR-I 영역은 서열 번호:2 [SSQSGASN]에 의해 정의되고, VR-IV 영역은 서열 번호:3 [SRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQS]에 의해 정의되고, VR-VIII 영역은 서열 번호:4 [QYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGV]에 의해 정의된다. 특정 구현예에서, VR-IV 영역의 삽입은 서열 번호: 5 [TPSGTTTQS]를 갖는 단편 및/또는 서열 번호: 6 [LQRGNRQAA]를 갖는 단편에 이루어진다. 특정 구현예에서, 소르타제 인식 부위가 삽입된 영역의 하나 이상의 아미노산이 결실된다.

[0114] 상기 구현예 중 임의의 것의 특정 구현예에서, AAV는 AAV2 또는 AAV9이다. 상기 구현예 중 임의의 것의 추가의 특정 구현예에서, n 은 15 내지 20, 10 내지 15, 5 내지 10, 0 또는 5이거나, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1이다. 특히 m 은 15 내지 20, 10 내지 15, 5 내지 10, 0 또는 5이거나, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1개의 아미노산인 것으로 구상된다. 상기 구현예 중 임의의 것의 특정 구현예에서, 링커 서열 X_n 또는 X_m 은 Gly, Ser, Thr 및 Ala의 적어도 80%를 포함한다. 바람직하게는, 링커 서열 X_m 또는 X_n 은 Gly, Ser, Thr 및 Ala로부터 선택된 아미노산으로 이루어진다. 상기 구현예 중 임의의 것의 특정 구현예에서, LPXTG 내의 X 는 Asp, Glu, Asn 또는 Gln, 전형적으로 Gln이다. 상기 구현예의 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-1 영역에 삽입되고 위치 K258, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K692, K706에서 라이신 중 하나 이상은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]은 VR-1 영역에 삽입되고 위치 K258, K507, K527, K549 및 K706에서의 하나 이상의 라이신은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-IV 영역에 삽입되고, 여기서 위치 K258, K309, K313, K321, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K649, K665, K688, K692 및 K706에서의 라이신 중 하나 이상은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-IV에 삽입되고, 여기서 위치 K258, K490, K507, K532, K544, K549, K556 및 K665에서의 라이신 중 하나 이상은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-IV에 삽입되고, 여기서 위치 K549에서의 라이신은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-VIII에 삽입되고, 여기서 위치 K309, K490, K507, K527, K532, K544, K549, K556, K620, K640, K688 및 K706에서의 라이신 중 하나 이상은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-VIII에 삽입되고, 여기서 위치 K490, K507, K527 및 K532에서의 하나 이상의 라이신은 돌연변이된다. 추가적인 특정 구현예에서, 소르타제 인식 서열 LPXTG[서열 번호: 10]는 VR-VIII에 삽입되고, 여기서 위치 K507에서의 하나 이상의 라이신은 Gly 또는 Ala로 돌연변이된다. 본원에 기재된 바람직한 구현예에서, 상기 하나 이상의 라이신은 Gly, Ser 또는 Ala로 돌연변이된다. 본 발명은 또한 이들 핵산을 포함하는 발현 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 상기 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 입자를 제공한다. 특정 구현예에서, 비변형 AAV 단백질 대 변형 단백질의 비율은 1/20, 1/10 또는 1/5 내지 5/1, 10/1 또는 20/1이다. 특정 구현예에서, AAV 입자는 소르타제 인식 부위를 통해 소분자, 탄수화물, 폴리펩타이드와 같은 접합체에 융합된다. 추가의 특정 구현예에서, AAV 입자는 소르타제 인식 부위를 통해 세포 수용체의 리간드 또는 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질과 같은 표적화 모이어티에 융합된다. 추가의 특정 구현예에서, 세포 표면 단백질에 결합하는 단백질은 항체 또는 나노바디, 예컨대 HER2에 결합하는 항체 또는 나노바디이다. 본 발명은 또한 본원에서 기재된 바와 같은 AAV 입자, 예컨대 본원에서 기재

된 바와 같은 AAV 입자를 약제로 사용하는 용도를 제공한다.

[0115] 본 발명이 그것의 특정 구현예들과 함께 설명되었지만, 전술한 설명에 비추어 많은 대안, 수정 및 변형이 이 기술분야의 숙련자들에게 분명할 것이라는 것이 명백하다. 따라서 첨부된 청구항들의 사상 및 넓은 범위에 속하는 이러한 모든 대안, 수정 및 변형을 포함하도록 의도된다. 본원에 개시된 발명의 측면, 진술 및 구현에는 다음의 비제한적인 예에 의해 더욱 뒷받침된다.

[0116] **실시예**

[0117] **실시예 1: 일반 설계 정보, 고려 사항 및 탐구적 결과**

[0118] 아데노 연관 바이러스(AAV)는 작고 병원성이 없으며 외피가 없는 ssDNA 바이러스이다. 게놈(4.7kb)은 2개의 주요 열린 해독틀로 구성된다. *rep* 유전자는 4개의 복제 단백질을 인코딩하고; *cap* 유전자는 AAV 캡시드의 3가지 구조 단백질(VP1, VP2 및 VP3)을 인코딩하는데, 이는 대체 스플라이싱 및 대체 시작 코돈을 통해 형성된다. 1:1:10의 비율로, 60개의 서브유닛으로 구성된 캡시드 코트를 형성한다. *rep* 및 *cap* 유전자는 역위 말단 반복부(ITR)가 축적하고, 이는 바이러스 DNA 복제와 패키징에 필요한 유일한 유전 요소이다. 결과적으로, 바이러스 *rep* 및 *cap* 유전자는 생산 과정 중에 트랜스(*trans*)로 제공될 수 있고 ~4.5kb의 관심 있는 이식유전자를 ITR 사이에 삽입할 수 있어 재조합 AAV(rAAV) 바이러스 벡터가 생성된다(도 1a).

[0119] 일반적으로 소타아제 반응은 기술 분야에서 여러 번 기재되어 왔으므로 당업자에게 알려져 있다. 소타아제 A 반응의 일반적인 개요는 도 1b에 묘사된다. 이를 통해 균일하고 예측 가능한 약물 대 항체 비율을 갖는 효율적이고 통제된 항체-약물 커플링이 가능하다. 이 기술은 지금까지 AAV 벡터에 대한 표적화 모이어티의 효소적 커플링에 사용된 적이 없다.

[0120] AAV 벡터를 표적화하는 잠재력은 리간드의 표적화 잠재력에 달려 있다. 나노바디는 이에 적합한 바람직한 모이어티이다. 이는 작고 조밀한 구조에 높은 특이성, 높은 안정성, 낮은 면역원성을 조합하며, 소르타제 A 기술은 약물이나 다른 나노바디에 나노바디 접합에 광범위하게 사용되었다. 더욱이, 나노바디는 사실상 임의의 세포 수용체에 맞춰 설계될 수 있다. 본 발명은 유방암 방사선훈종 요법에 사용되는 항-HER2(인간 상피 성장 인자 수용체 2) 나노바디 2Rs15d를 사용하여 설명된다.

[0121] 소르타제 A LPXTG 인식 모티프[서열 번호: 10]는 표적 단백질의 노출된 루프의 일부로 기능할 수 있다. 이전 문헌에서는 AAV 캡시드의 가변 영역(VR)-IV 및 VR-VIII에 최대 34개 아미노산의 펩타이드를 삽입하는 것이 잘 견디는 것으로 나타났다. VR-IV 및 VR-VIII 내의 LPXTG 인식 모티프[서열 번호: 10]를 배치하는 것은 (도 2a 및 2b)에 표시되어 있다. 소르타제 A 효소 상의 LPXTG[서열 번호: 10] 결합 틈은 다소 깊은 결합 포켓이므로 LPXTG[서열 번호: 10] 축적 링커의 길이와 서열이 고려된다.

[0122] 본 발명의 실시예에서는 AAV2의 자연적 트로피즘을 약화시키기 위해 돌연변이(R585A 및 R588A)로 인해 헤파린 설페이트 프로테오글리칸 수용체에 결합하는 능력이 파괴된 AAV2-HB0를 사용한다. 그러나 이 특정 AAV2 돌연변이체의 돌연변이가 본 발명의 문맥을 제한하는 것은 아니라는 것은 분명하며, 본원에 기재된 조사 결과는 일반적으로 다른 AAV 혈청형 및 기타 AAV2 변형에도 쉽게 적용할 수 있다.

[0123] 소르타제 A 매개 커플링 반응은 Ab 인식(예를 들어 HA 또는 FLAG) 및 친화성 태그(예를 들어 His) 태그 부착된 나노바디-단백질을 사용하여 수행된다. 본 실시예에서는 재조합 2Rs15d 나노바디를 사용한다.

[0124] 리간드 결합을 평가하기 위해 소르타제 A를 사용한 실험에서 상임산 작제물이 테스트되었다. 선택적 링커가 있는 LPQTG 모티프[서열 번호: 43]가 표 1에 표시된 대로 삽입되었다.

[0125] 표 1. 테스트된 삽입 부위에 대한 서열 정보.

[0126] 나노바디는 전형적으로 N 말단에 Gly₅ 태그가 붙어 있고, C 말단에는 나노바디 생산을 위해 3xFLAG-His₆가 융합되어 있다. 비접합된 및 원하지 않은 생성물은 정용여과를 통해 제거된다.

[0127] AAV2는 상이한 링커 길이를 갖는 루프 IV 및 VIII에 대한 LPQTG[서열 번호: 43] 삽입을 용인한다. LPQTG 모티프[서열 번호: 43]는 링커 없이 또는 모티프 양쪽에 1개 또는 2개의 GGSGS [SEQ ID NO 47] 반복으로 축적된 AAV2-HB0 VR-IV(AA 453과 454 사이) VR-VIII(AA 587과 588 사이)에 삽입되었다. 다음으로, 소르타제 A를 사용하여 Gly₅-나노바디를 접합시켰다. 웨스턴 블롯을 실행하고, 항-VP 항체(VP1, 2 및 3 검출)와 항-FLAG 항체(나노바디 검출)로 이미징하였다. 소르타제 A 반응은 접합 동안 VP 일차 구조를 절단하므로 17-18 kDa 밴드가 예상되고 VIII-1과 VIII-2에서 확인된다(도 3).

[0128] **실시예 2: AAV2_VR-I 0-2L**

[0129] 물질 및 방법

[0130] 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)를 갖는 LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 13, 서열 번호: 14, 서열 번호: 15) [양쪽에 측접하는 0, 1 또는 2개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 265에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 100배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 몰 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 반응한 샘플은 소르타제 A 또는 나노바디가 없는 소르타제 반응 완충액에 있는 동등량의 벡터와 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0131] 동시에, 동등량의 미반응된 나노바디를 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0132] 결과 및 논의

[0133] 나노바디 접합된 샘플을 사용한 항-VP1/2/3 염색 블롯(도 4)에서, 55 kDa 참조 밴드 바로 위에 희미한 밴드가 눈에 보이고(화살표), 이 밴드의 강도는 링커 길이가 0 내지 1 또는 2개의 GGSGS[서열 번호: 47] 요소로 증가함에 따라 증가한다. 이러한 명백한 분자 질량은 53 kDa의 C 말단 VP 단편을 산출하는 소르타제 A 매개 백본 절단과 일치한다.

[0134] 유사하게, 35 kDa의 마커 바로 위에 희미한 밴드가 눈에 보이는데, 이는 나노바디 결합된 VP1이나 VP2 단편을 가리키는 것일 수 있다. 그러나 100-배 과잉의 나노바디 및 나노바디 준비물에서 알려지지 않은 40kDa 종이 있어 더 희미한 밴드를 식별하기 어렵다.

