(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0067694
(43) 공개일자 2023년05월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 7/00 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
C12N 15/90 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 7/00 (2013.01)
A61K 48/0008 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-7013912(분할)
(22) 출원일자(국제) 2015년09월23일
심사청구일자 없음
(62) 원출원 특허 10-2017-7010962
원출원일자(국제) 2015년09월23일
심사청구일자 2020년09월18일
(85) 번역문제출일자 2023년04월24일
(86) 국제출원번호 PCT/US2015/051785
(87) 국제공개번호 WO 2016/049230
국제공개일자 2016년03월31일
(30) 우선권주장
62/054,899 2014년09월24일 미국(US)
(뒷면에 계속)

(71) 출원인
시티 오브 호프
미국 91010-3000 캘리포니아주 두아르테 이스트 두아르테 로드 1500
(72) 발명자
채터지, 사스와티
미국, 캘리포니아 91001, 앨터디나, 614 처치 캐니언 플레이스
스미스, 로라
미국, 캘리포니아 91101, 패서디나, 아파트 21, 405 엔. 매디슨 애비뉴
웡, 카메하메하
미국, 캘리포니아 91001, 앨터디나, 614 처치 캐니언 플레이스
(74) 대리인
특허법인한얼

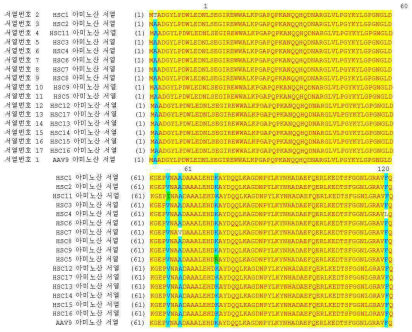
전체 청구항 수 : 총 146 항

(54) 발명의 명칭 **고효율 게놈 편집을 위한 아데노-관련 바이러스 벡터 변이체 및 이의 방법**

(57) 요 약

세포 게놈의 정확한 편집을 위한 아데노-관련 바이러스(AAV) 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체(AAV9에 대해) 및 이의 방법 및 키트가 제공된다. 본 명세서에 제공된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 표적화된 게놈 편집은 이전에 보고된 것보다 1,000 내지 100,000배 더 효율적인 것으로 나타난 빈도로 일어났다. 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계 및 추가로 대상체의 질환 또는 장애를 치료하기 위해 대상체 내로 상기 형질도입된 세포를 이식하는 단계를 통해 대상체의 세포 게놈을 편집함으로써 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 또한 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접적으로 투여함으로써 생체내 게놈 편집에 의해 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다.

대 표 도



(52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
C07K 14/005 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 2750/14121 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)
C12N 2750/14152 (2013.01)
C12N 2750/14171 (2013.01)

(30) 우선권주장
62/063,587 2014년10월14일 미국(US)
62/209,862 2015년08월25일 미국(US)

명 세 서

청구범위

청구항 1

캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(adeno-associated virus: AAV)로서,

상기 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드(AAV Clade F capsid)이고; 그리고

상기 수정 게놈은 (a) 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소, (b) 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 상기 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5', 및 (c) 상기 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스.

청구항 2

캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)로서,

상기 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드이고; 그리고

상기 수정 게놈은 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합을 위해 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 수정 게놈은 상기 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스.

청구항 3

캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)로서,

상기 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드이고;

상기 수정 게놈은 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소를 포함하며; 그리고

상기 AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%의 염색체 통합 효율을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 AAV는 상기 세포 내 포유류 염색체의 상기 표적 좌위 내로 상기 편집 구성요소를 통합하기 위해 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 적어도 약 1%의 염색체 통합 효율을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수정 게놈은 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열의 5' 역위 말단 반복(5' ITR) 뉴클레오타이드 서열 5', 및 상기 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3' 역위 말단 반복(3' ITR) 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 각각 AAV2 바이러스 5'ITR 및 AAV2 바이러스 3' ITR에 대해 실질적으로 동일한, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열과 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서로 실질적으로 거울상 이성질체인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 8

제5항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 36에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지고, 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 37에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 9

제4항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열과 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 각각 AAV5 바이러스 5'ITR 및 AAV5 바이러스 3' ITR에 대해 실질적으로 동일한, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열과 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서로 실질적으로 거울상 이성질체인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 11

제5항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 38에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지고, 상기 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 39에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 12

제1항 및 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수정 게놈은 상기 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 13

제1항 및 제3항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수정 게놈은 상기 편집 구성요소에 작동 가능하게 연결된 외인성 프로모터를 더 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 복제-결함 AAV 게놈은 AAV *rep* 유전자 및 AAV *cap* 유전자를 본질적으로 포함하지 않는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 각각의 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열과 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 뉴클레오타이드 길이가 약 500 내지 1000개 뉴클레오타이드 또는 약 600 내지 1000개의 뉴클레오타이드인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열과 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 길이를 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열과 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 비대칭적 뉴클레오타이드 길이를 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 상기 표적 좌위에 대한 상기 포유류 염색체의 상기 5' 영역에 대해 적어도 약 95% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 상기 표적 좌위에 대한 상기 포유류 염색체의 상기 3' 영역에 대해 적어도 약 95% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 상기 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 상기 5' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 가지고, 상기 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 상기 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 상기 3' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 표적 좌위는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진 뉴클레오타이드 서열이고, 상기 표적 좌위는 상기 포유류 염색체의 점 돌연변이를 나타내는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 23

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 적어도 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 24

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 1 내지 5500, 1 내지 5000, 1 내지 4500, 1 내지 4000, 1 내지 3000, 1 내지 2000, 1 내지 1000, 1 내지 500, 1 내지 200, 또는 1 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 5500, 2 내지 5000, 2 내지 4500, 2 내지 4000, 2 내지 3000, 2 내지 2000, 2 내지 1000, 2 내지 500, 2 내지 200, 또는 2 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3000, 10 내지 2000, 10 내지 1000, 10 내지 500, 10 내지 200, 또는 10 내지 100개의 뉴클레오타이드를 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 엑손, 인트론, 5' 비번역 영역(UTR), 3' UTR, 프로모터, 스플라이스 공여체, 스플라이스 수용체(acceptor), 서열 암호화 또는 비암호화 RNA, 절연체, 유전자, 또는 이들의 조합물을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 상기 표적 좌위 내의 유전자 또는 상기 표적 좌위에 걸쳐 있는 유전자의 암호 서열의 단편인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 27

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, n은 1 이상의 정수이고;

상기 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, m은 n과 동일한 정수이고; 그리고

상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위의 치환을 나타내는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, n은 1 이상의 정수이고;

상기 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, m은 n 초과의 정수이고; 그리고

상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위에 대해 치환적 첨가를 나타내는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, n은 2 이상의 정수이고;

상기 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, m은 n 미만의 정수이고; 그리고

상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 상기 표적 좌위에 대해 치환적 결실을 나타내는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 30

제1항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표적 좌위는 뉴클레오타이드 간의 결합이고;

상기 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, m은 1 이상의 정수이고; 그리고

상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위에 대한 첨가를 나타내는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 31

제1항 및 제3항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 편집 구성요소는 뉴클레오타이드 간의 결합인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 표적 좌위는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이고, 상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위에 대한 결실을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 염색체의 상기 표적 좌위는 대응하는 야생형 포유류 염색체에 대해 하나 이상의 돌연변이체 뉴클레오타이드를 포함하는 돌연변이체 표적 좌위인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 34

제33항에 있어서, 상기 돌연변이체 표적 좌위는 점 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실 또는 이들의 조합을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 35

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 돌연변이체 표적 좌위는 비형태적(amorphic) 돌연변이, 신형태적(neomorphic) 돌연변이, 또는 반정형(antimorphic) 돌연변이를 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 36

제33항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 돌연변이체 표적 좌위는 상염색체 우성 돌연변이, 상염색체 열성 돌연변이, 이형 접합적 돌연변이, 동형 접합적 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함하는, 복제-결함 아데노

관련 바이러스(AAV).

청구항 37

제33항 또는 제34항에 있어서, 상기 돌연변이체 표적 좌위는 상기 포유류 염색체 내에서 프로모터, 인핸서, 신호 서열, 인트론, 엑손, 스플라이스 공여체 부위, 스플라이스 수용체 부위, 내부 리보솜 유입 부위, 역위 엑손, 절연체, 유전자, 염색체 역위, 및 염색체 전좌로부터 선택되는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3로부터 선택된 적어도 하나의 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 39

제1항 내지 제38항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 2종의 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 40

제1항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 41

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 하기를 포함하는, AAV:

AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질;

AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는

AAV9 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질.

청구항 43

제1항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 44

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 45

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 하기를 포함하는, AAV:

AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질;

AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는

AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질.

청구항 46

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 47

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 18에 대해 각각 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 48

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 하기를 포함하는, AAV:

서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP2 단백질;

서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는

서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP2 및 VP3 단백질.

청구항 49

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 50

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 임의의 하나에 대해 각각 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 51

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 하기를 포함하는, AAV:

서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP2 단백질;

서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는

서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP2 및 VP3 단백질.

청구항 52

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 임의의 하나에 대해 각각 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 53

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAV9 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 각각 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 54

제1항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 하기를 포함하는, AAV:

서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1 및 VP2 캡시드 단백질;

서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1 및 VP3 캡시드 단백질; 또는

서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP2 및 VP3 캡시드 단백질.

청구항 55

제1항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 56

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1 캡시드 단백질로부터 선택된 VP1 캡시드 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 57

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1 및 VP2 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP1 및 VP2 캡시드 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 58

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및

아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 59

제1항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 각각 포함하는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 60

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 염색체는 인간 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X 및 Y로부터 선택된, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 61

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 염색체는 마우스 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X 및 Y로부터 선택된, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 62

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 염색체는 인간 염색체 19가 아닌, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 63

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 염색체는 체세포 염색체인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 체세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 65

제63항에 있어서, 상기 체세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 66

제63항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 체세포는 CD34+ 세포인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 67

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 68

제67항에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 태아 간 줄기 세포, 또는 말초혈액 줄기 세포인, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 69

제60항 내지 제62항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 세포는 CD34+ 조혈줄기 세포주(HSC), K562 CD34+ 백혈병 세포주, HepG2 인간 간 세포주, 말초혈액 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, CD34+ 말초혈액 줄기 세포, WI-38 인간

이배체 섬유아세포 세포주, MCF7 인간 유방암 세포주, Y79 인간 망막아세포종 세포주, SCID-X1 LBL 인간 EBV-불멸 B 세포주, 1차 인간 간세포, 1차 간내 혈관내피 세포, 및 1차 골격근 근원세포로 이루어진 군으로부터 선택된, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 70

제1항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 5%의 염색체 통합 효율을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 71

제1항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 10%의 염색체 통합 효율을 갖는, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV).

청구항 72

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV)를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 제형 중에 있는, 아데노 관련 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 73

제72항에 있어서, 상기 제형은 포유류에 대한 투여를 위해 구성된, 아데노 관련 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 74

제73항에 있어서, 상기 제형은 정맥내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 자가세포 전달 또는 동종이계 세포 전달을 통해 포유류에 대한 투여를 위해 구성된, 아데노 관련 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 75

제72항에 있어서, 상기 약제학적으로 허용 가능한 제형은 부형제를 포함하는, 아데노 관련 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 76

제75항에 있어서, 상기 부형제는 담체, 보조제 및 비히클 또는 이들의 조합물로부터 선택되는, 아데노 관련 바이러스를 포함하는 조성물.

청구항 77

아데노 관련 바이러스(AAV)의 재조합체 제조를 위한 패키징 시스템으로서,

하나 이상의 AAV Rep 단백질을 암호화하는 Rep 뉴클레오타이드 서열;

AAV 클레이드 F 캡시드의 하나 이상의 AAV Cap 단백질을 암호화하는 Cap 뉴클레오타이드 서열; 및

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항에 나타내는 바와 같은 수정 게놈을 포함하되,

상기 패키징 시스템은 상기 아데노 관련 바이러스를 형성하도록 상기 캡시드에서 상기 수정 게놈을 동봉하기 위해 세포에서 작동하는, 패키징 시스템.

청구항 78

제77항에 있어서, 상기 패키징 시스템은 상기 Rep 뉴클레오타이드 서열 및 상기 Cap 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 상기 수정 게놈을 포함하는 제2 벡터를 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 79

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 1종의 단백질을 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 80

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 2종의 단백질을 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 81

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 82

제77항 또는 제78항에 있어서, 상기 AAV 클레이드 F 캡시드는 제38항 내지 제59항 중 어느 한 항에 나타내는 바와 같은 AAV 클레이드 F 캡시드인, 패키징 시스템.

청구항 83

제77항 또는 제82항에 있어서, 상기 Rep 뉴클레오타이드 서열은 AAV2 Rep 단백질을 암호화하는, 패키징 시스템.

청구항 84

제83항에 있어서, 암호화된 상기 AAV2 Rep 단백질은 Rep 78/68 또는 Rep 68/52 중 적어도 하나인, 패키징 시스템.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, 상기 AAV2 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 40의 상기 AAV2 Rep 뉴클레오타이드 서열에 대해 최소 서열 동일성 백분율을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 최소 서열 동일성 백분율은 상기 AAV2 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 길이에 걸쳐 적어도 70%인, 패키징 시스템.

청구항 86

제77항 내지 제85항 중 어느 한 항에 있어서, 제3 벡터를 더 포함하되, 상기 제3 벡터는 헬퍼 바이러스 벡터인, 패키징 시스템.

청구항 87

제86항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스 벡터는 독립적 제3 벡터인, 패키징 시스템.

청구항 88

제86항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스 벡터는 상기 제1 벡터와 함께 일체화되는, 패키징 시스템.

청구항 89

제86항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스 벡터는 상기 제2 벡터와 함께 일체화되는, 패키징 시스템.

청구항 90

제86항 내지 제89항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제3 벡터는 헬퍼 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스(단순 헤르페스 바이러스(HSV)를 포함), 백시니아 바이러스 및 거대세포 바이러스(CMV)로 이루어진 군으로부터 선택된, 패키징 시스템.

청구항 92

제91항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스인, 패키징 시스템.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 아데노바이러스 게놈은 E1, E2, E4 및 VA로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 아데노바이러스 RNA 유전자를 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 94

제91항에 있어서, 상기 헬퍼 바이러스는 HSV인, 패키징 시스템.

청구항 95

제94항에 있어서, 상기 HSV 게놈은 UL5/8/52, ICP0, ICP4, ICP22 및 UL30/UL42로 이루어진 군으로부터 선택된 HSV 유전자 중 하나 이상을 포함하는, 패키징 시스템.

청구항 96

제86항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 벡터 및 상기 제3 벡터는 제1 형질감염 플라스미드 내에 포함되는, 패키징 시스템.

청구항 97

제86항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 벡터 및 상기 제3 벡터의 상기 뉴클레오타이드는 제2 형질감염 플라스미드 내에 포함되는, 패키징 시스템.

청구항 98

제86항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제1 벡터 및 상기 제3 벡터는 재조합 헬퍼 바이러스 내로 클로닝된, 패키징 시스템.

청구항 99

제86항 내지 제95항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 제2 벡터 및 상기 제3 벡터의 상기 뉴클레오타이드는 재조합 헬퍼 바이러스 내로 클로닝된, 패키징 시스템.

청구항 100

제77항 내지 제99항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는 AAV9, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, AAVHU31 및 AAVHU32로 이루어진 클레이드 F AAV의 캡시드인, 패키징 시스템.

청구항 101

AAV 캡시드 내 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 포함하는 유전자 편집 벡터로서, 상기 수정 게놈은

포유류 세포 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소;

상기 표적 좌위에 대해 상기 염색체의 5' 영역에 대한 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5';

상기 표적 좌위에 대해 상기 염색체의 3' 영역에 대한 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함하되,

외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 상기 포유류 세포 염색체의 상기 표적 좌위 내로 상기 편집 구성요소를 통합하기 위해 상기 AAV는 적어도 10%의 염색체 통합 효율을 갖는, 유전자 편집 벡터.

청구항 102

제101항에 있어서, 상기 수정 게놈은 제5항 내지 제71항 중 어느 한 항에 나타낸 바와 같은, 유전자 편집 벡터.

청구항 103

아데노 관련 바이러스(AAV)의 재조합체 제조 방법으로서, 상기 AAV를 형성하기 위해 상기 캡시드 내 상기 수정 게놈을 동봉하기 위한 작업성 조건 하에서 제77항 내지 제97항 중 어느 한 항의 패키징 시스템을 이용하여 세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는, 아데노 관련 바이러스의 재조합체 제조 방법.

청구항 104

아데노 관련 바이러스(AAV)의 재조합체 제조 방법으로서, 상기 AAV를 형성하기 위해 상기 캡시드 내 상기 수정 게놈을 동봉하기 위한 작업성 조건 하에서 제77항 내지 제96항, 제98항 또는 제99항 중 어느 한 항의 패키징 시스템을 이용하여 세포를 형질도입하는 단계를 포함하는, 아데노 관련 바이러스의 재조합체 제조 방법.

청구항 105

포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법으로서, 제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 상기 포유류 게놈을 포함하는 세포를 형질도입하는 단계를 포함하는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 106

제105항에 있어서, 상기 세포는 포유류 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 107

제106항에 있어서, 상기 포유류 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 108

제106항 또는 제107항에 있어서, 상기 포유류 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 109

제106항 또는 제107항에 있어서, 상기 포유류 세포는 줄기 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 110

제109항에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 111

제106항에 있어서, 상기 포유류 세포는 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구, 또는 망막 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 112

포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법으로서,

(a) 포유류로부터의 포유류 세포를 얻는 단계;

(b) 생체밖에서 포유류 세포를 배양하여 생체 밖 배양물을 형성하는 단계;

(c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 생체 밖 배양물에서 제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 상기 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및

(d) 상기 형질도입된 포유류 세포를 상기 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 113

포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법으로서,

(a) 제1 포유류로부터 포유류 세포를 얻는 단계;

(b) 생체밖에서 포유류 세포를 배양하여 생체 밖 배양물을 형성하는 단계;

(c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 생체 밖 배양물에서 제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 상기 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및

(d) 상기 형질도입된 포유류 세포를 제2 포유류에 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 114

제113항에 있어서, 상기 제1 포유류와 상기 제2 포유류는 동일한 종인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 115

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 포유류 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 116

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 포유류 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 117

제113항 또는 제114항에 있어서, 상기 포유류 세포는 줄기 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 118

제117항에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 119

제113항 내지 제118항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 세포는 CD34+ 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 120

제113항 내지 제119항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 포유류 세포는 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구 또는 망막 세포인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 121

포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법으로서,

생체내 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 상기 포유류의 세포를 형질도입하는데 유효한 양으로 포유류에게 제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV) 또는 제72항 내지 제76항 중 어느 한 항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 122

제105항 내지 제121항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 외인성 뉴클레아제 또는 외인성 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 공동형질도입하거나 또는 공동투여하는 일 없이 형질도입되거나 또는 투여되는,

포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 123

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 상기 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%의 염색체 통합 효율을 갖는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 124

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV의 상기 염색체 통합 효율은 상기 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 상기 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 2%, 3%, 4% 또는 5%인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 125

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수정 게놈의 상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 상기 표적 좌위 내로 통합되며, 염색체 통합 효율이 상기 포유류 세포의 적어도 10%, 20%, 40% 또는 50%인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 126

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 수정 게놈의 상기 편집 구성요소는 상기 포유류 염색체의 상기 표적 좌위 내로 통합되며, 염색체 통합 효율이 상기 포유류 세포의 10% 내지 70%, 20% 내지 70%, 40% 내지 70% 또는 50% 내지 70% 범위인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 127

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 상기 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 10%의 세포 집단 내 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 갖는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 128

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 상기 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 50%의 세포 집단 내 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 갖는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 129

제105항 내지 제122항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 상기 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 상기 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 75%의 세포 집단 내 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 갖는, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 130

제127항 내지 제129항 중 어느 한 항에 있어서, 세포 집단 내 상기 대립유전자 빈도는 시험관내 세포 집단 내 대립유전자 빈도인, 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법.

청구항 131

유전자 이식 비인간 동물(transgenic non-human animal)의 생성 방법으로서,

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 아데노 관련 바이러스(AAV) 또는 제72항 내지 제76항 중 어느 한 항의 조성물을 비인간 동물에게 투여하는 단계; 또는

제1항 내지 제71항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제72항 내지 제76항 중 어느 한 항의 조성물을 이용하여 비인간 동물 세포를 형질도입하는 단계 및 숙주 비인간 동물로부터 유전자 이식 비인간 동물을 생성하기에 충분한 조건 하에서 상기 세포를 숙주 비인간 동물 내로 이식하는 단계를 포함하는, 유전자 이식 비인간 동물의 생성 방법.

청구항 132

제131항에 있어서, 상기 비인간 동물 세포는 비인간 동물의 접합체 또는 배아로부터 유래된, 유전자 이식 비인간 동물의 생성 방법.

청구항 133

제131항 또는 제132항에 있어서, 상기 비인간 동물은 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 페럿, 또는 영장류인, 유전자 이식 비인간 동물의 생성 방법.

청구항 134

제131항 내지 제133항 중 어느 한 항의 방법에 의해 얻을 수 있는 유전자 이식 비인간 동물.

청구항 135

제134항의 유전자 이식 비인간 동물로부터 유래된 조직.

청구항 136

제135항에 있어서, 상기 조직은 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된, 조직.

청구항 137

제135항에 있어서, 상기 조직은 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된, 조직.

청구항 138

제134항의 유전자 이식 비인간 동물로부터 유래된 세포.

청구항 139

제138항에 있어서, 상기 세포는 1차 세포인, 세포.

청구항 140

제138항에 있어서, 상기 세포는 CD34+ 세포, 간세포, 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구 또는 망막 세포인, 세포.

청구항 141

제138항에 있어서, 상기 세포는 유도성 다능성 줄기(inducible pluripotent stem; iPS) 세포인, 세포.

청구항 142

제138항에 있어서, 상기 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직인, 세포.

청구항 143

제138항에 있어서, 상기 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된, 세포.

청구항 144

제138항에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 세포.

청구항 145

제144항에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포인, 세포.

청구항 146

제105항 내지 제111항 중 어느 한 항의 방법에 의해 얻을 수 있는 세포.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 상호참조**

[0002] 본 출원은 2015년 8월 25일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/209,862호, 2014년 10월 14일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/063,587호, 및 2014년 9월 24일자로 출원된 미국 가출원 특허 제62/054,899호의 우선일의 유익을 주장한다. 각각의 이들 언급된 출원의 내용은 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0003] **정부 관심의 언급**

[0004] 본 발명은 미국국립보건원에 의해 부여된 등록번호 HL087285 하의 정부 지원 하에 이루어졌다. 정부는 본 발명에 특정 권리를 가진다.

배 경 기 술

[0005] 아데노 관련 바이러스(adeno-associated virus: AAV) 게놈은 약 4.9 킬로염기 길이의 양성- 또는 음성-센싱된 단일-가닥 데옥시리보핵산(single-stranded deoxyribonucleic acid: ssDNA)의 구성물이다. 게놈은 DNA 가닥의 양 말단에서 역위 말단 반복(inverted terminal repeat: ITR), 즉, 2개의 오픈 리딩 프레임(open reading frame: ORF)(rep 및 cap)을 포함한다. Rep는 AAV 생활사에 필요한 rep 단백질을 암호화하는 4개의 중첩 유전자를 포함하고, cap은 정20면체 대칭의 캡시드를 형성하기 위해 함께 상호작용하는 캡시드 단백질: VP1, VP2 및 VP3의 중첩 뉴클레오타이드 서열을 함유한다.

[0006] 복제 결함 인간 파보바이러스 AAV2로부터 유래된 재조합 아데노 관련 바이러스(rAAV) 벡터는 아직 병원성 또는 종양원성으로 확실하게 동정되지 않은 안전하고 효과적인 유전자 전달 비히클이 되는 것으로 증명되고 있다[3-4, 6, 18-19, 26, 31]. rAAV는 비분화 1차 세포를 형질도입하고, 면역원성이 낮으며, 생체내에서 지속적 이식유전자(transgene) 발현을 지시한다[6, 10, 20]. 야생형 AAV에 의한 감염은 종양원성 형질전환의 저해와 관련되며, AAV 역위 말단 반복은 실제로 종양보호를 부여할 수 있다[2, 28, 52-55]. 인간 조직 패널의 최근의 연구는 골수 및 간이 인간에서 천연 유래 AAV 단리물의 2개의 가장 통상적인 부위였다는 것을 발견하였는데, 이는 AAV에 의한 골수 세포의 감염이 드물지 않다는 것을 시사한다.

[0007] 유전자 요법의 바이러스 벡터의 사용은 오랫동안 고려되었다. 오래가는 수정 및 생체밖 조작의 용이함을 위한 그의 잠재력에 기인하여, 조혈계는 유전자 요법의 가장 이른 표적 중 하나이다. 그러나, 상당한 노력에도 불구하고, 실제 치료적 성공은 알기 어렵게 남아있다[5]. 이는 휴지, 비분화성 조혈 줄기 세포(조혈 줄기 세포: HSC)를 효율적으로 형질도입하기 위한 대부분의 바이러스 벡터의 인식된 불능[23]뿐만 아니라 삽입 종양형성으로부터 생기는 안전성 문제[15, 22]에 기인한다. 그러나, 안정한 유전자 전달은 rAAV에 의해 뮤린과 인간 HSC 둘 다에 대해 성공적으로 입증되었다[8, 11-12, 24, 27, 29-30, 37].

[0008] 신경계 병태, 특히 혈액-뇌 장벽을 가로지르는 것의 어려움, 용질의 통과를 제한하는 내피 세포 사이의 밀착 연접에 의해 생성된 뇌 세포 외액으로부터의 순환 혈액의 세포 및 대사 분리에 기인하는 중추 신경계 질환 또는 장애를 치료하기 위해 유전자 요법에서 바이러스 벡터를 효과적으로 사용하는 것이 추가적으로 어려웠다.

[0009] CD34는 세포 표면 당단백질 및 세포-세포 부착 인자이다. CD34 단백질은 초기 조혈 및 혈관 조직에서 발현되고, 세포 발현 CD34는 $CD34^+$로 표기된다. 인간 $CD34^+$ HSC에서 rAAV의 염색체 통합[8, 12, 16, 29] 및 1차 및 2차의 다수-계통 생착을 지원할 수 있는 원시, 다능성, 자기-재생 인간 HSC의 효율적인 형질도입이 면역 결핍 NOD-SCID 마우스에서 입증되었다[29]. 일련의 생착을 지원할 수 있는 원시 HSC의 형질도입은 G0에 존재하는 원시, 휴지 CD34+CD38- 세포를 효율적으로 형질도입하기 위한 rAAV의 성향에 기인할 수 있는 것으로 나타났다[24]. 시험관내 인간 HSC 내로 그리고 생체내 뮤린 및 비인간 영장류 HSC에서 성공적인 rAAV-매개 유전자 전달의 몇몇 보고에도 불구하고, HSC 형질도입을 위한 rAAV의 효용에 관한 논란은 여전히 지속된다. 이들 차이는 발현 프로파일에 의해 형질도입을 평가한 단기간 시험관내 연구로부터 주로 생기며, 바이러스 비코팅[35], 세포내 수송[33], 핵 수송 및 제2 가닥 합성[36]을 포함하는 rAAV2로부터의 이식유전자 발현에 대한 동정된 제한에 기인한

다.

[0010] AAV2는 AAV-기반 벡터에 대해 가장 잘 연구된 원형 바이러스로 남아있지만[1, 13, 18, 21], 매우 다수의 새로운 AAV 혈청형의 동정은 잠재적 유전자 전달 벡터의 레퍼토리를 상당히 향상시킨다[14]. AAV1, 3 및 4는 아데노바이러스 저장액의 오염 물질로서 단리되었고, AAV5는 인간 콘딜로마 사마귀로부터 단리되었다. AAV6은 AAV1과 AAV2 사이의 실험실 재조합체로서 생겼다. 최근에, 인간 및 비인간 영장류 조직에서 천연 유래 AAV의 100개 초과의 별도의 단리물이 동정되었다. 이는 신규한 외피를 지니는 AAV2의 외피 단백질을 대신해서 위형(pseudotyping)에 대해 이들 단리물의 일부로부터 유래된 캡시드의 사용을 야기하고, 이에 의해 rAAV2 게놈은 그 다음에 AAV2 rep 및 신규한 캡시드 유전자를 이용하여 패키징된다. 바이러스 껍질의 부분으로서의 단백질인 신규한 캡시드의 사용은 AAV2와 관련된 이식유전자 발현에서 다수의 제한의 우회를 초래한다[32, 35-36].

[0011] 이들 제한을 피하기 위한 노력에서, 최근의 연구는 신규한 캡시드 서열이 감소된 프로테아좀-매개 캡시드 분해, 증가된 핵 수송 및 보유를 초래한다는 것을 나타내었다. 신규한 캡시드(이 중 다수는 신규한 수용기(receptor)를 이용함)는 앞의 다루기 힘든 조직의 효율적인 형질도입을 허용하는 rAAV의 향성을 넓히며, 최근의 시험에서 주된 임상적 제한을 제기한 AAV2에 대해 매우 일반적인 이미 존재하는 혈청학적 면역을 피하는 수단을 제공한다. 특히, 일부 신규한 캡시드는 rAAV의 세포내 가공을 변경시키는 것으로 나타난다. 예를 들어, 비코팅 및 이식유전자 발현은 천연 AAV2 캡시드에 비해 AAV8와 관련하여 가속화된다. 최근에, 이식유전자 발현은, 역위 말단 반복(ITR)의 혈청형 유래에도 불구하고 캡시드 단백질에 기반하는 것으로 나타났다.

[0012] 천연 유래 AAV는 사이토카인-프라이밍된 말초 혈액 줄기 세포에서 동정 가능하다. 이들 AAV의 캡시드 서열은 독특하다. 이들 캡시드는 재조합 AAV2 게놈을 위형화될 수 있다. 미국 특허 공개 제20130096182A1호는 캡시드 AAVF1-17, 및 세포 형질도입 및 유전자 전달을 위한 이들의 용도를 기재한다. 치료적 목적을 위한 영구적이고 가역적인 유전자 전달 및 발현에 관한 유전자 요법 영역의 임의의 개선은 당업계에서의 상당한 개선일 것이다. 게다가, 줄기 세포에 대한 안전하고 효율적인 유전자 전달은 수십년의 연구에도 불구하고 해당 분야에서 상당한 도전으로 남아있다. 따라서, 줄기 세포를 안전하게 유전자 변형시키는 능력은 상당한 진보를 상당한 진보를 나타낼 것이다.

[0013] 추가로, 게놈에서 발자국을 남기지 않는 게놈 내 특정 부위에서 유전자 표적화 또는 수정에 의한 게놈 편집은 유전 질환 및 후천성 질환의 정확한 수정에 대해 매력적이다. 현재의 기술은 외인성 엔도뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제, TAL 엔도뉴클레아제 또는 카스파제 9/CRISPR 시스템의 사용을 통해 이를 달성한다. 그러나, 이들 "전통적인" 접근은 엔도튜클레아제 절단의 독성 및 표적을 벗어난 효과와 관련된다. 따라서, 외인성 엔도뉴클레아제 절단에 대한 필요 없이 높은 빈도로 줄기 세포를 안전하고 효율적으로 유전자 변형시키는 능력은 상당한 진보를 나타낼 것이다.

[0014] 추가적으로, 인간 HSC의 유전자 형질도입의 현재의 방법은 정제된 공여체 줄기 세포의 생체밖 형질도입 다음에 보통 "조건화된" 수용자 내로의 이식을 수반한다. 세포 채취 절차는 침습성이며, 골수 채취 또는 여러 날의 공여체의 과립구 집락 자극 인자(G-CSF) 프라이밍 다음에 분리반출법을 수반한다. 생체밖 형질도입 절차는 줄기 세포의 조혈 가능성에 영향을 미칠 수 있다. 추가적으로, 시험관 내 형질도입된 세포는 이식 전에 불임증, 독성 등에 대해 시험되어야 한다. 수용자에게 이식하기 전에, 줄기 세포는 종종 생착을 보장하기 위해 화학요법 또는 방사선에 의한 조건화를 받아야 한다. 상기 과정은 보통 적어도 며칠 동안 그리고 때때로 더 길게 환자의 입원이 필요하다. 전반적으로, 이는 줄기 세포 유전자 요법의 효용을 크게 제한하는 몹시 힘들고, 비용이 들며 고위험의 절차이다. 정제 및 생체밖 형질도입에 대한 필요 없이 현재의 줄기 세포 형질도입 방법에 대한 더 양호한 대안을 제공하는 절차가 필요하다.

발명의 내용

[0015] 본 명세서에서 상동성 재조합을 통한 세포의 게놈을 편집하기 위한 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터(예를 들어, 클레이드(Clade) F 벡터, 예컨대 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV), 상기 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드임) 및 이의 사용 방법 및 키트가 제공된다.

[0016] 일부 양상에서, 본 개시내용은 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 제공하며, 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드이고; 수정 게놈은 (a) 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소, (b) 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5', 및 (c) 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는, 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타

이드 서열 3'을 포함한다. 일부 양상에서, 또한 본 개시내용은 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 제공하며, 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드이고; 수정 게놈은 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위해 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 수정 게놈은 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는다. 추가 양상에서, 본 개시내용은 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 제공하되, 캡시드는 AAV 클레이드 F 캡시드이고; 수정 게놈은 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소를 포함하고; AAV는 세포 내 포유류 염색제의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%의 염색체 통합 효율을 가진다. 본 개시내용의 다른 양상은 AAV 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 포함하는 유전자 편집 벡터에 관한 것이며, 상기 수정 게놈은 포유류 세포 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소; 표적 좌위에 대해 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5'; 표적 좌위에 대해 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'를 포함하되; 상기 AAV는 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 포유류 세포 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 10%의 염색체 통합 효율을 가진다.

[0017] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 적어도 약 1%의 염색체 통합 효율을 가진다.

[0018] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 수정 게놈은 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열의 5' 역위 말단 반복(5' ITR) 뉴클레오타이드 서열 5', 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열의 3' 역위 말단 반복(3' ITR) 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 AAV2 바이러스 5'ITR 및 AAV2 바이러스 3' ITR에 대해 각각 실질적으로 동일하다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열과 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서로 실질적으로 거울상 이성질체이다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 36에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지고, 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 37에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 AAV5 바이러스 5'ITR 및 AAV5 바이러스 3' ITR에 대해 각각 실질적으로 동일하다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서로 실질적으로 거울상 이성질체이다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 38에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가지고, 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 39에 대해 적어도 95% 서열 동일성을 가진다.

[0019] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 수정 게놈은 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 수정 게놈은 추가로 편집 구성요소에 작동 가능하게 연결된 외인성 프로모터를 포함한다.

[0020] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 복제-결함 AAV 게놈은 AAV *rep* 유전자 및 AAV *cap* 유전자가 본질적으로 존재하지 않는다.

[0021] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 각각의 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 약 500 내지 1000개의 뉴클레오타이드 또는 약 600 내지 1000개의 뉴클레오타이드의 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 일부 실시형태에서, 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 일부 실시형태에서, 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 비대칭적 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 일부 실시형태에서, 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 적어도 약 95% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 적어도 약 95% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 가지고, 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 가진다.

[0022] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진 뉴클레오타이드 서열이고, 표적 좌위는 포유류 염색체의 점 돌연변이를 나타낸다.

[0023] 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 인트론을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 엑손을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 비-암호 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 조절 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 상태와 관련된 좌위일 수 잇다.

[0024] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 적어도 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 1 내지 5500, 1 내지 5000, 1 내지 4500, 1 내지 4000, 1 내지 3000, 1 내지 2000, 1 내지 1000, 1 내지 500, 1 내지 200, 또는 1 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 5500, 2 내지 5000, 2 내지 4500, 2 내지 4000, 2 내지 3000, 2 내지 2000, 2 내지 1000, 2 내지 500, 2 내지 200, 또는 2 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3000, 10 내지 2000, 10 내지 1000, 10 내지 500, 10 내지 200 또는 10 내지 100개의 뉴클레오타이드를 포함한다.

[0025] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 엑손, 인트론, 5' 비번역 영역(UTR), 3' UTR, 프로모터, 스플라이스 공여체, 스플라이스 수용체(acceptor), 서열 암호화 또는 비암호화 RNA, 절연체, 유전자 또는 이들의 조합물을 포함한다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 표적 좌위 내의 또는 표적 좌위에 걸친 유전자의 암호 서열의 단편이다.

[0026] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 여기서 n은 1 이상의 정수이고; 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n과 동일한 정수이고; 편집 구성요소는 포유류 염색체의 표적 좌위의 치환을 나타낸다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 여기서, n은 1 이상의 정수이고; 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n 초과의 정수이고; 편집 구성요소는 포유류 염색체의 표적 좌위에 대한 치환적 첨가를 나타낸다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, n은 2 이상의 정수이고; 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n 미만의 정수이고; 편집 구성요소는 포유류 염색체의 표적 좌위의 치환적 결실을 나타낸다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 뉴클레오타이드 간의 결합이고; 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, m은 1개 이상의 정수이고; 편집 구성요소는 포유류 염색체의 표적 좌위의 첨가를 나타낸다.

[0027] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 편집 구성요소는 뉴클레오타이드 간의 결합이다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 편집 구성요소는 포유류 염색체의 표적 좌위에 대한 결실을 포함한다.

[0028] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 염색체의 표적 좌위는 대응하는 야생형 포유류 염색체에 대해 하나 이상의 돌연변이체 뉴클레오타이드를 포함하는 돌연변이체 표적 좌위이다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 점 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 비형태적(amorphic) 돌연변이, 신형태적(neomorphic) 돌연변이 또는 반정형(antimorphic) 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 상염색체 우성 돌연변이, 상염색체 열성 돌연변이, 이형 접합적 돌연변이, 동형 접합적 돌연변이 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 프로모터, 인핸서, 신호 서열, 인트론, 엑손, 스플라이스 공여체 부위, 스플라이스 수용체 부위, 내부 리보솜 유입 부위, 역위 엑손, 절연체, 유전자, 염색체 역위, 및 포유류 염색체 내의 염색체 전좌로부터 선택된다.

[0029] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 1종의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 2종의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90%의 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의

아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질; AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는 AAV9 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질; AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 90% 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 각각 암호화된 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 각각 암호화된 VP1 및 VP2 단백질; 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 각각 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 각각 암호화된 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 각각 암호화된 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP2 단백질; 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 90% 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1 및 VP2 캡시드 단백질; 서열번호 1에 제시된 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1 및 VP3 캡시드 단백질; 또는 서열번호 1에 제시된 아미노산 138 내지

736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1 캡시드 단백질로부터 선택된 VP1 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의으 하나의 VP1 및 VP2 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP1 및 VP2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736 에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 각각의 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.

[0030] 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 클레이드 F 캡시드는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16 및 AAVF17은 또한 각각 AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16 및 AAVHSC17로서 지칭된다. 다시 말해서, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16 또는 AAVF17의 임의의 설명은 각각 동등하며, AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16 또는 AAVHSC17로 대체될 수 있다.

[0031] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 인간 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X 및 Y로부터 선택된다. 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 마우스 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X 및 Y로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 인간 염색체 19가 아니다.

[0032] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 체세포 염색체이다. 일부 실시형태에서, 체세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 체세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 체세포는 CD34+ 세포이다.

[0033] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 태아 간 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 CD34+ 조혈줄기 세포주(HSC), K562 CD34+ 백혈병 세포주, HepG2 인간 간 세포주, 말초혈액 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, CD34+ 말초혈액 줄기 세포, WI-38 인간 이배체 섬유아세포 세포주, MCF7 인간 유방암 세포주, Y79 인간 망막아세포종 세포주, SCID-X1 LBL 인간 EBV-불멸 B 세포주, 1차 인간 간세포, 1차 간내 혈관내피 세포, 및 1차 골격근 근원세포로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0034] 본 명세서에 제공된 AAV 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 5%의 염색체 통합 효율을 가진다. 일부 실시형태에서, AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 10%의 염색체 통합 효율을 가진다.

[0035] 본 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV를 포함하는 조성물에 관한 것이되, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 제형이다. 일부 실시형태에서, 제형은 포유류에 대한 투여용으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 제형은 정맥내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 자가세포 전달, 또는 동종이계 세포 전달을 통해 포유

류에 대한 투여용으로 구성된다. 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 제형은 부형제를 포함한다. 일부 실시형태에서, 부형제는 담체, 보조제 및 비히클 또는 이들의 조합물로부터 선택된다.

[0036] 개시내용의 또 다른 양상은 아데노 관련 바이러스(AAV)의 재조합체 제조를 위한 패키징 시스템에 관한 것이되, 패키징 시스템은 하나 이상의 AAV Rep 단백질을 암호화하는 Rep 뉴클레오타이드 서열; AAV 클레이드 F 캡시드의 하나 이상의 AAV Cap 단백질을 암호화하는 Cap 뉴클레오타이드 서열; 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈을 포함하되; 패키징 시스템은 아데노 관련 바이러스를 형성하기 위해 캡시드 내 수정 게놈을 동봉하기 위한 세포에서 작동한다. 일부 실시형태에서, 패키징 시스템은 Rep 뉴클레오타이드 서열 및 Cap 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 수정 게놈을 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 하나의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 2개의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 본 명세서에 기재된 바와 같은 임의의 AAV 클레이드 F 캡시드이다. 일부 실시형태에서, Rep 뉴클레오타이드 서열은 AAV2 Rep 단백질을 암호화한다. 일부 실시형태에서, 암호화된 AAV2 Rep 단백질은 Rep 78/68 또는 Rep 68/52 중 적어도 하나이다. 일부 실시형태에서, AAV2 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 40의 AAV2 Rep 뉴클레오타이드 서열에 대해 최소 서열 동일성 백분율을 갖는 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 최소 서열 동일성 백분율은 AAV2 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열의 길이에 걸쳐 적어도 70%이다. 제공된 패키징 시스템 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 패키징 시스템은 제3 벡터를 추가로 포함하되, 제3 벡터는 헬퍼 바이러스 벡터이다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스 벡터는 독립적 제3 벡터이다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스 벡터는 제1 벡터와 함께 일체화된다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스 벡터는 제2 벡터와 함께 일체화된다. 일부 실시형태에서, 제3 벡터는 헬퍼 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스(단순 헤르페스 바이러스(HSV)를 포함), 백시니아 바이러스 및 거대세포 바이러스(CMV)로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스이다. 일부 실시형태에서, 아데노바이러스 게놈은 E1, E2, E4 및 VA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아데노바이러스 RNA 유전자를 포함한다. 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스는 HSV이다. 일부 실시형태에서, HSV 게놈은 UL5/8/52, ICP0, ICP4, ICP22 및 UL30/UL42로 이루어진 군으로부터 선택된 HSV 유전자 중 하나 이상을 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제3 벡터는 제1 형질감염 플라스미드 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제2 벡터 및 제3 벡터의 뉴클레오타이드는 제2 형질감염 플라스미드 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제3 벡터의 뉴클레오타이드는 재조합 헬퍼 바이러스 내로 클로닝된다. 일부 실시형태에서, 제2 벡터 및 제3 벡터의 뉴클레오타이드는 재조합 헬퍼 바이러스 내로 클로닝된다. 일부 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV9, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, AAVHU31 및 AAVHU32로 이루어진 군으로부터 선택된 클레이드 F AAV의 캡시드이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 패키징 시스템은 키트 내에 포함된다.

[0037] 개시내용의 다른 양상은 아데노 관련 바이러스(AAV)의 재조합체 제조 방법에 관한 것이되, 상기 방법은 AAV를 형성하기 위해 캡시드 내 수정 게놈을 동봉하도록 작동하는 조건 하에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 패키징 시스템을 이용하여 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 단계를 포함한다.

[0038] 다른 양상에서, 본 개시내용은 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 포유류 게놈을 포함하는 세포를 형질도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 세포는 포유류 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구, 또는 망막 세포이다. 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 임의의 방법에 의해 얻을 수 있는 세포에 관한 것이다.

[0039] 본 개시내용의 다른 양상은 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법에 관한 것이되, 상기 방법은 (a) 포유류로부터의 포유류 세포를 얻는 단계; (b) 생체 밖 포유류 세포를 배양하여 생체 밖 배양물을 형성하는 단계; (c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 생체 밖 배양물에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및 (d) 상기 형질도입된 포유류 세포를 포유류에

투여하는 단계를 포함한다.

[0040] 다른 양상에서, 본 개시내용은 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은 (a) 제1 포유류로부터 포유류 세포를 얻는 단계; (b) 생체 밖 포유류 세포를 배양시켜 생체 밖 배양물을 형성하는 단계; (c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 생체 밖 배양물에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 아데노 관련 바이러스(AAV)를 이용하여 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및 (d) 형질도입된 포유류 세포를 제2 포유류에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 포유류와 제2 포유류는 동일한 종이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 CD34+ 세포이다. 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구 또는 망막 세포이다.

[0041] 본 개시내용의 다른 양상은 포유류 게놈의 표적 좌위를 편집하기 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은 생체 내 AAV를 이용하여 포유류의 세포를 형질도입하기에 유효한 양으로 포유류에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0042] 제공된 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 외인성 뉴클레아제 또는 외인성 뉴클레아제를 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 공동 형질도입하거나 또는 공동 투여하는 일 없이 형질도입되거나 또는 투여된다.

[0043] 제공된 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%의 염색체 통합 효능을 가진다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위한 AAV의 염색체 통합 효율은 적어도 약 2%, 3%, 4% 또는 5%이다. 일부 실시형태에서, 수정 게놈의 편집 구성요소는 포유류 세포의 적어도 10%, 20%, 40% 또는 50%의 염색체 통합 효율로 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된다. 일부 실시형태에서, 수정 게놈의 편집 구성요소는 포유류 세포의 10% 내지 70%, 20% 내지 70%, 40% 내지 70%, 또는 50% 내지 70%의 범위에 있는 염색체 통합 효율로 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된다.

[0044] 제공된 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 10%의 세포 집단에서의 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 가진다. 일부 실시형태에서, AAV는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 50%의 세포 집단에서의 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 가진다. 일부 실시형태에서, AAV는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 적어도 약 75%의 세포 집단에서의 대립유전자 빈도를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 가진다. 일부 실시형태에서, 세포 집단 내 대립유전자 빈도는 시험관내 세포 집단에서의 대립유전자 빈도이다.

[0045] 개시내용의 다른 양상은 유전자 이식 비인간 동물(transgenic non-human animal)을 생성하는 방법에 관한 것이며, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 비인간 동물에게 투여하는 단계; 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 조성물을 이용하여 비인간 동물 세포를 형질도입하는 단계 및 (예를 들어, 이식된 세포가 배아의 부분을 형성하거나 또는 배아의 부분이 되도록 허용하고, 이어서, 숙주 내에서 유전자 이식 비인간 동물로 발생함으로써) 숙주 비인간 동물로부터 유전자 이식 비인간 동물을 생성하는 데 충분한 조건 하에서 숙주 비인간 동물 내로 세포를 이식하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 유전자 이식 비인간 동물은 추가로 유전자 이식 비인간 동물을 생성하기 위해 다른 비인간 동물과 교배된다. 일부 실시형태에서, 비인간 동물 세포는 비인간 동물의 접합체 또는 배아로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 비인간 동물은 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 페럿 또는 영장류이다.

[0046] 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 방법, 예컨대 상기 기재된 방법에 의해 얻을 수 있는 유전자 이식 비인간 동물에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 유전자 이식 비인간 동물은 마우스, 래트, 토끼, 돼지, 소, 양, 염소, 닭, 고양이, 개, 페럿 또는 영장류이다.

[0047] 본 개시내용의 또 다른 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 이식 비인간 동물로부터 유래된 조직에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 조직은 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직

으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 조직은 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다.

[0048] 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 유전자 이식 비인간 동물로부터 유래된 세포에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 세포는 1차 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 CD34+ 세포, 근원세포, 내피 세포, 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구 또는 망막 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 유도성 다능성 줄기(iPS) 세포이다. 일부 실시형태에서, 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직, 내피 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다. 일부 실시형태에서, 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포이다.

[0049] 특정 실시형태에 따르면, 세포의 게놈을 편집하기 위해 아데노 관련 바이러스(AAV) 클레이드 F 벡터(예를 들어, 클레이드 F 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV) 또는 AAV 벡터 변이체(예를 들어, AAV9 캡시드에 대해 캡시드 변이체를 포함하는 복제-결함 AAV)가 제공된다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 하나 이상의 캡시드 변이체(AAV9 캡시드에 대해), 게놈의 표적 좌위(또한 본 명세서에서 표적 부위로서 지칭됨)로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(또한 본 명세서에서 표적 카세트로서 지칭됨), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 편집 구성요소(표적 카세트)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 역위 말단 반복(ITR)을 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈 내에 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 본 명세서에 기재된 임의의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 하나 이상의 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 안전한 은닉 부위(harbor site)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 본 명세서에 기재된 질환 상태와 관련된 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포일 수 있다.

[0050] 특정 실시형태에 따르면, 세포 게놈을 편집하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 세포 게놈을 편집하는 방법은 하나 이상의 AAV 클레이드 F 벡터(예를 들어, 클레이드 F 캡시드 내에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV) 또는 본 명세서에 기재된 AAV 벡터 변이체(예를 들어, AAV9 캡시드에 대해 캡시드 변이체를 포함하는 복제-결함 AAV)를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 형질도입은 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체(AAV9 캡시드에 대해), 게놈의 표적 좌위(표적 부위) 내로 도입될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 편집 구성요소(표적 카세트)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ITR을 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈 내에 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15

(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대한 프로모터를 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)은 안전한 은닉 부위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 상태와 관련된 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 세포는 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포일 수 있다.

[0051] 특정 실시형태에 따르면, 대상체 세포의 게놈을 편집함으로써 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 대상체 세포의 게놈을 편집함으로써 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 대상체의 세포를 형질도입하는 단계 및 형질도입된 세포를 대상체 내로 이식하는 단계를 포함하되, 상기 형질도입된 세포는 질환 또는 장애를 치료한다. 특정 실시형태에서, 세포의 형질도입은 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체(AAV9 캡시드에 대해), 게놈의 표적 좌위(표적 부위)내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 편집 구성요소(표적 카세트)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ITR을 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 내놈 내에 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), AAVF9(서열번호 10), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대한 프로모터를 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 안전한 은닉 부위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 장태와 관련된 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 세포 게놈에서 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환, 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택될 수 있다.

[0052] 또한 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접 투여함으로

써 생체내 게놈 편집에 의해 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 개시된다. 특정 실시형태에서, 대상체에게 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접 투여함으로써 대상체의 세포의 생체내 게놈 편집에 의해 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 개시된다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체(AAV9 캡시드에 대해), 게놈의 표적 좌위(표적 부위) 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있되, 벡터는 대상체의 세포를 형질도입하고, 세포의 게놈 내로 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 통합한다. 편집 구성요소(표적 카세트)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ITR을 포함하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈 내에 포함될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF1(서열번호 2), AAVF2(서열번호 3), AAVF11(서열번호 4), AAVF3(서열번호 5), AAVF4(서열번호 6), AAVF6(서열번호 7), AAVF7(서열번호 8), AAVF8(서열번호 9), AAVF9(서열번호 10), AAVF5(서열번호 11), AAVF12(서열번호 12), AAVF17(서열번호 13), AAVF13(서열번호 14), AAVF14(서열번호 15), AAVF15(서열번호 16), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대해 프로모터를 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 안전한 은닉 부위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 상태와 관련된 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 세포 게놈 내 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환, 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택될 수 있다. 또한 본 명세서에서 세포 게놈을 편집하기 위한 하나 이상의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 포함하는 키트가 개시된다.

도면의 간단한 설명

[0053] 본 출원은 컬러로 실행한 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)을 지니는 본 출원의 사본은 요구 시 필요한 비용을 지불하면 특허청에 의해 제공될 것이다.

도 1은 AAV9에 비교한 클레이드 F AAV 캡시드 변이체 폴리펩타이드 서열의 정렬을 도시한 도면. 클레이드 F AAV 캡시드 변이체 폴리뉴클레오타이드 서열의 대응하는 정렬은 미국 특허 공개 제20130096182A1호의 도 1에 제공된다.

도 2는 염기 변화, 아미노산 변화 및 그것이 VP1 또는 VP3에 있는지의 여부를 포함하는 각각의 서열의 캡시드 내 일부 뉴클레오타이드 돌연변이를 열거하는 차트를 도시한 도면.

도 3은 게놈 편집을 위해 사용된 공여체 ITR-AAVS1-FP 벡터 작제물의 하나의 세트의 일부의 개략도를 도시한 도면. AAV 벡터는 5' 상동성 및 3' 상동성 아암, 및 2A 서열, 스플라이스 수용체 서열, 및 폴리아데닐화 서열을 포함한 조절 요소를 포함하였다. 황색 형광 단백질("YFP" 또는 "FP")을 이식유전자로서 사용하였다. AAV2 ITR은 상동성 아암에 측접하였고, 벡터 게놈을 AAVF 캡시드에서 패키징하여 AAVF-AAVS1-FP 공여체 벡터를 형성하였다. 중요하게는, FP 유전자를 포함하는 벡터는 발현을 유발하기 위한 프로모터를 포함하지 않는다. FP 유전자는 단지, 그것이 내인성 염색체 프로모터로부터 하류의 AAVS1 내로 정확하게 통합된다면, 발현될 것이다.

도 4는 표적화된 염색체 AAVS1 좌위 및 AAVF 벡터에 의해 매개되는 이식유전자 통합을 위한 표적 부위인 편집된 AAVS1 좌위의 개략적 맵을 도시한 도면. 상부 개략도(도 4A), "야생형 AAVS1 좌위"는 5' 상동성 아암 및 3' 상동성 아암을 포함하지만, 이식유전자를 포함하지 않는 야생형 AAVS1 좌위를 도시한다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 프라이머 및 "kb 길이" 프라이머를 이용하는 상동성 영역 밖에 위치된 프라이머에 의한 증폭은 단편 대략 1.9kb 길이("단편 1"로 표지한 선을 참조)를 초래하는데, 이는 단편이 통합된 이식유전자를 포함하지 않음을 나타낸다. 하부 개략도(도 4B), "편집된 AAVS1 좌위"는 5' 상동성 아암, 조절 구성요소, 통합된 이식유전자 및 3' 상동성 아암을 포함하는 편집된 AAVS1 좌위를 도시한다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 프라이머 및 "kb 길이" 프라이머를 이용하여 상동성 영역 밖에 위치된 프라이머에 의한 증폭은 단편 대략 3.0kb 길이("단편 2"로 표지한 선을 참조)를 초래하는데, 이는 단편이 이식유전자를 포함한다는 것을 나타낸다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 프라이머 및 "안쪽 역방향 프라이머"를 이용하는 5' 연접 영역(5' 상동성 아암과 이식유전자 사이의

연접)의 증폭은 단편 대략 1.7kb 길이("단편 3"으로 표지한 선을 참조)를 초래한다. "kb 길이" 프라이머 및 "안쪽 역방향 프라이머"를 이용하는 3' 연접 영역(이식유전자와 3' 상동성 아암 사이의 연접)의 증폭은 단편 대략 1.2kb 길이("단편 4"로 표지한 선을 참조)를 초래한다. 이식유전자가 통합되지 않는다면, 5' 연접 영역 또는 3' 연접 영역의 증폭 시 얻어진 생성물은 없다.

도 5는 형질도입 후 24시간에 K562 세포 내 YFP 발현의 유세포 측정 분석으로부터의 대표적인 산점도를 도시한 도면. 세포를 다양한 감염 다중도(multiplicity of infection: MOI)에서 AAVF7 FP 벡터를 이용하여 형질도입하였다 (A) 임의의 벡터에 의해 형질도입되지 않은 세포(비형질도입), (B) 50,000 MOI, (C) 100,000 MOI, (D) 200,000 MOI, 및 (E) 400,000 MOI. 나타낸 데이터는 대표적인 샘플로부터 유래된다. 각각의 산점도 내의 경계선 위의 사건은 FP 발현 세포를 나타내는데, 이는 이들 세포에서 공여체 ITR-AAVS1-FP 벡터로부터의 프로모터가 없는 FP 유전자가 내인성 염색체 프로모터로부터 하류의 인간 염색체 19에서 AAVS1 내에 정확하게 통합된다는 것을 나타낸다.

도 6은 형질도입 후 72시간에 K562 세포에서 YFP 발현의 유세포 분석으로부터의 대표적인 산점도를 나타낸다. 세포를 다양한 감염 다중도(MOI)에서 AAVF7 FP 벡터를 이용하여 형질도입하였다 (A) 임의의 벡터로 형질도입되지 않은 세포(비형질도입), (B) 50,000 MOI, (C) 100,000 MOI, (D) 200,000 MOI, 및 (E) 400,000 MOI. 경계선 위의 사건은 공여체 ITR-AAVS1-FP 벡터 내 프로모터가 없는 FP 유전자의 정확하게 표적화된 통합이 있는 세포를 나타낸다.

도 7은 CD34+ K562 백혈병 세포 내 AAVS1 좌위에서 프로모터가 없는 YFP 이식유전자의 표적화된 통합 후 YFP 발현의 평균 백분율을 도시한 도면. (A) MOI가 50,000; 100,000; 150,000; 200,000; 300,000; 및 400,000인 세포에서 AAVF7 벡터를 이용하는 형질도입 후 24시간에 YFP 발현을 나타내는 막대 그래프. (B) MOI가 50,000; 100,000; 150,000; 200,000; 및 400,000인 세포에서 AAVF7 벡터에 의한 형질도입 후 72시간에 YFP 발현을 나타내는 막대 그래프. 각각의 막대는 7개까지의 샘플로부터 편집된 데이터를 나타낸다.

도 8은 K562 세포 내 AAVS1 좌위 내로 YFP 이식유전자의 표적화된 통합의 PCR 확인을 도시한 도면. A) MOI 100,000에서 주형이 없거나, 비형질도입되거나 또는 AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 K562 세포로부터의 대표적인 샘플로부터의 증폭된 DNA를 나타내는 겔. 레인 1: DNA 사다리, 레인 2: 주형 대조군 없음, 레인 3: 비형질도입 대조군, 및 레인 4: AAVF7 FP 형질도입된 K562. 화살표는 FP 통합 AAVS1 대략 3.1kb 단편 또는 비통합 AAVS1 대략 1.9kb 단편 중 하나를 나타낸다. B) MOI 100,000에서 주형이 없거나, 비형질도입되거나 또는 AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 K562 세포로부터의 대표적인 샘플로부터의 증폭된 DNA를 나타내는 겔. 레인 1: DNA 사다리, 레인 2: 주형 대조군 없음, 레인 3: 비형질도입 대조군, 레인 4: AAVF7 FP 벡터 형질도입 K562. 화살표는 증폭된 FP통합 AAVS1 대략 3.1kb 단편 또는 증폭된 비통합 AAVS1 대략 1.9kb 단편 중 하나를 나타낸다.

도 9는 AAVF FP 벡터에 의한 형질도입 후 1일에 표적화된 통합 후 1차 CD34+ 세포에서의 YFP 발현의 대표적인 산점도를 도시한 도면. (A) 임의의 벡터에 의해 형질도입되지 않은 세포(비형질도입), (B) AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포, 및 (C) AAVF17 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포. AAVF7 또는 AAVF17 벡터 중 하나로 형질도입된 세포는 비형질도입 세포에 비해 상당한 양의 YFP 발현을 나타낸다(B 및 C를 각각 A와 비교). (B) 및 (C)에서 YFP 발현은 AAVF 벡터에 의해 전달된 프로모터가 없는 FP 유전자가 염색체 AAVS1 좌위 내로 정확하게 통합된다는 것을 나타낸다.

도 10은 AAVF FP 벡터에 의한 형질도입 후 4일에 표적화된 통합 후 1차 CD34+ 세포에서의 YFP 발현의 대표적인 산점도를 도시한 도면. (A) 임의의 벡터에 의해 형질도입되지 않은 세포(비형질도입), (B) AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포, 및 (C) AAVF17 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포. AAVF7 또는 AAVF17 FP 벡터 중 하나로 형질도입된 세포는 비형질도입 세포에 비해 상당한 양의 YFP 발현을 나타내는데(B 및 C를 각각 A와 비교함), 이는 AAVF 벡터에 의해 전달된 유전자의 정확한 표적화된 통합을 나타낸다.

도 11은 대표적인 샘플로부터의 AAVF FP 벡터에 의한 형질도입 후 18일에 표적화된 통합 후 1차 CD34+ 세포에서의 YFP 발현의 대표적인 산점도를 도시한 도면. (A) 임의의 벡터에 의해 형질도입되지 않은 세포(비형질도입), (B) AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포, 및 (C) AAVF17 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포에 의해 형질도입된 세포. AAVF7 또는 AAVF17 FP 벡터 중 하나에 의해 형질도입된 세포는 비형질도입 세포에 비해 상당한 양의 YFP 발현을 나타내었다(B 및 C를 각각 A와 비교한다).

도 12는 표적화된 통합 후 1차 CD34+ 세포에서 YFP 발현을 도시한 도면. (A) 비형질도입 세포 및 형질도입 후 제4일, 제18일, 제20일 및 제39일에 AAVF7 FP 벡터 또는 AAVF17 FP 벡터 중 하나로 형질도입된 세포에 대한 YFP

양성 세포의 백분율을 나타내는 표. (B) MOI 100,000으로 AAVF FP 형질도입 후 제4일, 제18일, 제20일 및 제39일에 1차 CD34+ 세포를 발현시키는 YFP의 빈도를 나타내는 선 그래프. 다이아몬드 선은 비형질도입 세포를 나타내고, 정사각형 선은 AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포를 나타내고, 삼각형 선은 AAVF17 FP 벡터에 의해 형질도입된 세포를 나타낸다.

도 13은 1차 CD34+ 세포에서 AAVS1 좌위 내로의 표적화된 통합의 PCR 확인을 도시한 도면. 주형이 없거나, 비형질도입이거나, 또는 MOI 150,000로 AAVF7 FP 벡터에 의해 형질도입된 1차 CD34+ 세포의 대표적인 샘플로부터의 증폭된 DNA를 나타내는 겔. 레인 1: DNA 사다리, 레인 2: 주형 대조군 없음, 레인 3: 비형질도입 대조군, 레인 4: DNA 마커 및 레인 5: 형질도입된 AAVF7 FP 벡터. 화살표는 5' 연접 영역의 증폭 산물을 나타내는 FP 통합된 AAVS1(대략 1.7kb 단편)을 나타낸다. 좌측 삽도는 레인 1에 로딩된 DNA 사다리를 나타낸다.

도 14는 정방향 프라이머 영역 밖에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 유전자 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 정확하게 통합된다는 것을 나타낸다.

도 15는 5' 상동성 아암 근처에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 통합된다는 것을 나타낸다.

도 16은 조절 구성요소의 5' 영역 근처에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 통합된다는 것을 나타낸다.

도 17은 조절 구성요소의 3' 영역 근처에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 통합된다는 것을 나타낸다.

도 18은 이식유전자의 5' 영역 근처에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 통합된다는 것을 나타낸다.

도 19는 "안쪽 역방향 프라이머" 영역 근처에서 시작하는 AAVS1 좌위에서 YFP 서열의 표적화된 통합의 서열 확인을 도시한 도면. 서열분석 결과는 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 통합된다는 것을 나타낸다.

도 20은 실시예 4의 실험에서 수행한 단계의 개략도를 도시한 도면. 백만개의 인간 제대혈 CD34+ 세포를 얻었고(단계 1 참조), 치사량에 가깝게-방사선 조사된 면역 결핍 NOD/SCID 성체 마우스에 주사하였다(단계 2 참조). CD34+ 세포를 주사하고 2시간 후에, 마우스에 AAVF-루시퍼라제 벡터(즉, AAVF7-루시퍼라제 벡터 또는 AAVF17-루시퍼라제 벡터)로 주사하였다. 2 내지 7일 후에, 마우스에 AAVF-비너스(Venus) 벡터(즉, AAVF7-비너스 벡터 또는 AAVF17-비너스 벡터)를 주사하였다(단계 3 참조). 최종적으로, 생체내 루시퍼라제 발현을 주사 후 4주에 측정하고 나서, 비너스 발현을 주사 후 6주에 정량화하였다(단계 4 참조).

도 21은 대표적인 수용인에서의 생체내 특이적 루시퍼라제 발현을 도시한 도면. 도 21A은 AAVF-루시퍼라제 벡터의 정맥내 주사를 받은 인간 제대혈 CD34+ HSC로 이미 이종이식된 성인 면역 결핍 마우스가 척추골, 비장, 둔부 및 장골, 즉, 이식 후 조혈작용의 모든 부위에서 특정 루시퍼라제 발현을 나타낸다는 것을 나타낸다. 화살표는 척추골, 비장, 간, 둔부 및 장골에서의 루시퍼라제 발현을 나타낸다. 간 및 비장에 대한 유동은 4.08e9이고, 꼬리에 대한 유동은 1.74e9였다. 도 21B는 AAVF-루시퍼라제 벡터의 정맥내 주사를 받은 인간 제대혈 CD34+ HSC로 이전에 이종이식되지 않은 성체 면역 결핍 마우스가 고수준의 특정 루시퍼라제 발현을 나타내지 않는다는 것을 나타낸다. 간 및 비장에 대한 유동은 1.47e8이고, 꼬리에 대한 유동은 2.22e8이었다.

도 22는 AAVF7-비너스 또는 AAVF17-비너스 벡터 중 하나의 정맥내 주사를 받은 인간 제대혈 CD34+ HSC로 이미 이종이식한 성체 면역 결핍 마우스에서의 비너스-발현 인간 CD34+ 또는 CD45+ 세포의 유세포 분석 데이터를 도시하는 히스토그램을 도시한 도면. 도 22A는 AAVF7-비너스 벡터로 주사된 이종이식 마우스의 대퇴부 CD34+ 세포로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 9.23%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22B는 AAVF7-비너스 벡터를 주사한 이종이식된 마우스의 대퇴부 CD45+ 세포로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 8.35%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22C는 AAVF17-비너스 벡터를 주사한 이종이식 마우스의 대퇴부 CD34+ 세포로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 8.92%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22D는 AAVF17-비너스 벡터로 주사한 이종이식 마우스의 대퇴부 CD45+ 세포로부터의 유세포분석 데이터를 나타낸다. 8.59%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22E는 AAVF7-비너스 벡터로 주사한 이종이식 마우스의 척추골 CD45+로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 15.3%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22F는 AAVF17-비너스 벡터로 주사한 이종이식 마우스의 척추골 CD45+로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 70.2%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22G는 AAVF7-비너스 벡터로 주사한 이종이식 마우스의 비장 CD45+ 세포로부터의 유세포 분석 데이터를 나타낸다. 10.3%의 생착된 인간

조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22H는 AAVF17-비너스 벡터로 주사한 이종이식 마우스의 비장 CD45+ 세포로부터의 유세포분석 데이터를 나타낸다. 9.90%의 생착된 인간 조혈 세포는 비너스를 발현시켰다. 도 22로부터의 결과를 또한 표 5에 제공한다.

도 23은 서로에 대한 그리고 다른 AAV 균주에 대한 AAV 클레이드 F 바이러스의 관계의 계통도를 도시한 도면. 계통도는 AAVF 바이러스의 캡시드 유전자의 뉴클레오타이드 서열 상동성에 기반한다(Smith et al, Mol Ther. 2014 Sep;22(9):1625-34).

도 24는 거대 DNA 삽입물의 삽입을 위한 단일 가닥 AAV 벡터 게놈의 맵을 도시한 도면. 단일 가닥 AAV2 게놈은 AAV2 ITR, 상동성 아암, 조절 서열 및 프로모터가 없는 비너스 오픈 리딩 프레임(open reading frame: ORF)을 포함하였다. 비너스는 형광 리포터 단백질이다. 비너스 ORF를 함유하는 프로모터가 없는 비너스는 스플라이스 수용체 및 2A 서열로부터 하류이다. 비너스 ORF 다음에 폴리아데닐화 신호가 이어진다. 각각의 상동성 아암은 800bp 길이이며, 염색체 19 상에서 PPP1R12C 유전자의 인트론 1을 표적화한다.

도 25는 AAVS1에서 편집 모이어티의 삽입 부위의 개략도를 도시한 도면. 비너스 오픈 리딩 프레임 및 스플라이스 수용체 부위 다음에 2A 서열로 이루어진 이식유전자 카세트는 상동성 아암에 의해 측면 중 하나에 대해 측접된다. 상동성 아암은 염색체 19 상의 AAVS1 좌위 내에서 인간 PPP1R12C 유전자의 인트론 1에 대해 상보성이며, 2개의 상동성 아암 사이의 부위 내로의 비너스의 삽입을 매개한다.

도 26A 내지 도 26F는 인간 세포주 및 1차 세포에서 재조합 AAVF 벡터에 의한 거대 단백질 암호 서열의 표적화된 게놈 삽입을 나타내는데, 이는 AAVF-매개 게놈 편집이 강하다는 것과 인간 CD34+ 세포 및 세포주에서 효율적인 편집이 있다는 것을 입증한다. 도 26A: CD34+는 1차 인간 CD34+ 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 줄기 세포를 나타낸다. 도 26B: K562은 인간 CD34+ 적백혈병 세포주이다. 도 26C: HepG2는 인간 간 세포주이다. 정확한 삽입을 나타내는 비너스 발현을 나타내는 세포의 백분율은 도 26A 내지 도 26C를 나타낸다. 도 26D는 비형질도입 세포에 비해 재조합 AAVF 바이러스에 의한 형질도입 후에 CD34+ 세포의 별도의 비너스 발현 집단을 나타내는 대표적인 유동 프로파일을 나타낸다. 도 26E는 K562 적백혈병 계통에서 AAV6 및 AAV8에 비교한 AAVF7, AAVF12, AAVF15, AAVF17 및 AAV9의 편집 활성을 나타낸다. 도 26F는 간 세포주인 HepG2에서의 동일한 바이러스의 편집 활성을 나타낸다. 데이터는 편집 및 비너스 발현을 나타내는 세포의 백분율을 나타낸다.

도 27은 인간 염색체 19 상에서 AAVS1 좌위 내로의 거대 삽입 및 작은 삽입의 검출을 위한 표적화된 통합 분석을 나타낸다. 개략적 맵은 프라이머의 위치를 나타낸다. 5' 프라이머는 염색체 서열에 대해 상보성이다. 3' 프라이머는 삽입물에 대해 특이적이다. 특이적 앰플리콘은 거대 삽입물에 대해 1.7kb인 것으로 예측되고, 작은 삽입물에 대해 1 kb인 것으로 예측된다. 분할 프라이머 쌍(염색체 및 삽입물 특이적)은 표적화된 분석에 대한 특이성을 부여한다.

도 28A 내지 도 28E는 AAVF 벡터가 구체화된 게놈 부위에서 뉴클레오타이드 치환을 매개한다는 것을 나타낸다. 도 28A는 인간 PPP1R12C 유전자의 인트론 1에서 10 bp 삽입물의 삽입을 위한 단일 가닥 AAV 벡터 게놈의 맵을 나타낸다. 이 벡터는 Nhe1 제한효소 인식 부위(GCTAGC)를 포함하는 야생형 좌측 상동성 아암(HA-L)을 암호화한다. NS mut 벡터는 AT에 대해 염색체 19 상에서 좌측 상동성 아암 내 TA 서열을 변화시키도록 설계되었다. 이 변화는 Nhe1 부위의 Sph1 부위로의 전환을 초래하여, GCTAGC로부터 GCATGC로 서열을 변화시킨다. 도 28B는 좌측 상동성 아암이 상류의 염색체 서열에 위치된 정방향 프라이머 및 염색체 19 상에서 PPP1R12C 유전자의 인트론 1 내 10bp 삽입에서 위치된 역방향 프라이머를 이용하여 증폭된다는 것을 나타낸다. 상부 개략도는 K562 세포로부터의 게놈 DNA가 야생형 또는 NS Mut AAVF 벡터 중 하나를 이용하여 편집될 때 생성된 예상된 단편의 상대적 크기를 표시한다. 도 28C는 야생형 AAVF 벡터로 편집된 K562 세포의 게놈 DNA로부터 유래된 실제 앰플리콘을 나타내는 겔이다. 레인은 비절단 앰플리콘(Un), Nhe 1(Nhe1)에 의한 앰플리콘 절단 그리고 Sph 1(Sph 1)에 의한 앰플리콘 절단을 나타낸다. 도 28D는 AAVF7 또는 야생형 또는 NS Mut 게놈 중 하나를 암호화하는 AAVF17 벡터에 의한 편집 후 K562 DNA의 겔 전기영동을 나타낸다. 도 28E는 AAVF7 또는 야생형 또는 NS Mut 게놈 중 하나를 암호화하는 AAVF17 벡터에 의한 편집 후 간세포 암종 세포주인 HepG2의 겔 전기영동을 나타낸다.

도 29는 AAVF7 및 AAVF17 야생형 또는 NS Mut 벡터로 편집한 세포로부터의 DNA의 서열 분석을 도시한도면.

도 30은 AAVF 벡터가 분화와 비분화 세포 둘 다에서의 편집을 매개하고, AAVF-매개 유전자 편집이 DNA 합성을 필요로 하지 않는다는 것을 나타내는 표를 도시한 도면. 도면은 1차 인간 CD34+ 세포의 분화 및 비분화 서브세트에서 비너스를 발현시키는 편집 세포의 빈도를 나타낸다. 비너스 양성 및 BrdU 양성 또는 음성인 모든 CD34+ 세포의 백분율은 유세포 분석기에 의해 결정하였다. BrdU 양성 세포는 분화 세포를 나타내고, BrdU 음성 세포는

비분화 세포를 나타낸다.

도 31A 내지 도 31c는 전신으로 전달된 AAVF 벡터에 의해 생체내에서 생착된 인간 조혈 줄기 세포의 효율적인 편집을 도시한 도면. 도 31A는 실험 설계의 다이어그램을 나타낸다. 면역 결핍 NOD/SCID 마우스는 인간 제대혈 CD34+ 조혈 줄기 세포로 생착되었다. AAVF17-비너스의 정맥내 주사 전 7주 동안 세포를 생착시켰다. AAVF 주사의 12.5주 후에 이종이식된 마우스의 척추골 및 대퇴부 골수 및 비장으로부터 조혈 세포를 채취하였다. 비너스 발현뿐만 아니라 인간 특이적 표면 마커의 존재에 대해 다중 색상 유세포 분석기에 의해 세포를 분석하였다. 구체적으로는, 비너스 발현을 적혈구 계통의 원시 CD34+ 인간 조혈 줄기/전구세포, CD45+ 인간 분화 단핵 조혈 세포 및 글리코포린 A+ 세포에서 분석하였다. 도 31B는 인간 적혈구 계통인 CD34+ 전구세포 내지 글리코포린 A+ 적혈구의 분화 경로의 개략도를 나타낸다. 도 31c는 이식 후 20주에 이종이식된 마우스의 골수 및 비장 세포에서 장기간 생착된 인간 세포의 유세포 분석 프로파일으 나타낸다. 세포를 편집 마커인 비너스뿐만 아니라 특이적 인간 세포 표면 마커의 발현을 분석하였다.

도 32A 및 도 32B는 인간 제대혈 CD34+ 조혈 줄기/전구 세포로 이종이식된 면역 결핍 마우스 내로의 AAVF 벡터의 정맥내 주사 후 생체내 데이터의 요약을 도시한 도면. 비너스 발현은 생체내 생착된 인간 조혈 줄기 세포 및 그들의 자손에서 인간 PPP1R12C 유전자의 인트론 1 내로의 프로모터가 없는 비너스 카세트의 표적화된 삽입을 반영한다. 도 32B는 도 32A의 데이터의 요약이다. 도 32A 및 도 32B는 편집이 장기간이며, 편집이 안정하게 유전되고(삽입이 분화된 자손 세포에서 효율적으로 발현됨), 생체내 편집이 생체밖 형질도입 다음에 이식보다 훨씬 더 효율적일 수 있으며, 편집된 CD34+ 세포의 자손은 비너스 발현을 장기간으로 보유한다는 것을 나타낸다.

도 33은 K562 적백혈병 세포주, 1차 인간 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 CD34+ 세포(PBSC) 및 HepG2 인간 간세포주에서 프로모터가 없는 SA/2A 대 ORF의 표적화된 염색체 삽입의 서열 분석을 도시한 도면. 염색체-특이적 프라이머 및 삽입물-특이적 프라이머를 이용하여 부위 특이적으로 통합된 서열을 증폭시켰다. 증폭된 산물을 TOPO-TA 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 생어(Sanger) 서열분석을 이용하여 서열분석하였다.

도 34는 1차 인간 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 CD34+ 세포 및 HepG2 인간 간 세포주 내 10bp 삽입물의 표적화된 염색체 삽입의 서열 분석을 도시한 도면. 염색체 특이적 프라이머 및 삽입물-특이적 프라이머를 이용하여 부위 특이적으로 통합된 서열을 증폭시켰다. 증폭된 산물을 TOPO-TA 벡터 내로 클로닝시키고 나서, 생어 서열분석을 이용하여 서열분석하였다.

도 35는 AAVF가 AAVS1 - CD34+ 세포 내로의 작은 삽입물의 통합을 표적화한다는 것을 도시한 도면.

도 36은 HepG2(간종양) 세포주에서 프로모터가 없는 비너스 및 RFLP의 AAV 표적화를 도시한 도면.

도 37은 비너스 양성 및 비너스 음성 집단, 비너스 음성 집단 내 CD34/글리코A 양성 세포 및 글리코 양성 및 CD34 양성 집단에 대해 CD34 및 글리코A 양성 세포를 역개폐하는 분류된 총 집단을 나타내는 대표적인 대퇴골 골수 유세포 분석 그래프를 도시한 도면.

도 38은 비너스 양성 및 비너스 음성 집단, 비너스 음성 집단 내 CD34/글리코A 양성 세포 및 글리코 양성 및 CD34 양성 집단에 대해 CD34 및 글리코A 양성 세포를 역개폐하는 분류된 총 집단을 나타내는 대표적인 비장 유세포 분석 그래프를 도시한 도면.

도 39는 AAV 벡터의 상대적 형질도입 대 편집 효율을 결정하기 위해 사용한 CBA-mCherry 및 AAS1-비너스 벡터 게놈의 맵을 도시한 도면.

도 40A 및 도 40B는 인간 CD34+ 제대혈 세포에서의 mCherry(도 40A) 및 비너스(도 40B)의 유세포 분석 프로파일을 도시한 도면. 도 40C는 형질도입 후 48시간에 CD34+ 세포에서의 mCherry 및 비너스 발현의 정량화를 도시한 도면. 도 40D는 mCherry에 대한 비너스의 상대적 발현의 비교(편집 비)를 도시한 도면. 막대는 대응하는 캡시드에 의해 mCherry를 발현시키는 것의 비로서 비너스를 발현시키는 세포의 비율의 비를 나타낸다. 검정색 가로 막대는 비 1을 의미하는데, 이는 동일한 효율의 비너스:mCherry 발현을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054] 본 발명의 특정 실시형태는 구체적 실시예, 서열 및 도면을 이용하여 상세하게 기재한다. 열거된 실시형태는 본 발명을 해당 실시형태로 제한하는 것으로 의도되지 않는데, 본 발명이 청구범위에 의해 나타내는 바와 같은 본 발명의 범주 내에 포함될 수 있는 모든 대안 및 동등물을 아우르는 것으로 의도되기 때문이다. 당업자는 본 발명의 실행에서 사용될 수 있는 본 명세서에 기재된 것과 유사하거나 또는 동등한 다수의 방법 및 물질을 인식할

것이다. 달리 정의되지 않는 한, 본 명세서에 사용되는 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자에 의해 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다. 모든 간행물 및/또는 특허는 본 명세서에서 완전히 제시되는 것처럼 참고로 포함된다.