[0135] 결론적으로, LPQTG 태그[서열 번호: 43]는 VR-I에 삽입될 수 있으며 접합은 덜 효율적이다. 접합 효율은 링커 길이가 증가함에 따라 증가하지만, 일반적으로 이 삽입 부위에서는 효율이 떨어진다.

[0136] **실시예 3: AAV2_VR-IV 0-5L**

[0137] 물질 및 방법

[0138] 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)를 갖는 LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 16 내지 서열 번호: 20) [양쪽에 측접하는 0, 1, 3, 4 또는 5개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 몰 농도로 존재하였다. 소르타제 A와 나노바디가 없는 동일한 반응 혼합물도 만들어졌다. 반응 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0139] 동시에, 반응 혼합물을 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0140] 결과 및 논의

[0141] 나노바디 접합된 샘플을 사용한 항-VP1/2/3 염색 블롯에서, 37 내지 39 kDa에서 선명한 밴드가 명확하게 보인다(도 5). 강도는 링커 반복부가 0개에서 1개 내지 3개로 증가하며, 링커 길이가 링커 반복부가 4개와 5개로 증가함에 따라 안정화되는 것으로 보인다. 대부분의 단편이 예상 분자량보다 약간 더 높은 분자량으로 이동한다는 점을 고려하면, 이러한 명백한 분자 질량은 32 내지 35 kDa의 C 말단 VP 단편을 산출하는 소르타제 A 매개 백본

절단과 일치한다.

[0142] 유사하게, 55 kDa 마커 주위에서 밴드가 눈에 보이는데, 이는 나노바디 접합된 N 말단 VP 단편을 나타낸다. 이 밴드는 링커 단편이 없는 경우에는 눈에 보이지 않으며, 1개의 링커 반복부가 눈에 보일 때는 거의 보이지 않지만, 3, 4, 또는 5개의 링커 반복부에서 명확하게 보이고, 3, 4, 또는 5개의 반복부 사이의 강도에 명백한 차이가 없다.

[0143] 결론적으로, LPQTG 태그[서열 번호: 43]는 AAV2의 VR-IV에 좋은 접합 효율로 삽입될 수 있다. 접합 효율은 링커 길이가 증가함에 따라 증가하며 LPQTG 태그의 양쪽에 3개의 GGSGS 링커 반복부에서 안정기에 도달하는 것으로 보인다.

[0144] **실시예 4: AAV2_VR-VIII 0-5L**

[0145] 물질 및 방법

[0146] 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)를 갖는 LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 21 내지 서열 번호: 26) [양쪽에 측접하는 0, 1, 2 또는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]. 혼합물에서 소르타제 A의 물 농도는 AAV 바이러스 단백질의 물 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 물 농도로 존재하였다. 소르타제 A와 나노바디가 없는 동일한 반응 혼합물도 만들어졌다. 반응 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0147] 동시에, 반응 혼합물을 나노바디의 동일한 양만을 함유하는 샘플과 함께 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하였다. 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0148] 결과 및 논의

[0149] 나노바디 접합된 샘플을 사용한 항-VP1/2/3 염색 블롯에서, 17 내지 20 kDa에서 선명한 밴드가 명확하게 보인다 (도 6). 강도는 링커 반복부가 0개에서 1개 내지 3개 또는 4개로 증가하며(링커 반복부가 2개일수록 강도가 낮음), 5개의 링커 반복부에서 다시 낮아지는 것으로 보인다. 이러한 명백한 분자 질량은 17 내지 20 kDa의 C 말단 VP 단편을 산출하는 소르타제 A 매개 백본 절단과 일치한다.

[0150] 유사하게, 70 kDa 마커 주위에서 밴드가 보이는데, 이는 나노바디가 접합된 N 말단 VP 단편을 나타내지만 미반응 VP1/2/3 밴드의 경우와 마찬가지로 약간 더 위쪽으로 이동한다. 이 밴드는 링커 단편이 없는 경우에는 눈에 보이지 않고, 링커 반복부가 1개에서 2개, 3개 또는 4개로 증가하며, 5개의 링커 반복부이면 다시 약간 낮아진다.

[0151] 결론적으로, LPQTG 태그[서열 번호: 43]는 적당한 접합 효율로 AAV2의 VR-VIII에 삽입될 수 있다. 접합 효율은 링커 길이가 증가함에 따라 증가하며 LPQTG 태그[서열 번호: 43]의 양쪽에 4개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부에서 최고치에 도달하는 것으로 보인다.

[0152] **실시예 5: AAV2_VR-IV 0-3L**

[0153] 물질 및 방법

[0154] 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)를 갖는 LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 27 내지 서열 번호: 30) [양쪽에 측접하는 0, 1, 2 또는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]. 혼합물에서 소르타제 A의 물 농도는 AAV 바이러스 단백질의 물 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 물 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 반응한 샘플은 소르타제 A 또는 나노바디가 없는 소르타제 반응 완충액에 있는 동등량의 벡터와 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 마우스 항-VP1/2/3(Progen #65158)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서

1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0155] 동시에, 동등량의 미반응된 AAV 및 동등량의 미반응된 나노바디를 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0156] 결과 및 논의

[0157] 나노바디 접합된 샘플을 사용한 항-VP1/2/3 염색 블롯에서, 37 kDa에서 선명한 밴드가 명확하게 보인다(도 7). 강도는 링커 반복부가 0개에서 1개로 증가하고, 1, 2 및 3개의 링커 반복부는 유사한 강도를 갖는다. 대부분의 단편이 예상 분자량보다 약간 더 높은 분자량으로 이동한다는 점을 고려하면, 이러한 명백한 분자 질량은 33 kDa의 C 말단 VP 단편을 산출하는 소르타제 A 매개 백본 절단과 일치한다.

[0158] 항-FLAG 겔에서, 45 kDa에서 밴드가 눈에 보이는데, 이는 나노바디 접합된 N 말단 VP 단편을 나타낸다. 이 밴드는 링커 단편이 없는 경우에는 눈에 보이지 않지만, 링커 반복부가 1개에서 2개 또는 3개로 증가함에 따라 강도가 증가한다.

[0159] 결론적으로, LPQTG 태그[서열 번호: 43]는 AAV9의 VR-IV에 좋은 접합 효율로 삽입될 수 있다. 접합 효율성은 링커 길이가 증가함에 따라 증가하며 LPQTG 태그[서열 번호: 43]의 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부에서 가장 높은 값에 도달하고, 이 작제물에서는 더 긴 링커 길이를 테스트하지 않았다.

[0160] **실시예 6: AAV9_VR-VIII 0-1-3L**

[0161] 물질 및 방법

[0162] 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)를 갖는 LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 31, 서열 번호: 32, 서열 번호: 33) [양쪽에 측접하는 0, 1 또는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A]. 혼합물에서 소르타제 A의 물 농도는 AAV 바이러스 단백질의 물 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 물 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 반응한 샘플은 소르타제 A가 없는 샘플을 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 마우스 항-VP1/2/3(Progen #65158)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0163] 동시에, 소르타제 A가 없는 샘플과 함께 반응 혼합물을 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0164] 결과 및 논의

[0165] 나노바디 접합된 샘플을 사용한 항-VP1/2/3 염색 블롯에서, 17kDa에서 희미한 밴드가 눈에 보인다(도 8). 1개의 링커 반복부에서는 밴드를 식별할 수 없지만, 링커 반복부가 1개에서 3개로 증가한다. 이러한 명백한 분자 질량은 17 20 kDa의 C 말단 VP 단편을 산출하는 소르타제 A 매개 백본 절단과 일치한다.

[0166] 항-FLAG 겔에서, 70 kDa에서 밴드가 눈에 보이는데, 이는 나노바디 접합된 N 말단 VP 단편을 나타낸다. 이 밴드는 링커 단편이 없을 때는 매우 희미하지만, 링커 반복부가 1개에서 3개로 증가함에 따라 강도가 증가한다.

[0167] 결론적으로, LPQTG[서열 번호: 43] 태그는 AAV9의 VR-VIII에 삽입될 수 있지만 접합은 비효율적이다. 접합 효율성은 링커 길이가 증가함에 따라 증가하며 LPQTG 태그[서열 번호: 43]의 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부에서 가장 높은 값에 도달하고, 이 작제물에서는 더 긴 링커 길이를 테스트하지 않았다.

[0168] **실시예 7: AV2_VR-I 2L, AAV2_VR-IV 3L, AAV2_VR-VIII 3L, AAV9_VR-IV 3L, and AAV2_VR-VIII 3L**

[0169] 물질 및 방법

[0170] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 15, 서열 번호: 18, 서열 번호: 24, 서열 번호: 30, 서열 번호: 33) [양쪽에 측접하는 2개의 GGSGS를 갖는 위치 265에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링

커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A, 및 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A]를 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12)와 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 몰 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 반응한 샘플은 소르타제 A 또는 나노바디가 없는 소르타제 반응 완충액에 있는 동등량의 벡터와 함께 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0171] 동시에, 반응 혼합물을 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0172] 결과 및 논의

[0173] VP1/2/3 염색 블롯에서, 소르타제 A가 생성한 C 말단 VP 단편과 관련된 여러 개의 밴드가 눈에 보인다(도 9). AAV2_VR-I의 경우, ~58 kDa의 밴드는 매우 희미하여 커플링이 비효율적임을 나타낸다. AAV2_VR-IV 및 AAV9_VR-IV의 경우, ~38 kDa의 밴드가 명확하게 보여, 효율적인 커플링을 나타낸다. AAV2_VR-VIII 및 AAV9_VR-VIII의 경우, ~18 kDa의 밴드는 AAV2_VR-I보다 더 높은 강도로 눈에 보이지만, AAV2_VR-IV 및 AAV9_VR-IV보다 강도가 약하여, 중간 수준의 커플링이 있음을 나타낸다.

[0174] 동일한 조사 결과가 FLAG 염색 블롯에서도 반영되었다. 접합된 AAV2_VR-I 및 AAV9_VR-VIII에 해당하는 밴드는 나노바디의 배경에 의해 완전히 가려진다. 접합된 AAV2_VR-VIII에 해당하는 밴드는 매우 희미하게 보인다. AAV2_VR-IV 및 AAV9_VR-IV에 해당하는 밴드가 명확하게 보인다.

[0175] 결론적으로, VR-IV에 삽입하면 가장 높은 커플링 효율을 보인다. VR-VIII에 삽입하는 것은 작동하는 것으로 보이지만, 효율성이 낮고, VR-I에 삽입하는 것도 가능하지만 상대적 효율성은 매우 낮다.

[0176] 실시예 8: GGG-바이오틴

[0177] 물질 및 방법

[0178] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 22 (587_1L_pdAAVe_008)) [양쪽에 측접하는 1개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]을 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 바이오틴 태그 부착된 GGG 펩타이드 (GGG-[K(바이오틴)]-아미드, Cambridge Research Biochemicals, crb1000649h)와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 100배 더 높았고, GGG-바이오틴 펩타이드는 AAV 바이러스 단백질에 비해 250배 더 높은 몰 농도로 존재하였다(샘플 (1)). 대조 샘플에는 (2) "AAV 없음", (3) 소르타제 A 없음, (4) GGG-바이오틴 펩타이드 없음, (5) GGG-바이오틴 펩타이드만, (6) BSA가 있는 GGG-바이오틴 펩타이드 및 (7) BSA만이 포함되었다. 대조 반응에서는 모든 성분들이 반응 (1)과 동일한 농도였으며, 샘플 (6) 및 (7)의 BSA 질량은 샘플 (1)의 바이러스 단백질 질량과 동일하였다. 반응 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다.

[0179] 그 다음, 반응된 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:10,000 스트렙타비딘-HRP(ThermoScientific, 21130)와 함께 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0180] 겔에서 VP의 분자량에 대한 기준으로, AAV만을 갖는 샘플은 상이한 블롯으로부터 항-VP1/2/3 항체를 사용하여 블롯 및 이미지화하여 포함하였다.

[0181] 결과 및 논의

[0182] 스트렙타비딘-HRP 블롯에서, 샘플(1)에서 VP1, 2 및 3의 소르타제 A 매개 바이오틴 표지를 관찰할 수 있으며, 모든 음성 대조군에서는 접합 징후가 나타나지 않는다(도 10). 분자 질량은 비접합 VP보다 낮는데, 이는 17 kDa

의 C 말단 단편이 제거되었다는 것을 고려할 때 예상되는 결과이다.

[0183] **실시예 9: HER2 대 GFP**

[0184] 물질 및 방법

[0185] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 24, 서열 번호: 30) [양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 453에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 589에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A]를 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12), 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11)와 함께 또는 나노바디 없이 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 물 농도는 AAV 바이러스 단백질의 물 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 물 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 반응된 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:1000 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0186] 동시에, 반응 혼합물을 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고, 이를 PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0187] 결과 및 논의

[0188] 이전 실험에서 관찰된 바와 같이, 위치 587에 LPQTG[서열 번호: 43] 삽입을 갖고 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부가 측접된 AAV2의 소르타제 A 매개 나노바디 접합은 눈에 보이지만 비효율적이다(도 11). 위치 455에 LPQTG[서열 번호: 43] 삽입을 갖고 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부가 측접된 AAV9의 소르타제 A 매개 나노바디 접합은 양호한 접합 효율로 눈에 보인다.

[0189] 이 실험에서 가장 중요한 점은 항-HER2 나노바디와 항-GFP 나노바디 사이에 접합 효율에 차이가 없는 것으로 보인다.

[0190] **실시예 10: AAV2_VR-VIII 및 AAV9_VR-IV의 LPQTG 대 LPETG**

[0191] 물질 및 방법

[0192] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 24, 서열 번호: 34, 서열 번호: 30, 서열 번호: 35) [양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPETG 태그를 갖는 AAV2-HB0, 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A 및 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPETG 태그를 갖는 AAV9-A]를 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A 및 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12)와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 물 농도는 AAV 바이러스 단백질의 물 농도보다 5배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 50배 더 높은 물 농도로 존재하였다. 혼합물을 25℃에서 20시간 동안 인큐베이션하였다. 그 다음, 반응된 샘플을 SDS-PAGE 겔 상에서 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하였다. 차단 후, 멤브레인을 1:500 토끼 항-VP1/2/3(Progen #61084)과 함께 4℃에서 16시간 동안 인큐베이션하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-토끼 항체(Dako P0448)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0193] 동시에, 반응 혼합물을 별도의 SDS-PAGE 겔 상에 로딩하고 실행하고, PVDF 멤브레인에 블롯팅하고, 1:1000 마우스 항-FLAG 항체(Novus Bio NBP1-97410)로 4℃에서 16시간 동안 염색하였다. 세척 후, 겔을 1:10000 HRP 접합된 염소 항-마우스 항체(Dako P0447)와 함께 실온에서 1시간 동안 인큐베이션하고 화학 발광을 사용하여 현상하였다.

[0194] 결과 및 논의

[0195] 이전 실험에서 관찰된 바와 같이, 위치 587에 LPQTG 삽입을 갖고 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부가 측접된 AAV2의 소르타제 A 매개 나노바디 접합은 눈에 보이지만 비효율적이다(도 12). 위치 455에 LPQTG [서열 번호: 43] 삽입을 갖고 양쪽에 3개의 GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부가 측접된 AAV9의 소르타제 A 매

개 나노바디 접합은 양호한 접합 효율로 눈에 보인다.

[0196] 항-VP1/2/3 및 항-FLAG 블롯 모두에서, LPETG[서열 번호: 44]는 적어도 위치 455에 삽입되고 3GGSGS[서열 번호: 47] 링커 반복부와 측접된 LPXTG[서열 번호: 10]를 갖는 AAV9에 대한 항-HER2 나노바디 접합의 경우 LPQTG[서열 번호: 43]에 비해 접합 효율이 약간 더 높은 것으로 보인다.

[0197] **실시예 11: 시험관 내 표적화**

[0198] 물질 및 방법

[0199] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 24) [양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0]를 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 소르타제 A ("Nb와 접합되지 않음") 없이, 그리고 나노바디도 소르타제 A ("Nb" 없이 접합되지 않음)도 없이 소르타제 A 및 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12) ("접합된 항-HER2 Nb"), 소르타제 A 및 항-GFP 나노바디 (서열 번호: 11) ("항-GFP Nb"와 접합됨), 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12)와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 몰 농도로 존재하였다. 소르타제 A 효소 및 미반응된 나노바디를 제거하기 위해 PBS에 대해 Micro Float-A-Lyzer 100kDa MWC(Repligen, F235049)를 사용하여 투석하기 전에 25°C에서 20시간 동안 반응물을 인큐베이션하였다. 마지막으로, 바이러스 게놈 역가는 ddPCR을 사용하여 결정되었다.

[0200] MCF-10A(HER2 음성) 및 BT-474(HER2 양성) 세포를 각각 10% FBS가 보충된 MEBM(Lonza) 및 각각 글루타맥스 및 10% FBS가 보충된 RPMI1640 (Gibco) 배지에서 배양하였다. 세포를 90ul의 배지에 50,000개씩 시딩하고, 30ul에서 1E5 vg/세포의 MOI로 벡터와 혼합하였다. 이 혼합물을 96-웰 플레이트에 시딩하고, 3시간 후에 80ul의 배지를 첨가하였다. 72시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 트립신으로 처리하고, 스핀 다운(spin down)하고, 1:10,000 PerCP-Cy5.5 접합된 항-HER2 항체(BioLegend 324416)가 포함된 400ul의 PBS에 재현탁시켰다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포 현탁액을 Attune 유동 세포측정기를 사용하여 분석하였다.

[0201] 결과 및 논의

[0202] 나노바디의 존재 여부와 관계없이, 접합 여부와 관계없이, LPQTG 함유 AAV 벡터(서열 번호: 24)는 MCF-10A HER2 음성 세포를 형질도입하지 않는다(도 13a, 13b 및 13c). 이는 HB0 돌연변이의 결과일 가능성이 가장 높는데, 변형되지 않은 AAV2는 1E5의 MOI에서 MCF-10A 세포를 효율적으로(86%) 형질도입하기 때문이다(테이터 미표시).

[0203] BT-474 HER2 양성 세포의 경우, 항-HER2 나노바디와 접합된 AAV 벡터의 형질도입 효율은 비접합 또는 항-GFP 나노바디와 접합된 벡터에 비해 극적으로 높다.

[0204] 이러한 결과는 표적화 나노바디와 벡터의 접합이 형질도입 효율과 특이성을 증가시킨다는 것을 분명히 보여준다(도 13a, 13b 및 13c).

[0205] **실시예 12: 형질도입 효율성의 비교**

[0206] 물질 및 방법

[0207] LPQTG 함유 AAV 벡터 (서열 번호: 24 및 서열 번호: 30) [양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 587에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV2-HB0 및 양쪽에 측접하는 3개의 GGSGS 링커를 갖는 위치 455에 위치한 LPQTG 태그를 갖는 AAV9-A]를 1x 소르타제 반응 완충액 (300mM Tris, 150mM NaCl, 5mM CaCl₂, pH 7.5)에서 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12)와 함께 그리고 소르타제 A ("Nb와 접합되지 않음") 없이 소르타제 A 및 항-HER2 나노바디 (서열 번호: 12) ("접합된 항-HER2 Nb")와 함께 인큐베이션하였다. 혼합물에서 소르타제 A의 몰 농도는 AAV 바이러스 단백질의 몰 농도보다 10배 더 높았고, 나노바디는 AAV 바이러스 단백질에 비해 100배 더 높은 몰 농도로 존재하였다. 소르타제 A 효소 및 미반응된 나노바디를 제거하기 위해 PBS에 대해 Micro Float-A-Lyzer 100kDa MWC(Repligen, F235049)를 사용하여 투석하기 전에 25°C에서 20시간 동안 반응물을 인큐베이션하였다. 마지막으로, 바이러스 게놈 역가는 ddPCR을 사용하여 결정되었다.

[0208] BT-474(HER2 양성) 세포를 각각 10% FBS가 보충된 MEBM(Lonza) 및 각각 글루타맥스 및 10% FBS가 보충된 RPMI1640 (Gibco) 배지에서 배양하였다. 세포는 90ul의 배지에 50,000개씩 시딩하고, 반응하지 않은 나노바디만을 30ul 또는 동등하게 희석하여 1E5 vg/세포의 MOI로 벡터와 혼합하였다. 이 혼합물을 96-웰 플레이트에 시딩하고, 3시간 후에 80ul의 배지를 첨가하였다. 72시간 후, 세포를 PBS로 세척하고 트립신으로 처리하고, 스핀 다운(spin down)하고, 1:10,000 PerCP-Cy5.5 접합된 항-HER2 항체(BioLegend 324416)가 포함된 400ul의 PBS에 재

현탁시켰다. 실온에서 30분 동안 인큐베이션한 후, 세포 현탁액을 Attune 유동 세포측정기를 사용하여 분석하였다.

[0209] 결과 및 논의

[0210] 형질도입 효율은 비접합 벡터에 비해 항-HER2 나노바디와 접합된 AAV 벡터보다 92배(AAV2_VR-VIII 3L, 서열 번호: 24) 및 8배(AAV9_VR-IV 3L, 서열 번호: 30) 더 높다(도 14).

[0211] 이러한 결과는 표적화 나노바디와 벡터의 접합이 형질도입 효율을 증가시킨다는 것을 분명히 보여준다.

[0212] 흥미롭게도, 그 효과는 AAV2_VR-VIII 3L의 경우 10배 이상 더 두드러지는데, 이는 AAV9_VR-IV 3L(~12%)에 비해 접합 효율(~2%)이 낮다. 이는 삽입 위치나 사용된 기본 혈청형으로 인한 것일 수 있다.

[0213] **실시예 13: 상이한 작제물의 생산 수율 비교**

[0214] 물질 및 방법

[0215] HEK293 세포를 10% FBS를 갖는 DMEM에서 10cm 페트리 접시당 3.6E+06개의 생존 세포로 시딩하고, 제조업체의 권고에 따라 (ITR 측점된 CAG-GFP를 인코딩하는) 이식유전자 플라스미드, 아데노바이러스 헬퍼 유전자를 코딩하는 플라스미드 및 rep/cap 인코딩 플라스미드를 사용하여 PEIpro를 사용하여 형질감염시켰다. AAV2, AAV9, AAV2-VR-VIII-LPQTG-3L[서열 번호: 24] 및 AAV9-VR-IV-LPQTG-3L[서열 번호: 30] 각각을 두플로(duplo)로 형질감염시켰다. 형질감염된 플레이트를 37°C 및 5% CO2에서 보관하였고, 형질전환 24시간 후에 배지를 5% FBS를 갖는 DMEM으로 교환하였다. 형질감염 72시간에, 상청액을 수집하였다. 트립신을 사용하여 세포를 제거하여 별도의 팔콘 튜브에 보관하였다. 두 튜브 모두 5분 동안 1000g로 회전시켰다. 배지의 상청액을 새로운 튜브로 옮기고, 세포 분획의 상청액은 버렸다.

[0216] 다음으로, 세포 펠릿을 3번의 동결/해동 사이클을 거쳐 용해시키고, 37°C에서 1시간 동안 DNase로 처리하고, 마지막으로 원심분리를 사용하여 불용성 잔해를 제거하였다. ddPCR을 사용하여, 상청액과 세포 분획으로부터 바이러스 게놈("Vg") 역가를 결정하였다. ELISA를 사용하여, 상청액과 세포 분획으로부터 바이러스 입자("Vp") 역가를 결정하였다.