[0055] 본 명세서에서 아데노 관련 바이러스(AAV) 클레이드 F 벡터(예를 들어, 클레이드 F 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV) 또는 AAV 벡터 변이체(예를 들어, AAV9 캡시드에 대해 캡시드 변이체를 포함하는 복제-결함 AAV) 및 외인성 뉴클레아제의 첨가에 대한 필요 없이 상동성 재조합을 이용하여 세포 게놈의 정확한 편집을 위해 개발된 이들의 관련 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 게놈 편집은 삽입, 결실, 변경, 점 돌연변이 또는 이들의 임의의 조합을 세포의 게놈 서열(예를 들어, 포유류 염색체의 표적 좌위) 내로 도입하는 것을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 및 관련된 방법은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 통합 전에 외인성 뉴클레아제의 첨가에 대한 필요 없이 세포 게놈의 특정 위치 내로 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열을 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 및 이의 관련된 방법은 뉴클레오타이드 간의 결합의 통합 전에 외인성 뉴클레아제의 첨가에 대한 필요 없이 세포 게놈의 특정 위치 내로 뉴클레오타이드 간의 결합을 삽입하기 위해 사용될 수 있다. 또한 특정 실시형태에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계 및 추가로 대상체의 질환 또는 장애를 치료하기 위해 대상체 내로 형질도입된 세포를 추가로 이식하는 단계를 통한 대상체 세포 게놈의 생체 밖 편집에 의해 대상체에서의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 또한 본 명세서에서 대상체에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접 투여함으로써 생체내 게놈 편집에 의해 대상체에서의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 또한 본 명세서에서 본 명세서에 기재된 하나 이상의 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 포함하는 세포의 게놈 편집을 위한 키트가 제공된다.

[0056] 다양한 AAV 벡터(예를 들어, AAV2, AAV6 및 AAV8)을 이용하는 상동성 재조합은 이전에 보고되었지만; 그러나, 보고된 효율은 백만개의 세포에서 매우 낮은 내지 대략 1이었다. 이하의 실시예 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 앞서 나타난 것보다 상당히 더 큰 빈도로 구체화된 염색체 위치에 대해 유전자 삽입을 재현 가능하게 표적화하기 위해 AAV 클레이드 F 벡터(또는 AAV 벡터 변이체)가 사용되었다. 예를 들어, 표적화된 게놈 편집은 놀랍게도 높은 빈도로 1차 세포의 게놈 내로 이식유전자의 삽입을 초래하는 AAV 클레이드 F 벡터(또는 AAV 벡터 변이체)를 이용하여 1차 세포를 형질도입함으로써 달성되며, 1차 세포의 대략 10%는 형질도입 후 6주에 이식유전자의 삽입을 나타내는 나타낸다. 이 빈도는 이미 보고된 것보다 1,000 내지 100,000배 더 효율적이다(예를 들어, 문헌 [Khan, 2011] 참조). 이하의 실시예 1 및 2에 나타낸 바와 같이, 1차 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포(K562) 및 CD34+ 1차 말초혈액-유래 인간 조혈 줄기 세포(PBSC)을 이용하여 고수준의 게놈 편집을 달성하였다. 표적화된 유전자 삽입을 단기간(1일)과 장기간(거의 6주까지) CD34+ 배양물 둘 다에서 관찰하였고, 이식유전자 발현 및 서열 분석에 의해 확인하였다. 더 나아가, 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 표적화된 재조합은 관련된 독성 없이 특정 게놈 공학 처리를 허용한다. 이하의 실시예 3에 나타낸 바와 같이, AAVF7 또는 AAVF17에 의한 위형화된 AAV 벡터의 정맥내 주사는 인간 CD34+ 조혈 줄기 및 전구세포 생체내의 형질도입을 초래하였다. 이하의 실시예 4에 나타낸 바와 같이, 작은 삽입물(대략 10bp)과 거대 삽입물(대략 800bp) 둘 다에 대해 세포 배양물에서 그리고 생체내에서 게놈 편집이 달성되었고, 표적 좌위 내로 정확하게 통합되는 것이 서열분석에 의해 나타났다. 이하의 실시예 5에 나타낸 바와 같이, 다양한 인간 세포주(예를 들어, 섬유아세포, 간세포 암종 세포, 유방암 세포, 망막아세포종 세포, 백혈병 세포 및 B 세포)의 게놈 편집이 달성되었는데, 이는 클레이드 F 벡터가 몇몇 별도의 세포 유형, 예컨대 섬유아세포, 간 세포, 유방 세포, 망막 세포, 및 B 세포에서 게놈을 편집하기 위해 사용될 수 있었다는 것을 입증한다. 그렇게 해서, 본 기술은 생체 밖뿐만 아니라 특정 기관에서 생체 내에서 세포 내 표적화된 게놈 편집에 대한 엄청난 가능성을 가진다.

[0057] 본 명세서에서 세포의 게놈을 편집하기 위한 클레이드 F 벡터(예를 들어, 클레이드 F 캡시드 내 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV) 또는 AAV 벡터 변이체(예를 들어, AAV9 캡시드에 대해 캡시드 변이체를 포함하는 복제-결함 AAV) 및 (재조합을 통해, 바람직하게는 외인성 뉴클레아제의 사용이 없는) 이의 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 게놈 편집은 게놈 내 하나 이상의 돌연변이의 수정 또는 삽입, 게놈 내 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 조절 서열, 안전한 은닉 부위 또는 게놈 내 다른 특정 위치에서 이식유전자를 포함하는 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입을 포함하는 게놈 서열의 변경, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있지만, 이들로 제한되지 않는다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 및 이의 방법을 이용하는 게놈 편집은 외인성 바이러스 서열 또는 다른 발자국을 삽입하는 일 없이 하나 이상의 게놈 서열의 정확한 변경의 유도를 초래할 수 있다.

[0058] 일부 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 바와 같은 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV), 예를 들어, AAV 클레이드 F 캡시드를 제공한다. 일부 실시형태에서, "수정 게놈"은 본 명세서에 기재된 바와 같은 캡시드 내에서 캡슐화에 충분한 추가적인 구성요소(들)(예를 들어, 5' 역위 말단 반복(5' ITR) 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편, 및 3' 역위 말단 반복(3' ITR) 뉴클레오타이드 서열, 또는 이의 단편)과 함께 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소를 포함하는 핵산 분자이다. 용어 "수정 게놈"은 수정 게놈 내에 포함된 편집 구성요소가, 일단 표적 좌위 내로 통합되면, 게놈 내 표적 좌위를 "수정"(예를 들어, 야생형 서열로의 대체에 의한 돌연변이를 포함하는 표적 좌위의 수정)할 것이 본질적으로 필요하지 않은 것으로 이해되어야 한다. 따라서, 일부 실시형태에서, 수정 게놈은 표적 좌위에 대해 상가적인 뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있는 편집 구성요소를 포함할 수 있다(예를 들어, 표적 좌위는 제1 오픈 리딩 프레임의 3' 말단이고, 편집 구성요소는 표적 좌위 내로 통합될 때, 융합 단백질을 암호화하는 유전자를 생성할 제2 오픈 리딩 프레임이다).

[0059] 일부 실시형태에서, 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)는 수정 게놈을 포함하며, 수정 게놈은 (a) 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소, (b) 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5', 및 (c) 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함한다. 일부 실시형태에서, 복제-결함 AAV는 수정 게놈을 포함하며, 상기 수정 게놈은 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열을 포함하고, 상기 수정 게놈은 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는다. 일부 실시형태에서, 복제-결함 AAV는 수정 게놈을 포함하고, 상기 수정 게놈은 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소를 포함하고; AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 염색체 통합 효율이 적어도 약 1%(예를 들어, 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%)이다. 일부 실시형태에서, 복제-결함 AAV는 수정 게놈을 포함하고, 상기 수정 게놈은 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소를 포함하고; AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 염색체 통합 효율이 적어도 약 1%(예를 들어, 적어도 약 2%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 또는 적어도 약 90%)이다. 임의의 하나의 수정 게놈의 일부 실시형태에서, 수정 게놈은 편집 구성요소 뉴클레오타이드 서열에 작동 가능하게 연결된 프로모터가 본질적으로 존재하지 않는다. 임의의 하나의 수정 게놈의 실시형태에서, 수정 게놈은 편집 구성요소에 작동 가능하게 연결된 외인성 프로모터를 추가로 포함한다. 임의의 하나의 복제-결함 AAV의 일부 실시형태에서, AAV는 세포 내 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 염색체 통합 효율은 적어도 약 1%, 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80% 또는 적어도 약 90%이다.

[0060] 개시내용의 다른 양상은 AAV 캡시드에서 암호화된 수정 게놈, 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈을 포함하는(예를 들어, 포유류 세포 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 편집 구성요소; 표적 좌위에 대해 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5'; 표적 좌위에 대해 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'을 포함하는) 복제-결함 아데노 관련 바이러스(AAV)를 포함하는 유전자 편집 벡터에 관한 것이되; AAV는 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소를 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 좌위 내로 통합하기 위해 염색체 통합 효율이 적어도 10%(예를 들어, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%)이다. 일부 실시형태에서, 염색체 통합 효율은 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 좌위 내로 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 10%(예를 들어, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%)이다.

[0061] 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈은 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열의 5' 역위 말단 반복(5' ITR) 뉴클레오타이드 서열 5', 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열의 3' 역위 말단 반복(3' ITR) 뉴클레오타이드

서열 3'을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 AAV2 바이러스 5'ITR 및 AAV2 바이러스 3' ITR에 대해 각각 실질적으로 동일하다(예를 들어, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하거나 또는 100% 동일함). 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 36에 대해 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%)의 서열 동일성을 가지고, 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 37에 대해 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99%, 또는 100%) 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 AAV5 바이러스 5'ITR 및 AAV5 바이러스 3' ITR에 대해 각각 실질적으로 동일하다(예를 들어, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 동일하거나 또는 100% 동일함). 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 38에 대해 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 서열 동일성을 가지고, 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 39에 대해 적어도 95%(예를 들어, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 5' ITR 뉴클레오타이드 서열 및 3' ITR 뉴클레오타이드 서열은 서로 실질적으로 거울상 이성질체이다(예를 들어, 5' 또는 3' ITR에서 1, 2, 3, 4 또는 5개의 뉴클레오타이드 위치에 대해서를 제외하고 서로 거울상 이성질체이다).

예시적인 AAV2 5' ITR (서열번호 36) -

ttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgcccgggctttgcccgggcggc

ctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaactccatcactagggggttcct

예시적인 AAV2 3' ITR (서열번호 37) -

aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggcgaccaaaggtcgcccgacgc

ccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagagagggagtggccaa

예시적인 AAV5 5' ITR (서열번호 38) –

ctctccccccctgtcgcgttcgctcgctcgctggctcgtttgggggggtggcagctcaaagagctgccagacgacggcccctctggccgt

cgccccccccaaacgagccagcgagcgagcgaacgcgacaggggggagagtgccacactctcaagcaaggggggttttgta

예시적인 AAV5 3' ITR (서열번호 39) -

tacaaaacctccttgcttgagagtgtggcactctccccccctgtcgcgttcgctcgctcgctggctcgtttgggggggtggcagctcaaa

gagctgccagacgacggcccctctggccgtcgccccccccaaacgagccagcgagcgagcgaacgcgacaggggggagag

[0062]

[0063] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈은 크기가 7kb 이하(킬로염기), 6kb 이하, 5kb 이하, 또는 4kb 이하이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈은 4kb 내지 7kb, 4kb 내지 6kb, 4kb 내지 5kb, 또는 4.1kb 내지 4.9kb이다.

[0064] 특정 실시형태에서, 세포 게놈을 편집하기 위한 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체(AAV9 캡시드에 대한 변이체)를 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포 게놈을 편집하기 위한 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 AAV 클레이드 F 캡시드를 포함한다. 특정 실시형태에서, 공여체 벡터는 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 형성을 초래하는 표준 AAV 패키징 방법에 따라 본 명세서에 기재된 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체 내로 패키징될 수 있다(예를 들어, 문헌[Chatterjee, 1992] 참조). 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 특정 세포에 대한 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 향성에 영향을 미친다.

[0065] 특정 실시형태에 따르면, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 인간 줄기 세포-유래 AAV로부터 유래될 수 있다. 건강한 공여체로부터의 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 $CD34^+$ 줄기 세포는 그들의 게놈 내에 내인성 천연 AAV 서열을 보유한다는 것은 이전에 나타났다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20130096182A1 및 미국 특허 공개 제20110294218A1호). 세포 형질도입에서 개개 캡시드 뉴클레오타이드 및 단백질의 효능을 포함하는 AAV 단리물 변이체(AAV9에 대한 변이체)의 효능은 이미 입증되었다(예를 들어, 미국 특허 공개 제20130096182A1호 및 미국 특허 공개 제20110294218A1호).

[0066] 게놈에서 내인성 천연 AAV 서열을 보유하는 공여체로부터의 전장 AAV 캡시드 변이체 유전자(AAV9에 대한

변이체)를 단리시키고, 서열분석하였다. 캡시드 변이체의 폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩타이드 서열은 도 1에서 그리고 미국 특허 공개 제20130096182A1호로서 공개된 2012년 11월 2일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/668,120호 및 2011년 4월 28일자로 출원된 미국 특허 출원 제13/097,046호, 미국 특허 공개 제20110294218A1호, 미국 특허 제8,628,966호로서 2014년 1월 14일자로 발행된 미국 특허 공개 제20130096182A1호에서 제공되며, 이들 모두는 본 명세서에 완전하게 제시되는 바와 같이 그들의 전문이 본 명세서에 참고로 포함된다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF1(서열번호 20), AAVF2(서열번호 21), AAVF3(서열번호 22), AAVF4(서열번호 23), AAVF5(서열번호 25), AAVF11(서열번호 26), AAVF7(서열번호 27), AAVF8(서열번호 28), AAVF9(서열번호 29), AAVF12(서열번호 30), AAVF13(서열번호 31), AAVF14(서열번호 32), AAVF15(서열번호 33), AAVF16(서열번호 34), AAVF17(서열번호 35), 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF1(서열번호 2), AAVF2(서열번호 3), AAVF11(서열번호 4), AAVF3(서열번호 5), AAVF4(서열번호 6), AAVF6(서열번호 7), AAVF7(서열번호 8), AAVF8(서열번호 9), AAVF9(서열번호 10), AAVF5(서열번호 11), AAVF12(서열번호 12), AAVF17(서열번호 13), AAVF13(서열번호 14), AAVF14(서열번호 15), AAVF15(서열번호 16), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다(예를 들어, 도 1 참조).

[0067] 특정 실시형태에 따르면, 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체의 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 본 명세서에서 교시되는 서열에 대해 본 명세서에 교시된 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 더 바람직하게는 약 98%, 및 가장 바람직하게는 약 99% 서열 동일성을 가질 수 있다. 동일성 백분율은 임의의 다수의 서열 비교 프로그램 또는 방법, 예컨대 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988)], 및 GAP, BESTFIT, FASTA, 또는 TFASTA(위스콘신주 메디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 제네틱스 컴퓨터 그룹의 위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지(Wisconsin Genetics Software Package)), 또는 BLAST(미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information) 웹 사이트를 통해 입수 가능)과 같은 프로그램 실행 비교 알고리즘을 이용하여 계산될 수 있다.

[0068] 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체 서열은 V1 및/또는 V3 cap 유전자 내 하나 이상의 위치에서 변형될 수 있고, 이들 유전자 또는 유전자의 기능성 부분은 별도로 또는 임의의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 및 본 명세서에 기재된 방법과 함께 사용될 수 있다. cap 유전자인 V1, V2 및 V3은 다수의 돌연변이 서열로부터 치환될 수 있고, 전형적으로 공직선(colinear) 방식 V1-V2-V3으로 사용된다. 그러나 서열은 절단, 예컨대 부분적 V1-V2-V3 또는 V1-V3 또는 V1-V1-V2-V3일 수 있다. 예를 들어, 하나의 서열은 AAVF14의 (AAVF4)-V3의 (AAVF8)-V2의 V1일 수 있었다. 바람직하게는, 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAV2의 수준으로 또는 더 고 수준으로 표적 세포를 절단한다.

[0069] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 캡시드 변이체는 캡시드 변이체(예를 들어, 서열번호 20 내지 35, AAV9 캡시드에 대한 변이체), AAV9 캡시드(서열번호 18), AAV2 캡시드(서열번호 19), 변이체, 단편, 또는 이들의 돌연변이체의 하나 이상의 V1, V2 및 V3 폴리뉴클레오타이드 서열의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 캡시드 변이체는 캡시드 변이체(서열번호 20 내지 35, AAV9 캡시드에 대한 변이체), 또는 임의의 다른 공지된 AAV 캡시드, 변이체, 단편, 또는 이들의 돌연변이체의 하나 이상의 V1, V2 및 V3 폴리뉴클레오타이드 서열의 조합을 포함할 수 있다.

[0070] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 캡시드 변이체(서열번호 2 내지 17, AAV9 캡시드에 대한 변이체), AAV9 캡시드(서열번호 1), 변이체, 단편, 또는 이들의 돌연변이체의 V1, V2, 및V3 폴리펩타이드 서열의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 캡시드 변이체는 클레이드 F 캡시드 변이체(서열번호 2 내지 17, AAV9에 대한 변이체), 임의의 다른 공지된 AAV 캡시드, 변이체, 단편, 또는 이들의 돌연변이체의 V1, V2 및 V3 폴리펩타이드 서열의 조합을 포함할 수 있다.

[0071] 일부 실시형태에서, 세포의 게놈을 편집하기 위한 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAV 클레이드 F 캡시드를 포함한다. 일부 실시형태에서, "AAV 클레이드 F 캡시드"는 각각 AAV9의 AAV VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열과 적어도 86%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98% 또는 적어도 99%) 서열 동일성을 갖는 AAV VP1, VP2 및/또는 VP3 서열을 갖는 캡시드를 지칭한다. 예시적인 클레이드 F 캡시드는 AAVF1-17(또한 본 명세서에서 AAVHSC1-17로서 지칭됨), AAV9, AAVHU31, AAVHU32 및 AAVAnc110(예를 들어, 문헌[Zinn

et al. In Silico Reconstruction of the Viral Evolutionary Lineage Yields a Potent Gene Therapy Vector (2015) Cell Reports, Vol 12, pp. 1056-1068] 참조)을 포함한다.

[0072] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 하나 또는 적어도 2개의 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함한다.

[0073] AAV 클레이드 F 캡시드의 예시적인 AAV VP1, VP2 및 VP3 단백질 서열은 이하의 표에 제공된다.

[0074]

AAV 캡시드	VP1	VP2	VP3
AAV9	서열번호 1의 아미노산 1 내지 736	서열번호 1의 아미노산 138 내지 736	서열번호 1의 아미노산 203 내지 736
AAVF1	서열번호 2의 아미노산 1 내지 736	서열번호 2의 아미노산 138 내지 736	서열번호 2의 아미노산 203 내지 736
AAVF2	서열번호 3의 아미노산 1 내지 736	서열번호 3의 아미노산 138 내지 736	서열번호 3의 아미노산 203 내지 736
AAVF3	서열번호 5의 아미노산 1 내지 736	서열번호 5의 아미노산 138 내지 736	서열번호 5의 아미노산 203 내지 736
AAVF4	서열번호 6의 아미노산 1 내지 736	서열번호 6의 아미노산 138 내지 736	서열번호 6의 아미노산 203 내지 736
AAVF5	서열번호 11의 아미노산 1 내지 736	서열번호 11의 아미노산 138 내지 736	서열번호 11의 아미노산 203 내지 736
AAVF6	서열번호 7의 아미노산 1 내지 736	서열번호 7의 아미노산 138 내지 736	서열번호 7의 아미노산 203 내지 736
AAVF7	서열번호 8의 아미노산 1 내지 736	서열번호 8의 아미노산 138 내지 736	서열번호 8의 아미노산 203 내지 736
AAVF8	서열번호 9의 아미노산 1 내지 736	서열번호 9의 아미노산 138 내지 736	서열번호 9의 아미노산 203 내지 736

AAVF9	서열번호 10 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 10 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 10 의 아미노산 203 내지 736
AAVF10	서열번호 3 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 3 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 3 의 아미노산 203 내지 736
AAVF11	서열번호 4 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 4 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 4 의 아미노산 203 내지 736
AAVF12	서열번호 12 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 12 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 12 의 아미노산 203 내지 736
AAVF13	서열번호 14 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 14 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 14 의 아미노산 203 내지 736
AAVF14	서열번호 15 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 15 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 15 의 아미노산 203 내지 736
AAVF15	서열번호 16 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 16 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 16 의 아미노산 203 내지 736
AAVF16	서열번호 17 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 17 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 17 의 아미노산 203 내지 736
AAVF17	서열번호 13 의 아미노산 1 내지 736	서열번호 13 의 아미노산 138 내지 736	서열번호 13 의 아미노산 203 내지 736

[0075]

[0076] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질; AAV9 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는 AAV9 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 1의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다.

[0077] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 또는 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP2의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP2 단백질; AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1 및 VP3 단백질; 또는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 각각 대응하는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3의 아미노산 서열에 대해 각각 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13 중 임의의 하나의 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대해 각각 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 아미노산 서열 동일성을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다.

[0078] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대해 각각 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP2 단백질; 서열번호 18에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는 서열번호 18에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 서열번호 18에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다.

[0079] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 각각 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 또는 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP2 단백질; 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타

이드 서열에 의해 암호화된 VP1 및 VP3 단백질; 또는 서열번호 20 내지 35 중 임의의 하나에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAVF1 내지 AAVF17 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3을 각각 암호화하는 뉴클레오타이드 서열에 대응하는 서열번호 20, 21, 22, 23, 25, 24, 27, 28, 29, 26, 30, 31, 32, 33, 34 또는 35 중 이의의 하나에 대해 적어도 85%(예를 들어, 적어도 86%, 적어도 88%, 적어도 90%, 적어도 92%, 적어도 94%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 포함하는 뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다.

[0080] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 각각 대응하는 AAV9 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대응하는 AAV9 VP1 및 VP2 캡시드 단백질; 서열번호 1에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAV9 VP1 및 VP3 캡시드 단백질; 또는 서열번호 1에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAV9 VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 1에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAV9 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다.

[0081] 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736에 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1 캡시드 단백질로부터 선택된 VP1 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736 및 아미노산 138 내지 736에 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1 및 VP2 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP1 및 VP2 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP2 및 VP3 캡시드 단백질로부터 독립적으로 선택된 VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 서열번호 2, 3, 5, 6, 11, 7, 8, 9, 10, 4, 12, 14, 15, 16, 17 또는 13에 각각 제시된 바와 같은 아미노산 1 내지 736, 아미노산 138 내지 736 및 아미노산 203 내지 736에 대응하는 AAVF1 내지 AAVF9 및 AAVF11 내지 AAVF17 중 임의의 하나의 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 각각 포함한다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 폴리뉴클레오타이드 서열의 단편은 전장 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 실질적으로 동일한 작용을 제공하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드의 부분일 수 있다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 폴리뉴클레오타이드 서열의 돌연변이체는 특정 폴리뉴클레오타이드 서열에 대해 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 치환, 첨가 및/또는 삽입에 의해 얻을 수 있다. 폴리뉴클레오타이드 서열의 이러한 단편 및/또는 돌연변이체는 전장 폴리뉴클레오타이드 서열에 의해 암호화된 폴리펩타이드와 실질적으로 동일한 작용을 갖는 폴리펩타이드를 암호화한다는 것이 이해되어야 한다.

[0083] 본 명세서에서 사용되는 바와 같은, 폴리펩타이드 서열은 폴리펩타이드 서열의 단편 및/또는 돌연변이체를 포함할 수 있는 한편, 여전히 전장 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 작용을 제공할 수 있다. 폴리펩타이드 서열의 단편은 전장 폴리펩타이드 서열과 실질적으로 동일한 작용을 제공하는 폴리펩타이드 서열의 부분을 의미한다. 폴리펩타이드 서열의 돌연변이체의 예는 폴리펩타이드 서열에 대한 하나 이상의 아미노산의 결실, 치환, 첨가 및/또는 삽입을 포함한다.

[0084] 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 재조합 또는 비-천연 유래 폴리뉴클레오타이드일 수 있다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 cDNA일 수 있다.

[0085] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 본 명세서에 기재된 임의의 AAVF(또는 AAVHSC) 또는 임의의 다른 AAV 클레이드 F 벡터를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 본 명세서에 기재된 임의의 AAVF (또는 AAVHSC) 벡터, 예컨대 AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, 변이체, 단편, 돌연변이체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다. 특정 실시형

태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 임의의 AAV9, AAVF1, AAVF2, AAVF3, AAVF4, AAVF5, AAVF6, AAVF7, AAVF8, AAVF9, AAVF10, AAVF11, AAVF12, AAVF13, AAVF14, AAVF15, AAVF16, AAVF17, AAVHU31, AAVHU32, 변이체, 단편, 돌연변이체, 또는 이들의 임의의 조합을 포함할 수 있다.

[0086] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 게놈의 표적 좌위(또한 본 명세서에서 표적 부위로서 지칭되며, 상기 용어는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용됨을 의미함) 내로 통합될 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열 또는 뉴클레오타이드 간의 결합, 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 5'(예를 들어, 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고, 표적 좌위(표적 부위)의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열), 및 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 상동성을 갖는 편집 구성요소의 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 3'(예를 들어, 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고, 표적 좌위(표적 부위)의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열)을 포함하는 편집 구성요소(또한 본 명세서에서 표적 카세트로서 지칭되며, 용어 "편집 구성요소" 및 "표적 카세트"는 본 명세서에서 상호 호환적으로 사용됨을 의미함)를 포함할 수 있다.

[0087] 특정 실시형태에서, 게놈의 표적 부위 내로 통합될 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 용어 "치료적"은 질환 또는 장애의 치료를 초래하는 물질 또는 과정을 지칭한다. "치료적 뉴클레오타이드 서열"은 치료 효과를 제공하는 뉴클레오타이드 서열이다. 치료 효과는 직접적(예를 들어, 단백질로서 발현되는 유전자의 핵산의 치환 또는 발현을 위해 인트론 내로의 cDNA의 삽입) 또는 간접적(예를 들어, 조절 구성요소, 예컨대 프로모터의 수정)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 치료적 뉴클레오타이드 서열은 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 치료적 뉴클레오타이드 서열은 유전자, 이의 변이체, 단편, 또는 돌연변이체일 수 있다. 특정 실시형태에서, 유전자 요법이 요망될 때, 치료적 뉴클레오타이드 서열은 치료적 항체를 포함하는 치료적으로 유효한 단백질을 암호화하는 임의의 뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 적합한 투여 경로, 예컨대 주사, 흡입, 흡수, 섭취 또는 기타 방법을 통해 치료적 유효량으로 바람직하게 투여된다.

[0088] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 하나의 뉴클레오타이드를 포함하고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 좌위는 하나의 뉴클레오타이드로 이루어진 뉴클레오타이드 서열이며, 표적 좌위는 점 돌연변이를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 적어도 1, 2, 10, 100, 200, 500, 1000, 1500, 2000, 3000, 4000 또는 5000개의 뉴클레오타이드를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 1 내지 5500, 1 내지 5000, 1 내지 4500, 1 내지 4000, 1 내지 3000, 1 내지 2000, 1 내지 1000, 1 내지 500, 1 내지 200, or 1 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 2 내지 5500, 2 내지 5000, 2 내지 4500, 2 내지 4000, 2 내지 3000, 2 내지 2000, 2 내지 1000, 2 내지 500, 2 내지 200, 또는 2 내지 100개의 뉴클레오타이드, 또는 10 내지 5500, 10 내지 5000, 10 내지 4500, 10 내지 4000, 10 내지 3000, 10 내지 2000, 10 내지 1000, 10 내지 500, 10 내지 200, 또는 10 내지 100개의 뉴클레오타이드를 포함하거나 또는 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 엑손, 인트론, 5' 비번역 영역(UTR), 3' UTR, 프로모터, 스플라이스 공여체, 스플라이스 수용체, 서열 암호화 또는 비암호화 RNA, 절연체, 유전자, 또는 이들의 조합물을 포함하거나 또는 이들로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 본 명세서에 기재된 바와 같은 표적 좌위 내의 또는 표적 좌위에 걸친 유전자의 암호 서열의 단편(예를 들어, 2kb 이하, 1kb 이하, 500bp 이하, 250bp 이하, 100bp 이하, 50bp 이하, 또는 25bp 이하)이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 뉴클레오타이드 간의 결합(예를 들어, 2개의 인접한 뉴클레오타이드를 연결하는 포스포다이에스터 결합)이다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 뉴클레오타이드 간의 결합이며, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염색체 내 표적 좌위는 하나 이상의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이고, 편집 구성요소는 염색체 내 표적 좌위에 대한 결실을 포함한다.

[0089] 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 편집 구성요소(또는 표적 카세트)는 하나 이상의 조절 구성요소 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 하나 이상의 조절 구성요소 폴리뉴클레오타이드 서열은 2A 서열, 스플라이스 수용체 서열, 폴리아데닐화 서열, 및 이들의 임의의 조합으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 표적 카세트는 5' 및 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열에 측접하는 하나 이상의 AAV 역위 말단 반복(ITR) 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실

시형태에서, 편집 구성요소(또는 표적 카세트)는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 발현을 유발하는 프로모터를 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 편집 구성요소(또는 표적 카세트)가 프로모터를 포함하지 않는다면, 세포 게놈 내로의 통합 후에 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 발현은 세포의 하나 이상의 조절 구성요소에 의해 제어될 수 있다. 특정 실시형태에서, 프로모터가 없는 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열의 발현은 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열이 세포 내로 정확하게 통합된다는 것을 입증한다.

[0090] 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 게놈의 표적 좌위(표적 부위)의 영역에 대해 상동성일 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 특정 실시형태에서, 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 편집 구성요소(또는 표적 카세트)의 5' 말단에 측접할 수 있다. 특정 실시형태에서, 편집 구성요소(또는 표적 카세트)에 측접하는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 게놈의 표적 좌위(표적 부위)의 상류인 영역에 대해 상동성일 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열일 수 있다. 특정 실시형태에서, 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 편집 구성요소(또는 표적 카세트)의 3' 말단에 측접할 수 있다. 특정 실시형태에서, 편집 구성요소(또는 표적 카세트)에 측접하는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 게놈의 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성일 수 있다. 특정 실시형태에서, 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 대략 500 내지 1,000개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 대략 800개의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 특정 실시형태에서, 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열은 대략 3,000개 까지의 뉴클레오타이드 길이일 수 있다. 일부 실시형태에서, 각각의 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 뉴클레오타이드 길이가 약 50 내지 2000개의 뉴클레오타이드, 예컨대 약 500 내지 1000, 약 600 내지 1000, 또는 약 700 내지 900개의 뉴클레오타이드이다. 일부 실시형태에서, 각각의 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 독립적으로 뉴클레오타이드 길이가 약 600, 약 800, 또는 약 1000개의 뉴클레오타이드이다.

[0091] 일부 실시형태에서, 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 실질적으로 동일한 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 일부 실시형태에서, 5' 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 비대칭적 뉴클레오타이드 길이를 가진다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 길이의 비대칭은 길이로 50%까지의, 예컨대 길이로 40%, 30%, 20% 또는 10% 차이까지의 5'과 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 길이 사이의 차이로 정의된다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 길이의 비대칭은 5' 및 3' 상동성 아암 중 하나의 아암이 약 600개의 뉴클레오타이드 길이를 갖고, 5' 및 3' 상동성 아암 중 다른 하나의 아암은 약 800 또는 약 900개의 뉴클레오타이드 길이를 갖는 것으로 정의된다.

[0092] 일부 실시형태에서, 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 적어도 약 90%(예를 들어, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 99.5%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 적어도 약 90%(예를 들어, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 96%, 적어도 약 97%, 적어도 약 98%, 적어도 약 99% 또는 적어도 약 99.5%) 뉴클레오타이드 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체의 5' 상동성 아암 또는 3' 상동성 아암 및 대응하는 5' 영역 또는 3' 영역의 뉴클레오타이드 서열의 차이는 각각 뉴클레오타이드 서열의 비암호 차이를 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체의 5' 상동성 아암 또는 3' 상동성 아암 및 대응하는 5' 영역 또는 3' 영역의 뉴클레오타이드 서열의 차이는 각각 보존적 아미노산 변화(예를 들어, 상이한 염기성 아미노산으로 바뀐 염기성 아미노산)를 초래하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하거나, 이것으로 본질적으로 이루어지거나 또는 이루어질 수 있다. 일부 실시형태에서, 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 가지며, 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 3' 영역에 대해 100% 서열 동일성을 가진다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위가 5' 또는 3' 상동성 아암에 비해 하나 이상의 돌연변이, 예컨대 하나 이상의 천연 유래 SNP를 포함한다고 해도, 5' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열 및 3' 상동성 아암 뉴클레오타이드 서열은 표적 좌위에 대한 포유류 염색체의 5' 영역 및 3' 내에서 각각 상동성으로 고려된다.

[0093] 특정 실시형태에서, 세포 게놈의 표적 좌위(표적 부위)는 세포 게놈의 편집이 일어날 것이 요망되는 게놈의 임의의 영역일 수 있다. 예를 들어, 세포 게놈의 표적 좌위(표적 부위)는 세포의 염색체 좌위(예를 들어, 포유류 염색체의 영역)을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 염색체의 좌위는 안전한 은닉 부위일 수 있다. 안전한

은닉 부위는 뉴클레오타이드 서열이 내인성 유전자 활성을 섭동하는 일 없이 예측 가능한 방식으로 통합하고 작용할 수 있는 게놈 내 위치이다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 인간 염색체 19에서의 AAVS1 좌위(또한 PPP1R12C 좌위로서 알려짐)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 인간 염색체 19에서의 AAVS1 좌위 내 PPP1R12C의 제1 인트론일 수 있다. 염색체 19 qter13.3 내지 13.4에 대한 AAVS1 좌위는 본 명세서에 삽입된 유전자는 병원성 결과 없이 발현되는데, 이는 병원성 결과 없이 이 좌위에서 통합하는 야생형 AAV와 유사하기 때문에 이식유전자의 삽입을 위한 "안전한 은닉" 부위가 되는 것이 이전에 나타났다(Giraud 1994; Linden, 1996A; Linden 1996B). 일부 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 본 명세서에 기재된 바와 같은 질환 상태와 관련된 좌위이다.

[0094] 특정 실시형태에서, 표적 좌위는 대응하는 야생형 포유류 염색체에 대해 하나 이상의 돌연변이체 뉴클레오타이드를 포함하는 포유류 염색체 내 돌연변이체 표적 좌위이다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 점 돌연변이, 미스센스 돌연변이, 넌센스 돌연변이, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 삽입, 하나 이상의 뉴클레오타이드의 결실, 또는 이들의 조합을 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 비형태적 돌연변이, 신형태적 돌연변이, 또는 반정형 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 상염색체 우성 돌연변이, 상염색체 열성 돌연변이, 이형 접합적 돌연변이, 동형 접합적 돌연변이, 또는 이들의 조합을 포함한다. 본 명세서에 기재된 돌연변이체 표적 좌위 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 돌연변이체 표적 좌위는 포유류 염색체 내의 프로모터, 인핸서, 신호 서열, 인트론, 엑손, 스플라이스 공여체 부위, 스플라이스 수용체 부위, 내부 리보솜 유입 부위, 역위 엑손, 절연체, 유전자, 염색체 역위, 및 염색체 전좌로부터 선택된다.

[0095] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염색체 내 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 여기서 n은 1 이상의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, 또는 그 사이의 임의의 정수)이고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n과 동일한 정수이고, 편집 구성요소는 염색체의 표적 좌위의 치환을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염색체 내 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 여기서 n은 1 이상의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, 또는 그 사이의 임의의 정수)이며, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n 초과의 정수이고, 편집 구성요소는 염색체의 표적 좌위의 치환적 첨가를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염색체 내 표적 좌위는 n개의 뉴클레오타이드를 포함하는 뉴클레오타이드 서열이며, 여기서 n은 2 이상의 정수(예를 들어, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, 또는 그 사이의 임의의 정수)이고, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하며, 여기서 m은 n 미만의 정수이고; 편집 구성요소는 염색체의 표적 좌위의 치환적 결실을 나타낸다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 염색체 내 표적 좌위는 뉴클레오타이드 간의 결합이며, 본 명세서에 기재된 바와 같은 편집 구성요소는 m개의 뉴클레오타이드를 포함하고, 여기서 m은 1 이상의 정수(예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 100, 500, 1000, 2000, 3000, 4000. 5000, 또는 그 사이의 임의의 정수)이며; 편집 구성요소는 염색체의 표적 좌위에 대한 첨가를 나타낸다.

[0096] 일부 실시형태에서, 염색체 내 표적 좌위는 포유류 염색체(예를 들어, 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트, 또는 토끼 염색체) 내 표적 좌위이다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 인트론을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 엑손을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 비암호 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 표적 좌위는 포유류 염색체의 조절 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 인간 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, X 및 Y로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 마우스 염색체 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, X 및 Y로부터 선택된다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 인간 염색체 19가 아니다. 일부 실시형태에서, 포유류 염색체는 체세포 염색체이다. 예시적인 체세포는 본 명세서에 추가로 기재된다.

[0097] 특정 실시형태에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열 또는 편집 구성요소는 통합 전에 DNA 절단에 대한 필요 없이 상동성 재조합을 통해 게놈 내로 통합될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 서열 또는 편집 구성요소는 외인성 뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 RNA 가이드 뉴클레아제(CRISPR/Cas)의 첨가에 대한 필요 없이 상동성 재조합을 통해 게놈 내로 통합될 수 있다.

[0098] 특정 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체에 의해 편집된 세포는 임의

의 유형의 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 매우 다양한 포유류 세포, 예를 들어 간, 폐, 연골 및 기타 결합조직, 눈, 중추 및 말초 신경계, 림프계, 뼈, 근육, 혈액, 뇌, 피부, 심장 및 소화관의 세포일 수 있다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체에 의해 편집될 세포가, 예를 들어 간 세포일 때, 삽입된 뉴클레오타이드 서열은 병태를 치료하거나(장애를 개선 또는 치유하거나 또는 질환 또는 장애의 추가적인 진행을 중단시킴) 또는 예방하도록 지시된다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체에 의해 편집될 세포가 간 세포일 때, 치료 또는 예방될 간 병태는, 간 병태 중에서도 혈우병, 효소 전달, 경변증, 암 또는 죽상 동맥 경화증을 포함한다. 특정 실시형태에서, 세포는 체세포(예를 들어, 포유류 체세포)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포(예를 들어, 체세포, 예컨대 포유류 체세포)는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포(예를 들어, 체세포, 예컨대 포유류 체세포)는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래될 수 있다. 일부 실시형태에서, 세포는 CD34+ 세포(예를 들어, CD34+ 체세포)이다. 일부 실시형태에서, 세포(예를 들어, 체세포, 예컨대 포유류 체세포)는 간 세포, 섬유아세포, 유방 세포, 림프구 또는 망막 세포이다.

[0099] 본 명세서에 나타낸 바와 같이, 본 명세서에 기재된 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체와 함께 패키징된 AAV는 특정 표적 조직, 예컨대 혈액 줄기 세포, 간, 심장, 눈, 유방 및 관절 조직에 대한 특이적 향성을 보이며, 표적 조직 내로 관심 대상의 유전자의 도입을 위해 줄기 세포를 형질도입하는 데 사용될 수 있다. 특정 벡터는 혈액 뇌 장벽과 같은 밀착 제어된 생물학적 연접을 가로지를 수 있는데, 이는 벡터에 대해 추가적인 신규한 용도 및 표적 기관을 개시하여, 게놈 편집을 통한 유전자 요법 방법을 제공한다. 따라서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 그들의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체에 기반하여 특정 세포에 대한 향성을 입증할 수 있다. 예를 들어 a) 근육 조직 또는 세포에 대해, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF5, AAVF7, AAVF13, AAVF15 및 AAVF17의 군으로부터 선택될 수 있고; b) 심장 또는 폐 조직 또는 세포에 대해, 벡터는 AAVF13, AAVF15 및 AAVF17의 군으로부터 선택될 수 있으며; c) 간 또는 CNS 조직 또는 세포에 대해, 벡터는 AAVF5, AAVF13, AAVF17, AAVF7 또는 AAVF15로부터 선택될 수 있고; d) 줄기 세포에 대해, 벡터는 AAVF17일 수 있으며; e) B 세포 전구체에 대해, 벡터는 AAVF5일 수 있고; f) 골수성 및 적혈구 전구체에 대해, 벡터는 AAVF12일 수 있으며; 그리고 g) 림프절, 신장, 비장, 연골 및 뼈 조직 또는 세포에 대해, 벡터는 AAVF7, AAVF13, AAVF15 및 AAVF17의 군으로부터 선택된 벡터의 군으로부터 선택될 수 있다.

[0100] 추가로, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 다양한 태그, 예컨대 6-His 태그 또는 친화도 태그를 포함하는 세포에 대해, 또는 인터페론 반응, 예컨대 병원성 또는 종양 세포에 반응하여 투여된 천연 유래 항체 유발 또는 도입 단클론성 항체에 대해 향성을 가질 수 있다.

[0101] 특정 실시형태에서, 세포는 줄기 세포(예를 들어, 포유류 줄기 세포)일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포 또는 간충직 줄기 세포를 포함하는 임의의 유형의 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포(예를 들어, 포유류 줄기 세포)는 조혈 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, 골수 줄기 세포, 태아 간 줄기 세포, 또는 말초혈액 줄기 세포일 수 있다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 CD34+ 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포(예를 들어, 포유류 줄기 세포)는 조혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포일 수 있다. 줄기 세포의 형질도입은 일시적 또는 영구적(또는 지속적으로 불림)일 수 있다. 일시적이라면, 일 실시형태는 치료적 뉴클레오타이드가 벡터에 의해, 벡터에 부착된 물질에 의해 또는 외부 인자 또는 힘에 의해 제어되도록 사용되거나 또는 발현되는 시간의 길이를 허용한다.

[0102] 특정 실시형태에서, 세포는 CD34+ 조혈줄기 세포주(HSC), K562 CD34+ 백혈병 세포주, HepG2 인간 간 세포주, 말초혈액 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, CD34+ 말초혈액 줄기 세포, WI-38 인간 이배체 섬유아세포 세포주, MCF7 인간 유방암 세포주, Y79 인간 망막아세포종 세포주, SCID-X1 LBL 인간 EBV-불멸 B 세포주, 1차 인간 간세포, 1차 간내 혈관내피 세포, 및 1차 골격근 근원세포로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0103] 또한 본 명세서에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계를 포함하는, 대상체 세포의 게놈을 생체 밖 편집하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계는 추가적인 외인성 뉴클레아제, 예컨대 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 RNA 가이드 뉴클레아제(CRISPR/Cas) 없이 일어날 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 임의의 유형의 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 줄기 세포일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 줄기 세포의 게놈을 편집하는 방법은 하나 이상의 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 줄기 세포를 형질도입하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포의 형질도입은 추가적인 외인성 뉴클레아제에 대한

필요 없이 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 바와 같은 체세포일 수 있다. 예를 들어, 특정 실시형태에서, 체세포의 게놈을 편집하는 방법은 하나 이상의 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 체세포를 형질도입하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 체세포의 형질도입은 추가적인 외인성 뉴클레아제에 대한 필요 없이 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로의 통합을 위한 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열로부터 선택된 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체(AAV9에 대한 변이체), 편집 구성요소(표적 카세트)를 포함하거나, 또는 게놈의 표적 좌위(표적 부위) 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열, 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 뉴클레오타이드 간의 결합 또는 뉴클레오타이드 서열 또는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열은 통합 전에 DNA 절단을 위한 추가적인 외인성 뉴클레아제에 대한 필요 없이 게놈 내로 통합될 수 있다.

[0104] 또한 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 세포를 형질도입하는 단계 및 추가로 상기 형질도입 세포를 대상체 내로 이식하여 질환 또는 장애를 치료하는 단계를 포함하는, 대상체 세포의 게놈을 생체 밖에서 편집함으로써 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 벡터를 이용하여 상기 대상체의 세포를 형질도입하는 단계를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 세포는 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이 형질도입될 수 있다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용한 세포의 형질도입은 본 명세서에 제공된 바와 같이 또는 당업자에게 공지된 임의의 형질도입 방법에 의해 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 감염다중도(MOI) 50,000; 100,000; 150,000; 200,000; 250,000; 300,000; 350,000; 400,000; 450,000; 또는 500,000에서, 또는 세포의 최적의 형질도입을 제공하는 임의의 MOI에서 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 형질도입될 수 있다. 특정 실시형태에서, 형질도입된 세포는 대상체 내로 추가로 이식되되, 형질도입 세포는 질환 또는 장애를 치료한다. 특정 실시형태에서, 세포는 본 명세서에 기재된 임의의 세포 유형일 수 있다.

[0105] 또한 본 명세서에 기재된 바와 같은 포유류 게놈의 표적 좌위의 편집 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV)를 이용하여 포유류 게놈을 포함하는 세포(예컨대 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트 또는 토끼 세포)를 형질도입하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 포유류로부터의 포유류 세포를 얻는 단계(예컨대 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트 또는 토끼); (b) 생체밖에서 포유류 세포를 배양하여 생체 밖 배양물을 형성하는 단계; (c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 생체 밖 배양물에서 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV)를 이용하여 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및 (d) 형질도입된 포유류 세포를 포유류에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 상기 방법은 (a) 제1 포유류로부터 포유류 세포를 얻는 단계; (b) 생체밖에서 포유류 세포를 배양하여 생체 밖 배양물을 형성하는 단계; (c) 형질도입된 포유류 세포를 형성하기 위해 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, 생체 밖 배양물 내 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV)를 이용하여 포유류 세포를 형질도입하는 단계; 및 (d) 형질도입된 포유류 세포를 제2 포유류에 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 제1 포유류와 제2 포유류는 상이한 종이다(예를 들어, 제1 포유류는 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트 또는 토끼이고, 제2 포유류는 상이한 종이다). 일부 실시형태에서, 제1 포유류와 제2 포유류는 동일한 종이다(예를 들어, 둘 다 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트 또는 토끼이다). 일부 실시형태에서, 상기 방법은 생체내 AAV를 이용하여 포유류 세포를 형질도입하는 데 효과적인 양으로 포유류(예컨대 인간, 마우스, 소, 말, 개, 고양이, 래트 또는 토끼)에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, 캡시드에 동봉된 수정 게놈을 포함하는 복제-결함 AAV)를 투여하는 단계를 포함한다.

[0106] 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 결합조직(혈액을 포함), 근육 조직, 신경 조직 및 상피 조직으로 이루어진 군으로부터 선택된 조직으로부터 유래된다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 폐, 심장, 간, 신장, 근육, 뇌, 눈, 유방, 뼈 및 연골로 이루어진 군으로부터 선택된 기관으로부터 유래된다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 줄기 세포이다. 일부 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포 또는 말초혈액 줄기 세포이다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 포유류 세포는 CD34+ 세포이다.

[0107] 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV(예를 들어, 클레이드 F AAV)는 외인성 뉴클레아제를 암호화하는 외인성 뉴클레아제 또는 뉴클레오타이드 서열을 공동형질도입 또는 공동투여하는 일 없이 형질도입 또는

투여된다. 예시적인 외인성 뉴클레아제는 아연 핑거 뉴클레아제(ZFN), 전사 활성화인자-유사 효과기 뉴클레아제(TALEN), 또는 RNA 가이드 뉴클레아제(CRISPR/Cas)를 포함한다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV는 외인성 아연 핑거 뉴클레아제를 암호화하는 외인성 아연 핑거 뉴클레아제 또는 뉴클레오타이드 서열을 공동 형질도입 또는 공동 투여하는 일 없이 형질도입 또는 투여된다. 일부 실시형태에서, 아연 핑거 뉴클레아제는 AAVS1 좌위를 표적화하는 DNA-결합 도메인(예를 들어, AAVS1 좌위 내 PPP1R12C의 제1 인트론을 표적화하는 DNA-결합 도메인)을 포함하는 아연 핑거 뉴클레아제이다.

[0108] 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV(예를 들어, 클레이드 F AAV)는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%(예를 들어, 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 약 100%)의 염색체 통합 효율을 가진다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV(예를 들어, 클레이드 F AAV)는 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 편집 구성요소를 통합하기 위해 적어도 약 1%(예를 들어, 적어도 약 2%, 적어도 약 3%, 적어도 약 4%, 적어도 약 5%, 적어도 약 10%, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 70%, 적어도 약 80%, 적어도 약 90%, 적어도 약 95%, 적어도 약 98% 또는 약 100%)의 염색체 통합 효율을 가진다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 수정 게놈의 편집 구성요소는 염색체 통합 효율 10% 내지 70%, 20% 내지 70%, 40% 내지 70%, 50% 내지 70%, 10% 내지 80%, 20% 내지 80%, 40% 내지 80%, 50% 내지 80%, 10% 내지 90%, 20% 내지 90%, 40% 내지 90%, 50% 내지 90%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 40% 내지 100% 또는 50% 내지 100%의 포유류 세포 범위로 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된다. 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, 수정 게놈의 편집 구성요소는 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때, 염색체 통합 효율 10% 내지 70%, 20% 내지 70%, 40% 내지 70%, 50% 내지 70%, 10% 내지 80%, 20% 내지 80%, 40% 내지 80%, 50% 내지 80%, 10% 내지 90%, 20% 내지 90%, 40% 내지 90%, 50% 내지 90%, 10% 내지 100%, 20% 내지 100%, 40% 내지 100% 또는 50% 내지 100% 포유류 세포의 범위로 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된다.

[0109] 상기 방법 중 임의의 하나의 일부 실시형태에서, AAV(예를 들어, 클레이드 F AAV)는 포유류 염색체의 표적 좌위 내로 통합된 편집 구성요소를 포함하는 대립유전자에 대해 세포 집단에서의 대립유전자 빈도 적어도 약 10%(예를 들어, 적어도 약 20%, 적어도 약 30%, 적어도 약 40%, 적어도 약 50%, 적어도 약 60%, 적어도 약 75%, 적어도 약 85%, 적어도 약 90% 또는 적어도 약 95%)를 추가로 특징으로 하는 염색체 통합 효율을 가진다. 일부 실시형태에서, 세포 집단 내 대립유전자 빈도는 생체내 세포 집단, 예컨대 시험관 내 본 명세서에 제공된 세포 유형의 집단(예를 들어, CD34+ 조혈줄기 세포주(HSC), K562 CD34+ 백혈병 세포주, HepG2 인간 간 세포주, 말초혈액 줄기 세포, 제대혈 줄기 세포, CD34+ 말초혈액 줄기 세포, WI-38 인간 이배체 섬유아세포 세포주, MCF7 인간 유방암 세포주, Y79 인간 망막아세포종 세포주, SCID-X1 LBL 인간 EBV-불멸 B 세포주, 1차 인간 간세포, 1차 간내 혈관내피 세포, 또는 1차 골격근 근원세포)에서의 대립유전자 빈도이다.

[0110] 특정 실시형태에 따르면, 대상체의 줄기 세포의 게놈을 생체 밖 편집하는 단계 및 추가로 질환 또는 장애를 치료하기 위해 상기 편집된 세포를 대상체 내로 이식하는 단계에 의해 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, 대상체의 줄기 세포 게놈을 편집함으로써 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 이용하여 대상체의 줄기 세포를 형질도입하는 단계 및 상기 형질도입된 줄기 세포를 대상체 내로 이식하는 단계를 포함할 수 있되, 상기 형질도입된 줄기 세포는 질환 또는 장애를 치료한다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체, 줄기 세포 게놈 내 표적 좌위(표적 부위) 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포를 형질도입하는 것은 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이 수행될 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열은 통합 전에 DNA 절단을 위한 추가적인 외인성 뉴클레아제에 대한 필요 없이 게놈 내로 통합될 수 있다.

[0111] 특정 실시형태에서, 세포가 줄기 세포일 때, 치료되는 질환 또는 장애는 게놈의 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기되는 임의의 질환 또는 장애일 수 있다. 특정 실시형태에서, 치료되는 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환, 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택된다. 특정 실시형

태에서, 편집될 세포가 줄기 세포일 때, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF7, AAVF12, AAVF15, AAVF17, 변이체, 돌연변이체, 및 이들의 조합의 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 편집될 세포가 줄기 세포일 때, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF5, AAVF7, AAVF12, AAVF15, AAVF17, 변이체, 돌연변이체, 및 이들의 조합의 군으로부터 선택될 수 있다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF7(서열번호 27), AAVF12(서열번호 30), AAVF15(서열번호 33), AAVF17(서열번호 35), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 조합의 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF5(서열번호 25), AAVF7(서열번호 27), AAVF12(서열번호 30), AAVF15(서열번호 33), AAVF17(서열번호 35), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 조합의 군으로부터 선택된 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 조합으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF7(서열번호 8), AAVF12(서열번호 12), AAVF15(서열번호 16), AAVF17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다.

[0112] 다른 실시형태에서, $CD34^+$ HSC로부터 또는 다른 공급원으로부터 게놈 편집할 수 있는 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 HSC 및 iPSC를 포함하는 줄기 세포, 및 기타 세포, 예컨대 심장, 관절, 뇌를 포함하는 중추 신경계, 근육 및 간의 세포의 고효율 형질도입을 위해 사용될 수 있다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체가 시험관내에서 사용된다면, 연구 및 조사 목적을 위해 또는 그들은 이후에 대상체 내로 이식될 세포 또는 조직을 준비하기 위해 사용될 수 있다. 바람직하게는, 대상체는 포유류, 예컨대 인간이지만, 본 벡터 및 해당 벡터를 이용하는 방법에 의해 형질도입될 수 있는 조직을 갖는 임의의 다른 동물일 수 있다. 본 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 인간과 수의학적 용도 둘 다에 적합하다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 또한 줄기 세포, 예컨대 HSC의 일시적 형질도입을 위해 시험관내에서 사용될 수 있다. 형질도입의 길이는 배양 조건에 의해 제어될 수 있다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체가 생체내에서 사용된다면, 그들은 표적 세포, 예컨대 간 또는 연골 세포에서의 흡수 또는 사용을 위한 요법을 받는 대상체에게 직접 투여될 수 있다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체가 중추 신경계의 세포를 형질도입하는 데 사용된다면, 그들은 바람직하게는 혈액-뇌 장벽을 가로지를 수 있고, 그들의 효능을 유지한다.

[0113] 또한 대상체에게 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접적으로 투여함으로써 대상체 세포의 생체내 게놈 편집에 의해 대상체 내 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 제공된다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 본 명세서에 기재된 임의의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체일 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 the AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체, 줄기 세포의 게놈 내 표적 좌위(표적 부위) 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위) 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 투여되는 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 대상체 세포의 게놈 편집에 의해 질환 또는 장애를 치료한다. 특정 실시형태에서, 생체내 게놈 편집은 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이 생길 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 본 명세서에 제공된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드 서열은 미국 특허 공개 제20130096182A1호의 도 1에서 또는 본 명세서의 도 1에서 제공되는 서열로부터 선택될 수 있다, 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 조합. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 바람직하게는 적합한 투여 경로, 예컨대 주사, 흡입, 흡수, 섭취 또는 기타 방법을 통해 치료적 유효량으로 투여된다.

[0114] 문헌[Xu *et al.*, Wang *et al.*, 및 Carbonaro *et al.*]을 포함하는 이전의 연구는 바이러스 벡터의 생체내 전달 후 HSC의 형질도입을 나타내었다(문헌[Xu 2004; Wang 2014; 및 Carbonaro 2006] 참조). 그러나, 모두 3가지의 이들 연구는 레트로바이러스(Xu 2004) 또는 렌티바이러스(Wang 2014 및 Carbonaro 2006)를 수반하였다. 추가적으로, 문헌[Xu *et al.* 및 Carbonaro *et al.*]의 주사를 신생아 마우스에서 수행하였고, 라파마이신 미치 대퇴부내 주사는 문헌[Wang et al.]의 효율적인 형질도입을 위해 필요하였다. 그러나, 이들 논문 중 어떤 것도 성체

마우스 내로의 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 생체내 형질도입에 의한 형질도입을 보고하지 않는다. 실시예 3에서 제공하는 신규한 결과는 정맥내 주사에 의한 HSC 상의 AAV 벡터 형질도입을 처음으로 나타낸다.

[0115] 이하의 실시예 3에 나타내는 바와 같이, AAVF7 또는 AAVF17에 의해 위형화된 클레이드 F 벡터(또는 AAV 벡터 변이체)의 정맥내 주사는 생체내 인간 CD34+ 조혈 줄기 및 전구세포의 형질도입을 초래하였다. 정맥내 주사된 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터는 인간 조혈작용 부위로 수송되고, 인간 세포를 형질도입하였다. 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 정맥내 주사는 인간 CD34+ 줄기 전구세포뿐만 아니라 그들의 CD45+ 자손에서 비너스 발현을 초래하였다. 이들 데이터는 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체의 정맥내 주사가 줄기 세포 채취, 생체밖 형질도입, 수용인의 조건화 및 형질도입된 세포의 후속적인 이식에 대한 필요 없이 생체내 게놈 공학처리를 위해 사용될 수 있다는 것을 나타낸다. 이 접근은 전세계의 환자에 대해 줄기 세포 유전자 요법을 상당히 더 안전하고, 더 접근가능하게 하며, 덜 비싸고, 입원에 대한 필요를 회피한다.

[0116] 특정 실시형태에서, 대상체에 대해 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 직접 투여함으로써 대상체 세포의 생체내 게놈 편집에 의해 대상체에서 질환 또는 장애를 치료하는 방법이 개시된다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체, 게놈의 표적 좌위(표적 부위) 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 편집 구성요소(표적 카세트), 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 편집 구성요소(표적 카세트)에 측접하고 표적 좌위(표적 부위)의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함할 수 있되, 상기 벡터는 대상체의 세포를 형질도입하고, 세포의 게놈 내로 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 통합한다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF1(서열번호 2), AAVF2(서열번호 3), AAVF11(서열번호 4), AAVF3(서열번호 5), AAVF4(서열번호 6), AAVF6(서열번호 7), AAVF7(서열번호 8), AAVF8(서열번호 9), AAVF9(서열번호 10), AAVF5(서열번호 11), AAVF12(서열번호 12), AAVF17(서열번호 13), AAVF13(서열번호 14), AAVF14(서열번호 15), AAVF15(서열번호 16), AAVF16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF7(서열번호 8) 또는 AAVF17(서열번호 13)의 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 AAVF5(서열번호 11), AAVF(서열번호 8) 또는 AAVF17(서열번호 13)의 폴리펩타이드 서열을 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대한 프로모터를 포함하지 않는다. 특정 실시형태에서, 표적 좌위(표적 부위)는 안전한 은닉 부위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위일 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포는 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포일 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 세포 게놈 내 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기될 수 있다. 특정 실시형태에서, 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환, 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택될 수 있다.

[0117] 생체내 적용의 효능을 추가로 입증함에 있어서, (AAV9에 대해) 단리물 변이체를 이용하는 면역 결핍 마우스에 대한 형질도입 세포의 이식은 연장 및 지속된 이식유전자 발현을 초래하였고, 유전자 요법을 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 전신으로 전달될 때, 이들 벡터는 유전성, 후천성, 감염 및 발암성 질환의 요법과 관련하여 간 및 연골에 대해 향성을 나타낸다. 간 형질도입에 대해, 본 AAV 단리물은 간에 대한 전신 유전자 전달을 위한 현재의 금본위인 AAV8보다 대략 10배 더 높은 간 형질도입 수준을 가진다. 이 특성은 혈우병, 효소 결핍 질환 및 죽상 동맥 경화증과 같은 질환에 대해 간으로부터의 유전자 기반 효소 대체 요법을 위해 이용될 수 있다. 조직에서 연골 조직에 대한 본 AAV 단리물의 추가적인 향성은 골 장애, 예컨대 관절염, 골다공증 또는 기타 연골/골계 질환의 치료를 위해 이용될 수 있다. 변이체 서열 및 방법은 따라서 장기간 통합이 바람직하지 않은 일시적 형질도입을 위해 사용될 수 있다.

[0118] AAV 클레이드 F 캡시드 패밀리 또는 AAV 캡시드 변이체 패밀리의 구성원은 HSC, 예를 들어, AAVF 15 및 AAVF 17을 형질도입하여 지속된 유전자 발현과 함께 장기간 생착이 생기게 하며, 따라서 줄기 세포 유전자 요법 벡터에 대한 강한 후보가 된다. AAVF17 및 AAVF15(또한 약어 형태로 "HSC17" 및 "HSC15"로서 지칭됨)는 이식 후 22주까지의 가장 고수준의 장기간 생체내 형질도입을 뒷받침하였다. AAV 변이체의 정맥내 주사 후 일련의 생체발광 이미징은 AAVF15가 일반적으로 생체내에서 가장 고수준의 장기간 이식유전자 발현을 뒷받침한다는 것을 나타내었다. AAVF13 및 17을 포함하는 다른 AAV 변이체는 또한 강한 생체내 형질도입을 뒷받침하였다.

[0119] AAVF15는 AAV9보다 약 5 내지 10배 더 크게 고도로 간 향성인 것이 발견되었다. AAVF13 및 AAVF15는 또한 AAV9

보다 적어도 10배 더 양호하게 심장 및 골격근을 형질도입하였다. 시험관내 중화 역가는 풀링한 인간 IVIG에서 AAVF 1-9 캡시드에 대한 항체의 우세함이 AAV9와 유사한 반면, AAVF13, AAVF15, AAVF16 및 AAVF17에 대한 항체는 다소 덜 우세하였다는 것을 나타내었다. 생체내 중화 분석은 AAV9에 비해 AAVF15에 의한 IVIG 투여 후에 간 및 근육에서 100-배 이상으로 더 높은 벡터 게놈 복제물/세포가 발견되었다는 것을 확인하였는데, 이는 이미 존재하는 항체가 AAVF15를 완전하게 중화시키지 않는다는 것을 시사한다. 근질환 또는 장애는 심장, 예컨대 관상 동맥 심장 질환 또는 심근병증을 포함하는 질환 또는 장애를 갖는 근세포를 포함하는 임의의 세포, 조직, 기관 또는 계를 포함할 수 있다.

[0120] 추가로, 부위 특이적 돌연변이유발 실험은 AAVF15에서의 R505G 돌연변이가 향상된 간 향성을 초래한다는 것을 나타낸다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 사용하여 혈우병, 죽상 동맥 경화증 및 대사의 다양한 선천이상과 같은 유전적 질환의 전체 숙주를 치료할 수 있다. 일 예에서, AAVF15는 혈우병 B를 효과적으로 치료한다. 이들 패밀리의 일부 구성원은 또한 관절 및 연골 질환, 예컨대 관절염을 치료하기 위해 사용될 수 있는 전신 주사 후에 관절을 표적화한다. 패밀리의 다른 구성원은 정맥내 주사 시 심장을 표적화한다. 패밀리의 또 다른 구성원은 뇌를 표적화한다. 일부 실시형태에서, AAVF5 캡시드 단백질을 포함하는 벡터는 본 명세서에 제공된 방법, 키트 또는 조성물의 부분으로서 제공되는데, AAVF5가 다양한 세포 유형을 형질도입하는 것으로 나타났기 때문이다(도 4 참조).

[0121] 특정 실시형태에서, 게놈 편집에 의해 대상체에서 신경학적 질환 또는 장애를 치료하는 방법은 혈액-뇌 장벽, 혈액-안구 장벽 또는 혈액-신경 장벽을 가로지를 수 있는 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체를 투여하는 단계를 포함할 수 있다. 본 명세서에 개시된 특정 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 유전자 요법 또는 변형된 바이러스 벡터를 이용하는 진단적 또는 치료적 목적을 위해 임의의 벡터에 접근 가능한 것으로 이전에 알려지지 않은 생물학적 연접을 가로지르는 독특한 능력을 가진다. 이들 연접은 통상적인 특징을 가진다. 혈액-뇌 장벽은 신체 내에서 순환하는 혈액과 중추 신경계 내 세포외액 사이의 분리이며, 모세혈관 주위의 밀착 연접에 의해 생성된다. 혈액-뇌 장벽을 일반적으로 작은 소수성 분자의 확산에 의한 통과만을 허용한다. 혈액-안구 장벽은 국소 혈관과 대부분의 눈 사이에 의해 이루어진 분리이며, 망막 및 홍채 모세관의 내피에 의해 이루어진다. 혈액-신경 장벽은 축삭, 슈반(Schwann) 세포, 및 말초 신경계의 다른 관련된 세포 내에서 작용하고 신경 다발들 및 감싸는 신경주막 내의 신경내막 미세혈관으로 이루어진 생리적 공간이다. 이들 장벽 중 셋에 의해, 내부 환경에서, 여기서는 혈관 및 다른 세포외 공간에서의 급격한 변화로부터 신경을 보호하기 위한 제한된 투과성이 있다. 임의의 이들 장벽을 가로지르는 벡터는 신경학적 질환 또는 장애를 치료하기 위해 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 전달하거나 또는 표지 제제 또는 진단 제제로서 작용하는 독특한 능력을 가진다. 이들 생물학적 장벽을 가로지르는 데 특히 적합한 것으로 실험적으로 입증된 특정 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 AAVF15, AAVF15 A346T 및 AAVF15 R505G를 포함한다.

[0122] 뇌, 척수, 신경절, 운동 신경, 감각 신경, 자율 신경, 시신경, 망막 신경 및 청신경의 질환 또는 장애와 같은 세포 또는 기관 유형에 의해 일반적으로 분류될 수 있는, 당업자에게 잘 공지된 다수의 신경학적 질환 또는 장애가 있다. 예로서, 뇌 질환 또는 장애는 암 또는 기타 뇌 종양, 염증, 박테리아 감염, 광견병을 포함하는 바이러스 감염, 아메바 또는 기생충 감염, 뇌졸중, 마비, 신경퇴행성 장애, 예컨대 알츠하이머병, 파킨슨병, 또는 기타 치매 또는 인지 기능의 감소, 플라크, 뇌병증, 헌팅턴병, 동맥류, 유전적 또는 후천적 기형, 후천적 뇌 손상, 투렛 증후군, 기면증, 근육성이영양증, 미진, 뇌성마비, 자폐증, 다운 증후군, 주의 결핍 및 주의 결핍 과잉행동 장애, 만성 염증, 뇌전증, 혼수, 뇌수막염, 다발성 경화증, 중증 근무력증, 다양한 신경병증, 하지불안 증후군, 및 테이 삭스병을 포함할 수 있다.

[0123] 근질환 또는 장애는 단지 예시로서, 근병증, 만성 피로 증후군, 섬유근육통, 근육성이영양증, 다발성 경화증, 위축증, 경련, 크램핑, 경직, 다양한 염증, 예컨대 피부근육염, 횡문근융해, 근막통증증후군, 종창, 구획 증후군, 호산구 증가 근육통 증후군, 미토콘드리아 근병증, 근경직성 장애, 마비, 건염, 류마티스 다발 근육통, 암 및 힘줄 장애, 예컨대 건염 및 건막염을 포함한다.

[0124] 심장 질환 또는 장애는 단지 예로서, 관상 동맥 질환, 관상 심장병, 울혈성 심부전, 심근병증, 심근염, 심낭질환, 선천성 심장 질환, 암, 심내막염, 및 판막질환을 포함한다.

[0125] 폐 질환 또는 장애는 단지 예로서, 천식, 알레르기, 만성 폐쇄성 폐질환, 기관지염, 폐기종, 낭성 섬유증, 폐렴, 결핵, 폐 부종, 암, 급성 호흡곤란 증후군, 진폐증, 및 간질성 폐 질환을 포함한다.

[0126] 간 질환 또는 장애는 단지 예로서, 암, A, B 및 C형 간염, 경변증, 황달, 및 간 질환을 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 신장 질환 또는 장애는 단지 예로서, 암, 당뇨병, 신증후군, 신장 결석, 후천적 신장 질환, 선

천성 질환, 다낭 신장 질환, 신염, 원발성 옥살산뇨증, 및 시스틴뇨증을 포함한다. 비장 질환 또는 장애는 단지 예로서, 암, 비장 경색, 유육종증, 및 고셰병을 포함한다. 골질환 또는 장애는, 단지 예로서, 골다공증, 암, 낮은 골밀도, 파제트병 및 감염을 포함한다.

[0127] AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체에 의해 또는 이를 이용하여 수송된 치료적 뉴클레오타이드 서열 또는 심지어 소분자를 이용하여 치료되는 임의의 이들 질환 또는 장애에 의해, 치료적 뉴클레오타이드 서열은 단백질 치료제, 예컨대 암--세포자멸사 단백질을 암호화하는 핵산, miRNA, shRNA, siRNA, 기타 RNA-아형 또는 이들의 조합일 수 있다. 일부 실시형태에서, 벡터는 단리되고 본 명세서에 기재된 바와 같이 정제된다. 단리 및 정제는 효능을 증가시키고 오염을 감소시키기 위한 바람직한 생체내 투여이다. 벡터는 하나의 유기체로부터 단리되고 다른 유기체에 도입된 유전자 또는 다른 유전적 물질인 이식유전자를 영구적으로 또는 일시적으로 형질도입할 수 있다. 본 명세서에서, 다른 유기체는 벡터를 받는 대상체일 수 있다.

[0128] 특정 실시형태에서, 게놈 편집을 위한 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 본 명세서에 나타낸 바와 같은 주어진 질환 또는 장애에 대해 주어진 표적 세포 또는 조직에 대한 가장 고효능의 실험 결과에 기반하여 선택될 수 있다. 예를 들어 a) 근육 질환 또는 장애에 대해 그리고 근육을 통해 대상체에게 투여되는 항체 유전자 또는 기타 백신 치료에 대해, AAVF5, AAVF7, AAVF13, AAVF15, 및 AAVF17의 군으로부터 선택되는 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체; b) 심장 및 폐 질환 또는 장애에 대해, AAVF13, AAVF15 및 AAVF17의 군으로부터 선택되는 벡터; c) 간 또는 신경학적 질환 또는 장애에 대해, AAVF5 및 AAVF15로부터 선택된 벡터; d) 줄기 세포을 생착시킴으로써 치료되는 병태에 대해, 벡터 AAVF17; e) B 세포 전구체를 형질도입함으로써 치료되는 병태에 대해, 벡터 AAVF5; f) 골수성 및 적혈구 전구체를 형질도입함으로써 치료되는 병태에 대해, 벡터 AAVF12; 및 g) 림프절, 신장, 비장, 연골 및 뼈 질환 또는 장애에 대해, AAVF7, AAVF13, AAVF15, 및 AAVF17의 군으로부터 선택된 벡터의 군으로부터 선택된 벡터; 여기서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 세포 또는 조직을 형질도입하고, 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열은 세포 게놈 내로 통합되고, 질환 또는 장애를 치료한다. 특정 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 본 명세서에 기재된 세포에 대해 향성을 보이는 (AAV9에 대한) 하나 이상의 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함할 수 있다.

[0129] 대상체는 상기 방법을 위해 작업하는 임의의 동물이지만, 바람직하게는 인간일 수 있는 포유류이다. 벡터가 항체 유전자 또는 기타 백신 치료를 포함한다면, 이는 근육 내 주사를 통해 투여될 수 있고, HIV, 인플루엔자, 말라리아, 파상풍, 홍역, 볼거리, 풍진, HPV, 백일해, 또는 임의의 다른 백신을 포함하는 질환에 대해 면역학적 보호를 제공할 수 있다. 벡터는 패키징, 단리 및 정제될 수 있고, 적어도 하나의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 지니는 임의의 유형의 줄기 세포를 형질도입할 수 있다. 벡터는 이식유전자를 형질도입할 수 있거나 또는 대상체에 대해 및/또는 동일한 종의 다른 대상체에 대해 내인성인 정확한 유전자를 운반한다.

[0130] "AAV"는 아데노 관련 바이러스이다. 상기 용어는 달리 표시되지 않는 한, 바이러스 또는 이의 유도체, 바이러스 아형, 및 천연 유래 및 재조합 형태를 지칭하기 위해 사용될 수 있다. AAV는 AAV-1, AAV-2 등으로서 지칭되는 100종 이상의 상이한 아형을 가지며, 인간과 비인간 유래 AAV를 둘 다 포함한다. 12가지의 AAV 혈청형이 있다. AAV의 다양한 아형은 다수의 상이한 세포 유형을 형질도입하기 위해 재조합 유전자 전달 바이러스로서 사용될 수 있다.

[0131] 폴리뉴클레오타이드에 적용되는 "재조합체"는 폴리뉴클레오타이드가 클로닝, 제한 또는 결실 단계, 및 천연 유래 폴리뉴클레오타이드와 별개인 작제물을 초래하는 기타 절차의 다양한 조합의 산물이라는 것을 의미한다. 재조합 바이러스는 본래의 폴리뉴클레오타이드 작제물의 복제물 및 본래의 바이러스 작제물의 자손을 포함하는 재조합 폴리뉴클레오타이드를 포함하는 바이러스 입자이다. "rAAV 벡터"는 보통 세포의 유전적 형질전환을 위한 관심대상의 서열인, AAV 유래가 아닌 폴리뉴클레오타이드 서열(즉, AAV에 대해 이종성인 폴리뉴클레오타이드)을 포함하는 재조합 AAV 벡터를 지칭한다.

[0132] 본 명세서에 사용되는 바와 같은 AAV에 대한 "헬퍼 바이러스"는 AAV가 포유류 세포에 의해 복제되고 패키징되게 하는 바이러스이다. AAV에 대한 헬퍼 바이러스는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 아데노바이러스(예컨대 하위그룹 C의 아데노바이러스 5형), 헤르페스 바이러스(예컨대, 단순 헤르페스 바이러스, 엡스타인-바르 바이러스, 및 거대세포 바이러스) 및 폭스바이러스를 포함한다.

[0133] "관절 조직"은 연골, 윤활액, 및 하기를 생기게 하거나 또는 하기인 성숙, 전구체 및 줄기 세포를 포함하는 다수의 조직으로 구성된다: (i) 연골 생성 세포; (ii) I형 윤활막세포; (iii) II형 윤활막세포; (iv) 체류 또는 순환 백혈구; (v) 섬유아세포; (vi) 혈관 내피 세포; 및 (vii) 주피세포.

[0134] "복제-적격" 바이러스는 감염성이고 감염 세포에서 복제될 수 있는 바이러스를 지칭한다. AAV의 경우에, 복제 적격은 일반적으로 기능성 AAV 패키징 유전자뿐만 아니라 헬퍼 바이러스 유전자, 예컨대 아데노바이러스 및 단순 헤르페스 바이러스의 존재가 필요하다. 일반적으로, rAAV 벡터는 그들이 하나 이상의 AAV 패키징 유전자가 없기 때문에, 복제 부적격(또한 본 명세서에서 복제 결함으로 지칭됨)이다. 일부 실시형태에서, AAV는 AAV *rep* 유전자 및/또는 AAV *cap* 유전자가 본질적으로 존재하지 않는다면, AAV는 복제 결함(또는 복제-부적격)으로 고려될 수 있다. 일부 실시형태에서, AAV가 AAV *rep* 유전자 및/또는 AAV *cap* 유전자를 결여한다면, AAV는 복제 결함(또는 복제-부적격)으로 고려될 수 있다. 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 변이체 단리물을 포함하는 조성물은 무세포 조성물이다. 조성물은 일반적으로 세포 단백질 및/또는 기타 오염 물질이 없고, 추가적인 구성요소, 예컨대 완충제(예를 들어, 인산염 완충제, 트리스(Tris) 완충제), 염(예를 들어, NaCl, MgCl2), 이온(예를 들어, 마그네슘 이온, 망간 이온, 아연 이온), 보존제, 가용화제 또는 세정제(예를 들어, 비이온성 세정제; 다이메틸설폭사이드)를 포함할 수 있다.

[0135] 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 변이체 단리물 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열은 본 명세서에서 교시되는 서열에 대해 적어도 약 95%, 96%, 97%, 더 바람직하게는 약 98%, 및 가장 바람직하게는 약 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함한다. 백분율 동일성은 임의의 다수 서열 비교 프로그램 또는 방법, 예컨대 문헌[Pearson & Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:2444 (1988)], 및 비교 알고리즘을 실행하는 프로그램, 예컨대 GAP, BESTFIT, FASTA, 또는 TFASTA(위스콘신 제네틱스 소프트웨어 패키지, 위스콘신주 메디슨 사이언스 드라이브 575에 소재한 제네틱 컴퓨터 그룹), 또는 미국 국가생물공학센터 웹사이트를 통해 이용가능한 BLAST을 이용하여 계산될 수 있다.

[0136] 다른 양상에서, 발현 카세트는 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 변이체 단리물 중 하나 이상을 포함하는 폴리펩타이드를 암호화하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 서열은 캡시드 단백질을 포함하는 3개의 유전자인 V1 내지 V3(또한 VP1 내지 VP3으로 지칭됨)의 부분으로 구성된다. 예를 들어, 카세트는 캡시드 AAVF1로부터의 V1, AAV9 hu.14에 비교하는 표준 V2, 및 AAVF17 캡시드로부터의 V3을 포함할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 캡시드는 각각의 캡시드 유전자 성분 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 예를 들어, 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 본 명세서에 제시된 캡시드 서열에 대해 임의의 VP1 내지 VP3(V1 내지 V3)으로부터 선택될 수 있고, 증가된 형질 도입의 목적으로 하는 특성이 달성된다면, 임의의 순서로 그리고 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 예를 들어, 캡시드 서열은 VP1A-VP1B-VP2-VP3(V1A-V1B-V2-V3), VP3-VP1-VP2(V3-V1-V2) 또는 VP1-VP2-VP3A-VP3B(V1-V2-V3A-V3B)일 수 있었다.

[0137] 다른 실시형태는 대상체의 면역화 방법을 포함한다. 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체를 포함하는 조성물은 대상체에서 면역을 초래하는 면역원성 반응을 야기하는 방식으로 대상체에게 도입될 수 있다. 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체는 단독으로 또는 발현 카세트의 부분으로서 조성물 중에 있을 수 있다. 일 실시형태에서, 발현 카세트(또는 폴리뉴클레오타이드)는 유전자 전달 벡터를 이용하여 도입될 수 있다. 유전자 전달 벡터는, 예를 들어 비바이러스 벡터 또는 바이러스 벡터일 수 있다. 예시적인 바이러스 벡터는 신드비스-바이러스 유래 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 렌티바이러스 벡터를 포함하지만, 이들로 제한되지 않는다. 면역학적 반응을 생성하는 데 유용한 조성물은 또한 미립자 담체를 이용하여 전달될 수 있다. 추가로, 이러한 조성물은, 예를 들어, 금 또는 텅스텐 입자 및, 예를 들어 유전차 총을 이용하여 대상체에게 전달되는 코팅 입자 상에서 코팅될 수 있다. 조성물은 또한 리포좀으로서 제형화될 수 있다. 본 방법을 일 실시형태에서, 대상체는 포유류이고, 예를 들어 인간일 수 있다.