[0217] 결과 및 논의

[0218] 생산 수율과 충만 백분율 측면에서 약간의 변동성이 있지만, 돌연변이 벡터의 부착 생산은 선구 (AAV2 및 AAV9) 혈청형의 부착 생산과 유사하다(도 15a 및 15b). 다시 말해, 양쪽에 15개 아미노산이 측점되어 있는 LPQTG 부위를 삽입해도 생산 수율이 크게 감소하지 않는다.

[0219]

출원에 언급된 서열

AAV2 야생형 Cap

시작 VP2 T138

시작 VP3 M203

VP1-VP2 transition P135-G141

PVKTAP [서열번호: 1]

VR-I S261-N268

SSQSGASN [서열번호: 2]

VR-IV S446-S474

SRTNT PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQS [서열번호: 3]

T PSGTTTQS [서열번호: 5]

VR-VIII Q575-V600

QYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV [서열번호: 4]

LQRGNRQA A [서열번호: 6]

VP1 [서열번호: 7]

```

1   MAADGYLPDW LEDTLSEGIR QWWKLKPGPP PPKPAERHKD DSRGLVLPGY
51  KYLGPFNGLD KGEPVNEADA AALEHDKAYD RQLDSGDNPY LKYNHADA EF
101 QERLKEDTSF GGNLGRAVFQ AKKRVLEPLG LVEEPVKTAP GKKRPVEHSP
151 VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT
201 NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGRFPKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
351 PYVLGSAHQG CLPPFPADV F MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
401 QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
501 SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQGSEKT
551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV

```

[0220]

A A

601 LPGMVWQDRD VYLQGPIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
701 TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

VP2 [서열번호: 8]

138 TAP GKKRPVEHSP
151 VEPDSSSGTG KAGQQPARKR LNFGQTGDAD SVPDPQPLGQ PPAAPSGLGT
201 NTMATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
351 PYVLGSAHQG CLPPFPADV MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
401 QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
501 SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQGSEKT
551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV

A A

601 LPGMVWQDRD VYLQGPIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
701 TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

VP3 [서열번호: 9]

203 MATGSGAP MADNNEGADG VGNSSGNWHC DSTWMGDRVI TTSTRTWALP
251 TYNNHLYKQI SSQSGASNDN HYFGYSTPWG YDFNRFHCH FSPRDWQRLI
301 NNNWGFPRKR LNFKLFIQV KEVTQNDGTT TIANNLTSTV QVFTDSEYQL
351 PYVLGSAHQG CLPPFPADV MVPQYGYLTL NNGSQAVGRS SFYCLEYFPS
401 QMLRTGNNFT FSYTFEDVPF HSSYAHSQSL DRLMNPLIDQ YLYYLSRTNT
451 PSGTTTQSRL QFSQAGASDI RDQSRNWLPG PCYRQQRVSK TSADNNNSEY
501 SWTGATKYHL NGRDSL VNPG PAMASHKDDE EKFFPQSGVL IFGKQGSEKT
551 NVDIEKVMIT DEEEIRTTNP VATEQYGSVS TNLQRGNRQA ATADVNTQGV

A A

601 LPGMVWQDRD VYLQGPIWAK IPHTDGHFHP SPLMGGFGLK HPPPQILIKN
651 TPVPANPSTT FSAAKFASFI TQYSTGQVSV EIEWELQKEN SKRWNPEIQY
701 TSNYNKSVNV DFTVDTNGVY SEPRPIGTRY LTRNL*

[0221]

돌연변이 R585A 및 R588A는 HB⁰ 변형을 지칭한다

인식 모티프:

X_n-LPXTG-X_m

LPXTG [서열 번호: 10]

X는 임의의 자연 AA 이거나, X는 DEQN 이거나, X는 Q 이다.

n= 0-20

m= 0-20

VR-I 루프 부근 30 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K258 K321 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620 K640 K649 K665
K692 K706

루프 VR-I 부근 15 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K258 K507 K527 K549 K706

VR-IV 루프 부근 30 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K258 K309 K313 K321 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620 K640
K649 K665 K688 K692 K706

VR-IV 루프 부근 15 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K258 K490 K507 K532 K544 K549 K556 K665

VR-IV 루프 부근 5 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K549

VR-VIII 루프 부근 30 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K309 K490 K507 K527 K532 K544 K549 K556 K620 K640 K688 K706

VR-VIII 루프 부근 15 응스트롬 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K490 K507 K527 K532

[0222]

VR-VIII 루프 부근 5 용스트림 내의 표면 노출된 라이신은 다음과 같다:

K507

GFP 나노바디:

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAASGFPVNRYSMRWYRQAPG
KEREWVAGMSSAGDRSSYEDSVKGRFTISRDDARNTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNVNVGFEY
WGQGTQVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH [서열 번호: 11]

HER2 나노바디:

GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSEVQLVESGGGSVQAGGSLKLTCAASGYIFNSCGMGWYRQSPG
RERELVSRISGDGDTWHKESVKGRFTISQDNVKKTLVQLQMNSLKPEDTAVYFCAVCYNLETYW
GQGTQVTVSSAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDKGAHHHHHHH [서열 번호: 12]

AAV2-VR-I-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGLPQTGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFRPK
RLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQ
YGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFTSYTFEDVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLID
QYLYYLSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWT
GATKYHLNGRDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTT
NPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNP
EIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 13]

AAV2-VR-I-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT

[0223]

YNNHLYKQISSQSGSGSGLPQTGGSGSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRQDWQRLI
 NNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPP
 FPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQ
 LDRLMNPLIDQYLYLRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSAD
 NNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKV
 MITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWA
 KIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWEL
 QKENSKRWNPEIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 14]

AAV2-VR-I-2L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
 QPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGSGSGSGSGLPQTGGSGSGSGSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCH
 FSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLG
 SAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLTNNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPF
 HSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYLRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQ
 QRVSKTSADNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSE
 KTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDV
 YLQGPWAKIPHTDGHFHPSPMLGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQV
 SVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSNNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호:
 15]

AAV2-VR-IV-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
 QPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFPRKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
 LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYY
 LSRTNTPSGLPQTGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNSEYSWT
 GATKYHLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTT
 NPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHP

[0224]

SPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWN
 IEQYTSNYNKSXNVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 16]

AAV2-VR-IV-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
 QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRQWRLNNWGFPRKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
 LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYY
 LSRTNTPSGGGGSGGGGSLPQTGGGGGSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRV
 SKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTN
 VDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQ
 GPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVE
 IEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSXNVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 17]

AAV2-VR-IV-3L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
 QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSRQWRLNNWGFPRKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
 LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLYY
 LSRTNTPSGGSGSGGSGGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQS
 RNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQS
 GVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAATADVNTQGVLP
 PGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKF
 ASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYNKSXNVNDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYL
 TRNL [서열 번호: 18]

AAV2-VR-IV-4L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG

[0225]

QPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGGSGSGGSGSGGSGGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGSGSGGTTTQSRLQFSQ
AGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSLVPNGPAMASH
KDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVSTNLQAGNAQAA
TADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPVA
NPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVY
SEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 19]

AAV2-VR-IV-5L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
QPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGGSGSGGSGSGGSGGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSGG
TTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKYHLNGRDSL
VNP GPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQYGSVST
NLQAGNAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPP
PQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVN
VDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 20]

AAV2-VR-VIII-0L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLG
QPPAAPSGLTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRHFCHFSRQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY

[0226]

HLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVAT
EQYGSVSTNLQAGNLPQTGAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHP
SPLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWN
PEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 21]

AAV2-VR-VIII-1L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLG
QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY
HLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVAT
EQYGSVSTNLQAGNGGGGSLPQTGGGGGSAQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWA
KIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWEL
QKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 22]

AAV2-VR-VIII-2L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLG
QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQDWQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY
HLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVAT
EQYGSVSTNLQAGNGSGSGGGGSLPQTGGGGGSGSGAQAATADVNTQGVLPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[서열 번호: 23]

AAV2-VR-VIII-3L:

[0227]

MAADGYLPDWLEDTLSEGRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLG
 QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQWQRLINNNWGFRPKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
 LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
 LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY
 HLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVAT
 EQYGSVSTNLQAGNGSGSGSGSGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGGAQAATADVNTQGVL
 PGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKF
 ASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYL
 TRNL [서열 번호: 24]

AAV2-VR-VIII-4L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLG
 QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQWQRLINNNWGFRPKRLNFK
 LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
 LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
 LSRTNTPSGTTTQSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY
 HLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVAT
 EQYGSVSTNLQAGNGSGSGSGSGSGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGSGSGGAQAA
 TADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPA
 NPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYNKSVNVDFTVDTNGVY
 SEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 25]

AAV2-VR-VIII-5L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGE
 PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
 LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPPLG
 QPPAAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRQWQRLINNNWGFRPKRLNFK

[0228]

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPPAAPSGVGSGLTASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDREVTTSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNF
KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENVPFHSSYAHQSGLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGLPQTGQNQQTCLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWP
GASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKT
TNPVATESYGGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHDTGDNFH
PSPLMGGFGMKHPPQILIKNTVPVADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSkrw
NPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열번호: 27]

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLPGPNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPPAAPSGVGSGLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSSQWLGDREVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRDPWQRLINNNWGFPRKRLNF
KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHSSQLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGGSGSGLPQTGGSGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVT
QNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADK
VMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVLQGPW
AKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPOILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGOVSVEIEW

ELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 28]

AAV9-VR-IV-2L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPPAAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNF
KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGGSGSGSGSGSLPQTGGSGSGSGSGSQNLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSY
RQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGT
GRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGILPGMVWQDR
DVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKDKLNSFITQYST
GQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[서열 번호: 29]

AAV9-VR-IV-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPPAAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNF
KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNMFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGGSGSGSGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSQNLKFSVAGPSAMAVQ
GRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLS
GSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYQVATNHQSAQAQAQTGWVQNGI
LPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR
YLTRNL [서열 번호: 30]

AAV9-VR-VIII-0L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK

[0230]

RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
 GEPPAAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLNNNWGFRPKRLNF
 KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
 TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
 YLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSW
 ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTNPVA
 TESYGQVATNHQSAQALPQTGQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFH
 PSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSQRW
 NPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 31]

AAV9-VR-VIII-1L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
 GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
 RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
 GEPPAAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLNNNWGFRPKRLNF
 KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
 TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
 YLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSW
 ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTNPVA
 TESYGQVATNHQSAQAGSGSLPQTGGSGSGQAQTGWVQNGILPGMVWQDRDVYLQGPIWA
 KIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTVPADPPTAFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWE
 LQKENSQRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTRYLTRNL [서열 번호: 32]

AAV9-VR-VIII-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPNGLDK
 GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
 RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAAKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
 GEPPAAPSGVGSLTMASSGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVTTSTRTWALPT
 YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQRLNNNWGFRPKRLNF
 KLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
 TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNFQFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
 YLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQGRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSW
 ALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTNPVA

[0231]

TESYGQVATNHQSAQAGSGSGSGSGGGGSLPQTGGGGSGSGSGSGSGQAQTGWVQNQGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR
YLTRNL [서열번호: 33]

AAV2-VR-VIII-LPETG-3L:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFGNGLDKGE
PVNEADAAALEHDKAYDRQLDSGDNPYLYKNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV
LEPLGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPGLG
QPPAAPSLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFK
LFNIQVKEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPQYGYLT
LNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYTFEDVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYY
LSRTNTPSGTTTQSRQLFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTSADNNNSEYSWTGATKY
HLNGRDSLVPNGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVAT
EQYGSVSTNLQAGNGSGSGSGSGGGGSLPETGGGGSGSGSGSGSGQAATADVNTQGVL
PGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKF
ASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYSNNVNDFTVDINGVYSEPRPIGTRYL
TRNL [서열번호: 34]