[0138] 용어 "친화도 태그"는 제2 폴리펩타이드의 정제 또는 검출을 제공하기 위해 제2 폴리펩타이드에 부착될 수 있거나 또는 기질에 대한 제2 폴리펩타이드의 부착을 위한 부위를 제공할 수 있는 폴리펩타이드 세그먼트를 나타내기 위해 본 명세서에서 사용된다. 원칙적으로, 항체 또는 다른 특정 결합제에 대해 이용 가능한 임의의 펩타이드 또는 단백질은 친화도 태그로서 사용될 수 있다. 친화도 태그는 폴리-히스티딘 트랙인 단백질 A(Nilsson et al., EMBO J. 4:1075, 1985; Nilsson et al., Methods Enzymol. 198:3, 1991), 글루타티온 S 트랜스퍼라제(Smith and Johnson, Gene 67:31, 1988), Glu-Glu 친화도 태그(Grussenmeyer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:7952-4, 1985), 기질 P, 플래그(Flag)(상표명) 펩타이드(Hopp et al., Biotechnology 6:1204-10, 1988), 스트렙타비딘 결합 펩타이드, 또는 기타 항원성 에피토프 또는 결합 도메인을 포함한다. 일반적으로, 문헌[Ford et al., Protein Expression and Purification 2: 95-107, 1991]을 참조하며, DNA 암호화 친화도 태그는 상업적 공급업자로부터 입수 가능하다(예를 들어, Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.).

[0139] 가장 빈번하게 사용되는 이용 가능한 친화도 태그 정제 시스템 중에서, 폴리히스티딘(His) 또는 글루타티온 S-

트랜스퍼라제(GST) 태그를 이용한다. His은 Ni+2 이온을 혼입하는 기질에 대해 양호한 선택성으로 결합하고, 전형적으로 이미노다이아세트산 또는 니트릴로트라이아세트산 킬레이트기에 의해 고정된다. 상기 기법은 고정된 금속 친화도 크로마토그래피로서 알려져 있다. His-태그 단백질의 흡수는 양성자화 및 약한 염기성의 히스티딘기의 결합 능력의 상실을 방지하기 위해 중성 내지 약간 알칼리성의 pH에서 수행된다. 결합 단백질의 용리는 이미다졸 또는 낮은 pH 조건으로의 대체에 의해 야기된다.

[0140] 외래 DNA의 영구적인 도입 없이 체세포로부터 유도 다능성 줄기 세포를 생성하는 방법이 또한 기재된다. 상기 방법은 폴리퀩타이드 서열, 또는 이의 VP1(V1) 또는 VP3(V3) 부분을 암호화하는 본 명세서에 기재된 바와 같은 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 변이체 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 벡터를 이용하여 줄기 세포를 일시적으로 형질도입하는 단계를 수반하였다.

[0141] 이들 및 다른 실험을 위해, 당업자는 AAV를 변형하고 증식시키는 방법을 안다. 예를 들어, AAV-2는 용균성 바이러스로서 그리고 프로바이러스로서 증식될 수 있다. 용균성 성장을 위해, AAV는 헬퍼 바이러스와 함께 공동 감염이 필요하다. 아데노바이러스 또는 단순 헤르페스 중 하나는 헬퍼 기능을 공급할 수 있다. 헬퍼를 이용 가능하지 않을 때, AAV는 AAV 말단과 숙주 서열 사이의 재조합을 수반하는 통합된 프로바이러스로서 지속될 수 있고, 대부분의 AAV 서열은 프로바이러스에서 무손상으로 남아있는다. 숙주 DNA를 통합하기 위한 AAV의 능력은 헬퍼 바이러스가 존재하지 않을 때 증식을 허용한다. AAV 프로바이러스를 운반하는 세포가 후속적으로 헬퍼로 감염될 때, 통합된 AAV 게놈은 구조되고, 생산적 용균성 생활사가 일어난다. 특정 변형을 운반하는 rAAV 벡터의 구성 및, 예를 들어 변형 캡시드에 의한 rAAV 입자의 생성은, 예를 들어 문헌[Shi et al. (2001), Human Gene Therapy 12:1697-1711; Rabinowitz et al. (1999), Virology 265:274-285; Nicklin et al. (2001), Molecular Therapy 4:174-181; Wu et al. (2000), J. Virology 74:8635-8647; 및 Grifman et al. (2001), Molecular Therapy 3:964-974]에서 기재된다.

[0142] 또 다른 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 또는 AAV 입자를 함유하는 약제학적 조성물에 관한 것이다. AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 또는 입자를 함유하는 약제학적 조성물은 바람직하게는 약제학적으로 허용 가능한 부형제, 보조제, 희석제, 비히클 또는 담체, 또는 이들의 조합물을 함유한다. "약제학적으로 허용 가능한 담체"는 조성물의 활성 성분과 조합될 때, 파괴적 생리학적 반응, 예컨대 의도하지 않은 면역 반응을 야기하는 일 없이 생물학적 활성을 보유하는 성분을 허용하는 임의의 물질을 포함한다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 물, 인산염 완충 식염수, 에멀전, 예컨대 오일/물 에멀전 및 습윤제를 포함한다. 이러한 담체를 포함하는 조성물은 문헌[Remington's Pharmaceutical Sciences, current Ed., Mack Publishing Co., Easton Pa. 18042, USA; A. Gennaro (2000) "Remington: The Science and Practice of Pharmacy", 20th edition, Lippincott, Williams, & Wilkins; Pharmaceutical Dosage Forms and Drug De간y Systems (1999) H. C. Ansel et al., 7th ed., Lippincott, Williams, & Wilkins; and Handbook of Pharmaceutical Excipients (2000) A. H. Kibbe et al., 3rd ed. Amer. Pharmaceutical Assoc]에 제시된 것과 같은 잘 공지된 통상적인 방법에 의해 제형화된다. 이러한 담체는 통상적인 방법에 의해 제형화될 수 있고, 적합한 용량으로 대상체에게 투여될 수 있다. 적합한 조성물의 투여는 상이한 방법에 의해, 예를 들어, 정맥내, 복강내, 피하, 근육내, 국소 또는 피내 투여에 의해 달성될 수 있다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 포유류에 대한 투여를 위해 제형화된다. 일부 실시형태에서, 상기 조성물은 정맥내 주사, 피하 주사, 근육내 주사, 자가세포 전달 또는 동종이계 세포 전달을 통해 포유류에 대한 투여용으로 제형화된다. 투여 경로는 물론 특히 약제학적 조성물 중에 함유된 벡터의 종류에 의존한다. 투약 요법은 담당 의사 및 다른 임상 인자에 의해 결정될 것이다. 의료 분야에 잘 공지된 바와 같이, 임의의 하나의 환자에 대한 투약량은 환자의 크기, 체표면적, 연령, 성별, 투여될 특정 화합물, 투여 시간 및 경로, 감염 또는 질환의 종류 및 병기, 일반적 건강 상태 및 기타 동시에 투여 중인 약물을 포함하는 다수의 인자에 의존한다.

[0143] AAV 클레이드 F 벡터 또는 캡시드 변이체 중 일부는 형질도입된 조혈 줄기 세포의 이식 후에 또는 rAAV의 직접적 전신 전달 후에 생체내에서 장기간 안정한 이식유전자 발현을 뒷받침할 수 있다.

[0144] 특정 실시형태에서, 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 캡시드 단리물 변이체를 포함하는 핵산은 새로운 바이러스의 게놈 내로 삽입될 수 있으며, 클레이드 F 캡시드 또는 캡시드 단리물 변이체 유전자의 첨가에서 새로운 바이러스에 대한 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 캡시드 단리물의 동일 또는 유사한 조직 또는 기관 향성을 전달한다. 이러한 유전자 요법은 생체내 및 생체밖 유전자 요법 절차를 이용하여 달성될 수 있다; 예를 들어, 미국 특허 제5,474,935호; 문헌[Okada, Gene Ther. 3:957-964, 1996] 참조. AAV 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 캡시드 변이체 유전자를 이용하는 유전자 요법은 전형적으로 단독으로 또는 치료적 목적을 위해 의도된 다른 유전자와 함께 시험관내 표적 유전자를 새로운 바이러스 내로 도입하는 단계를 수반할 것이다. 향성 유전자가 하나 이상의 추가

적인 유전자와 함께 도입된다면, 바람직하게는 얻어진 폴리펩타이드는 클레이드 F 캡시드 또는 AAV 단리물에 대해 향성을 갖는 조직에서 치료적 목적을 위해 투여된다. 이어서, 바이러스는 이러한 요법이 필요한 환자에게 투여될 수 있거나 또는 생체밖에서, 예컨대 이식물을 기다리는 기관에 투여될 수 있다. 바이러스는 레트로바이러스, RNA 바이러스, DNA 바이러스, 예컨대 아데노바이러스 벡터, 아데노 관련 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 헤르페스 바이러스 벡터 등일 수 있다. 새로운 바이러스 벡터가 캡슐화되는 투여를 위한 리포좀을 사용하는 바이러스 벡터를 이용하는 형질감염 방법이 또한 상정된다.

[0145] 본 명세서에 제공된 특정 실시형태에 따르면 본 명세서에 기재된 하나 이상의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체 또는 이의 조성물 또는 제형을 포함하는 키트가 제공된다. 특정 실시형태에서, 키트 내 하나 이상의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체는 세포의 게놈 편집을 위해 사용될 수 있다. 특정 실시형태에서, 키트는 하나 이상의 AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 벡터 변이체에 의해 게놈 편집 효과를 조사하기 위한 연구 도구로서 사용될 수 있다.

[0146] 개시내용의 다른 양상은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 변이체 벡터)의 재조합체 제조를 위한 패키징 시스템 및 이의 사용 방법에 관한 것이다. 일부 실시형태에서, 패키징 시스템은 하나 이상의 AAV Rep 단백질을 암호화하는 Rep 뉴클레오타이드 서열; 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 캡시드의 하나 이상의 AAV Cap 단백질을 암호화하는 Cap 뉴클레오타이드 서열; 및 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈을 포함하되, 패키징 시스템은 아데노 관련 바이러스를 형성하기 위해 캡시드 내 수정 게놈을 동봉하기 위한 세포에서 작동성이다.

[0147] 일부 실시형태에서, 패키징 시스템은 Rep 뉴클레오타이드 서열 및 Cap 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 제1 벡터, 및 수정 게놈을 포함하는 제2 벡터를 포함한다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 패키징 시스템의 내용에서 사용되는 바와 같이, "벡터"는 핵산을 세포(예를 들어, 플라스미드, 바이러스, 코스미드, 인공 염색체 등) 내로 도입하기 위한 비히클인 핵산 분자를 지칭한다.

[0148] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3으로부터 선택된 적어도 1 또는 적어도 2종의 단백질을 포함한다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, the AAV 클레이드 F 캡시드는 클레이드 F VP1, 클레이드 F VP2 및 클레이드 F VP3 단백질을 포함한다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, AAV 클레이드 F 캡시드는 AAV9, AAVHSC1, AAVHSC2, AAVHSC3, AAVHSC4, AAVHSC5, AAVHSC6, AAVHSC7, AAVHSC8, AAVHSC9, AAVHSC10, AAVHSC11, AAVHSC12, AAVHSC13, AAVHSC14, AAVHSC15, AAVHSC16, AAVHSC17, AAVHU31 및 AAVHU32로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0149] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, Rep 뉴클레오타이드 서열은 AAV2 Rep 단백질을 암호화한다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 암호화된 AAV2 Rep 단백질은 Rep 78/68 또는 Rep 68/52 중 적어도 하나이다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, AAV2 Rep 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열은 서열번호 40의 AAV2 Rep 아미노산 서열에 대해 최소 서열 동일성 백분율을 갖는 단백질을 암호화하는 뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 최소 서열 동일성 백분율은 AAV2 Rep 단백질의 아미노산 서열 길이에 걸쳐 적어도 70%(예를 들어, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100%)이다.

예시적인 AAV2 Rep 아미노산 서열(서열번호 40) -

mpgfyeivikvpsdldehlpgisdsfvnwvaekewelppdsdmdlnlieqapltvaeklqrdfltewrrvskapealffv
qfekgesyfhmhvlvettgvksmvlgrflsqirekliqriyrgieptlpnwfavtktrngagggnkvvdecyipnyllpktqpelq
wawtnmeqylsaclnlterkrlvaqhlthvsqtqeqnkenqnpnsdapvirsktsarymelvgwlvdkgitsekqwiqedqas
yisfnaasnsrsqikaaldnagkimsltktapdylvgqqppvedissnriykilelngydpqyaasvflgwatkkfgkrntiwlfgpa
ttgktniaeaiahtvpfygcvnwtnenfpfndcvdkmviwweegkmtakvvesakailggskvrvdqkckssaqidptpvivt
sntnmcavidgnsttfehqqplqdrmfkfeltrrldhdfgkvtkqevkdffrwakdhvvevehefyvkkggakkrpapsdadis
epkrvresvaqpstsdaeasinyadryqnkcsrhvgmnlmlfpcrqcermnqnsnicfthgqkdclecfpvsesqpvsvvkka
yqklcyihhimgkvpdactacdlvnvdlddcifeq

[0150]

[0151] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 패키징 시스템은 제3 벡터, 예를 들어, 헬퍼 바이러스 벡터를 추가로 포함한다. 제3 벡터는 독립적 제3 벡터이거나, 제1 벡터와 함께 일체화되거나, 또는 제2 벡터와 함께 일체화될 수 있다. 일부 실시형태에서, 제3 벡터는 헬퍼 바이러스 단백질을 암호화하는 유전자를 포함한다.

[0152] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스는 아데노바이러스, 헤르페스 바이러스(단순 헤르페스 바이러스(HSV)를 포함함), 폭스바이러스(예컨대 백시니아 바이러스), 거대세포 바이러스(CMV) 및 바큘로바이러스로 이루어진 군으로부터 선택된다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스가 아데노바이러스인 경우, 아데노바이러스 게놈은 E1, E2, E4 및 VA로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 아데노바이러스 RNA 유전자를 포함한다. 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 헬퍼 바이러스가 HSV인 경우, HSV 게놈은 UL5/8/52, ICP0, ICP4, ICP22 및 UL30/UL42로 이루어진 군으로부터 선택된 HSV 유전자 중 하나 이상을 포함한다.

[0153] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 벡터는 하나 이상의 형질감염 플라스미드 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제3 벡터는 제1 형질감염 플라스미드 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제2 벡터 및 제3 벡터는 제2 형질감염 플라스미드 내에 포함된다.

[0154] 패키징 시스템의 일부 실시형태에서, 제1, 제2 및/또는 제3 벡터는 하나 이상의 재조합 헬퍼 바이러스 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제1 벡터 및 제3 벡터는 재조합 헬퍼 바이러스 내에 포함된다. 일부 실시형태에서, 제2 벡터 및 제3 벡터는 재조합 헬퍼 바이러스 내에 포함된다.

[0155] 일부 양상에서, 본 개시내용은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 변이체 벡터)의 재조합체 제조를 위한 방법을 제공하되, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV(예를 들어, AAV 클레이드 F 벡터 또는 AAV 변이체 벡터)를 형성하기 위해 캡시드 내 수정 게놈을 동봉하기 위한 작업적 조건 하에서 기재된 바와 같은 패키징 시스템을 이용하여 세포를 형질감염 또는 형질도입하는 단계를 포함한다. AAV의 재조합체 제조를 위한 예시적인 방법은 일시적 형질감염(예를 들어, 본 명세서에 기재된 바와 같은 제1, 및 제2, 및 선택적으로 제3 벡터를 포함하는 하나 이상의 형질감염 플라스미드에 의함), 바이러스 감염(예를 들어, 하나 이상의 재조합 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 폭스바이러스(예컨대, 백시니아 바이러스), 헤르페스 바이러스(본 명세서에 기재된 바와 같은 제1 및 제2, 및 선택적으로 제3 벡터를 포함하는 단순 헤르페스 바이러스(HSV), 거대세포 바이러스, 또는 바큘로바이러스를 포함함)에 의함), 및 안정한 생산자 세포주 형질감염 또는 감염(예를 들어, 하나 이상의 AAV Rep 단백질을 암호화하는 Rep 뉴클레오타이드 서열 및/또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 AAV 클레이드 F 캡시드의 하나 이상의 AAV Cap 단백질을 암호화하는 Cap 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 안정한 생산자 세포, 예컨대 포유류 또는 곤충 세포에 의함, 그리고 형질 플라스미드 또는 재조합 헬퍼 바이러스의 형태로 전달 중인 본 명세서에 기재된 바와 같은 수정 게놈에 의함)을 포함한다.

[0156] 본 개시내용의 다른 예시적인, 비-제한적 실시형태를 이하에 제공한다.

[0157] 실시형태 1. 하나 이상의 캡시드 변이체; 게놈의 표적 부위 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 표적 카세트; 표적 카세트에 측접하고 표적 부위의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 표적 카세트에 측접하고 표적 부위의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 줄기 세포의 게놈을 편집하기 위한 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 변이체.

[0158] 실시형태 2. 실시형태 1에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 변이체는 HSC7(서열번호 8), HSC12(서열번호 12), HSC15(서열번호 16), HSC17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는, AAV 벡터 변이체.

[0159] 실시형태 3. 실시형태 2에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 변이체는 HSC7(서열번호 8), HSC12(서열번호 12), HSC15(서열번호 16), HSC17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열에 대해 적어도 95%의 서열 동일성 백분율을 갖는 폴리펩타이드 서열을 포함하는, AAV 벡터 변이체.

[0160] 실시형태 4. 실시형태 1에 있어서, 상기 표적 부위는 안전한 은닉 부위인, AAV 벡터 변이체.

[0161] 실시형태 5. 실시형태 4에 있어서, 상기 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위인, AAV 벡터 변이체.

[0162] 실시형태 6. 실시형태 1에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포인, AAV 벡터 변이체.

[0163] 실시형태 7. 줄기 세포의 게놈을 편집하는 방법으로서, 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이, 하나 이상의 캡시드 변이체; 게놈의 표적 부위 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 표적 카세트; 표적 카세트에 측접하고, 표적 부위의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 표적 카세트에 측접하고, 표적 부위의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이

드 서열을 포함하는 하나 이상의 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 변이체를 이용하여 줄기 세포를 형질도입하는 단계를 포함하는, 방법.

[0164] 실시형태 8. 실시형태 7에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 변이체는 HSC7(서열번호 8), HSC12(서열번호 12), HSC15(서열번호 16), HSC17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 방법.

[0165] 실시형태 9. 실시형태 7에 있어서, 상기 AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대한 프로모터를 포함하지 않는, 방법.

[0166] 실시형태 10. 실시형태 7에 있어서, 상기 표적 부위는 안전한 은닉 부위인, 방법.

[0167] 실시형태 11. 실시형태 10에 있어서, 상기 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위인, 방법.

[0168] 실시형태 12. 실시형태 7에 있어서, 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포인, 방법.

[0169] 실시형태 13. 대상체의 줄기 세포의 게놈을 편집함으로써 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 추가적인 외인성 뉴클레아제 없이, 하나 이상의 캡시드 변이체; 줄기 세포의 게놈 내 표적 부위 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 표적 카세트; 표적 카세트에 측접하고, 표적 부위의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 표적 카세트에 측접하고, 표적 부위의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하는 아데노 관련 바이러스(AAV) 벡터 변이체를 이용하여 대상체의 줄기 세포를 형질도입하는 단계; 및 상기 대상체 내로 상기 형질도입된 줄기 세포를 이식하는 단계를 포함하되, 상기 형질도입된 줄기 세포는 상기 질환 또는 장애를 치료하는, 방법.

[0170] 실시형태 14. 실시형태 13에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 변이체는 HSC7(서열번호 8), HSC12(서열번호 12), HSC15(서열번호 16), HSC17(서열번호 13), 변이체, 단편, 돌연변이체 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터의 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 방법.

[0171] 실시형태 15. 실시형태 13에 있어서, AAV 벡터 변이체는 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대해 프로모터를 포함하지 않는, 방법.

[0172] 실시형태 16. 실시형태 13에 있어서, 상기 표적 부위는 안전한 은닉 부위인, 방법.

[0173] 실시형태 17. 실시형태 16에 있어서, 상기 안전한 은닉 부위는 염색체 19 상의 AAVS1 좌위인, 방법.

[0174] 실시형태 18. 실시형태 13에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포인, 방법.

[0175] 실시형태 19. 실시형태 13에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 상기 세포 게놈에서 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기되는, 방법.

[0176] 실시형태 20. 실시형태 19에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환, 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택되는, 방법.

[0177] 실시형태 21. 대상체에게 AAV 벡터 변이체를 직접 투여하는 것에 의한 대상체 세포의 생체내 게놈 편집에 의해 대상체의 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서, 상기 벡터는 하나 이상의 캡시드 변이체; 게놈의 표적 부위 내로 통합될 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 표적 카세트; 표적 카세트에 측접하고 표적 부위의 상류인 영역에 대해 상동성을 갖는 5' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열; 및 표적 카세트에 측접하고 표적 부위의 하류인 영역에 대해 상동성을 갖는 3' 상동성 아암 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함하되, 상기 벡터는 상기 대상체 세포를 형질도입하고, 세포 게놈 내로 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열을 통합하는, 방법.

[0178] 실시형태 22. 실시형태 21에 있어서, 상기 하나 이상의 캡시드 변이체는 HSC1(서열번호 2), HSC2(서열번호 3), HSC11(서열번호 4), HSC3(서열번호 5), HSC4(서열번호 6), HSC6(서열번호 7), HSC7(서열번호 8), HSC8(서열번호 9), HSC9(서열번호 10), HSC5(서열번호 11), HSC12(서열번호 12), HSC17(서열번호 13), HSC13(서열번호 14), HSC14(서열번호 15), HSC15(서열번호 16), HSC16(서열번호 17), 변이체, 단편, 돌연변이체, 및 이들의 임의의 조합의 군으로부터 선택된 폴리펩타이드 서열을 포함하는, 방법.

[0179] 실시형태 23. 실시형태 21에 있어서, 상기 세포는 줄기 세포인, 방법.

[0180] 실시형태 24. 실시형태 23에 있어서, 상기 줄기 세포는 조혈 줄기 세포, 다능성 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 또는 간충직 줄기 세포인, 방법.

[0181] 실시형태 25. 실시형태 24에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 세포 게놈 내 하나 이상의 돌연변이에 의해 야기되는, 방법.

[0182] 실시형태 26. 실시형태 25에 있어서, 상기 질환 또는 장애는 유전 대사 질환, 리소좀 축적 질환, 점액성 다당류증, 면역결핍 질환 및 이상혈색소증 및 감염으로부터 선택된, 방법.

[0183] 실시형태 27. 실시형태 21에 있어서, 상기 AAV 벡터 변이체는 상기 하나 이상의 치료적 뉴클레오타이드 서열에 대해 프로모터를 포함하지 않는, 방법.

[0184] 실시형태 28. 실시형태 22에 있어서, 상기 표적 부위는 안전한 은닉 부위인, 방법.

[0185] 실시형태 29. 실시형태 23에 있어서, 상기 안전한 은닉 부위는 상기 염색체 19 상의 AAVS1 좌위인, 방법.

[0186] 다음의 실시예는 개시내용의 다양한 실시형태를 예시하기 위한 의도이다. 그렇게 해서, 논의된 특정 실시형태는 본 발명의 범주에 대한 제한으로서 해석되어서는 안 된다. 다양한 균등물, 변화 및 변형이 본 개시내용의 범주로부터 벗어나는 일 없이 이루어질 수 있다는 것이 당업자에게 명확할 것이며, 이러한 동등한 실시형태가 본 명세서에 포함된다 것이 이해되어야 한다. 추가로, 본 개시내용에 열거된 모든 참고문헌은 그들의 전문이 본 명세서에 완전히 제시되는 것과 같이 본 명혜서에 포함된다.

[0187] **실시예**

[0188] **실시예 1: CD34+ 인간 조혈 줄기 세포주 또는 K562 세포주에서의 AAV 클레이드 F 벡터 변이체 매개 게놈 편집**

[0189] 외인성 뉴클레아제를 사용하지 않고 AAVF(AAVHSC) 벡터를 이용하는 특정 DNA 서열의 부위 특이적 삽입 또는 표적화된 통합을 통한 게놈 편집을 건강한 공여체로부터의 인간 CD34+ 조혈 세포주 또는 CD34+ 적백혈병 세포주인 K562 세포주에서 수행하였다. 공여체 재조합 AAV 벡터인 ITR-AAVS1-FP 벡터의 하나의 세트를 구성하고 나서, 천연 야생형 AAV 통합 부위인 염색체 19 상의 AAVS1 좌위 내로 이식유전자를 통합하기 위해 사용하였다(Kotin, 1992; Giraud, 1994). 염색체 19 qter13.3 내지 13.4 상의 AAVS1 좌위는 이식유전자의 삽입을 위한 "안전한 은닉" 부위가 되는 것으로 이전에 나타났는데, 병원성 결과 없이 이 좌위에 통합하는 야생형 AAV와 유사하게 여기에 삽입된 유전자가 병원성 결과 없이 발현되기 때문이다(Giraud, 1994; Linden, 1996A; Linden 1996B). 통합될 이식유전자는 비너스 황색 형광 단백질("YFP" 또는 "FP") 유전자인데, 이는 인간 염색체 19 상의 AAVS1 좌위와 상동성을 갖는 대략 800개의 뉴클레오타이드에 의해 각각의 측면 상에 측정된다(도 3의 개략도 참조). 이식유전자가 염색체 암호화된 조절 서열로부터 하류인 정확한 좌위에 통합된다면, 프로모터가 없고 발현만 되도록, 공여체 AAV 벡터를 설계한다(도 4 참조). 따라서, 일어난 임의의 비너스 YFP 이식유전자 발현은 AAVS1에서 또는 근처에 위치된 염색체 프로모터의 제어 하에 있었다.

[0190] 공여체 벡터인 ITR-AAVS1-FP를 문헌[Chatterjee et al, 1992]에 기재된 표준 AAV 패키징 방법에 따라 AAVHSC 캡시드 내로 패키징하였다. 구체적으로, 위형 AAVHSC-AAVS1-FP 벡터(즉, AAV 벡터 변이체)를 형성하는 AAVHSC7, AAVHSC15 또는 AAVHSC17 캡시드 내로 ITR-AAVS1-FP를 패키징하였다. 인간 CD34+ 조혈 줄기 세포주 또는 K562 세포를 상이한 감염 다중도(MOI)(즉, 50,000 MOI; 100,000 MOI; 200,000 MOI; 300,000 MOI; 및 400,000 MOI)에서 위형 AAVHSC-AAVS1-FP를 이용하여 형질도입하였다.

[0191] 상동성 재조합에 의한 AAVS1 좌위 내로의 YFP 이식유전자의 통합을 형질도입된 K562 세포 내 YFP 발현의 유동세포측정에 의해 처음에 분석하였다. AAVHSC7 FP 벡터를 이용하는 표적화된 통합은 형질도입후 24 시간(도 5 및 도 7A) 및 형질도입후 72시간(도 6 및 도 7B)에 YFP 이식유전자의 발현을 초래하였다. 추가적으로, AAVHSC7 FP 벡터의 MOI가 증가됨에 따라, YFP 발현의 평균 백분율이 또한 증가되었다(도 7A 및 도 7B).

[0192] YFP 이식유전자의 표적화된 통합을 상동성 영역 밖에 위치된 프라이머를 이용하여 편집 게놈의 PCR 증폭에 의해 추가로 확인하였다. 간략하게, AAVHSC7 FP 벡터를 이용하여 100,000개의 벡터 게놈/세포의 MOI에서 형질도입한 K562 세포로부터 DNA를 추출하였다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 및 "kb 길이 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다(도 4 참조). YFP 이식유전자의 통합은 대략 1.9kb의 야생형 크기로부터 대략 3.1kb 단편을 함유하는 YFP 이식유전자까지 AAVS1 좌위의 크기 증가를 초래하였다(도 4 참조, 선으로 표지된 "단편 1"을 선으로 표지된 "단편 2"와 비교). 염색체 19 AAVS1 좌위 내에 YFP 이식유전자를 함유하는 대략 3.1kb 단편의 증폭은 YFP 이식유전자가 AAVHSC7 FP 벡터를 이용하여 형질도입된 세포에서 AAVS1 좌위 내로 효과적으로 통합되었다는

것을 나타내었다(도 8A 및 도 8B, 레인 4).

[0193] **실시예 2: 1차 인간 CD34+ 말초 혈액 줄기 세포에서의 AAV 벡터 변이체 매개 게놈 편집.**

[0194] 외인성 뉴클레아제의 사용 없이 AAVHSC 벡터를 이용하는 특정 DNA 서열의 부위 특이적 삽입 또는 표적화된 통합을 통한 게놈 편집을 또한 인간 CD34+ 1차 말초혈액-유래 인간 조혈 줄기 세포(PBSC)에서 수행하였다. 간략하게, 벡터인 ITR-AAVS1-FP를 AAVHSC7, AAVHSC12, AAVHSC15 및 AAVHSC17를 포함하는 AAVHSC 캡시드에서 패키징하였다(표준 AAV 패키징 방법에 대해 문헌[Chatterjee, 1992]). 1차 CD34+ 세포를 위형 AAVHSC-AAVS1-FP 벡터(즉, AAV 벡터 변이체)를 이용하여 MOI 100,000 및 150,000에서 형질도입하였다.

[0195] 상동성 재조합에 의한 YFP 이식유전자의 AAVS1 좌위 내로의 통합을 YFP 발현의 유동세포측정 분석에 의해 평가하였다. 1차 CD34+ 세포에서 AAVHSC7 FP 및 AAVHSC17 FP 벡터를 이용하는 표적화된 통합은 형질도입후 1일에 MOI 150,000(도 9), 형질도입후 4일에 MOI 100,000(도 10), 및 형질도입 후 18일에 MOI 100,000(도 11)에서 YFP 이식유정자의 발현을 초래하였다. 형질도입 후 5.5주에 MOI 100,000(39일)에서 YFP를 발현시키는 양성 세포의 백분율은 감소되지 않았다(도 12A 및 도 12B 참조, 20일 결과를 39일 결과와 비교). 분화 세포 집단에서 프로모터가 없는 YFP 이식유전자의 장기간 발현은 이식유전자의 정확한 통합을 나타낸다.

[0196] YFP 이식유전자의 표적화된 통합을 PCR 분석에 의해 추가로 확인하였다. 삽입된 이식유전자 서열과 천연 염색체 5' 상동성 아암 서열 사이의 5' 연접 영역을 증폭시키는 프라이머를 이용하여 편집 게놈을 증폭시켰다(도 4 참조, 선으로 표지된 "단편 3" 참조). 간략하게, AAVHSC7 FP 벡터를 이용하여 MOI 150,000 벡터 게놈/세포에서 1차 CD34+ 세포로부터 DNA를 추출하였다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 및 "안쪽 역방향 프라이머" 프라이머를 이용하여 PCR 증폭을 수행하였다(도 4 참조). 형질도입된 1차 CD34+ 세포의 5' 연접 영역의 대략 1.7kb 단편의 증폭은 YFP 이식유전자가 AAVS1 좌위 내로 성공적으로 통합되었다는 것을 나타내었다(도 13, 레인 5 참조). 반면에, AAVHSC7 FP 벡터에 의해 형질도입되지 않은 해당 세포에 대한 증폭 산물은 없었다(도 13, 레인 3 참조).

[0197] 상이한 부분의 편집된 AAVS1 좌위의 서열 분석에 의해 YFP 이식유전자의 표적화된 통합을 추가로 확인하였다. "바깥쪽 정방향 프라이머 영역" 근처(도 14 참조), 5' 상동성 아암 근처(도 15 참조), 조절 구성요소의 5' 영역 근처(도 16 참조), 조절 구성요소의 3' 영역 근처(도 17 참조), 이식유전자의 5' 영역 근처(도 18 참조), 및 "안쪽 역방향 프라미어" 영역 근처(도 19 참조)에서 시작하는 서열분석을 수행하였다. 서열분석은 YFP 유전자가 존재하고 AAVS1 좌위 내로 성공적으로 통합되었다는 것을 나타내었다.

[0198] 실시예 1 및 2에 제공하는 바와 같이, AAVHSC 벡터는 외인성 엔도뉴클레아제의 첨가에 대한 필요 없이 인간 CD34+ 조혈 세포주 및 CD34+ PBSC에서 효율적인 표적화된 게놈 편집을 성공적으로 매개하였다. AAVHSC 벡터는 AAVS1 좌위에 대응하는 측접 상동성 아암에 기반하여 염색체 19 상에서 AAVS1 좌위에 대한 YFP 이식유전자의 통합을 지시할 수 있었다. AAV-매개 유전자이식이 이전에 보고되었지만; 그러나, 보고된 빈도는 보통 1e6 세포에서 1 내지 1e4 세포에서 1의 규모로 낮았다. 본 명세서에 나타내는 바와 같이, AAVHSC 벡터를 이용하는 표적화된 게놈 편집은 이전에 보고된 것보다 1,000 내지 100,000배 더 효율적인 1차 세포의 대략 10%의 빈도로 장기로 일어났다(예를 들어, 문헌[Khan, 2011] 참조). 인간 CD34+ 조혈 세포주에서의 YFP 이식유전자의 발현을 형질도입 후 1일 만큼 빨리 관찰하였고, 제3일에 확인하였다. PBSC에서 YFP 이식유전자의 발현을 제1일로부터 관찰하기 시작하고, 최종 분석 시점까지 장기간 계속하였다(거의 6주까지). AAVHSC 벡터 형질도입의 결과로서의 명시적인 독성은 관찰되지 않았다. 높은 삽입 빈도, 사용의 용이함 및 관찰된 독성 결여에 기반하여, AAVHSC 벡터를 이용하는 표적화된 게놈 편집에 기반한 요법은 실행적이고 실현 가능하다.

[0199] **실시예 3: AAV 벡터 변이체를 이용하는 생체내 게놈 공학처리.**

[0200] AAVHSC 벡터 암호화 루시퍼라제 및 AAVHSC 벡터 암호화 비너스는 인간 제대혈 CD34+ HSC로 이전에 이종이식한 성체 면역 결핍 마우스에 주사하였다. 이하에 나타내는 바와 같이, AAVHSC 벡터의 정맥내 주사는 생체내 인간 CD34+ 조혈 줄기 및 전구세포의 형질도입을 초래하였고, 정맥내 주사한 AAVHSC 벡터를 인간 조혈작용 부위 및 형질도입 인간 세포 부위에 수송하였다.

[0201] *방법*. 간략하게, 면역 결핍 NOD/SCID 성체 마우스를 처음에 ^{137}Cs 공급원으로부터의 350cGy의 치사량에 가까운 선량으로 방사선 조사하였다. 둘째로, 1백 만개의 인간 제대혈 CD34+ 세포를 치사량에 가깝게-방사선 조사된 면역 결핍 NOD/SCID 마우스에 주사하였다. 다음에, CD34+ HSC 이식 후 2시간에, 마우스에 AAVHSC-루시퍼라제 벡터(AAVHSC7-루시퍼라제 벡터 또는 AAVHSC17-루시퍼라제 벡터 중 하나)의 대략 1E11 내지 5e11 입자로 정맥내 주사하였다. 이들 벡터를 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 사용하였다. AAVHSC-루시퍼라제 벡터는 이식유전자 발현의 일련의 생체내 생물 발광 경고를 허용하기 위해 편재하는 CBA 프로모터의 제어 하에서 단일-가닥 반딧불

이 루시퍼라제 유전자(ssLuc)를 암호화한다. 본 명세서에 완전히 제시되는 바와 같이 그의 전문이 본 명세서에 참고로 포함되는 미국 특허 출원 제13/668,120호(미국 특허 공개 제20130096182A1호로서 공개됨) 그리고 문헌[Smith *et al.*]에서 이들 벡터를 구체적으로 기재한다(문헌[Smith, 2014] 참조). 미국 특허 출원 제13/668,120호(미국 특허 공개 제20130096182A1호로서 공개) 및 문헌[Smith *et al*]에 기재된 바와 같이(문헌[Smith, 2014] 참조) AAVHSC-루시퍼라제 벡터를 HSC7 캡시드 변이체(HSC7 캡시드의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 27로서 제공하고, HSC7 캡시드의 폴리펩타이드 서열을 서열번호 8로서 제공함(도 1 참조)) 또는 HSC17 캡시드 변이체(HSC17 캡시드의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 35로서 제공하고, HSC17 캡시드의 폴리펩타이드 서열을 서열번호 13으로서 제공함(도 1 참조)) AAVHSC7-루시퍼라제 벡터 및 AAVHSC17-루시퍼라제 벡터를 형성하기 위해 위형화하였다(표준 AAV 패키징 방법에 대해 문헌[Chatterjee, 1992] 참조). AAVHSC-루시퍼라제 벡터는 마우스와 인간 세포를 둘 다 형질도입할 수 있다는 것을 주목한다. 그러나, 이하에 기재하는 AAVHSC-비너스 벡터에서 암호화된 비너스와 대조적으로, 루시퍼라제는 AAVS1 내로 통합하지 않을 것이다. 대신, 루시퍼라제는 무작위로 통합할 수 있거나 또는 에피솜에 머무를 수 있다.

[0202] AAVHSC-루시퍼라제 벡터에 의한 주사 후 2 내지 7일에, 마우스에 AAVHSC-비너스 벡터의 대략 1E11 내지 5e11 입자로 주사하였다. 구체적으로, AAVHSC7-루시퍼라제 벡터로 처음 주사한 마우스에 AAVHSC7-비너스 벡터로 주사하고 나서, AAVHSC17-루시퍼라제 벡터로 처음 주사한 마우스에 AAVHSC17-비너스 벡터로 주사하였다. 사용한 비너스 공여체 벡터를 상기 실시예 1 및 2에서 구체적으로 기재한다. 비너스 이식유전자가 암호화된 조절 서열로부터 하류인 정확한 AAVS1 좌위에 통합된다면, 프로모터가 없고 발현만 되도록, 공여체 AAV 벡터를 설계하였다(도 3 및 도 4 참조). 따라서, 일어난 임의의 비너스 이식유전자 발현은 AAVS1에서 또는 근처에 위치된 염색체 프로모터의 제어 하에 있었다. 중요하게는, 비너스 유전자를 포함하는 벡터는 발현을 유발하는 프로모터를 포함하지 않는다. 비너스 유전자는 내인성 염색체 프로모터로부터 하류인 인간 세포 내 AAVS1 내로 정확하게 통합된다면, 발현만 될 것이다. 공여체 벡터, ITR-AAVS1-비너스(도 3 참조)를 문헌[Chatterjee et al, 1992]에 기재된 표준 AAV 패키징 방법에 따라 AAVHSC 캡시드 내로 패키징하였다. AAVHSC7-비너스 벡터 및 AAVHSC17-비너스 벡터를 형성하기 위해 벡터를 HSC7 캡시드 변이체(HSC7 캡시드의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 27로서 제공하고, HSC7 캡시드의 폴리펩타이드 서열을 서열번호 8로서 제공함(도 1 참조)) 또는 HSC17 캡시드 변이체(HSC17 캡시드의 폴리뉴클레오타이드 서열을 서열번호 35로서 제공하고, HSC17 캡시드의 폴리펩타이드 서열을 서열번호 13으로서 제공함(도 1 참조))에서 위형화하였다.