AAV9-VR-IV-LPETG-3L:

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPFGNGLDK
GEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLYKNHADADEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKK
RLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTEVPDPQPI
GEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRTVITSTRTWALPT
YNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNF
KLFIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSYQLPYVLGSAHEGCLPPFPADVFMIPQYGYL
TLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNTFSYEFENVPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLY
YLSKTINGSGSGSGSGSGGGGSLPETGGGGSGSGSGSGSGQNQQTLKFSVAGPSAMAVQ
GRNYIPGPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLS
GSLIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQGI
LPGMVWQDRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPQILIKNTPVPADPPTAFNKD
KLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYSNNVEFAVNTEGVYSEPRPIGTR
YLTRNL [서열번호: 35]

[0232]

VP1 캡시드 VR-IV 영역 아미노산 453-454

NTPSGLPQTGTTTQS [서열 번호: 36]

VP1 캡시드 VR-VIII 영역 아미노산 587-588

LQRGNGGSGSLPQTGGGSGSRQAAT [서열 번호: 37]

VP1 캡시드 VR-VIII 영역 아미노산 587-588 이중 링커

LQRGNGGSGSGGSGSLPQTGGGSGSGGSGSRQAAT [서열 번호: 38]

서열 서열 1: GGGGS [서열 번호: 39]

X_n-NPXTG-X_m: NPXTG [서열 번호: 40]

X_n-LPXTA-X_m: LPXTA [서열 번호: 41]

X_n-LAXTG-X_m: LAXTG [서열 번호: 42]

소르타제 A 인식 서열 1: LPQTG [서열 번호: 43]

소르타제 A 인식 서열 2: LPETG [서열 번호: 44]

소르타제 A 인식 서열 3: LPNTG [서열 번호: 45]

소르타제 A 인식 서열 4: LPDTG [서열 번호: 46]

서열 서열 2: GGSGS [서열 번호: 47]

X_n-LPXAG-X_m: LPXAG [서열 번호: 48]

[0233]

Xn-LPXLG-Xm: LPXLG [서열 번호: 49]

Xn-APXTG-Xm: APXTG [서열 번호: 50]

Xn-LPXSG-Xm: LPXSG [서열 번호: 51]

Xn-FPXTG-Xm: FPXTG [서열 번호: 52]

Xn-XPKTG-Xm: XPKTG [서열 번호: 53]

Xn-LPEXG-Xm: LPEXG [서열 번호: 54]

Xn-NPQTN-Xm: NPQTN [서열 번호: 55]

Xn-QVPTG-Xm: QVPTG [서열 번호: 56]

Xn-LPNTA-Xm: LPNTA [서열 번호: 57]

Xn-LPLTG-Xm: LPLTG [서열 번호: 58]

Xn-APKTG-Xm: APKTG [서열 번호: 59]

Xn-DPKTG-Xm DPKTG [서열 번호: 60]

Xn-SPKTG-Xm: SPKTG [서열 번호: 61]

Xn-APATG-Xm: APATG [서열 번호: 62]

Xn-LAETG-Xm: LAETG [서열 번호: 63]

Xn-LPEAG-Xm: LPEAG [서열 번호: 64]

Xn-LPECG-Xm: LPECG [서열 번호: 65]

Xn-LPESG-Xm: LPESG [서열 번호: 66]

Xn-LMVGG-Xm: LMVGG [서열 번호: 67]

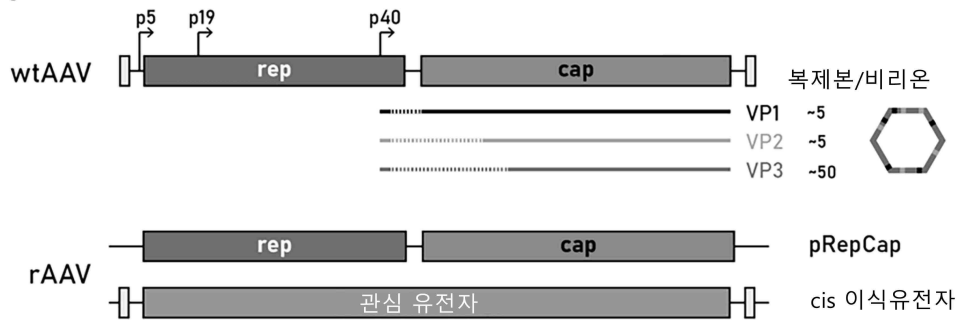
[0234]

[0235]

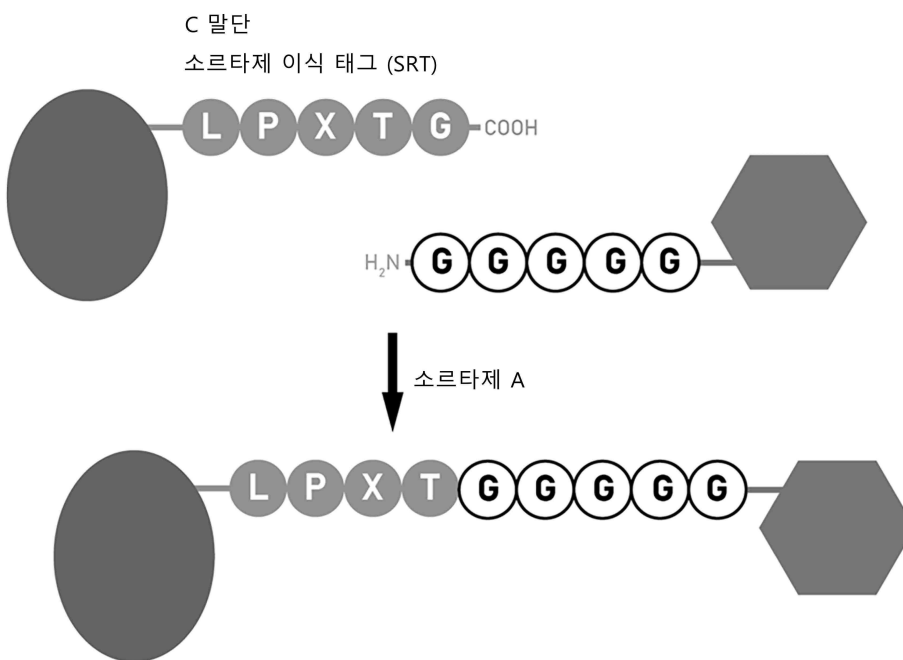
도면

도면1

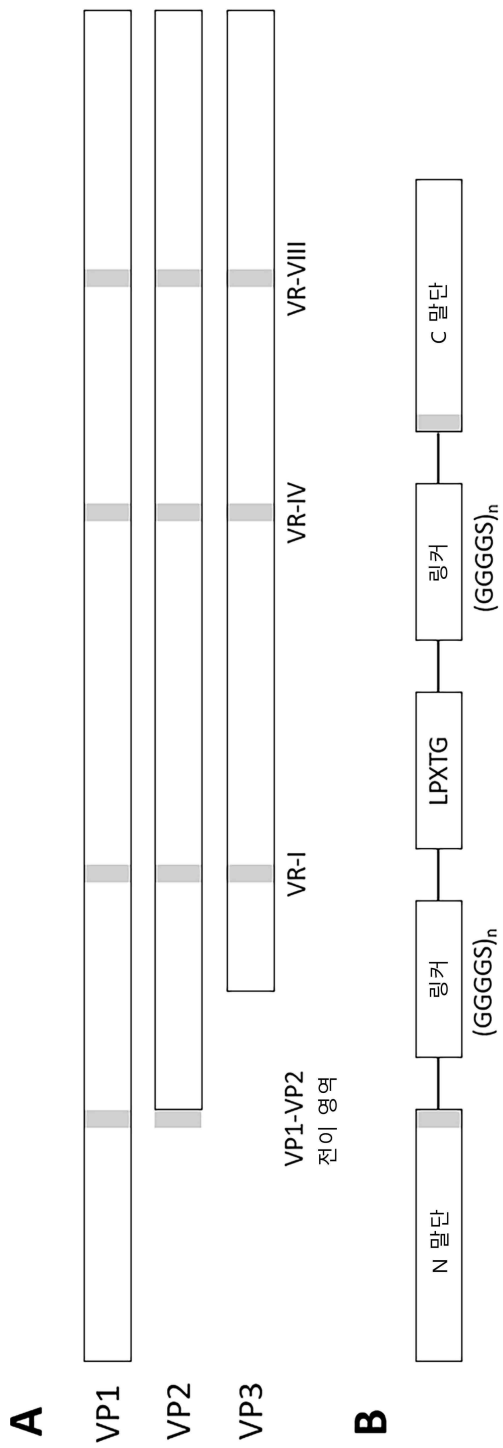
A



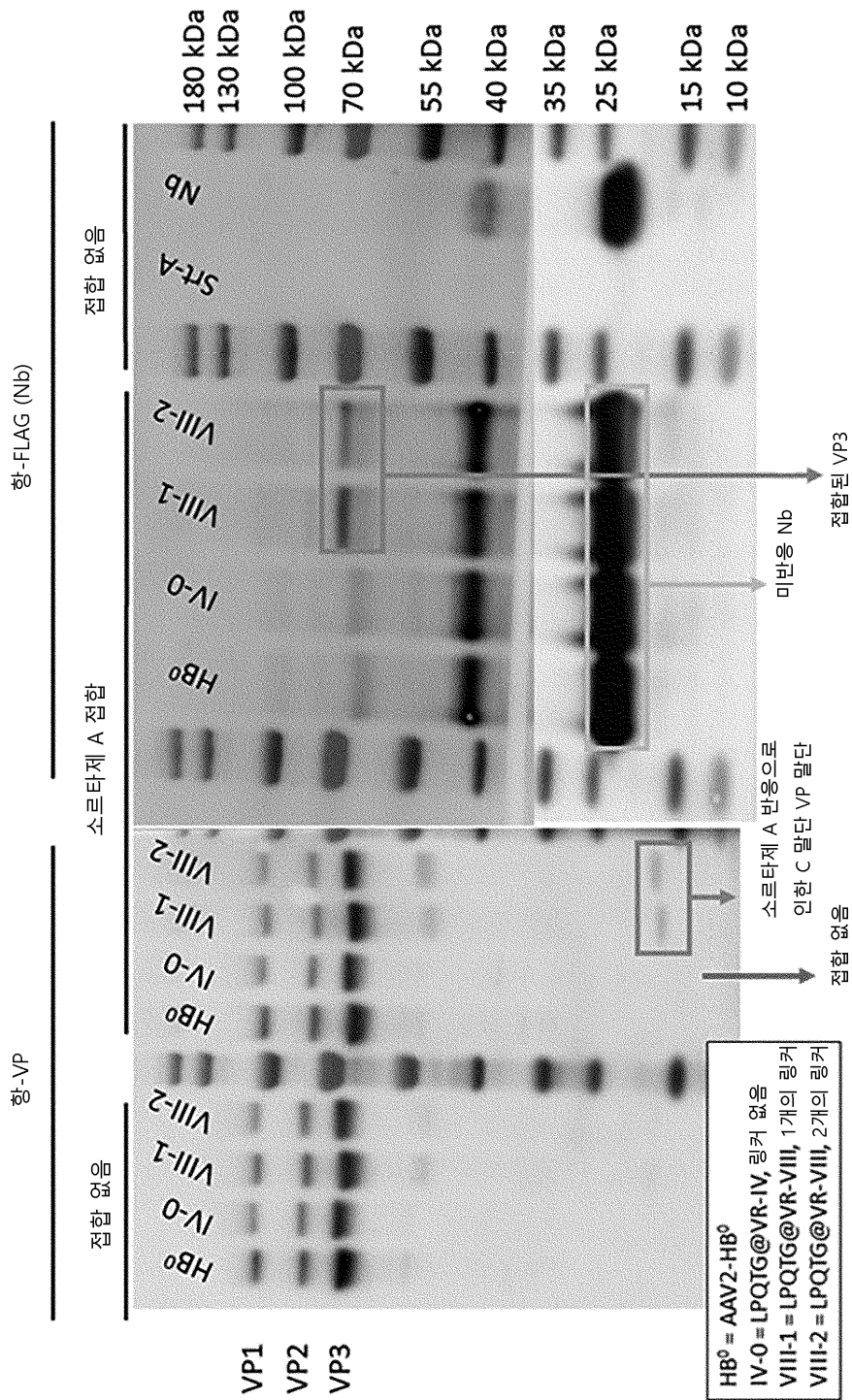
B



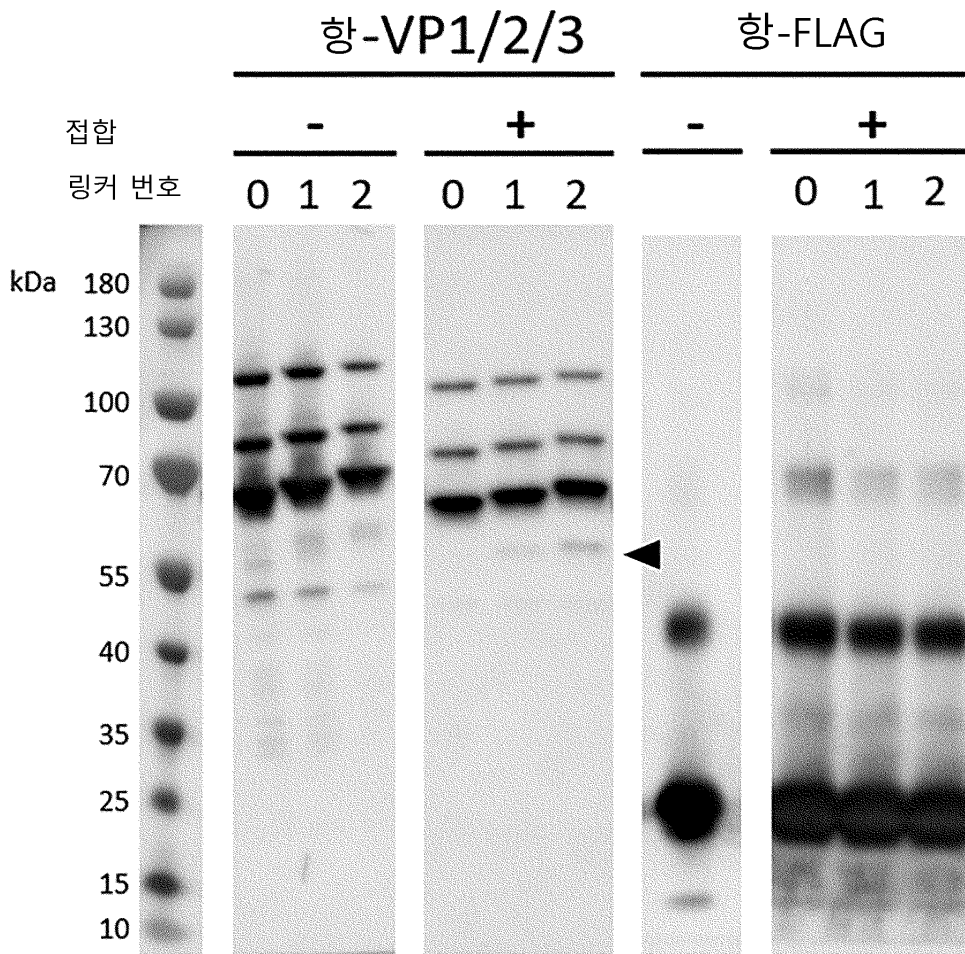
도면2



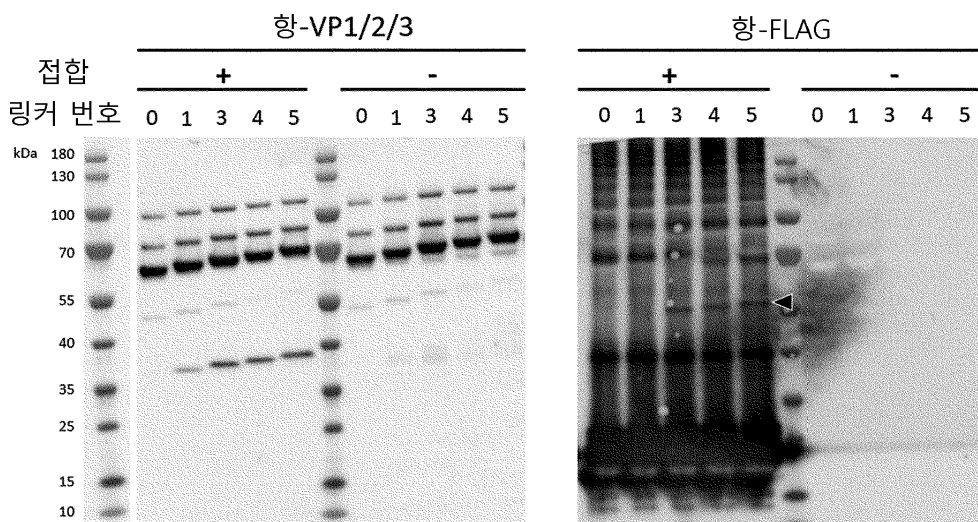
도면3



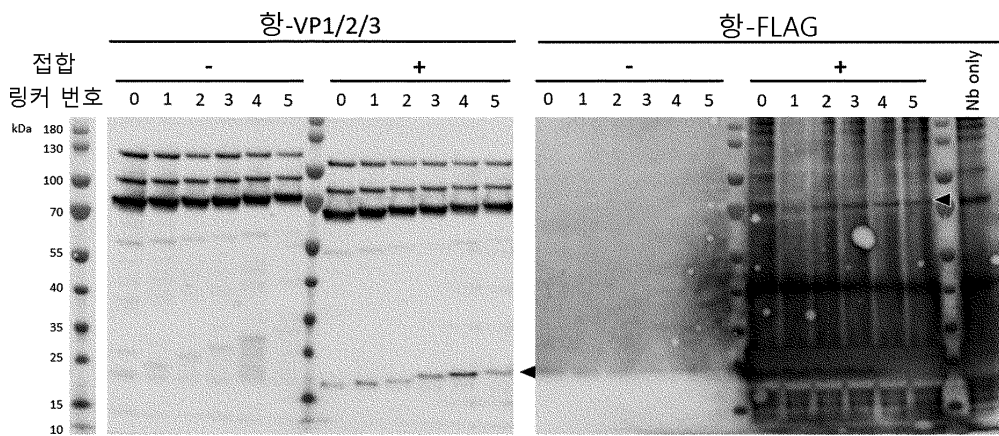
도면4



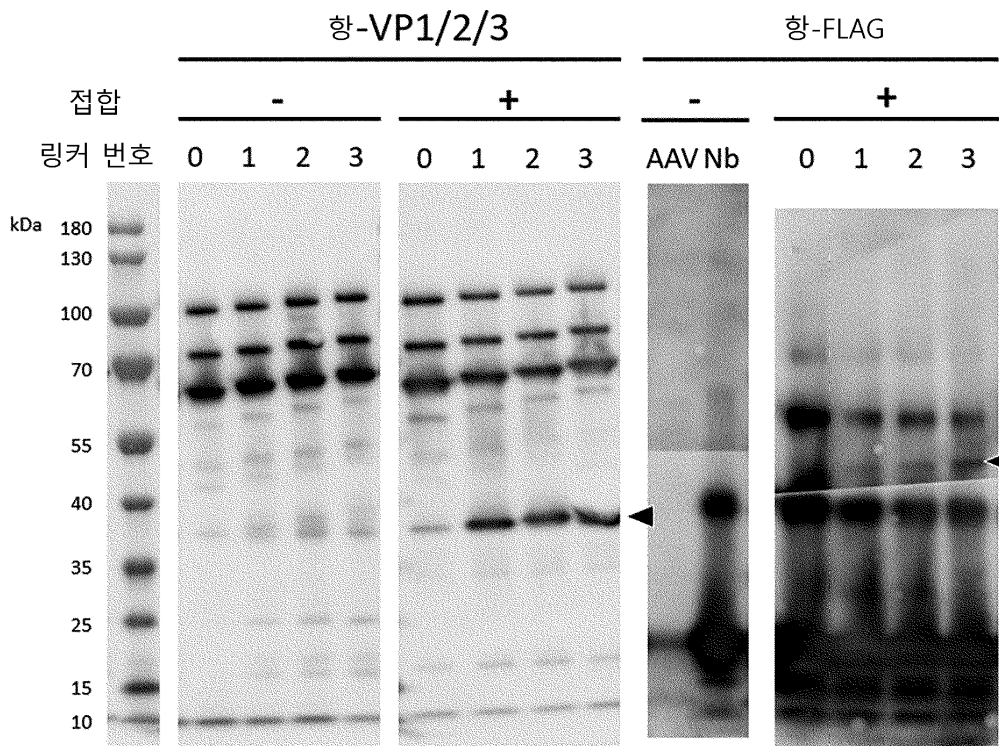