[0203] 최종적으로, 생체내 루시퍼라제 발현을 주사 후 4주에 측정하였다. 주사 후 6주에, 인간 CD34+ 및 CD45+ 세포의 생착을 측정하고 나서, 비너스 발현을 정량화하였다. 본 실시에에서 수행한 실험의 전반적인 개략도에 대해 도 20을 참조한다.

[0204] *결과*. 주사 후 4주, AAVHSC-루시퍼라제 벡터의 정맥내 주사를 받은 이종이식 및 비이종이식 마우스에 대해 생체내 이미징을 수행하였다. 결과는 이식 후 조혈작용의 모든 부위인 척추골, 비장, 둔부 및 장골에서 특이적 루시퍼라제 발현을 나타내었는다(도 21A 참조). 그러나, 인간 제대혈 CD34+ HSC로 이전에 이종이식하지 않은 마우스에서 조혈 기관에서의 특이적이지 않은 루시퍼라제 발현이 관찰되었다(도 21B 참조). 이들 결관는 정맥내로 주사한 AAVHSC 벡터가 인간 조혈작용의 생체내 부위로 수송되고, 줄기 및 전구 세포를 우선적으로 형질도입한다는 것을 나타낸다.

[0205] AAVHSC-비너스 벡터, 인간 CD34+ 및 CD45+ 세포로 주사 후 6주에 유세포 분석을 이용하여 세포를 분석하였다. 결과는 주사한 인간 제대혈 CD34+ 세포가 마우스 내로 생착되었고, 더 성숙한 혈액 세포가 생기게 되었다는 것을 나타내었다. 구체적으로, 원시 인간 혈액 전구세포(즉, CD34+ 세포)를 골수에서 관찰하였다(표 1 참조, CD34+ 세포 및 대퇴부 골수). 추가적으로, 인간 단핵 혈액 세포(즉, CD45+ 세포)는 표 1에 나타낸 바와 같이 대퇴부 골수, 척추골 골수, 및 비장에서 분명하였다.

표 1

[0206]

면역 결핍 마우스에서 인간 혈액 세포의 생착			
AAVHSC7			
세포 유형	대퇴부 골수	척추 골수	비장
CD45+	68.4	30.4	24.3
CD34+	22	NT*	NT
AAVHSC17			
세포 유형	대퇴부 골수	척추 골수	비장
CD45+	46.6	24	18.3

CD34+	13.1	NT	NT
*NT= 시험하지 않음 CD45+ 세포: 인간 단핵구 혈액 세포 CD34+ 세포: 인간 조혈 전구세포			

[0207] 주사 후 6주에, AAVHSC7-비너스 또는 AAVHSC17-비너스 벡터 중 하나의 정맥내 주사를 받은 이종이식 마우스의 인간 HSC로부터의 비너스 발현을 분석하기 위해 유세포 분석을 사용하였다. 결과는 AAVHSC 형질도입이 대퇴부 및 척추골 골수로부터의 CD45+ 인간 HSC뿐만 아니라 CD34+ 인간 HSC에서 용이하게 관찰되었다는 것을 나타내었다(표 2 및 도 22A 내지 도 22F 참조).

표 2

[0208]

생착된 인간 조혈 세포 발현 비너스의 백분율			
AAVHSC7			
세포 유형	대퇴부 골수	척추 골수	비장
CD45+	8.35	15.3	10.3
CD34+	9.23	NT*	NT
AAVHSC17			
세포 유형	대퇴부 골수	척추 골수	비장
CD45+	8.59	70.2	9.9
CD34+	8.92	NT	NT
*NT= 시험하지 않음 CD45+ 세포: 인간 단핵구 혈액 세포 CD34+ 세포: 인간 조혈 전구세포			

[0209] 추가적으로, 비너스가 이들 세포에서 발현되었기 때문에 비장 내 인간 CD45+ 세포는 형질도입의 증거를 용이하게 나타내었다(표 2 및 도 22G 및 도 22H). 이는 이식된 인간 제대혈 CD34+ 세포로부터 생긴 CD45+ 세포가 비너스를 발현시킨다는 것을 입증한다. 이들 결과는 AAVHSC 벡터 생체내의 정맥내 주사가 인간 조혈 세포의 형질도입을 초래한다는 것을 나타낸다.

[0210] **실시예 4: AAV 클레이드 F 벡터를 이용하는 게놈 내로의 거대 및 소 편집 구성요소의 삽입**

[0211] *방법.* rAAV 생성, 정제 및 적정. NEBuilder v.1.6.2(매사추세츠주 입스위치에 소재)를 이용하여 설계한 프라이머가 있는 뉴 잉글랜드 바이오랩스 깁손 어셈블리 클로닝 키트(New England Biolabs Gibson Assembly Cloning Kit)를 이용하여 AAV2 골격 내로 모든 표적화 게놈을 클로닝하였다. 모든 표적화 게놈을 서열분석하고 나서, 제한 분해 및 서열분석을 이용하여 AAV2 ITR 완전성을 확인하였다. 단일 가닥 표적화 게놈을 단순 헤르페스 바이러스(HSV)-감염 293 세포 내 AAVF 캡시드 내로 패키징하였다. 얻어진 재조합 AAV 벡터를 CsCl2 밀도 원심분리 구배 2라운드를 통해 정제하고 나서, 이식유전자-특이적 프라이머 및 프로브를 이용하는 qPCR을 이용하여 역가를 결정하였다.

[0212] K562, HepG2 및 PBSC 형질도입. 만성 골수성 백혈병(CML) 세포주, K562 및 간세포 암종 세포주 HepG2를 미국 미생물 보존센터(ATCC)(버지니아주 매너서스에 소재)로부터 얻었고, ATCC 가이드라인에 따라 배양시켰다. CD34+ 간접 단리 키트(밀테니 바이오테크(Miltenyi Biotech))를 이용하여 건강한 공여체의 사이토카인 프라이밍된 PB로부터의 단핵구로부터 말초 혈액 줄기 세포(PBSC)를 정제하고 나서, 단리 직후에 형질도입을 수행하였다. PBSC를 20% FCS, 100㎍/㎖ 스트렙토마이신, 100U/㎖ 페니실린, 2㎜ol/ℓ L-글루타민, IL-3(10ng/㎖; 알앤디 시스템즈(R&D Systems)), IL-6(10ng/㎖; 알앤디 시스템즈), 및 줄기 세포 인자(1ng/㎖; 알앤디 시스템즈)를 함유하는 이스코브 변형 둘베코 배지(Iscove's Modified Dulbecco's Medium: IMDM)(어바인 사이언티픽(Irvine Scientific))에서 배양시켰다. HepG2 세포를 분할시키고 나서, 형질도입 전 대략 24시간에 플레이팅시켰다. 형질도입 직전에 K562 세포를 플레이팅시켰다. MOI 범위 5E4 내지 4E5에서 AAVF 표적화 벡터를 이용하여 K562, HepG2 또는 PBSC를 형질도입하였다. 세포를 형질도입하고 나서, 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 상동성 재조합을 달성하였다. 형질도입 후 1 내지 39일 사이의 시점에 유동 및 분자 분석을 위해 세포를 채취하였다. 지시된 바와 같은 APC BrdU 유동 키트(BD 바이오사이언시즈)를 이용하는 채취 전에 시험관내 형질도입의 BrdU 표지를 수행하였다.

[0213] TI PCR 및 서열분석. AAVF 표적화 벡터를 이용하여 형질도입한 K562, HepG2 또는 PBSC로부터 고분자량 DNA를 단리시켰다. 상동성 아암 바깥의 염색체 영역으로 어닐링되는 프라이머, 시그마(Sigma) AAVS1 정방향 프라이머(5' - GGC CCT GGC CAT TGT CAC TT - 3') 및 삽입 카세트로 어닐링되는 프라이머, 즉, 비너스 역방향 프라이머(5' - AAC GAG AAG CGC GAT CAC A - 3') 또는 RFLP HindIII 역방향 프라이머(5' - CCAATCCTGTCCCTAGTAAAGCTT - 3')를 이용하여 TI 특이적 PCR을 수행하였다. 로슈 확장 고성능 PCR 시스템(Roche Expand Hifidelity PCR system)(인디애나주 인디애나폴리스에 소재)을 사용하였고, 순환 조건은 다음과 같다: 1주기, 5분 -95℃; 15주기, 30초 - 95℃, 30초 - 62℃에서 시작하고 주기 당 0.5℃만큼 감소, 2분 - 68℃; 20주기, 30초 - 95℃, 30초 - 53℃, 2분 - 68℃; 1주기, 5분 - 68℃. 퀴아퀵 PCR 정제 키트(Qiaquick PCR Purification Kit)(퀴아젠(Qiagen))을 이용하는 직접 서열분석을 위해 PCR 산물을 PCR 정제하거나, 또는 서열분석용 토포 TA 클로닝 키트(TOPO TA Cloning Kit)를 이용하여 클로닝하고 생어 서열분석(라이프 테크놀로지즈(Life Technologies))에 의해 클론을 서열분석하였다.

[0214] CD34+ 세포의 이식. 모든 동물 관리 및 실험을 실험동물 운영 위원회에 의해 승인된 프로토콜 하에 수행하였다. 6 내지 8주령 수컷 NOD.CB17-Prkdcscid/NCrCrl (NOD/SCID) 마우스를 특정 병원균이 없는 시설에서 유지하였다. 마우스를 이식 전 적어도 48시간 동안 설파메톡사졸 및 트라이메토프림 경구 소아 항생제(하이-테크 파마칼(Hi-Tech Pharmacal)(뉴욕주 아미티빌에 소재), 10㎖/500㎖ H2O)에 넣었다. 마우스를 137Cs 공급원으로부터의 350cGy의 치사량에 가까운 선량으로 방사선 조사하고, 이식 전 최소 4시간 동안 회복시켰다. 탯줄 제대혈(CB) CD34+ 세포를 CD34+ 간접 단리 키트(밀테니 바이오테크)를 이용하여 단리시켰다. 1 X 10^6개의 CB CD34+ 세포를 대략 200㎕에서 재현탁시키고 나서, 꼬리 정맥 주사에 의해 이식하였다. AAVF 표적화 벡터의 2.4E11 내지 6.0E11 입자를 CB CD34+ 이식 후 1 또는 7주에 꼬리 정맥을 통해 정맥내로 주사하였다. 대퇴부 골수(BM), 척추골 BM 및 비장을 이식 후 6주, 7주 또는 19주에 채취하였다.

[0215] 유세포측정 분석. 시안 ADP 유세포분석기(다코(Dako))를 이용하여 시험관내 형질도입을 AAVF 표적화 벡터 매개 통합, 및 BrdU 및 7-AAD에 대해 분석하였다. 자가형광의 차감 후에 특정 형광을 정량화하였다. FACS 아리아 소프(FACS Aria SORP)(BD 바이오사이언시즈(BD Biosciences)) 상에서 인간 특이적 항체, APC-컨쥬게이팅된 항-CD34 및 PE-컨쥬게이팅된 항-글리코포린 A, 및 PE- 및 APC-컨쥬게이팅된 IgG 대조군(BD Biosciences)에 의한 염색에 의해 이종이식 마우스의 채취된 척추골 BM, 대퇴부 BM 및 비장에서 CD34+ 및 적혈구 세포에서의 통합된 형광 카세트의 생체내 발현을 분석하였다. 플로우조(FlowJo) 소프트웨어(트리 스타(Treestar))를 이용하여 유세포 분석 데이터를 분석하였다.

[0216] *결과.* 캡시드 유전자의 뉴클레오타이드 서열 상동성에 기반하여 AAV 클레이드 F에 대해 맵핑하기 위해 줄기 세포-유래 AAV를 나타내었다(도 23, 문헌[Smith et al, Mol Ther. 2014 Sep;22(9):1625-34]). 이들 줄기 세포-유래 AAV는 AAVHSC1-17로 명명하였다. 이들 AAV를 또한 본 명세서에서 각각 AAVF1-17로서 지칭한다.

[0217] 상동성 아암 및 거대 삽입물을 함유하는 수정 게놈을 설계하기 위해 단일 가닥 AAV 벡터 게놈을 사용하였다(도 24). 상기 삽입물은 독립적 단백질 발현을 허용하기 위해 스플라이스 수용체(SA) 및 2A 서열(2A)로부터 하류의 프로모터가 없는 비너스 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하였다. 비너스는 황색 형광 단백질의 변이체이다(예를 들어, 문헌[Nagai et al. Nat Biotechnol, 2002, 20(1): 87-90] 참조). 좌측 및 우측 상동성 아암(HA)은 각각 800bp 길이이고, 염색체 19 상의 AAVS1 좌위에 위치된 인간 PPP1R12C의 인트론 1에서의 서열에 대해 상보성이었다(도 25). 유사한 단일 가닥 AAV 벡터 게놈은 2개의 상동성 아암 사이에 10bp 삽입물을 지니도록 설계하였다(도 35). AAVS1 좌위는 이종성 이식유전자의 삽입을 위한 안전한 은닉 부위로 고려된다.

[0218] 상동성 아암, 오픈 리딩 프레임 및 조절 서열을 AAV2 역위 말단 반복(ITR) 사이에서 클로닝하였다. 이어서, 이 수정 게놈을 AAVHSC, AAV8, 9, 6 및 2를 포함하는 상이한 AAV 캡시드에서 패키징하였다(위형화). 이어서, 재조합 바이러스를 사용하여 표적 세포의 핵에 편집 게놈을 전달하였다. 시험한 표적 세포는 CD34+ 적백혈병 세포주, 간 세포주 및 1차 인간 CD34+ 조혈 줄기/전구세포뿐만 아니라 그들의 조혈 자손을 포함하였다.

[0219] 인간 PPP1R12C 유전자의 인트론 1에 대해 상보성인 상동성 아암에 선행하고, 측접하는 비너스 ORF를 포함하는 AAVF 벡터를 사용하여 1차 인간 CD34+ 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 줄기 세포(도 26A), 인간 CD34+ 적백혈병 세포주인 K562(도 26B), 및 인간 간 세포주인 HepG2(도 26C)에 편집 게놈을 전달하였다. 1차 CD34+ 세포는 60%까지 가장 고수준의 편집을 지원하였다(도 26A 내지 도 26F). K562 및 HepG2를 포함하는 불멸 세포주는 또한 상당한 수준의 편집을 나타내었다. 모든 경우에, 달성된 편집 수준은 AAV6 및 AAV8을 포함하는 비클레이트 F 바이러스에 의해 달성되니 것보다 지속적으로 상당히 더 높았다(도 26A 내지 도 26F 및 도 36).

[0220] 다른 실험에서, AAVF7, AAVF15 또는 AAVF17 벡터를 이용하여 형질도입한 사이토카인 프라이밍된 CD34+ 말초혈액 줄기 세포(PBSC)로부터 추출한 DNA를 염색체-특이적 프라이머 및 삽입물-특이적 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 벡터는 거대 삽입물(비너스) 또는 짧은 삽입물(10bp, RFLP) 중 하나를 포함하였다. 겔은 정확한 크기의 앰플리콘이 편집 CD34 세포로부터 증폭되었다는 것을 나타내었다(도 27, 도 35, 및 도 36). 1.7kb 및 1kb 밴드의 존재는 각각 거대 및 소 삽입물의 정확하게 표적화된 통합을 반영하였다. AAVF 벡터에 의한 편집 후 단기간과 장기간 시점 둘 다에서 표적화된 통합이 나타났다(도 27).

[0221] 다른 실험에서, 인간 PPP1R12C 유전자의 인트론 1에서 10bp 삽입물의 삽입을 위해 단일 가닥 AAV 벡터 게놈을 설계하였다(도 28A). 이들 벡터는 Nhe1 제한효소 인식 부위(GCTAGC)를 포함한 야생형 좌측 상동성 아암(HA-L)을 포함하였다. 염색체 19 상의 좌측 상동성 아암 내 TA 서열을 AT로 바꾸기 위해 NS mut 벡터를 설계하였다. 이 변화는 Nhe1 부위의 Sph1 부위로의 전환을 초래하여, 서열을 GCTAGC로부터 GCATGC로 변경시켰다. 도 28B는 K562 세포로부터의 게놈 DNA를 야생형 또는 NS Mut AAVF 벡터 중 하나를 이용하여 편집하였을 때 Nhe1 또는 Sph1을 이용하여 절단함으로써 생성된 예상 단편의 상대적 크기를 나타낸다. 야생형 AAVF 벡터를 이용하여 편집한 K562 세포의 게놈 DNA로부터 유래된 실제 앰플리콘을 예측한 바와 같이 Nhe 1를 이용하여(Sph1은 이용하지 않음) 분해하였다(도 28C). 야생형 또는 NS Mut 게놈 중 하나를 암호화하는 AAVF7 또는 AAVF17 벡터에 의한 편집 후 증폭된 K562 DNA를 이용한 결과는 Nhe1에 의한 분해가 비편집 세포로부터의 앰플리콘과 비슷하게 앰플리콘의 절단을 더 이상 초래하지 않았다는 것을 나타내었다. Sph1에 의한 분해는 절단을 초래하였는데, 이는 염색체의 좌측 상동성 아암 내 Nhe1 부위가 Sph1 부위로 대체되었음을 입증한다(도 28D). 증폭된 DNA의 전기영동은 간세포 암종 세포주인 HepG2를 형성하는데, 이는 야생형 또는 NS Mut 게놈 중 하나를 암호화하는 AAVF7 또는 AAVF17 벡터에 의한 편집 후에 Nhe1에 의한 분해가 비편집 세포로부터의 앰플리콘과 비슷하게 앰플리콘의 절단을 더 이상 초래하지 않았다는 것을 나타내었다(도 28E). Sph1에 의한 분해는 절단을 초래하였는데, 이는 염색체의 좌측 상동성 아암 내 Nhe1 부위가 Sph1 부위로 대체되었다는 것을 입증한다. 서열 분석은 AAVF7 및 AAVF17 야생형 또는 NS Mut 벡터에 의한 편집을 확인하였다(도 29). 이들 결과는 AAVF7뿐만 아니라 AAVF17이 둘 다 두 상이한 세포주에서의 염색체 서열에서 2개의 뉴클레오타이드 치환을 성공적으로 매개하였다는 것을 입증한다. 이들 결과는 또한 인간 세포의 게놈 DNA에서 2개의 염기쌍 치환을 매개하는 AAVF 벡터의 능력을 입증하는데, 이는 질환 원인 돌연변이의 수정 또는 게놈 내 새로운 돌연변이의 유도를 위한 그들의 사용을 시사한다.

[0222] 다른 실험에서, 건강한 인간 CD34+ PBSC 상에서의 AAVF 벡터의 편집 능력에 대해 세포 분할에 대한 잠재적 필요를 시험하였다. 10μM의 BrdU를 이용하는 펄싱을 통해 BrdU를 2시간 동안 형질도입된 인간 CD34+ PBSC 내로 혼입시켰다. AAVF 형질도입 CD34+ 세포를 채취하고 나서, 침투시키고, DNA 분해효소 처리 전에 고정시켰다. DNA 분해효소 처리 후에, 처리 세포를 항-BrdU APC 항체를 이용하여 20분 동안 염색하였다. 설명서에 따라 APC BrdU 유동 키트(BD 바이오사이언시즈)를 이용하여 채취하기 전에 시험관내 편집 세포의 BrdU 표지를 수행하였다. 이어서, 비너스 발현을 위한 유세포 분석뿐만 아니라 BrdU 표지에 의해 세포를 분석하였다. 결과는 BrdU 양성과 음성 집단 둘 다에서 비너스 발현의 유사한 빈도를 나타내었는데, 이는 세포 분할은 AAVF-매개 편집이 필요하지 않다는 것을 시사한다(도 30).

[0223] 다른 실험에서, 생체내 생착된 인간 조혈 줄기 세포의 편집을 인간 제대혈 CD34+ 조혈 줄기 세포가 생착된 전신 전달된 AAVF 벡터 면역 결핍 NOD/SCID 마우스에 의해 시험하였다(도 31A 및 도 31B). 골수뿐만 아니라 비장 둘 다에서, 대다수의 인간 세포는 비너스를 발현시키는 것으로 발견된 반면, 마우스 세포에서 비너스 발현은 관찰되지 않았다(도 31c, 도 37 및 도 38). 마우스 게놈이 상동성 아암에 대해 상보성인 AAVS1 좌위를 포함하지 않기 때문에, 이들 발견은 유전자 표적화의 특이성을 입증한다. 분석한 인간 세포 중에서, 비너스 발현은 골수뿐만 아니라 비장 둘 다의 원시 CD34+ 전구세포뿐만 아니라 성숙 글리코포린 A+ 적혈구 세포에서 관찰되었다.

[0224] 다른 실험에서, 마우스는 인간 제대혈 CD34+ 세포가 생착되었고, AAVF-비너스는 1 또는 7주 후에 정맥내 경로에 의해 주사하였다. 척추 또는 대퇴부 골수 또는 비장을 비너스의 정맥내 주사 후 5, 6 또는 13주에 채취하였다. 이들은 6, 7 또는 20주의 이식 후 누적 시간을 나타내었다. 결과는 AAVF-비너스의 정맥내 주사가 원시(CD34+)뿐만 아니라 더 성숙한, 분화된(CD45+) 생체내 생착 인간 조혈 세포 둘 다의 편집을 초래한다는 것을 나타낸다. 인간 적혈구 계통의 세포는 이식 및 주사 후 장기간의 매우 효율적인 편집을 입증하였다(도 32). AAVF-매개 편집은 안정한 것으로 발견되었고, 생체 내 생착된 인간 CD34+ 세포의 분화된 자손에 의해 안정하게 유전되었다(도 32). 편집된 CD34+ 세포의 분화된 자손은 비너스를 장기간 발현시켰다(도 32).

[0225] 다른 실험에서, K562 적백혈병 세포주, 1차 인간 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 CD34+ 세포 및 HepG2 인간 간세포주에서 프로모터가 없는 SA/2A 비너스 ORF의 표적화된 염색체 삽입을 위한 서열 분석을 수행하였다(도 33). 부위 특이적으로 통합된 서열을 염색체-특이적 프라이머 및 삽입-특이적 프라이머를 이용하여 증폭시켰다. 결과

는 경우마다 좌측 상동성 아암과 우측 상동성 아암 사이의 연접에서 SA/2A 비너스의 정확한 삽입을 나타내었다(도 33).

[0226] 다른 실험에서, 1차 인간 사이토카인-프라이밍된 말초혈액 CD34+ 세포 및 HepG2 인간 간 세포주에서 10bp 삽입물의 표적화된 염색체 삽입을 위해 서열 분석을 수행하였다(도 34). 염색체 특이적 프라이머 및 삽입물 특이적 프라이머를 이용하여 부위 특이적으로 통합된 서열을 증폭시켰다. 결과는 경우마다 좌측 상동성 아암과 우측 상동성 아암 사이의 연접에서 10bp 삽입물의 정확한 삽입을 나타내었다(도 34).

[0227] 이들 데이터는 거대 삽입물과 짧은 삽입물은 둘 다 AAV 클레이드 F 벡터를 이용하여 게놈 내로 성공적으로 편집될 수 있다는 것과 게놈 내로의 통합이 정확하다는 것을 나타낸다. 이들 데이터는 또한 게놈 편집 외인성 뉴클레아제가 존재하지 않을 때 고효율을 위해 AAV 클레이드 F 벡터가 사용될 수 있었다는 것을 나타낸다.

[0228] **실시예 5: 인간 세포주에서 PPP1R12c 좌위의 편집**

[0229] *방법*

[0230] AAVF 벡터에 의한 인간 세포 유형의 편집을 평가하기 위해, 다음의 인간 세포주를 사용하였다:

[0231]

세포주	조직 유형
WI-38	정상 인간 이배체 섬유아세포
MCF7	인간 유방암 세포주
Hep-G2	인간 간세포 암종 세포주
K562	CD34+ 적백혈병 세포주
Y79	인간 망막아세포종 세포주
SCID-X1 LBL	SCID-X1 환자로부터의 인간 EBV-불멸 B 세포주

[0232] 사용한 AAVF 벡터는 프로모터가 없는 비너스 리포터를 암호화하는 편집 구성요소를 포함하는 벡터 게놈을 각각 포함하였다. 독립적 단백질 발현을 허용하기 위해 프로모터가 없는 비너스는 스플라이스 수용체(SA) 및 2A 서열(2A)로부터 하류의 비너스의 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하였다. 좌측 및 우측 상동성 아암(HA)은 각각 800bp 길이였고, 염색체 19 상의 AAVS1 좌위에 위치된 인간 PPP1R12C의 인트론 1에서의 서열에 대해 상보성이었다. AAVS1 좌위는 이종성 이식유전자의 삽입을 위한 안전한 은닉 부위로 고려된다. 상동성 아암, 비너스 ORF 및 조절 서열을 포함하는 편집 구성요소를 AAV2 역위 말단 반복(ITR) 사이에서 클로닝하였다.

[0233] 세포 배양물. 모든 세포주를 37℃에서 5% CO2의 습윤한 분위기에서 성장시키고 나서, 다음과 같이 배양시켰다: 15% 태아 소 혈청(FBS)(깁코(Gibco), 카탈로그 번호 26140)로 보충한 RPMI1640(깁코, 카탈로그 번호 21875)에서 SCID-X1 림프아세포(코리엘(Coriell))을 배양시키고 나서; 10% FBS(깁코, 카탈로그 번호 26140) 및 1% L-글루타민(깁코, 카탈로그 번호 25030)로 보충한 DMEM(코닝, 카탈로그 번호 15-017-CVR) 중에서 K562 세포(ATCC)를 배양시키고; HepG2 세포(ATCC)를 10% FBS(깁코, 카탈로그 번호 26140)로 보충한 EMEM(ATCC, 카탈로그 번호 30-2003) 중에서 배양시키고 나서; MCF-7 세포(ATCC)를 10% FBS(깁코, 카탈로그 번호 26140), 1% MEM 비필수 아미노산(깁코, 카탈로그 번호 11140), 1% 피루브산나트륨(깁코, 카탈로그 번호 11360) 및 10㎍/㎖ 인간 재조합 인슐린(깁코, 카탈로그 번호 12585-014)로 보충한 MEM(깁코, 카탈로그 번호 11095) 중에서 배양시켰으며; WI-38 섬유아세포(ATCC) 및 10% FBS(깁코, 카탈로그 번호 26140), 1% MEM 비필수 아미노산(깁코, 카탈로그 번호 11140) 및 1% 피루브산나트륨(깁코, 카탈로그 번호 11360)으로 보충한 MEM(깁코, 카탈로그 번호 11095)에서 HEK293 세포(ATCC)를 배양시키고; Y79 세포(ATCC)를 20% FBS(깁코, 카탈로그 번호 26140)로 보충한 RPMI1640(깁코, 카탈로그 번호 A10491) 중에서 배양시켰다.

[0234] 인간 세포주의 AAVF-매개 편집. 96웰 형식에 대해 20,000개 세포/0.1㎖ 또는 24웰 형식에 대해 20,000개 세포/0.5㎖로 제0일에 부착 세포를 파종하였다. 24시간 후(제1일) AAVF 벡터의 첨가 전 세포수를 측정하였다. 96웰 형식으로 20,000개 세포/0.1㎖ 또는 24웰 플레이트 형식으로 20,000개 세포/0.5㎖에 대해 제1일에 현탁 세포를 파종하였다. 제1일에, 감염다중도(MOI) 150,000 벡터 게놈(VG)/세포를 이용하여 AAVF를 세포에 첨가하였다. AAVF 첨가 전에, 전달을 위해 사용한 피펫 끝을 황산프로타민(10mg/㎖)으로 코팅하였다. 형질도입 직전에 30초 동안 전속력으로 AAVF를 와류 믹서 상에서 철저하게 현탁시켰다. 세포에 첨가한 AAVF의 용적은 웰 내 총 용적이 5%를 초과하지 않았다. 제3일에, 세포를 채취하고 나서(부착 세포는 약하게 트립신처리하여 조직 배양 플레이트로부터 그들을 제거함), 세척하고, 하이퍼사이트 오토샘플러를 구비한 인텔리사이트(Intellicyt) 유세포 분석기를 이용하는 유세포 측정에 의해 비너스 발현에 대해 분석하였다. 비너스 양성 - 비형질도입 세포(전형적으로 1% 미만 비너스 양성 세포)에서 관찰된 배경 형광인 총 세포 집단의 백분율로서 편집을 표현하였다. 외인성 뉴클레아제의 사용 없이 AAVF 편집 실험을 수행하였다.

[0235] *결과*

[0236] 시험한 모든 AAVF에 대해 인간 PPP1R12c 좌위의 편집을 관찰하였고, 세포 유형 선택성을 나타내었다(표 3). 일반적으로, AAVF5는 감염 후 48시간 후에 총 세포 집단의 12 내지 45%로부터 각각의 세포주에서 가장 고수준의 편집을 생성하였다. AAVF9는 또한 B 림프아구 세포주(SCID-X1 LBL 및 K562)에서 고수준의 유전자 편집을 생성하였다. AAVF17는 이들 조건 하에서 정상 인간 이배체 섬유아세포(WI-38 세포)에서 가장 고수준의 유전자 편집을 생성하였다. AAVF1, AAVF4, AAVF7 벡터는 비형질도입 세포에서 보이는 것보다 지속적으로 더 크지만 AAVF5, AAVF9 및 AAVF17에 의해 관찰되는 최대 수준보다 일반적으로 더 낮은 편집 수준을 생성하였다. 이들 데이터는 AAVF가 인간 조직에 대해 광범위한 향성을 가지고, 특히, 간, CNS(예를 들어, 망막), 조직 섬유아세포, 유방 및 림프구에서의 유전자 편집에 유용할 수 있다는 것을 입증한다.

표 3

AAVF에 의한 인간 세포주의 편집

[0237]

	인간 세포주					
벡터	K562	Hep-G2	WI-38	Y79	MCF7	SCID-X1 LBL
	비너스 양성 세포 백분율					
AAVF1	2.06	1.92	1.39	0.7	2.71	0.57
AAVF4	1.36	2.95	6.29	0.35	3.42	0.12
AAVF5	45.32	-	11.85	12.5	20.47	45.02
AAVF7	5.78	3.83	4.87	1.42	3.6	0.94
AAVF9	18.06	-	-	2.46	6.14	6.79
AAVF17	3.18	3.71	17.6	1.29	5.66	0.44

[0238] **실시예 6: 1차 인간 세포에서의 AAVF 편집**

[0239] AAVF 벡터에 의한 1차 인간 세포의 편집을 평가하기 위해, 인간 간세포, 간내 혈관내피 세포 및 골격근 근원세포의 1차 배양물을 사용하였다.

[0240] 사용한 AAVF 및 AAV 벡터는 각각 프로모터가 없는 비너스 리포터를 암호화하는 벡터 게놈을 패키징하였다. 독립적 단백질 발현을 허용하기 위해 삽입물은 스플라이스 수용체(SA) 및 2A 서열(2A)로부터 하류의 비너스 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하였다. 좌측 및 우측 상동성 아암(HA)은 각각 800bp 길이이고, 염색체 19 상의 AAVS1 좌위에 위치된 인간 PPP1R12C의 인트론 1에서의 서열에 대해 상보성이었다. AAVS1 좌위는 이종성 이식유전자의 삽입을 위한 안전한 은닉 부위로 고려된다. 상동성 아암, 오픈 리딩 프레임 및 조절 서열로 이루어진 수정 게놈을 AAV2 역위 말단 반복(ITR) 사이에 클로닝하였다.

[0241] *방법*

[0242] 세포 배양물. 조직 배양물 인큐베이터에서 5% 습윤화된 CO2 하에 모든 1차 인간 세포를 37℃에서 배양시켰다. 달리 특정되지 않는 한, 모든 물질 및 배지 성분을 라이프 테크놀로지사로부터 얻었다.

[0243] 인비트로젠사(Invitrogen)로부터 인간 간세포의 1차 배양물을 얻었고, 제조업자에 의해 제안된 바와 같은 I형 콜라켄 코팅 플레이트 상에서 배양시켰다. 해동/플레이팅 배지[32.5㎖ 윌리엄스 E 배지(#A12176) 1.6㎖ 태아 소혈청, 3.2㎕의 10mM 덱사메타손 및 0.9㎖의 플레이팅 칵테일 A/35.0㎖ 최종 용적]에서 액체 질소 중의 저장물로부터 세포를 회수하였다. 플레이팅 칵테일 A는 0.5㎖ 페니실린 10,000U/㎖)/스트렙토마이신(10,000㎍/㎖) 용액(카탈로그 번호 15140), 0.05㎖의 4.0mg 인간 재조합 인슐린/㎖(카탈로그 번호 12585-014), 0.5㎖의 200 mM 글루타맥스(GlutaMAX)(상표명) 용액(카탈로그 번호 35050) 및 0.75㎖의 1.0M 헤페스, pH7.4(카탈로그 번호 15630)/1.8㎖ 최종 용적으로 이루어졌다. 100㎖의 윌리엄스 E 배지, 0.001㎖의 덱사메타손, 및 3.6㎖의 유지 칵테일 B(카탈로그 번호 A13448)/103.6㎖ 최종 용적을 함유한 유지 배지에서 인간 간세포를 유지시켰다.

[0244] 인간 골격근 근원세포의 1차 배양물을 론자사(Lonza)로부터 얻었고, 제조업자에 의해 기재되는 바와 같은 SkGM(상표명) 배지에서 배양시켰다.

[0245] SkGM(상표명)-2 불릿(Bullit)(상표명) 키트(론자, 카탈로그 번호 CC-3245)는 500㎖ SkGM-2 배지(#0000482653)에서 0.5㎖ 인간 상피 성장 인자[hEGF](#0000482653), 0.5㎖ 덱사메타손(#0000474738), 10㎖ L-글루타민(#0000474740), 50㎖ 소태아 혈청(#0000474741), 0.5㎖ 겐타마이신/암포테리신-B[GA](#0000474736)을 포함하였

다.

[0246] 인간 간내 혈관내피 세포의 1차 배양물을 크리에이티브 바이오어레이사(Creative Bioarray)로부터 구입하였고, 수퍼컬트(SuperCult)(등록상표) 내피 세포 배지에서 배양시키고, 제조업자에 의해 기재되는 바와 같이 젤라틴 기반 코팅 상에서 성장시켰다. 수퍼컬트(상표명) 내피 세포 배지 보충 키트(카탈로그 번호 ECM-500 키트)는 0.5㎖ VEGF(#15206), 0.5㎖ 헤파린(#15250), 0.5㎖ EGF(#15217), 0.5㎖ FGF(#15204), 0.5㎖ 하이드로코티손(#15318), 5.0㎖ 항생제-항진균제 용액(#15179), 5.0㎖ L-글루타티온(#15409), 10.0㎖ 내피세포 보충물(#15604), 50.0㎖ FBS(#15310) 및 500.0㎖의 수퍼컬트(등록상표) 내피세포 배지(#15517)를 포함하였다.

[0247] 1차 인간 세포의 AAVF-매개 편집. 96-웰 형식에 대해 2 x 10^4개 세포/0.1㎖ 또는 24-웰 형식에 대해 2x 10^4개 세포/0.5㎖에 대해 제0일에 인간 1차 간세포를 파종하였다. 48시간 이후에 이하에 기재한 바와 같이 제2일에 바이러스 벡터를 첨가하였다. 96-웰 형식으로 2 x 10^4개 세포/0.1㎖ 또는 24웰 형식으로 2 x 10^4개 세포/0.5㎖로 제1일에 인간 골격근 근원세포 및 인간 간내 혈관내피 세포를 파종하였다. 제2일에, 바이러스 벡터를 감염다중도(MOI) 150,000 VG(벡터 게놈)/세포로 이들 세포에 첨가하였다(AAVF5에 대해 MOI 5 x 10^4개 VG/세포를 사용하였고, AAVF17에 대해 MOI 2.5 x 10^4개 VG/세포를 사용하였다). 세포에 대한 벡터의 첨가 전에, 벡터 전달을 위해 사용한 모든 피펫 끝을 황산프로타민(10㎎/㎖)으로 코팅하고 나서, 형질도입 직전에 30초 동안 벡터를 교반시킴으로써 철저하게 혼합하였다. 세포에 첨가한 벡터의 용적은 웰 내 총 용적의 5%를 초과하지 않았다.

[0248] 인간 1차 간세포에 대한 배양 배지를 제3일에 새롭게 하였다. 제4일에, 세포를 채취하고 나서(부착 세포를 트립신 처리함), 하이퍼사이트 오토샘플러를 구비한 인텔리사이트 유세포 측정기를 이용하는 유세포 분석에 의해 비너스 발현에 대해 분석하였다. 편집을 비너스 양성 - 비형질도입 세포에서 관찰된 배경 형광인 총 세포 집단의 백분율(전형적으로 1% 미만의 비너스 양성 세포)로서 표현하였다.

[0249] *결과*

[0250] 인간 PPP1R12c 좌위의 편집을 시험한 모든 AAVF에 대해 관찰하였고, 세포 유형 선택성을 나타내었다(표 4). 일반적으로, AAVF5는 감염 48시간 후에 인간 간세포에서 최저 2%로부터 1차 골격 근원세포 및 간내 혈관내피 세포에서 각각 24% 내지 35%로 각각의 1차 세포 집단에서 고수준의 편집을 제공하였다. AAVF7 및 AAVF17은 또한 1차 간내 혈관내피 세포 및 골격 근원세포에서 고수준의 유전자 편집을 생성하였다. 이들 세포에서 AAVF 벡터를 이용하는 편집 수준은 AAV2 또는 AAV6에 의해 관찰된 것보다 10- 내지 50-배 더 높았다. AAVF 벡터는 비형질도입 세포 또는 프로모터가 없는 비너스 벡터 게놈을 패키징하는 AAV2 또는 AAV6을 이용하여 형질도입된 세포에서 보이는 것보다 지속적으로 더 큰 편집 수준을 생성하였다. 이들 세포에서 AAV2 또는 AAV6 중 하나에 대해 편집은 거의 관찰되지 않거나 관찰되지 않았다. 1차 인간 세포에서 이들 데이터는 AAVF5, AAVF7 및 AAVF17이 인간 조직에 대해 광범위 향성을 가지고, 특히 간, 골격근, 및 내피 세포 집단에 대해 지시된 유전자 요법 적용에 유용할 수 있다는 것을 입증한다.

[0251] 비교를 위해, 닭 베타 액틴(CBA) 프로모터의 제어 하에 각각의 1차 인간 세포 집단을 또한 AAVF 유전자 전달 벡터 패키징 mCherry를 이용하여 형질도입하였다. 이어서, 비너스/mCherry의 단백질 발현의 비를 사용하여 AAV6, AAVF5 및 AAVF7에 대해 편집 비(실험의 유전자 편집 벡터(비너스)를 이용하는 다양한 세포 유형에서 검출가능한 단백질 발현을 갖는 세포 수 대 앞서 언급한 유전자 전달 벡터(mCherry)를 이용하는 검출 가능한 단백질 발현을 갖는 세포 수의 비를 반영함)를 추정하였다. 표 5에 나타낸 바와 같이, AAVF-매개 유전자 편집은 일반적으로 연구한 1차 인간 세포에서의 대응하는 AAVF-매개 유전자 전달 접근보다 단백질 발현에 대해 더 효과적인 반면, AAV6-매개 유전자 편집은 이러한 세포에서의 AAV6-매개 유전자 전달과 실질적으로 동일하거나 또는 약간 덜 효과적이었다. 특히, 또한 표 5에서 나타내는 바와 같이, AAVF-매개 유전자 편집은 연구한 1차 인간 세포에 대한 AAV6-매개 유전자 편집에 의해 관찰한 것보다 더 높았다. 이들 데이터는 AAVF-매개 유전자 편집이 다양한 1차 인간 세포에서의 AAV6보다 더 효율적이라는 것과, AAVF-매개 유전자 편집이 이러한 세포에서의 대응하는 유전자 전달 접근 이상으로 유리하게 비교한다는 것을 입증한다.