도면5



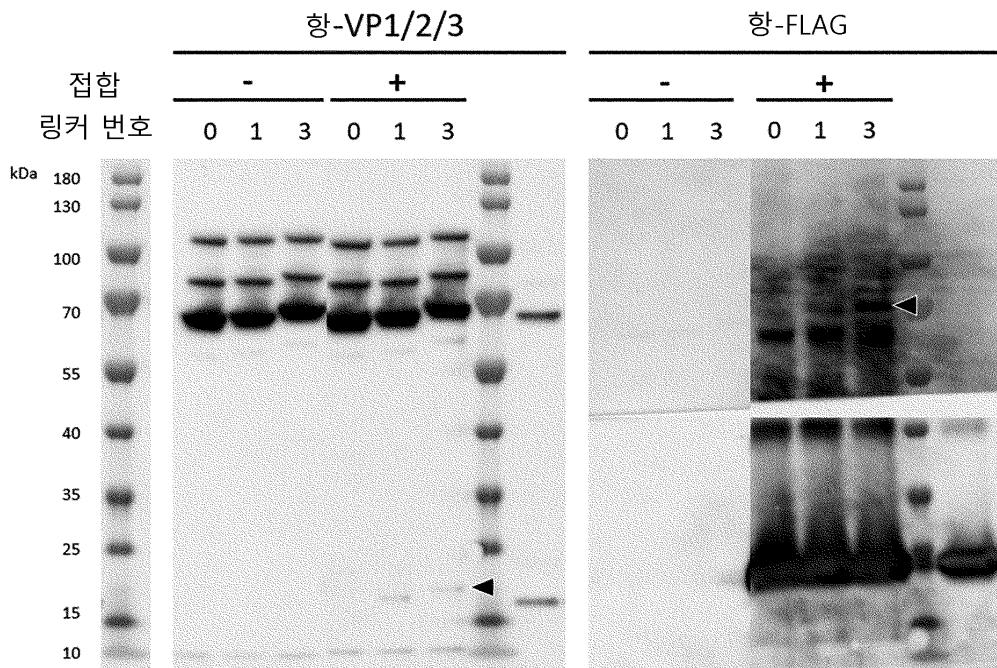
도면6



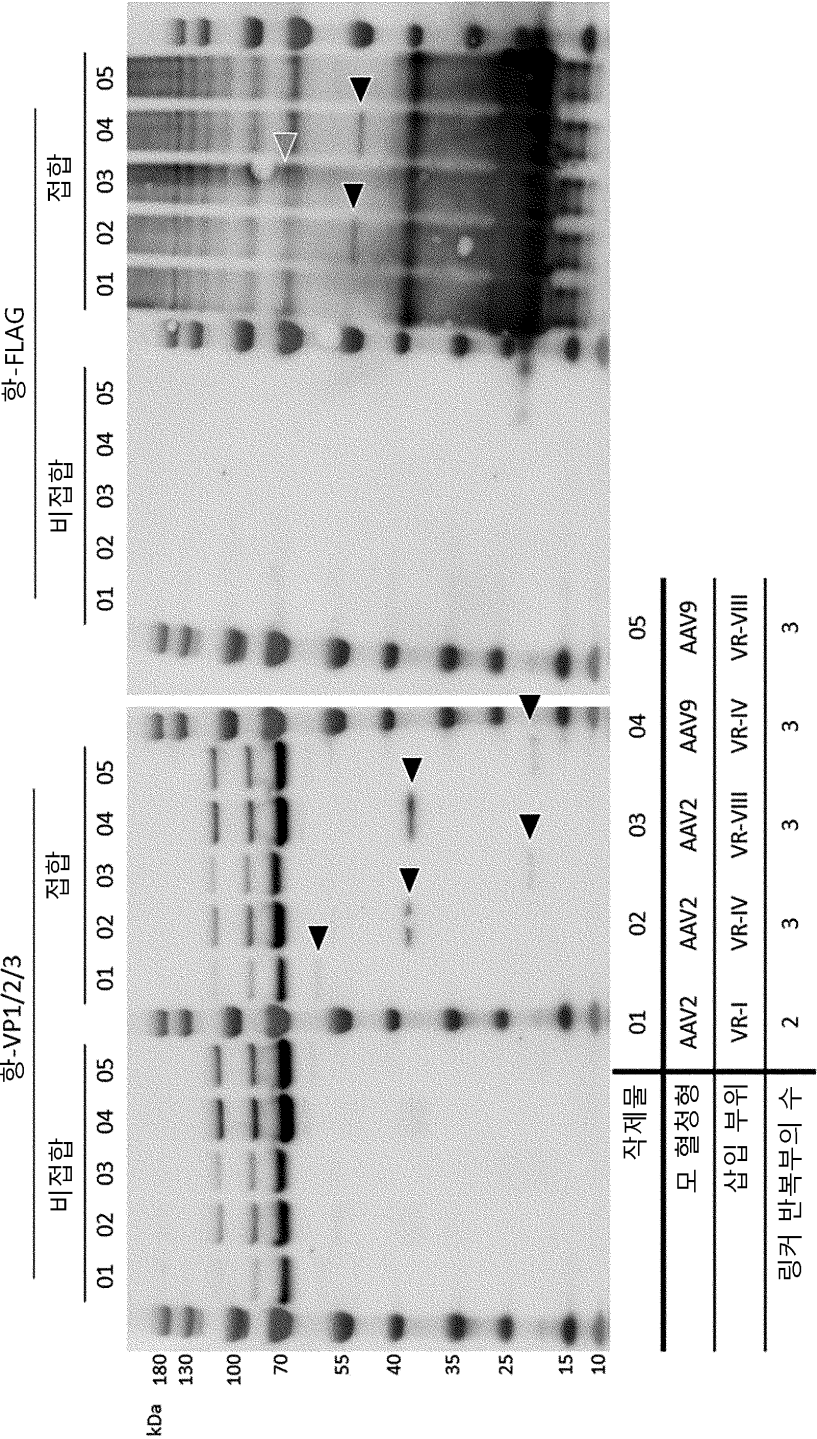
도면7



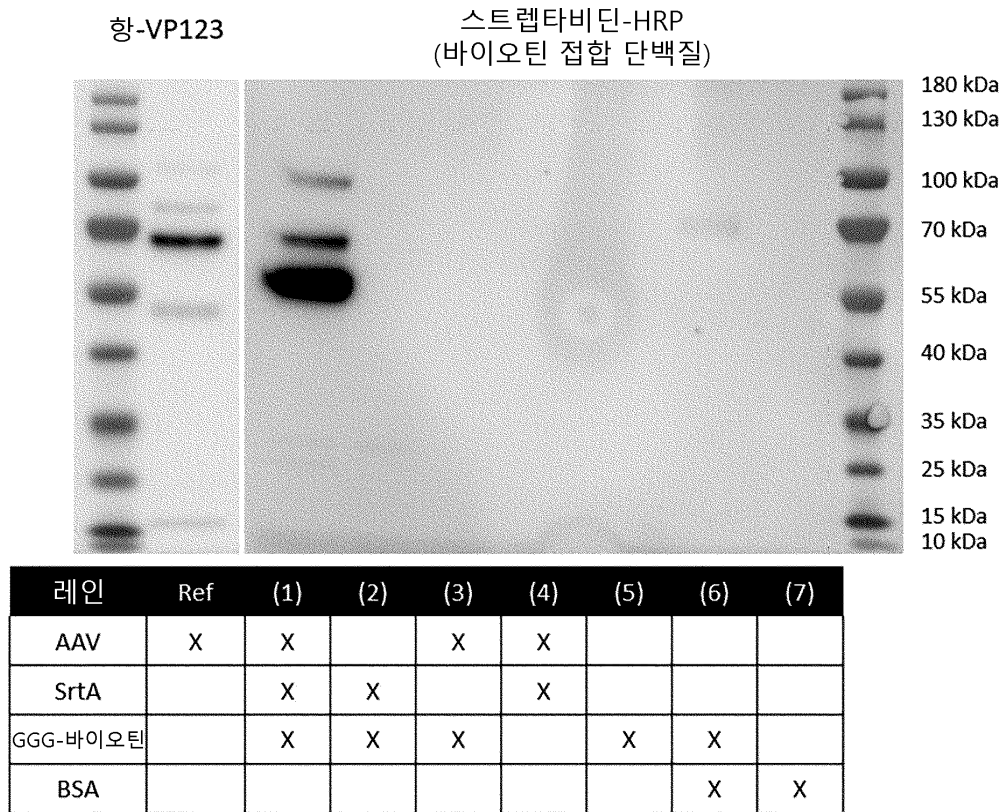
도면8



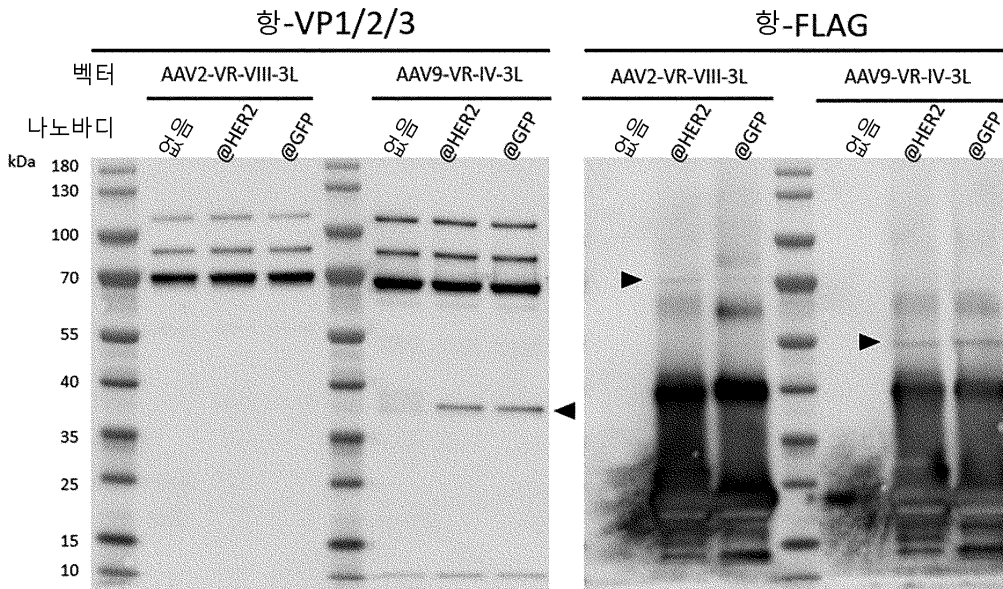
도면9



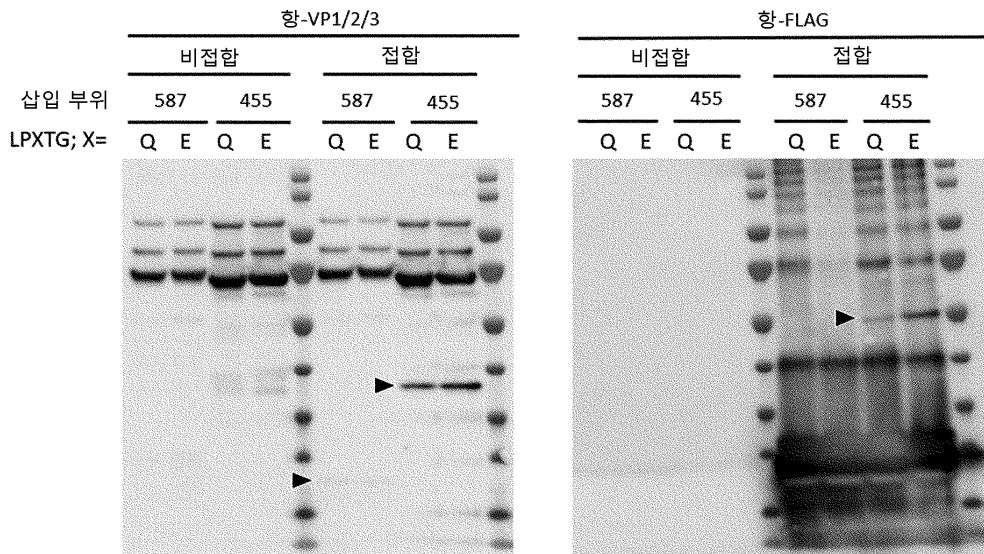
도면10



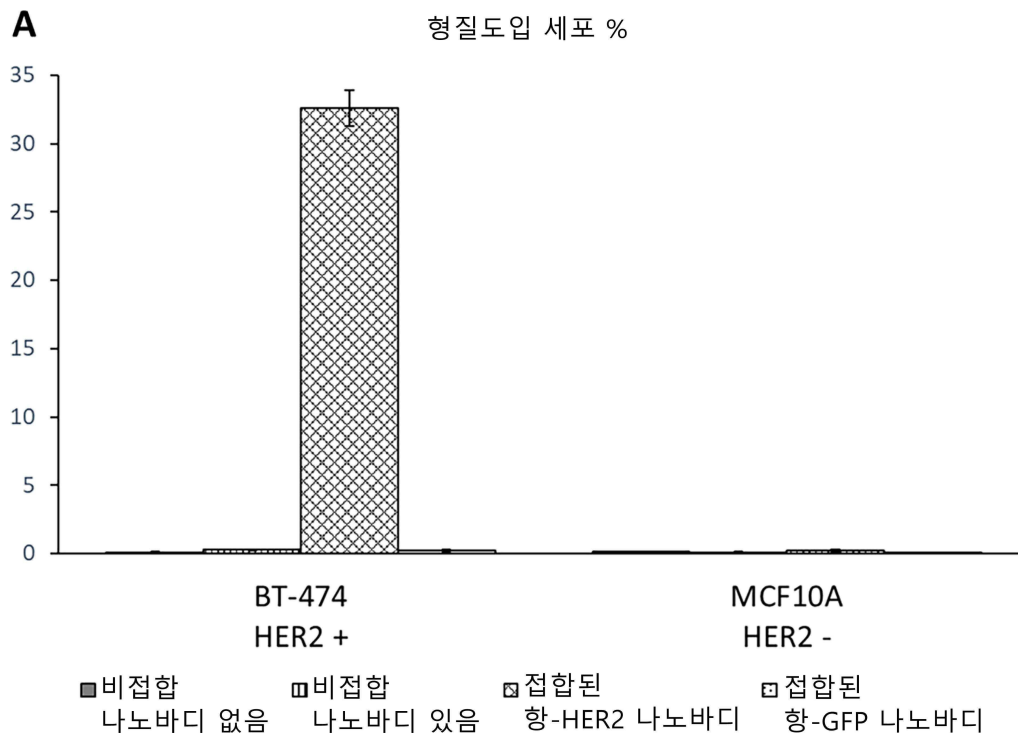
도면11