[0252] mCherry 리포터를 패키징하는 AAVF 벡터는 또한 1차 인간 세포를 효과적으로 형질도입하였으며, 세포 유형 특이성을 나타내었다(표 6). 인간 제정맥 내피 세포(HUVEC) 및 간내 혈관내피 세포(HSEC)에 대해, AAVF9를 이용하는 형질도입은 감염 48시간 후에 38 내지 50% mCherry 양성 세포를 생성하였다. AAVF9는 또한 효율적으로 인간 골격근 근원세포를 형질도입하였고, 더 적은 정도로, 모든 시험한 AAVF는 이들 조건 하에서 HSEC를 효과적으로 형질도입하였다(표 6). 이론에 의해 구속되는 일 없이, 상동성 아암이 발현이 있는 mCherry 벡터 게놈 내에 존재

하지 않았고 CBA 프로모터에 의해 유도되기 때문에, 이들 연구에서 전부는 아니지만 대부분의 mCherry 발현은 리포터의 에피솜 발현을 나타낼 가능성이 있다.

표 4

1차 인간 세포의 AAVF-매개 편집

[0253]

벡터	HSEC	간세포	SMM
	비너스 양성 세포 백분율		
AAV2	0.34	0.06	0.52
AAV6	0.00	0.00	0.00
AAVF5	34.70	2.00	24.20
AAVF7	18.40	0.62	18.65
AAVF17	21.40	1.37	19.60

표 5

1차 인간 세포에서의 AAVF의 편집 비

[0254]

벡터	간세포		SMM	
	비너스/mCherry	AAVF/AAV6	비너스/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0.84		0.80	
AAVF5	9.42	11.21	14.32	17.90
AAVF7	0.95	1.10	13.05	16.30

벡터	HSEC	
	비너스/mCherry	AAVF/AAV6
AAV6	0.60	
AAVF5	5.30	8.80
AAVF7	2.70	4.50

HSEC= 간내 혈관내피 세포
SMM = 골격근 근원세포

표 6

[0255]

AAVF 벡터 패키징 mCherry를 이용하는 1차 인간 세포의 형질도입				
벡터	HSEC	간세포	SMM	HUVEC
mCherry 양성 세포 백분율				
AAVF1	7.04	0.13	1.65	1.47
AAVF4	9.10	0.05	1.72	0.61
AAVF5	4.00	0.01	1.03	0.71
AAVF7	4.43	0.70	0.77	2.15
AAVF9	38.24	1.05	29.27	50.13
HSEC= 간내 혈관내피 세포 SMM = 골격근 근원세포 HUVEC = 인간 제정맥 내피 세포				

[0256] **실시예 7: 유전자-전달(형질도입) 효율에 대한 AAVF 상대적 유전자-편집(HDR)의 연구**

[0257] 상대적 단백질 발현에 의해 측정되는 바와 같이 AAVF 벡터뿐만 아니라 AAV2 및 AAV6의 유전자-전달 형질도입 효율에 대한 상대적 유전자 편집 효율을 평가하기 위해 두 유형의 AAV-기반 벡터(CBA-mCherry 유전자 전달 벡터, 및 AAVS1-비너스 유전자 편집 벡터, 도 39)를 사용하였다. 유전자 전달 벡터에 대해, CBA-mCherry 작제물은 닭 베타 액틴(CBA) 프로모터의 대조군 하에 mCherry 유전자를 포함하였고, 폴리아데닐화 신호를 이용하였지만, 임

의의 상동성 아암을 함유하지 않았다. 유전자-편집 벡터에 대해, AAVS1-비너스 작제물은 염색체 19의 AAVS1 영역 내에서 PPP1R12C 유전자의 인트론 1에 대해 비너스 ORF를 표적화하는 (HA-L) 및 우측(HA-R) 상동성 아암과 함께 프로모터가 없는 비너스 오픈 리딩 프레임(ORF)을 포함하였다. 또한 비너스 ORF 상류에 스플라이스 수용체(SA) 및 2A 서열이 있는데, 이는 비너스 전사체가 스플라이싱되게 하고 PPP1R12C 유전자와 독립적으로 발현되게 하였다.

[0258] 유전자 전달에 대해 유전자 편집을 매개하기 위한 AAVF, AAV2 및 AAV6 벡터의 능력을 1차 인간 제대혈 CD34+ 조혈 줄기/전구 세포에서 비교하였다. 사용한 세포를 다수 공여체로부터 풀링하였다. 정제한 CD34+ 세포를 세포당 다중도 150,000 벡터 게놈(VG)에서 유전자 전달 벡터(AAV*-CBA-mCherry) 또는 유전자 편집 벡터(AAV*-Venus) 중 하나를 이용하여 형질도입하였다. 48시간 후에, 세포를 채취하고 나서, 유세포 분석기에 의해 분석하였다(도 40A 및 도 40B). 나타낸 데이터는 배경 비형질도입 세포의 차감을 포함한다.

[0259] mCherry 발현이 형질도입 효율을 나타내는 반면, 비너스 발현은 유전자 편집 효율을 나타낸다는 가설을 세웠다. 이론에 의해 구속되는 일 없이, 다음은 AAV 형질도입 대 편집의 잠재적 메커니즘의 요약이다. 감염 시, AAV는 세포 표면 수용기에 결합하며, 핵 전좌 및 유입 전에 내재화된다. 핵에서, AAV는 비코팅을 겪으며, 벡터 게놈은 방출된다. 이들 과정은 벡터 게놈과 상관없이 동일한 세포 집단 내에서 각각의 주어진 캡시드에 대해 동일한 속도로 일어날 가능성이 있다. 비코팅 후에, 단일 가닥 CBA-mCherry 게놈은 mCherry 발현 전에 제2 가닥 합성을 겪는다. 다른 한편으로, 프로모터가 없는 비너스 편집 벡터는 염색체 19에 대해 상보성의 게놈 영역으로 보내진다. 이어서, 상동성 아암에 의해 결합된 SA/2A-비너스 카세트는 상동성 의존적 수선(HDR) 메커니즘을 통해 상동성 아암의 내부 연접에서 염색체 내로 재조합할 수 있다. 이 재조합 사건 후에, 비너스는 성공적으로 편집된 세포에서 발현된다.

[0260] 비너스는 AAVF9를 제외한 모든 벡터에 대해 mCherry보다 훨씬 더 큰 세포 집단에서 발현되었다(도 40A 및 40C). 비너스 발현은 AAVF1, AAVF5, AAVF7, AAVF16 및 AAVF17을 이용하는 형질도입 후에 특히 높았다. 동일한 캡시드는 훨씬 더 저수준의 mCherry 발현을 야기하였다(도 40A 및 40C). AAV2 및 AAV6에 의한 형질도입 후에 mCherry와 비너스 발현 둘 다의 최소량이 관찰되었다. mCherry에 대한 비너스의 상대적 발현의 비교를 또한 수행하였다. 구체적으로, 편집 비(실험의 유전자 편집 벡터(비너스)를 이용하는 다양한 세포 유형에서 검출가능한 단백질 발현을 갖는 세포 수 대 앞서 언급한 유전자 전달 벡터(mCherry)를 이용하는 검출 가능한 단백질 발현을 갖는 세포 수의 비를 반영함)를 결정하였다. 편집비는 핵 내의 비코팅을 통한 바이러스 유입 과정에 대한 정규화 후 각각의 AAV 캡시드에 의해 매개되는 편집의 상대적 효율의 추정을 제공한다. 시험한 모든 AAV 벡터는 AAVF9를 제외하고 유전자 전달/이식유전자 발현(mCherry)에 비해 더 효율적인 유전자 편집(비너스)을 나타내었다(도 40D 및 표 7). AAVF5 및 AAVF7은 가장 높은 편집비를 나타내었다(도 40D 및 표 7). AAVF-매개 유전자 편집(비너스)을 또한 AAV 2- 및 AAV6-매개 유전자 편집(비너스)에 대해 비교하였다(표 7, AAVF의 비너스:mCherry 비를 AAV2 또는 AAV6 중 하나에 대한 동일 비로 나눈 것을 나타냄). AAVF 유전자-편집 작제물의 유전자-편집 유효성을 AAV2- 및 AAV6-유전자 편집 작제물에 대해 유리하게 비교하였다. AAVF5 및 AAVF7의 편집비는 비교한 벡터 중에서 가장 높았는데, 이는 이들 벡터가 특히 고도로 효율적인 편집을 매개한다는 것을 나타낸다.

표 7

[0261]

CD34+ CB 세포에서의 편집 대 형질도입 비			
벡터	편집:형질도입 (비너스:mCherry) 비	AAVF 편집: AAV6 편집비	AAVF 편집:AAV2 편집비
AAVF1	4.32	1.23	3.02
AAVF4	3.42	0.98	0.98
AAVF5	16.60	4.74	11.62
AAVF7	14.66	4.19	10.26
AAVF9	0.73	0.21	0.51
AAV2	1.43	0.41	1.00
AAV6	3.50	1.00	2.45

[0262] 본 발명은 기능적으로 동등한 본 발명의 소수의 양상 및 임의의 실시형태의 예시가 본 발명의 범주 내이기 때문에 의도된 실시예에 개시된 특정 실시형태에 의해 범주가 제한되는 것으로 의도되지 않는다. 사실, 본 명세서에 나타내고 기재한 것에 추가로 본 발명의 다양한 변형이 당업자에게 명확하게 될 것이며, 첨부하는 청구범위의

범주 내에 속하는 것으로 의도된다.

[0263] **참고문헌**

1. BAINBRIDGE, J.W., SMITH, A.J., BARKER, S.S., ROBBIE, S., HENDERSON, R., BALAGGAN, K., VISWANATHAN, A., HOLDER, G.E., STOCKMAN, A., TYLER, N., PETERSEN-JONES, S., BHATTACHARYA, S.S., THRASHER, A.J., FITZKE, F.W., CARTER, B.J., RUBIN, G.S., MOORE, A.T., and ALI, R.R. (2008). Effect of gene therapy on visual function in Leber's congenital amaurosis. N Engl J Med 358, 2231-2239.
2. BATCHU, R.B., SHAMMAS, M.A., WANG, J.Y., FREEMAN, J., ROSEN, N., and MUNSHI, N.C. (2002). Adeno-associated virus protects the retinoblastoma family of proteins from adenoviral-induced functional inactivation. Cancer Res 62, 2982-2985.
3. BELL, P., WANG, L., LEBHERZ, C., FLIEDER, D.B., BOVE, M.S., WU, D., GAO, G.P., WILSON, J.M., and WIVEL, N.A. (2005). No evidence for tumorigenesis of AAV vectors in a large-scale study in mice. Mol Ther 12, 299-306.
4. BERNS, K.I., and GIRAUD, C. (1996). Biology of adeno-associated virus. Curr Top Microbiol Immunol 218, 1-23.
5. BIFFI, A., and CESANI, M. (2008). Human hematopoietic stem cells in gene therapy: preclinical and clinical issues. Curr Gene Ther 8, 135-146.
6. BRANTLY, M.L., CHULAY, J.D., WANG, L., MUELLER, C., HUMPHRIES, M., SPENCER, L.T., ROUHANI, F., CONLON, T.J., CALCEDO, R., BETTS, M.R., SPENCER, C., BYRNE, B.J., WILSON, J.M., and FLOTTE, T.R. (2009). Sustained transgene expression despite T lymphocyte responses in a clinical trial of rAAV1-AAT gene therapy. Proc Natl Acad Sci U S A.
7. CHATTERJEE, S., JOHNSON, P.R., and WONG, K.K., JR. (1992). Dual-target inhibition of HIV-1 in vitro by means of an adeno-associated virus antisense vector. Science 258, 1485-1488.
8. CHATTERJEE, S., LI, W., WONG, C.A., FISHER-ADAMS, G., LU, D., GUHA, M., MACER, J.A., FORMAN, S.J., and WONG, K.K., JR. (1999). Transduction of primitive human marrow and cord blood-derived hematopoietic progenitor cells with adeno-associated virus vectors. Blood 93, 1882-1894.
9. CHATTERJEE, S., WONG, KK. (1993). Adeno-Associated Viral Vectors for the Delivery of Antisense RNA. METHODS -LONDON- A COMPANION TO METHODS IN ENZYMOLOGY- 5, 1.
10. CIDECIYAN, A.V., HAUSWIRTH, W.W., ALEMAN, T.S., KAUSHAL, S., SCHWARTZ, S.B., BOYE, S.L., WINDSOR, E.A., CONLON, T.J., SUMAROKA, A., [0264]

PANG, J.J., ROMAN, A.J., BYRNE, B.J., and JACOBSON, S.G. (2009). Human RPE65 gene therapy for Leber congenital amaurosis: persistence of early visual improvements and safety at 1 year. Hum Gene Ther 20, 999-1004.

11. EINERHAND, M.P., ANTONIOU, M., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., BERNS, K.I., GROSVELD, F., and VALERIO, D. (1995). Regulated high-level human beta-globin gene expression in erythroid cells following recombinant adeno-associated virus-mediated gene transfer. Gene Ther 2, 336-343.

12. FISHER-ADAMS, G., WONG, K.K., JR., PODSAKOFF, G., FORMAN, S.J., and CHATTERJEE, S. (1996). Integration of adeno-associated virus vectors in CD34+ human hematopoietic progenitor cells after transduction. Blood 88, 492-504.

13. FLOTTE, T.R., BRANTLY, M.L., SPENCER, L.T., BYRNE, B.J., SPENCER, C.T., BAKER, D.J., and HUMPHRIES, M. (2004). Phase I trial of intramuscular injection of a recombinant adeno-associated virus alpha 1-antitrypsin (rAAV2-CB-hAAT) gene vector to AAT-deficient adults. Hum Gene Ther 15, 93-128.

14. GAO, G., VANDENBERGHE, L.H., ALVIRA, M.R., LU, Y., CALCEDO, R., ZHOU, X., and WILSON, J.M. (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78, 6381-6388.

15. HACEIN-BEY-ABINA, S., VON KALLE, C., SCHMIDT, M., LE DEIST, F., WULFFRAAT, N., MCINTYRE, E., RADFORD, I., VILLEVAL, J.L., FRASER, C.C., CAVAZZANA-CALVO, M., and FISCHER, A. (2003). A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 348, 255-256.

16. HAN, Z., ZHONG, L., MAINA, N., HU, Z., LI, X., CHOUTHAI, N.S., BISCHOF, D., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., SLAYTON, W.B., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (2008). Stable integration of recombinant adeno-associated virus vector genomes after transduction of murine hematopoietic stem cells. Hum Gene Ther 19, 267-278.

17. JAYANDHARAN, G.R., ZHONG, L., LI, B., KACHNIARZ, B., and SRIVASTAVA, A. (2008). Strategies for improving the transduction efficiency of single-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. Gene Ther 15, 1287-1293.

18. KAPLITT, M.G., FEIGIN, A., TANG, C., FITZSIMONS, H.L., MATTIS, P., LAWLOR, P.A., BLAND, R.J., YOUNG, D., STRYBING, K., EIDELBERG, D., and DURING, M.J. (2007). Safety and tolerability of gene therapy with an adeno-associated virus (AAV) borne GAD gene for Parkinson's disease: an open label, phase I trial. Lancet 369, 2097-2105.

[0265]

19. KELLS, A.P., HADACZEK, P., YIN, D., BRINGAS, J., VARENIKA, V., FORSAYETH, J., and BANKIEWICZ, K.S. (2009). Efficient gene therapy-based method for the delivery of therapeutics to primate cortex. Proc Natl Acad Sci U S A 106, 2407-2411.

20. KESSLER, P.D., PODSAKOFF, G.M., CHEN, X., MCQUISTON, S.A., COLOSI, P.C., MATELIS, L.A., KURTZMAN, G.J., and BYRNE, B.J. (1996). Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein. Proc Natl Acad Sci U S A 93, 14082-14087.

21. MANNO, C.S., CHEW, A.J., HUTCHISON, S., LARSON, P.J., HERZOG, R.W., ARRUDA, V.R., TAI, S.J., RAGNI, M.V., THOMPSON, A., OZELO, M., COUTO, L.B., LEONARD, D.G., JOHNSON, F.A., MCCLELLAND, A., SCALLAN, C., SKARSGARD, E., FLAKE, A.W., KAY, M.A., HIGH, K.A., and GLADER, B. (2003). AAV-mediated factor IX gene transfer to skeletal muscle in patients with severe hemophilia B. Blood 101, 2963-2972.

22. MCCORMACK, M.P., and RABBITTS, T.H. (2004). Activation of the T-cell oncogene LMO2 after gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 350, 913-922.

23. MILLER, D.G., ADAM, M.A., and MILLER, A.D. (1990). Gene transfer by retrovirus vectors occurs only in cells that are actively replicating at the time of infection. Mol Cell Biol 10, 4239-4242.

24. PAZ, H., WONG, C.A., LI, W., SANTAT, L., WONG, K.K., and CHATTERJEE, S. (2007). Quiescent subpopulations of human CD34-positive hematopoietic stem cells are preferred targets for stable recombinant adeno-associated virus type 2 transduction. Hum Gene Ther 18, 614-626.

25. PETRS-SILVA, H., DINCULESCU, A., LI, Q., MIN, S.H., CHIODO, V., PANG, J.J., ZHONG, L., ZOLOTUKHIN, S., SRIVASTAVA, A., LEWIN, A.S., and HAUSWIRTH, W.W. (2009). High-efficiency transduction of the mouse retina by tyrosine-mutant AAV serotype vectors. Mol Ther 17, 463-471.

26. PODSAKOFF, G., WONG, K.K., JR., and CHATTERJEE, S. (1994). Efficient gene transfer into nondividing cells by adeno-associated virus-based vectors. J Virol 68, 5656-5666.

27. PONNAZHAGAN, S., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (1997). Adeno-associated virus type 2-mediated transduction of murine hematopoietic cells with long-

[0266]

term repopulating ability and sustained expression of a human globin gene in vivo. J Virol 71, 3098-3104.

28. RAJ, K., OGSTON, P., and BEARD, P. (2001). Virus-mediated killing of cells that lack p53 activity. Nature 412, 914-917.

29. SANTAT, L., PAZ, H., WONG, C., LI, L., MACER, J., FORMAN, S., WONG, K.K., and CHATTERJEE, S. (2005). Recombinant AAV2 transduction of primitive human hematopoietic stem cells capable of serial engraftment in immune-deficient mice. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 11053-11058.

30. SRIVASTAVA, A. (2004). Gene delivery to human and murine primitive hematopoietic stem and progenitor cells by AAV2 vectors. Methods Mol Biol 246, 245-254.

31. TOWNE, C., SCHNEIDER, B.L., KIERAN, D., REDMOND, D.E., JR., and AEBISCHER, P. (2009). Efficient transduction of non-human primate motor neurons after intramuscular delivery of recombinant AAV serotype 6. Gene Ther.

32. ZHONG, L., CHEN, L., LI, Y., QING, K., WEIGEL-KELLEY, K.A., CHAN, R.J., YODER, M.C., and SRIVASTAVA, A. (2004a). Self-complementary adeno-associated virus 2 (AAV)-T cell protein tyrosine phosphatase vectors as helper viruses to improve transduction efficiency of conventional single-stranded AAV vectors in vitro and in vivo. Mol Ther 10, 950-957.

33. ZHONG, L., LI, B., JAYANDHARAN, G., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., HERZOG, R.W., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., and SRIVASTAVA, A. (2008a). Tyrosine phosphorylation of AAV2 vectors and its consequences on viral intracellular trafficking and transgene expression. Virology 381, 194-202.

34. ZHONG, L., LI, B., MAH, C.S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJE-MCKENNA, M., COOPER, M., HERZOG, R.W., ZOLOTUKHIN, I., WARRINGTON, K.H., JR., WEIGEL-VAN AKEN, K.A., HOBBS, J.A., ZOLOTUKHIN, S., MUZYCZKA, N., and SRIVASTAVA, A. (2008b). Next generation of adeno-associated virus 2 vectors: point mutations in tyrosines lead to high-efficiency transduction at lower doses. Proc Natl Acad Sci U S A 105, 7827-7832.

35. ZHONG, L., LI, W., YANG, Z., QING, K., TAN, M., HANSEN, J., LI, Y., CHEN, L., CHAN, R.J., BISCHOF, D., MAINA, N., WEIGEL-KELLEY, K.A., ZHAO, W., LARSEN, S.H., YODER, M.C., SHOU, W., and SRIVASTAVA, A. (2004b). Impaired nuclear transport and uncoating limit recombinant adeno-associated virus 2 vector-

[0267]

mediated transduction of primary murine hematopoietic cells. Hum Gene Ther 15, 1207-1218.

36. ZHONG, L., ZHAO, W., WU, J., LI, B., ZOLOTUKHIN, S., GOVINDASAMY, L., AGBANDJEMCKENNA, M., and SRIVASTAVA, A. (2007). A dual role of EGFR protein tyrosine kinase signaling in ubiquitination of AAV2 capsids and viral second-strand DNA synthesis. Mol Ther 15, 1323-1330.

37. ZHOU, S.Z., BROXMEYER, H.E., COOPER, S., HARRINGTON, M.A., and SRIVASTAVA, A. (1993). Adeno-associated virus 2-mediated gene transfer in murine hematopoietic progenitor cells. Exp Hematol 21, 928-933.

38. KHAN, I.G., HIRATA, R.K., RUSSELL, D.W. (2011) AAV-mediated gene targeting methods for human cells. Nat Protoc. 4, 482-501.

39. KHOTIN, R.M., LINDEN, R.M., and BERNS, K.I. (1992). Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination. EMBO 13, 5071-8.

40. GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1994). Site-specific integration by adeno-associated virus is directed by a cellular DNA sequence. Proc. Natl Acad Sci USA 21, 10039-43.

41. LINDEN, R.M., WARD, P., GIRAUD, C., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1996A). Site-specific integration by adeno-associated virus. Proc. Natl Acad Sci USA 21, 11288-94.

42. LINDEN, R.M., WINOCOUR, E., and BERNS, K.I. (1996B). The recombination signals for adeno-associated virus site-specific integration. Proc. Natl Acad Sci USA 15, 7966-72.

43. XU, L., O'MALLEY, T., SANDS, M.S., WANG, B., MEYERROSE, T., HASKINS, M.E., and PONDER, K.P (2004). *In Vivo* Transduction of Hematopoietic Stem Cells After Neonatal Intravenous Injection of an Amphotrophic Retroviral Vector in Mice. Mol. Ther. Jul; 10(1):37-44.

44. WANG, C.X., SATHER, B.D., WANG, X., ADAIR, J., KHAN, I., SINGH, S., LANG, S., ADAMS, A., CURINGA, G., KIEM, H-P., MIAO, C.H., RAWLINGS, D.J., and TORBETT, B.E. (2014). Rapamycin relieves lentiviral vector transduction resistance in human and mouse hematopoietic stem cells. Blood. Aug; 124(6):913-23.

45. CARBONARO, D.A., JIN, X., PETERSEN, D., WANG, X., DOREY, F., KIL, K.S., ALDRICH, M., BLACKBURN, M.R., KELLEMS, R.E., and KOHN, D.B. (2006) *In Vivo* Transduction by Intravenous Injection of a Lentiviral Vector Expressing Human

[0268]

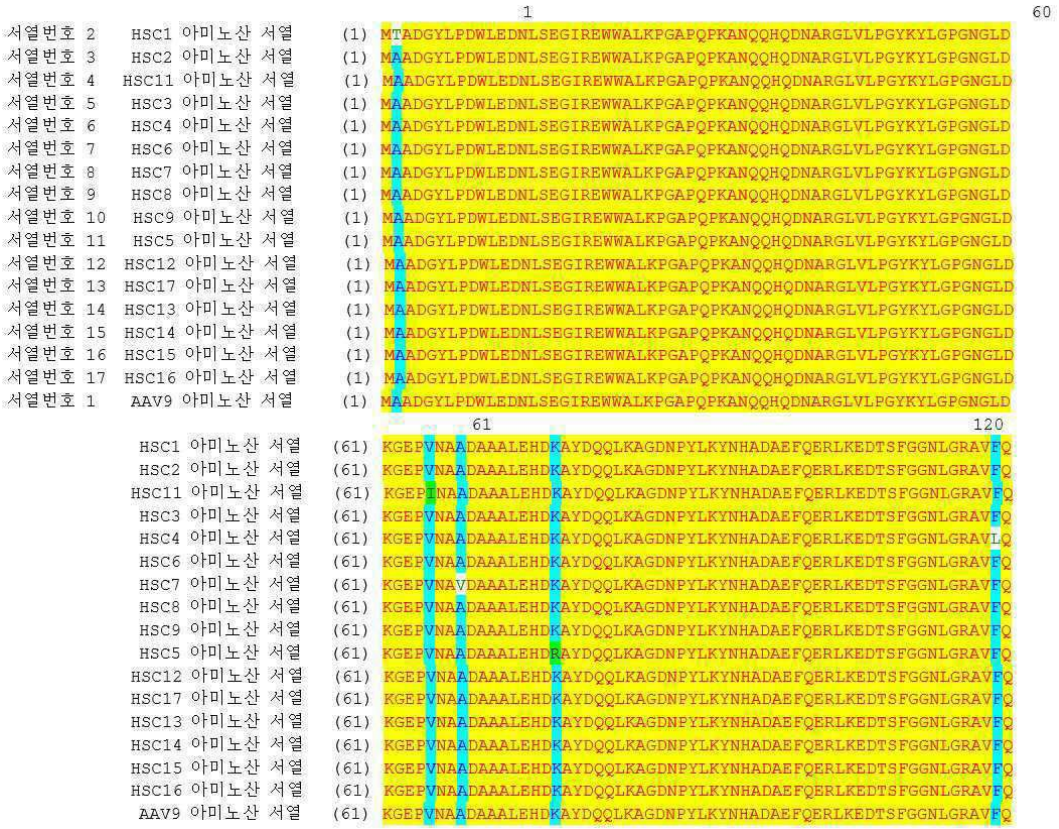
ADA into Neonatal ADA Gene Knockout Mice: A Novel Form of Enzyme Replacement Therapy for ADA Deficiency. Mol. Ther. Jun; 13(6):1110-20.

46. SMITH, L.J., UL-HASAN, T., CARVAINES, S.K., VAN VLIET, K., YANG, E., WONG, JR, K.K., AGBANDJE-MCKENNA, M., and CHATTERJEE, S. (2014) Gene Transfer Properties and Structural Modeling of Human Stem Cell-derived AAV. Mol. Ther. Sept; 22(9):1625-1634.

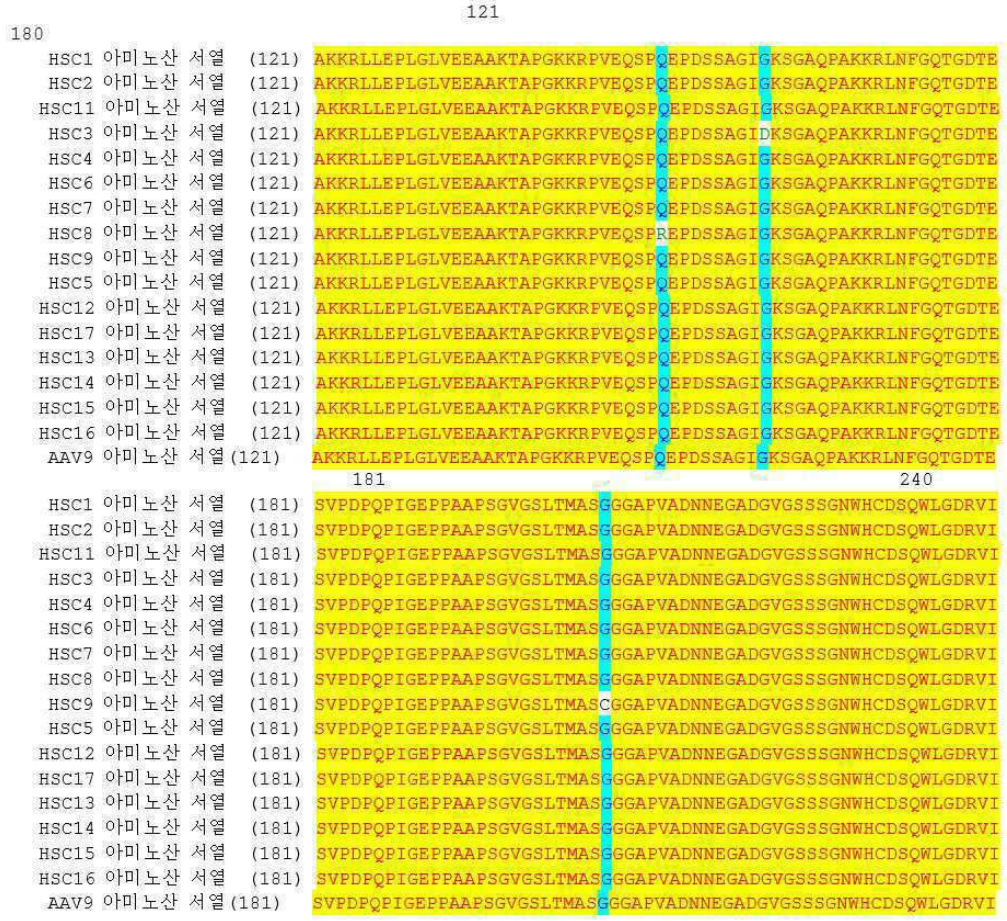
[0269]

도면

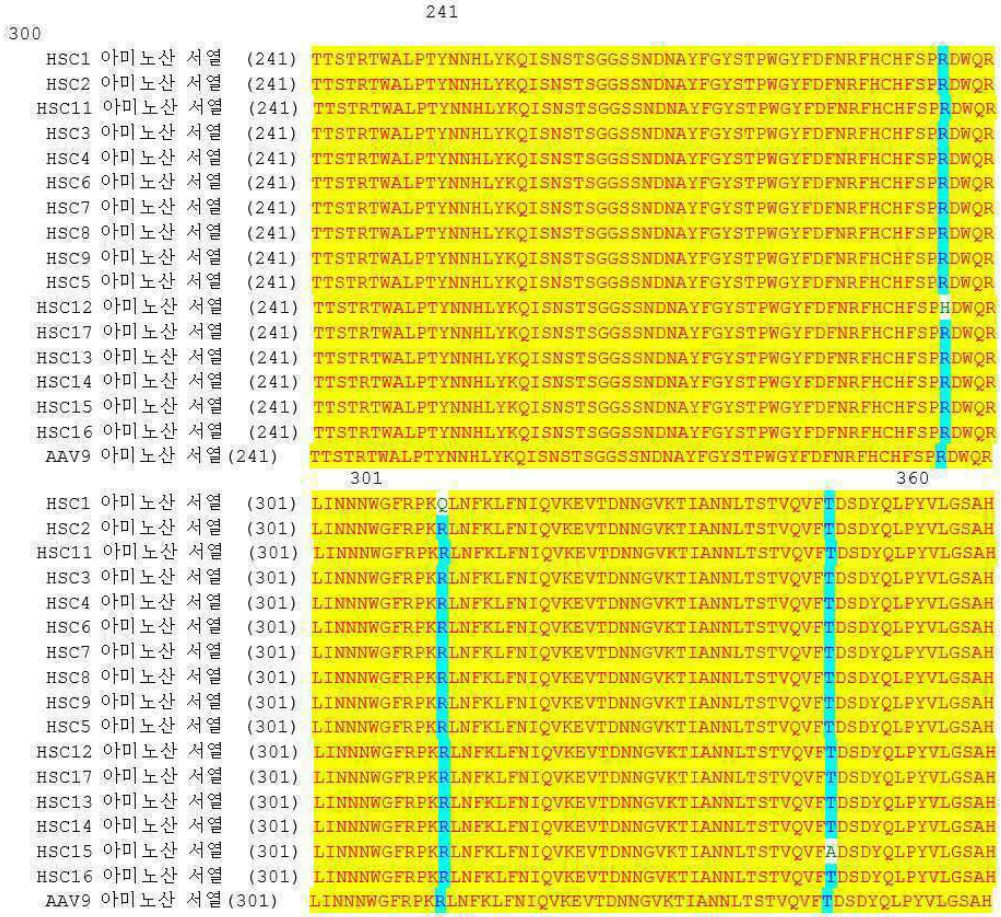
도면1a


1
60
서열번호 2 HSC1 아미노산 서열 (1) MTADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 3 HSC2 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 4 HSC11 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 5 HSC3 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 6 HSC4 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 7 HSC6 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 8 HSC7 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 9 HSC8 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 10 HSC9 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 11 HSC5 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 12 HSC12 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 13 HSC17 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 14 HSC13 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 15 HSC14 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 16 HSC15 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 17 HSC16 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
서열번호 1 AAV9 아미노산 서열 (1) MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWALKPGAPQPKANQQHQDNARGLVLPGYKYLGPGNGLD
61
120
HSC1 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC2 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC11 아미노산 서열 (61) KGEPINAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC3 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC4 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVLQ
HSC6 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC7 아미노산 서열 (61) KGEPVNAVDAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC8 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC9 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC5 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDRAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC12 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC17 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC13 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC14 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC15 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
HSC16 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ
AAV9 아미노산 서열 (61) KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLKAGDNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQ

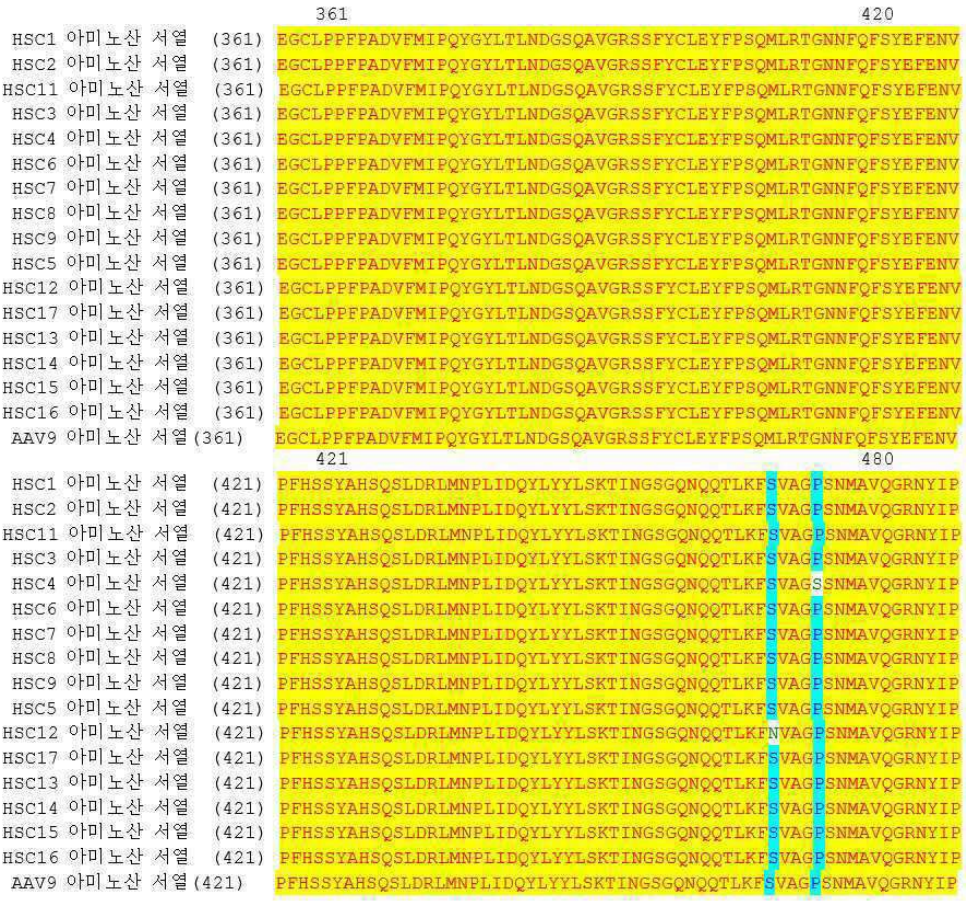
도면1b


121
180
HSC1 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC2 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC11 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC3 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIDKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC4 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC6 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC7 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC8 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPREPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC9 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC5 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC12 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC17 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC13 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC14 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC15 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
HSC16 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
AAV9 아미노산 서열 (121) AKKRLLEPLGLVEEAAKTAPGKKRPVEQSPQEPDSSAGIGKSGAQPAKKRLNFGQTGDTE
181
240
HSC1 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC2 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC11 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC3 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC4 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC6 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC7 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC8 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC9 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASCGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC5 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC12 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC17 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC13 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC14 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC15 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
HSC16 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI
AAV9 아미노산 서열 (181) SVPDPQPIGEPPAAPSGVGSLTMASGGGAPVADNNEGADGVGSSSGNWHCDSQWLGDRVI

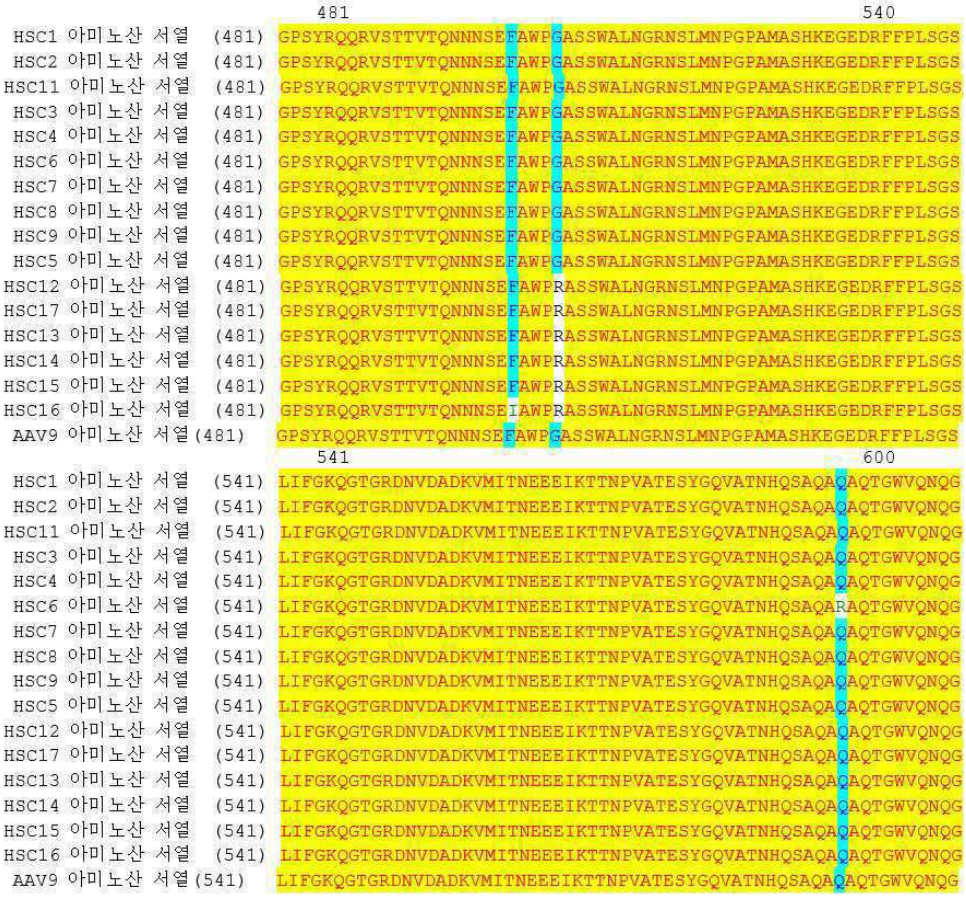
도면1c


241
300
HSC1 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC2 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC11 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC3 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC4 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC6 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC7 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC8 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC9 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC5 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC12 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPHDWQR
HSC17 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC13 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC14 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC15 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
HSC16 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
AAV9 아미노산 서열 (241) TTSTRTWALPTYNNHLYKQISNSTSGGSSNDNAYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
301
360
HSC1 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKQLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC2 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC11 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC3 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC4 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC6 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC7 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC8 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC9 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC5 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC12 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC17 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC13 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC14 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
HSC15 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFADSDYQLPYVLGSAH
HSC16 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH
AAV9 아미노산 서열 (301) LINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTDNNGVKTIANNLTSTVQVFTDSDYQLPYVLGSAH