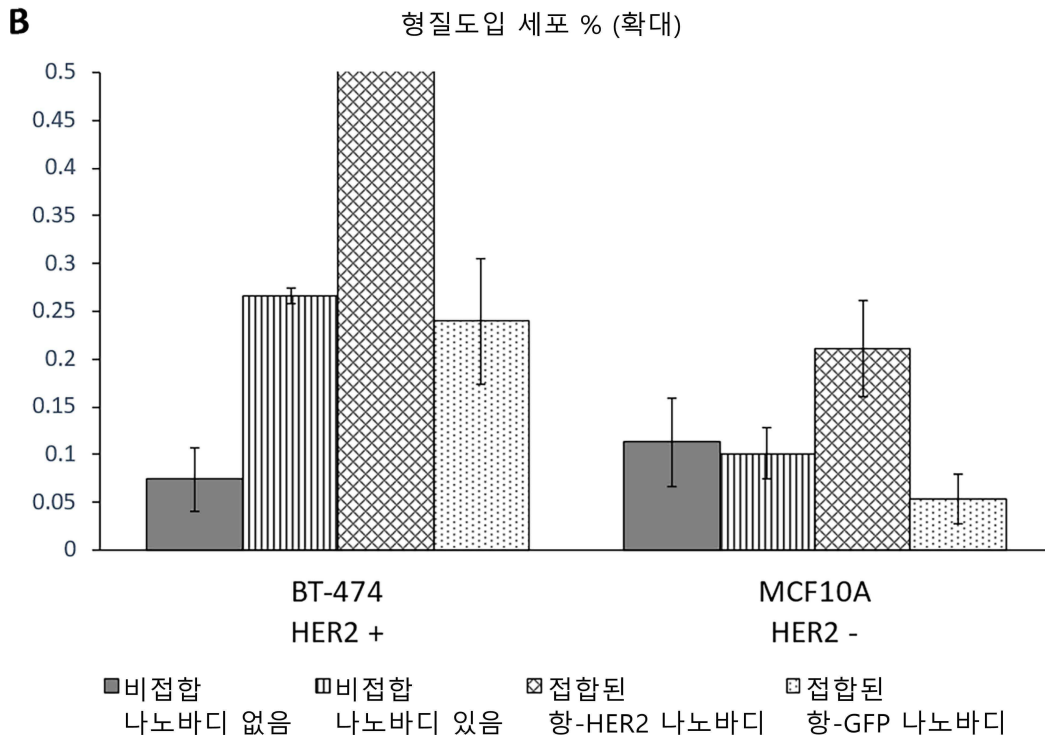
도면12



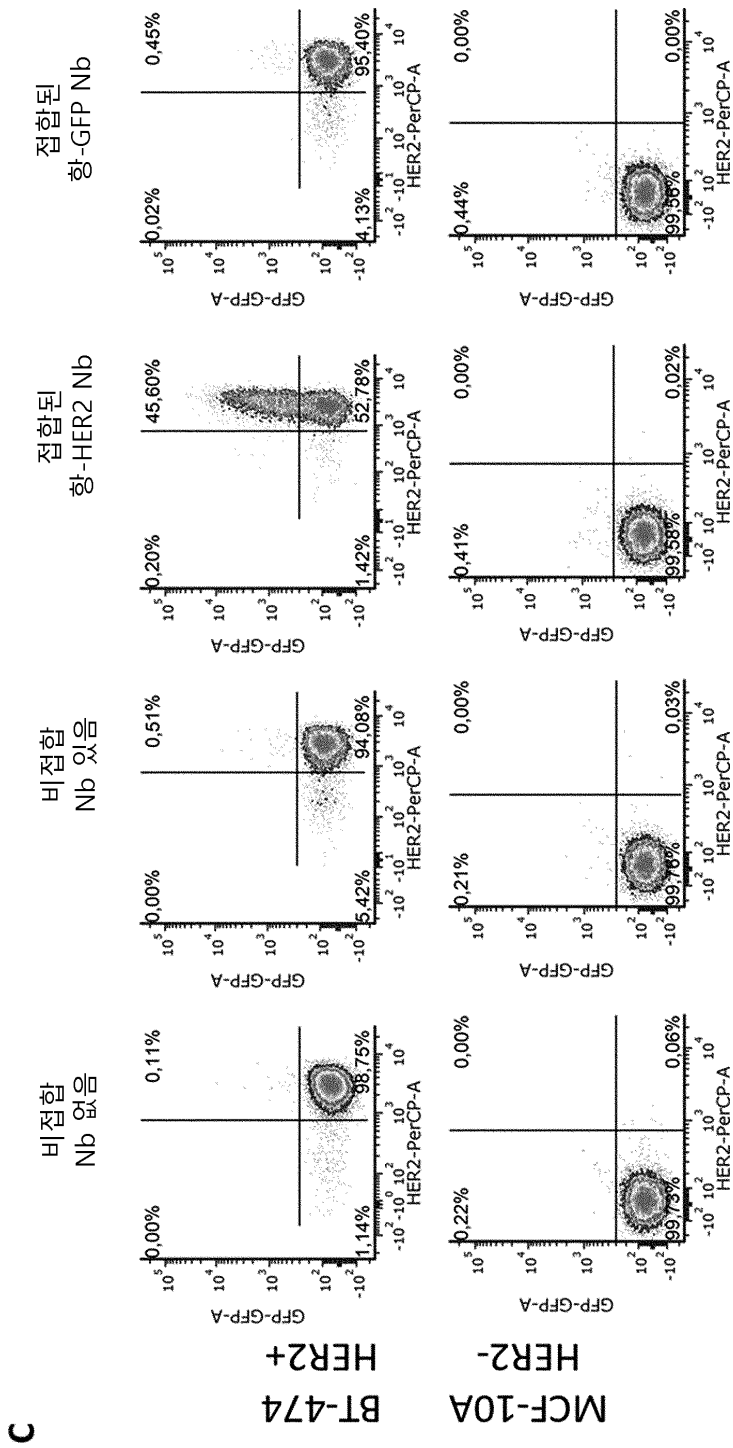
도면13a



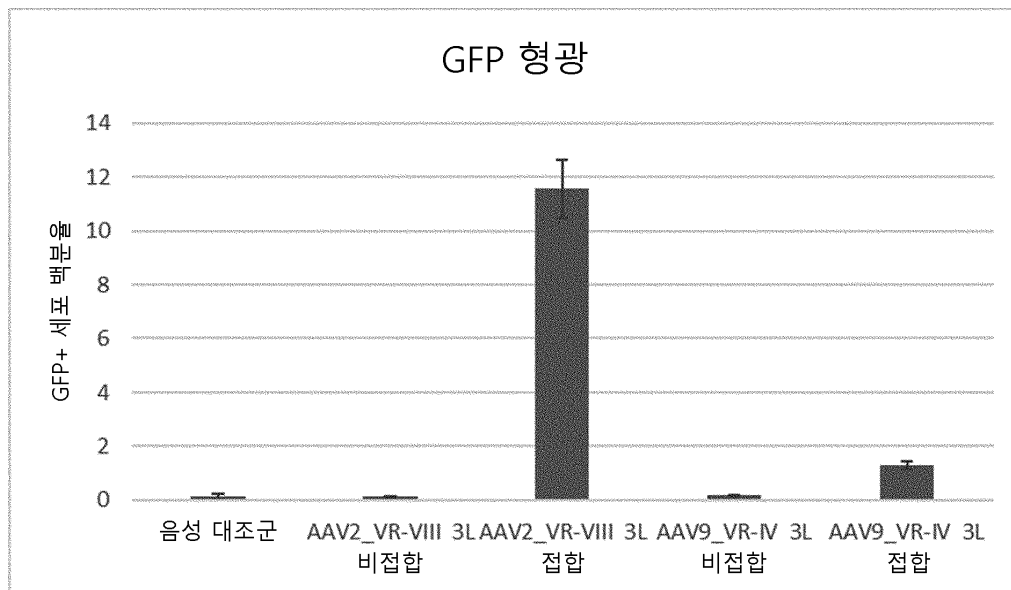
도면13b



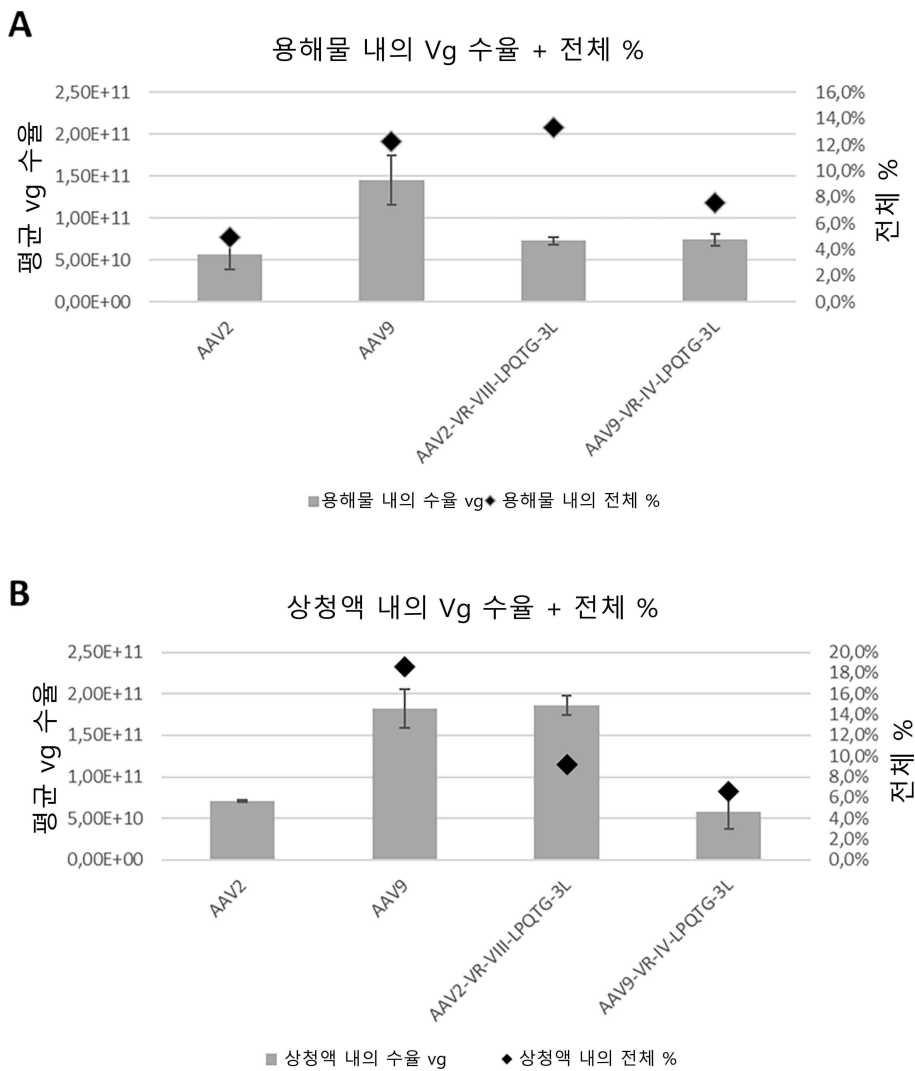
도면13c



도면14



도면15



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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