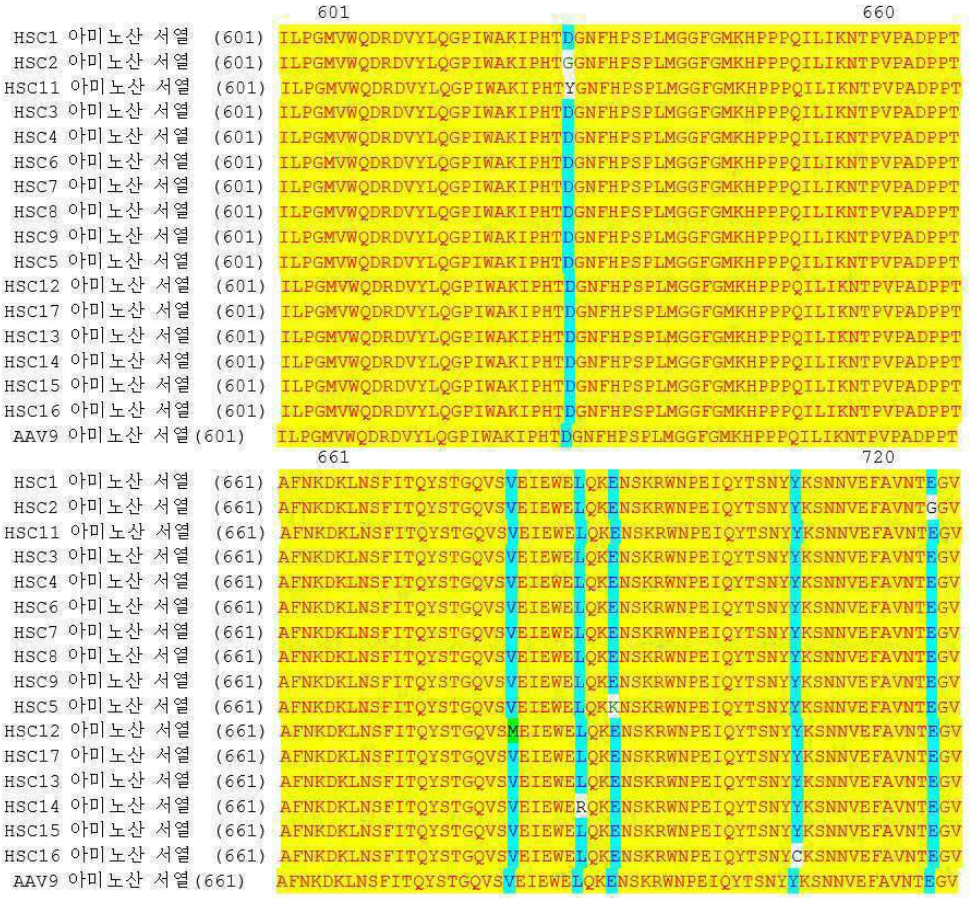
도면1d


361
420
HSC1 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC2 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC11 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC3 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC4 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC6 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC7 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC8 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC9 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC5 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC12 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC17 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC13 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC14 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC15 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
HSC16 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
AAV9 아미노산 서열 (361) EGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNDGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFQFSYEFENV
421
480
HSC1 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC2 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC11 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC3 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC4 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGSSNMAVQGRNYIP
HSC6 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC7 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC8 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC9 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC5 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC12 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFNVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC17 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC13 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC14 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC15 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
HSC16 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP
AAV9 아미노산 서열 (421) PFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKTINGSGQNQQTLKFSVAGPSNMAVQGRNYIP

도면1e


481 540
HSC1 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC2 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC11 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC3 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC4 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC6 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC7 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC8 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC9 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC5 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC12 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC17 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC13 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC14 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC15 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
HSC16 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEIAWPRASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
AAV9 아미노산 서열 (481) GPSYRQQRVSTTVTQNNNSEFAWPGASSWALNGRNSLMNPGPAMASHKEGEDRFFPLSGS
541 600
HSC1 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC2 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC11 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC3 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC4 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC6 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQARAQTGWVQNQG
HSC7 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC8 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC9 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC5 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC12 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC17 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC13 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC14 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC15 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
HSC16 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG
AAV9 아미노산 서열 (541) LIFGKQGTGRDNVDADKVMITNEEEIKTTNPVATESYGQVATNHQSAQAQAQTGWVQNQG

도면1f


601 660
HSC1 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC2 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTGGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC11 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTYGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC3 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC4 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC6 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC7 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC8 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC9 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC5 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC12 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC17 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC13 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC14 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC15 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
HSC16 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
AAV9 아미노산 서열 (601) ILPGMVWQDRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGMKHPPPQILIKNTPVPADPPT
661 720
HSC1 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC2 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTGGV
HSC11 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC3 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC4 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC6 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC7 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC8 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC9 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC5 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKKNSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC12 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSMEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC17 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC13 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC14 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWERQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC15 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV
HSC16 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYCKSNNVEFAVNTEGV
AAV9 아미노산 서열 (661) AFNKDKLNSFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSNNVEFAVNTEGV

도면1g


721 736
HSC1 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC2 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC11 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC3 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC4 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC6 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC7 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC8 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC9 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC5 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC12 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC17 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC13 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC14 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC15 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
HSC16 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL
AAV9 아미노산 서열 (721) YSEPRPIGTRYLTRNL

도면2a

캡시드	염기 변화	AAV 9 인간 단리물 아미노산	클론 신규 아미노산	아미노산의 차이	아미노산의 배치 (HVR = 초가변 영역)
HSC1 서열번호 2	G에서 A로	GCT - 알라닌	ACT - 트레오닌	알라닌 비극성 및 중성이고; 트레오닌은 극성 및 중성임	캡시드 내로 4개의 염기; 2번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP1
HSC1 서열번호 2	G에서 A로	CGA - 아르기닌	CAA - 글루타민	아르기닌은 극성 및 강염기성이고; 글루타민은 극성 및 중성임	캡시드 내로 935개의 염기; 312번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP3
HSC2 서열번호 3	A에서 G로	GGA - 글리신	GGG - 글리신	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1515개의 염기; 505번째 아미노산; HVR 7 다음의 첫번째 아미노산, VP3
HSC2 서열번호 3	A에서 G로	GAC- 아스파트산	GGC - 글리신	아스파트산은 극성 및 산성이고; 글리신은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 1877개의 염기; 626번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP3
HSC2 서열번호 3	A에서 G로	GAA - 글루탐산	GGA - 글리신	글루탐산은 극성 및 산성이고; 글리신은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 2153개의 염기; 718번째 아미노산; HVR에서 12개의 마지막 아미노산, VP3
HSC3 서열번호 5	G에서 A로	GGC - 글리신	GAC - 아스파트산	글리신은 비극성 및 중성이고; 아스파트산은 극성 및 산성임	캡시드 내로 479개의 염기; 160번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP1
HSC3 서열번호 5	A에서 G로	TCA - 세린	TCG - 세린	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1044개의 염기, 348번째 아미노산; HVR에 있지 않음 VP3
HSC4 서열번호 6	T에서 C로	TTC - 페닐알라닌	CTC - 류신	페닐알라닌은 비극성 및 중성이고; 류신은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 355개의 염기, 119번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP1
HSC4 서열번호 6	C에서 T로	CCC - 프롤린	TCC - 세린	프롤린은 비극성 및 중성이고; 세린은 극성 및 중성임	캡시드 내로 1402개의 염기; 468번째 아미노산; HVR 5에서, VP3
HSC4 서열번호 6	G에서 A로	CCG - 프롤린	CCA - 프롤린	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1809개의 염기; 603번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP3

도면2b

캡시드	염기 변화	AAV 9 인간 단리물 아미노산	클론 신규 아미노산	아미노산의 차이	아미노산의 배치 (HVR = 초가변 영역)
HSC6 서열번호 8	A에서 G로	CAG - 글루타민	CGG - 아르기닌	글루타민은 극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1769개의 염기; 590번째 아미노산; HVR 10에서; VP3
HSC5 서열번호 11	A에서 G로	AAG - 라이신	AGG - 아르기닌	라이신은 극성 및 염기성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 230개의 염기; 77번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP1
HSC5 서열번호 11	C에서 T로	CCC - 프롤린	CCT - 프롤린	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1404개의 염기; 468번째 아미노산; HVR 5에서, VP3
HSC5 서열번호 11	G에서 A로	GAA - 글루탐산	AAA - 라이신	글루탐산은 극성 및 산성이고; 라이신은 극성 및 염기성임	캡시드 내로 2068개의 염기; 690번째 아미노산; HVR에 있지 않음, VP3
HSC5 서열번호 11	T에서 C로	AAT - 아스파라긴	AAC - 아스파라긴	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 2148개의 염기; 716번째 아미노산; HVR 13에서, VP3
HSC11 서열번호 5	G에서 A로	GTC - 발린	ATC - 아이소류신	아이소류신은 비극성 및 중성이고; 발린은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 193개의 염기; 65번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP1
HSC11 서열번호 4	G에서 T로	GAC- 아스파트산	TAC - 타이로신	아스파트산은 극성 및 산성이고; 타이로신은 극성 및 중성임	캡시드 내로 1876개의 염기; 626번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP3
HSC7 서열번호 8	C에서 T로	GCA - 알라닌	GTA - 발린	알라닌은 비극성 및 중성이고; 발린은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 203개의 염기; 68번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP1
HSC7 서열번호 8	C에서 T로	TTC - 페닐알라닌	TTT - 페닐알라닌	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 924개의 염기; 308번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP3
HSC8 서열번호 9	A에서 G로	CAG - 글루타민	CGG - 아르기닌	글루타민은 극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 452개의 염기; 151번째 아미노산; HVR 1에서; VP1

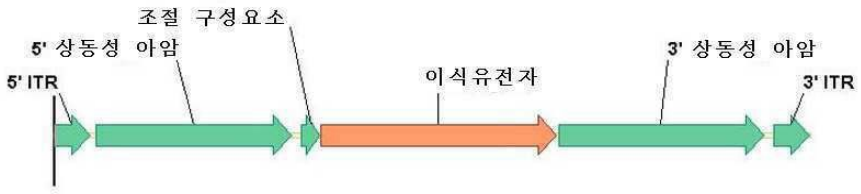
도면2c

캡시드	염기 변화	AAV 9 인간 단리물 아미노산	클론 신규 아미노산	아미노산의 차이	아미노산의 배치 (HVR = 초가변 영역)
HSC8 서열번호 9	G에서 A로	GAG - 글루타민 Acid	GAA - 글루타민산	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 2058개의 염기; 686번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP3
HSC9 서열번호 10	T에서 C로	TTT - 페닐알라닌	TTC - 페닐알라닌	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 357개의 염기; 119번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP1
HSC9 서열번호 10	T에서 G로	TGT - 시스테인	GGT - 글리신	시스테인은 극성 및 중성이고; 글리신은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 616개의 염기; 206번째 아미노산; HVR에 있지 않음; VP3의 처음
HSC12 서열번호 12	A에서 T로	GCA - 알라닌	GCT - 알라닌	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 579개의 염기; 캡시드 내로 193번째 아미노산. HVR 2 근처의 VP2 말단
HSC12 서열번호 12	G에서 A로	CGT - 아르기닌	CAT - 히스티딘	아르기닌은 극성 및 강염기성이고; 히스티딘은 극성 및 약염기성임	캡시드 내로 887개의 염기; 캡시드 내로 296번째 아미노산; VP3에서, HVR에 있지 않음
HSC12 서열번호 12	G에서 A로	AGT - 세린	AAT - 아스파라긴	세린은 극성 및 중성이고; 아스파라긴은 극성 및 중성임	캡시드 내로 1391개의 염기; 캡시드 내로 464번째 아미노산; HVR 5 내 VP3에서
HSC12 서열번호 12	T에서 C로	GCT - 알라닌	GCC - 알라닌	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1506개의 염기; 캡시드 내로 502번째 아미노산; HVR 7 내 VP3에서
HSC12 서열번호 12	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤
HSC12 서열번호 12	G에서 A로	GTG - 발린	ATG - 메티오닌	발린은 비극성 및 중성이고; 메티오닌은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 2041개의 염기; 캡시드 내로 681번째 아미노산; VP3에서; HVR에 있지 않음
HSC13 서열번호 14	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤

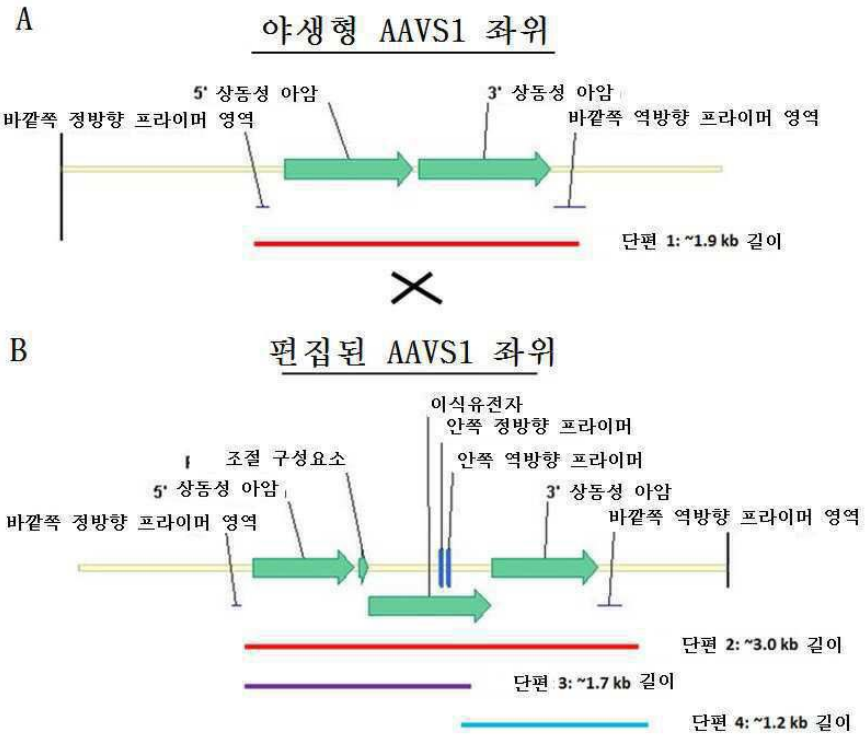
도면2d

캡시드	염기 변화	AAV 9 인간 단리물 아미노산	클론 신규 아미노산	아미노산의 차이	아미노산의 배치 (HVR = 초가변 영역)
HSC14 서열번호 15	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤
HSC14 서열번호 15	T에서 G로	CTG - 류신	CGG - 아르기닌	류신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 2060개의 염기; 캡시드 내로 687번째 아미노산; VP3에서; HVR에 있지 않음.
HSC15 서열번호 16	A에서 G로	ACG - 트레오닌	GCG - 알라닌	트레오닌은 극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1036개의 염기; 캡시드 내로 346번째 아미노산 346번째; VP3에서; HVR에 있지 않음
HSC15 서열번호 16	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신인 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤
HSC16 서열번호 17	T에서 A로	TTT - 페닐알라닌	ATT - 아이소류신	페닐알라닌은 비극성 및 중성이고; 아이소류신은 비극성 및 중성임	캡시드 내로 1501개의 염기; 캡시드 내로 501번째 아미노산; VP3에서, HVR7 내
HSC16 서열번호 17	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤
HSC16 서열번호 17	G에서 A로	CCG - 프롤린	CCA - 프롤린	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 1713개의 염기; 캡시드 내로 571번째 아미노산; VP3에서, HVR에 있지 않음
HSC16 서열번호 17	A에서 G로	TAC - 타이로신	TGC - 시스테인	타이로신은 극성 및 중성이고; 시스테인은 극성 및 중성임	캡시드 내로 2117개의 염기; 캡시드 내로 706번째 아미노산 706번째; VP3에서; HVR 12 내이며, YF 돌연변이 다음임
HSC17 서열번호 13	C에서 T로	GAC - 아스파트산	GAT - 아스파트산	아미노산 차이 없음	캡시드 내로 180개의 염기; 캡시드 내로 60번째 아미노산; VP1에서; HVR에 있지 않음
HSC17 서열번호 13	G에서 A로	GGA - 글리신	AGA - 아르기닌	글리신은 비극성 및 중성이고; 아르기닌은 극성 및 강염기성임	캡시드 내로 1513개의 염기; 캡시드 내로 505번째 아미노산; VP3에서, HVR 7의 오른쪽 뒤

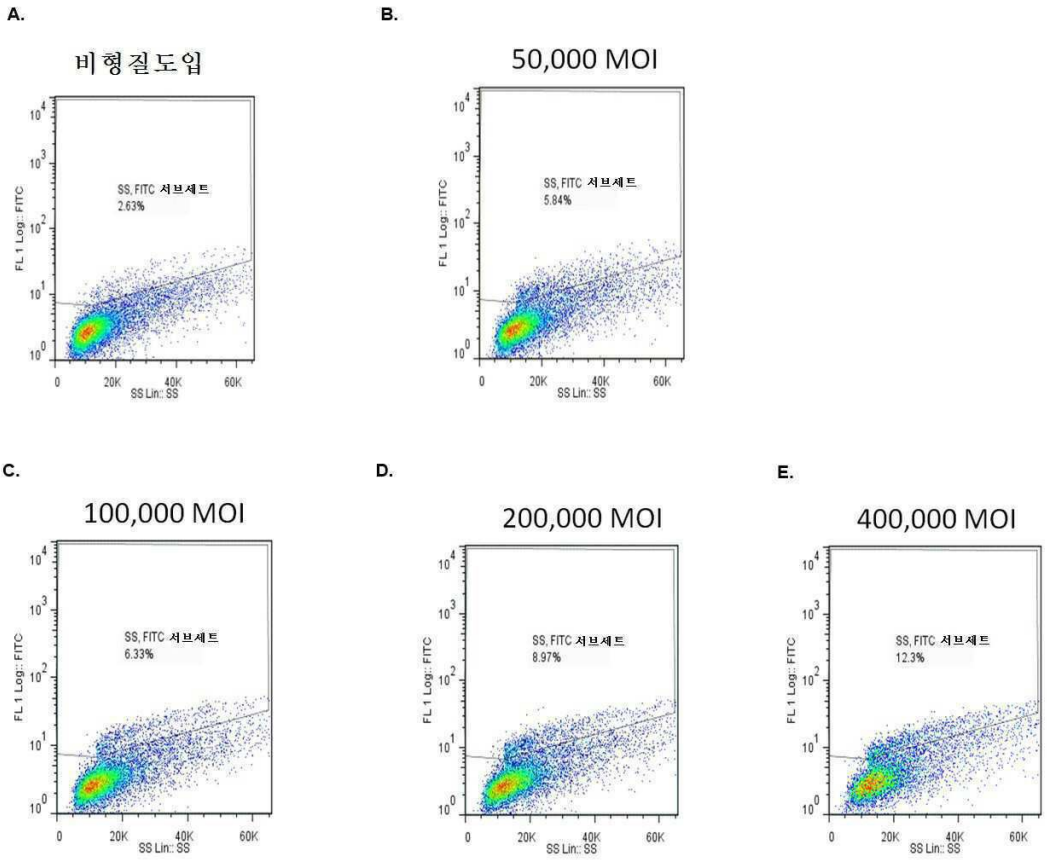
도면3



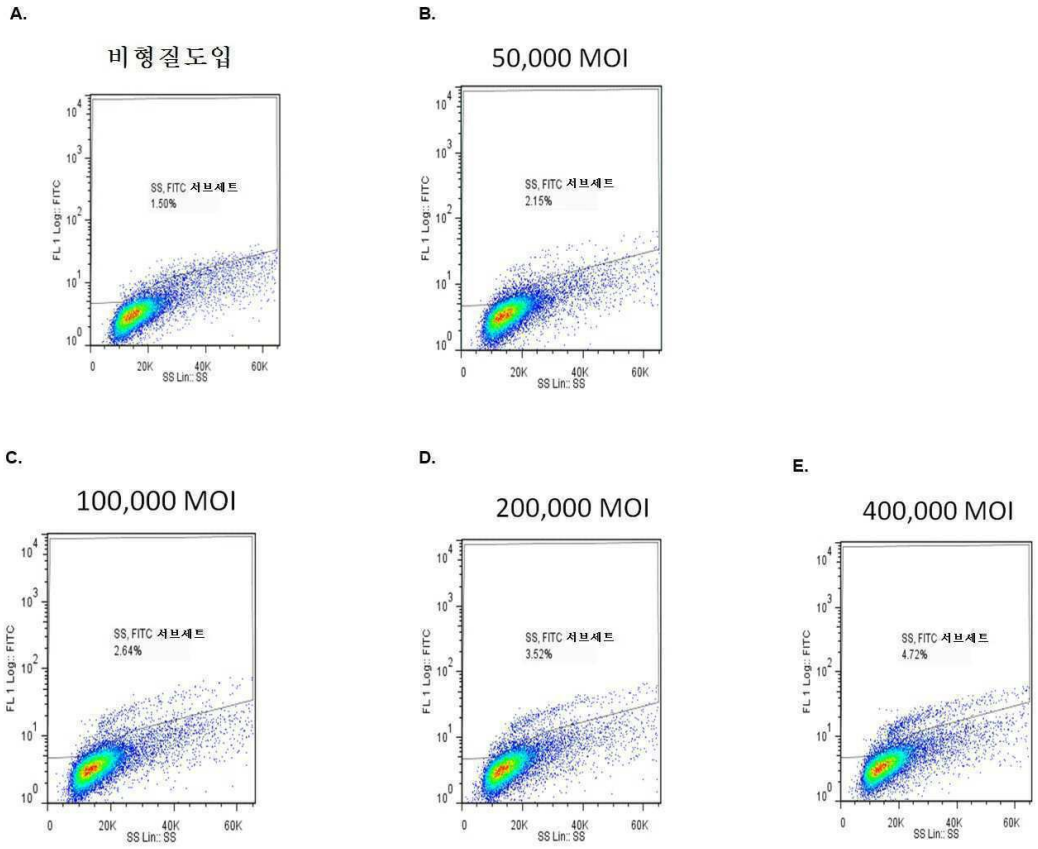
도면4


A
야생형 AAVS1 좌위
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
단편 1: ~1.9 kb 길이
B
편집된 AAVS1 좌위
이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
조절 구성요소
안쪽 역방향 프라이머
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
단편 2: ~3.0 kb 길이
단편 3: ~1.7 kb 길이
단편 4: ~1.2 kb 길이

도면5

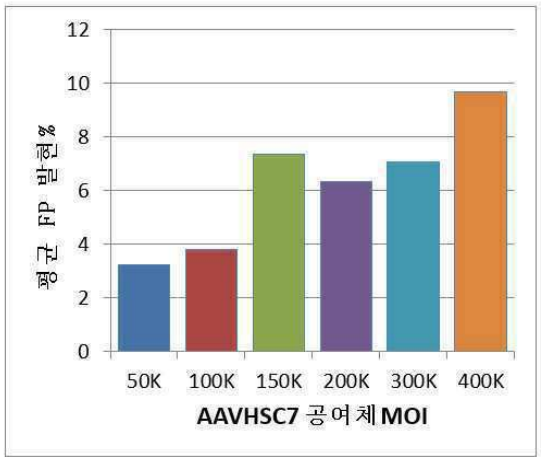

A.
비형질도입
SS, FITC 서브세트
2.63%
B.
50,000 MOI
SS, FITC 서브세트
5.84%
C.
100,000 MOI
SS, FITC 서브세트
6.33%
D.
200,000 MOI
SS, FITC 서브세트
8.97%
E.
400,000 MOI
SS, FITC 서브세트
12.3%
FL 1 Log :: FITC
SS Lin :: SS

도면6

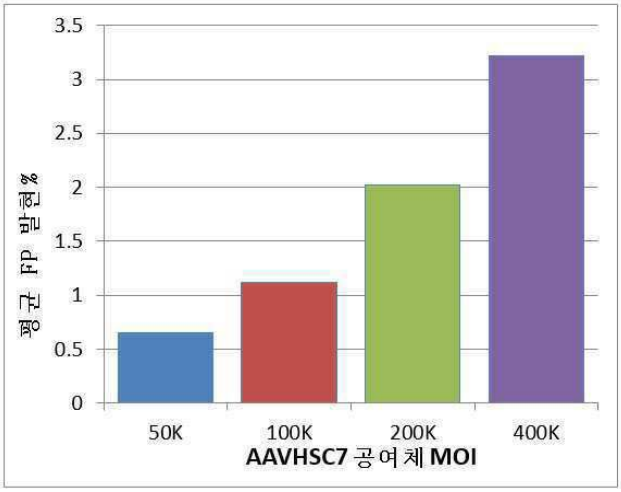

A.
비형질도입
SS, FITC 서브세트
1.50%
B.
50,000 MOI
SS, FITC 서브세트
2.15%
C.
100,000 MOI
SS, FITC 서브세트
2.64%
D.
200,000 MOI
SS, FITC 서브세트
3.52%
E.
400,000 MOI
SS, FITC 서브세트
4.72%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

도면7

A.

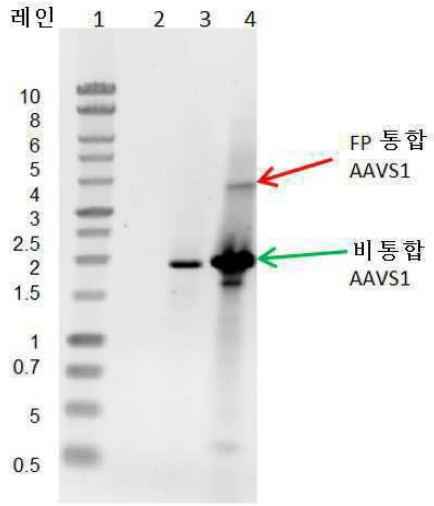

12
10
8
6
4
2
0
평균 FP 발현%
50K
100K
150K
200K
300K
400K
AAVHSC7 공여체 MOI

B.

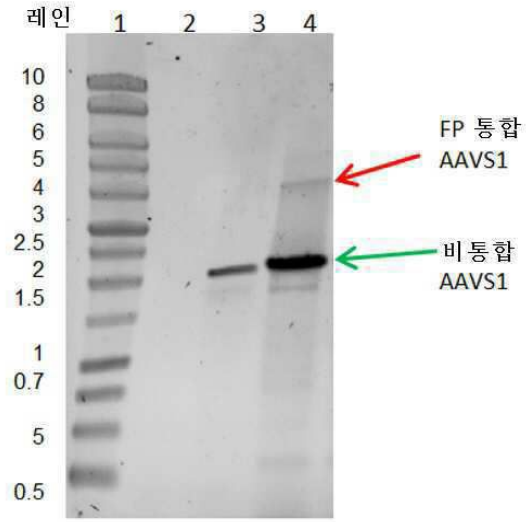

3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
평균 FP 발현%
50K
100K
200K
400K
AAVHSC7 공여체 MOI

도면8

A.

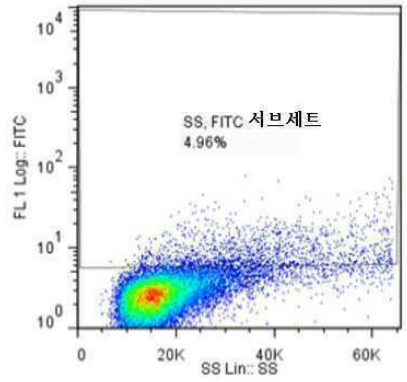

레인 1 2 3 4
10
8
6
5
4
3
2.5
2
1.5
1
0.7
5
0.5
FP 통합
AAVS1
비통합
AAVS1

B.

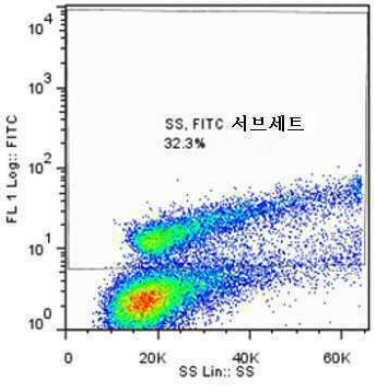

레인 1 2 3 4
10
8
6
5
4
3
2.5
2
1.5
1
0.7
5
0.5
FP 통합
AAVS1
비통합
AAVS1

도면9

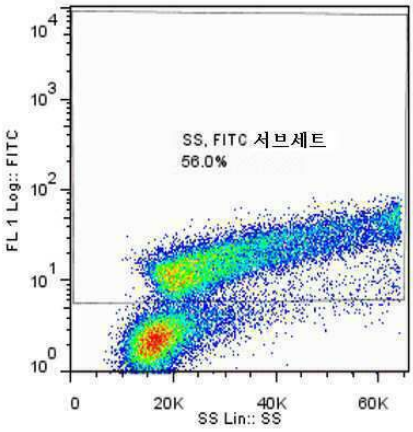
A.


SS, FITC 서브세트
4.96%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

B.

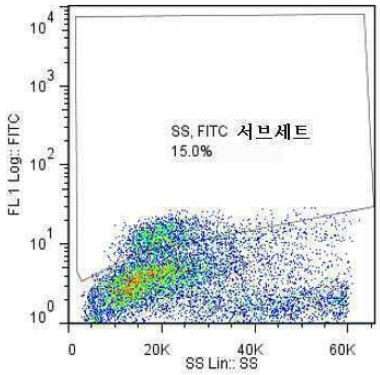

SS, FITC 서브세트
32.3%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

C.

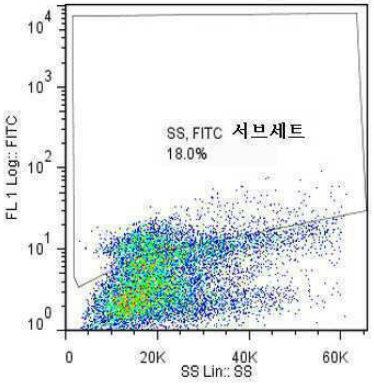

SS, FITC 서브세트
56.0%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

도면10

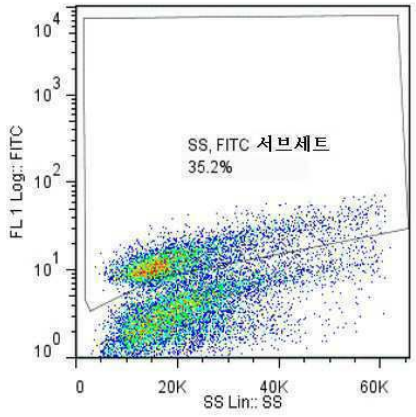
A.


SS, FITC 서브세트
15.0%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

B.

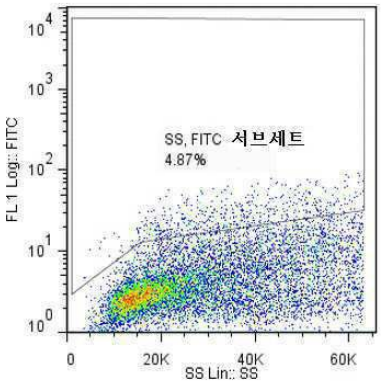

SS, FITC 서브세트
18.0%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

C.

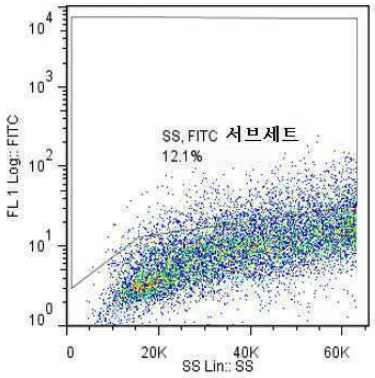

SS, FITC 서브세트
35.2%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

도면11

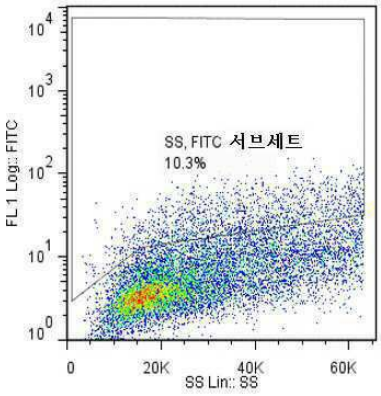
A.


SS, FITC 서브세트
4.87%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

B.


SS, FITC 서브세트
12.1%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

C.


SS, FITC 서브세트
10.3%
FL 1 Log:: FITC
SS Lin:: SS
0
20K
40K
60K

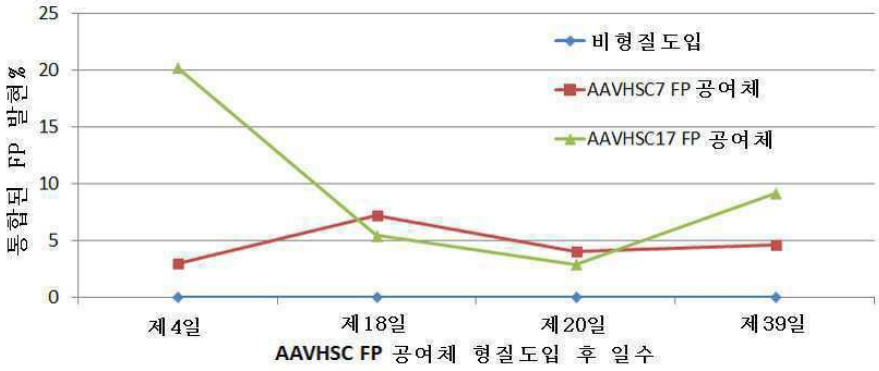
도면12

A.

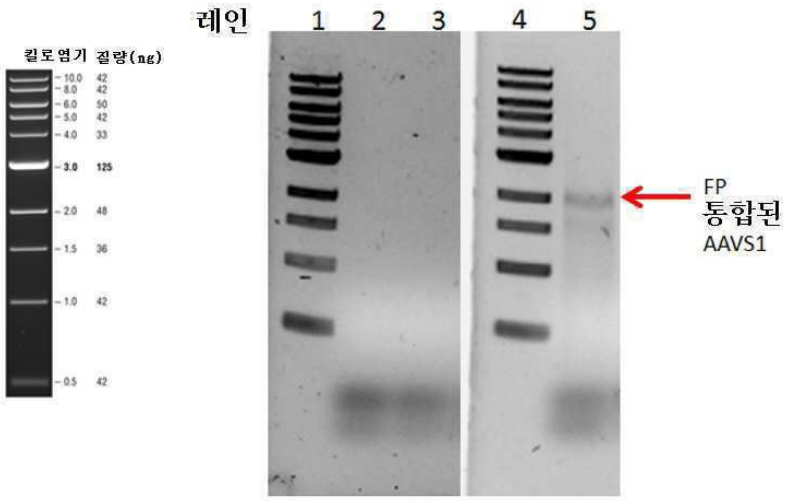
FP 양성 세포%

	제4일	제18일	제20일	제39일
비형질도입	0	0	0	0
AAVHSC7 FP 공여체	3	7.23	4.07	4.61
AAVHSC17 FP 공여체	20.2	5.43	2.85	9.18

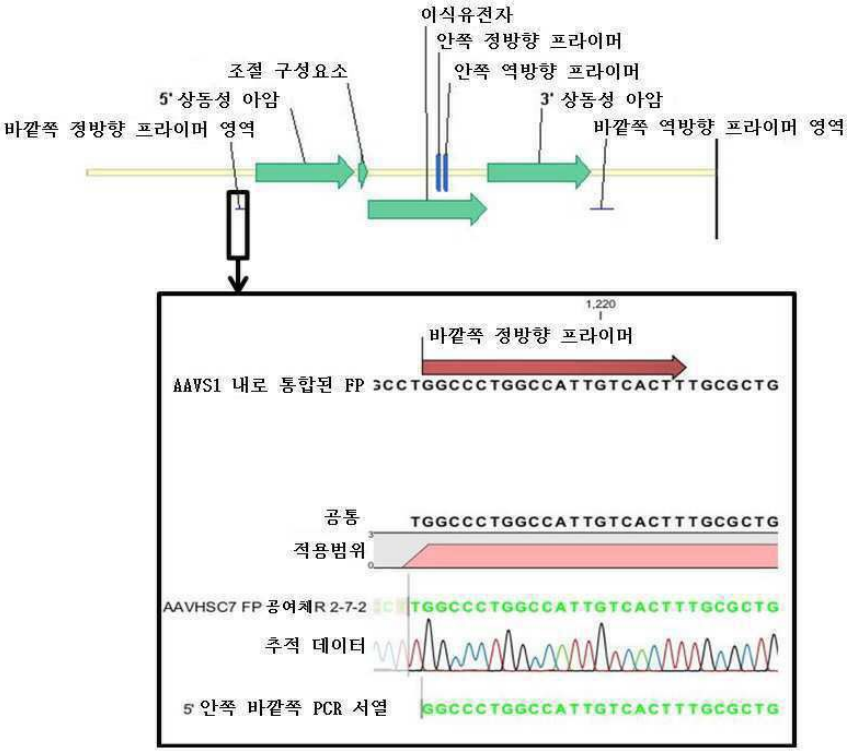
B.



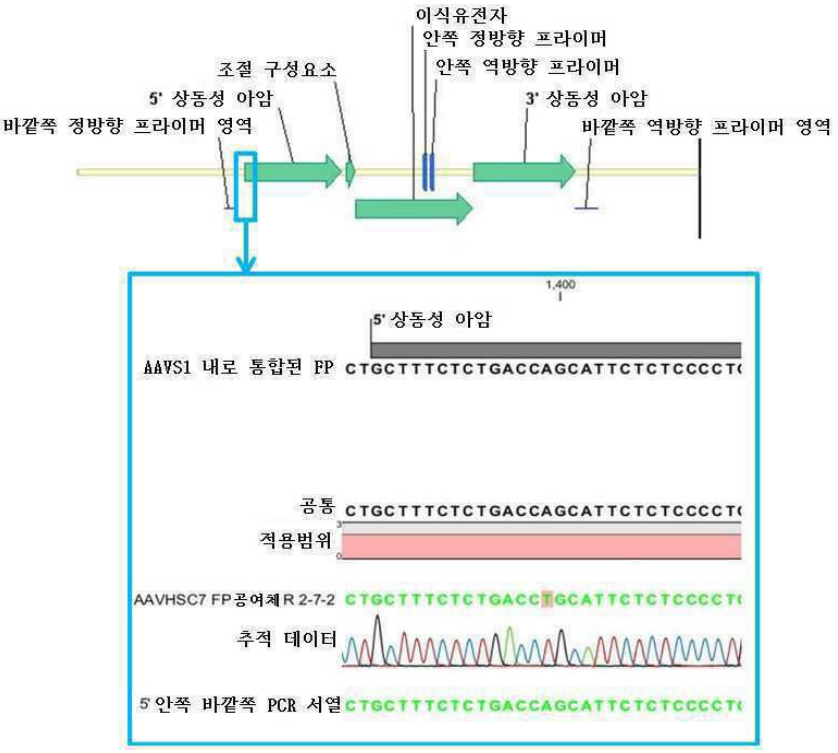
도면13



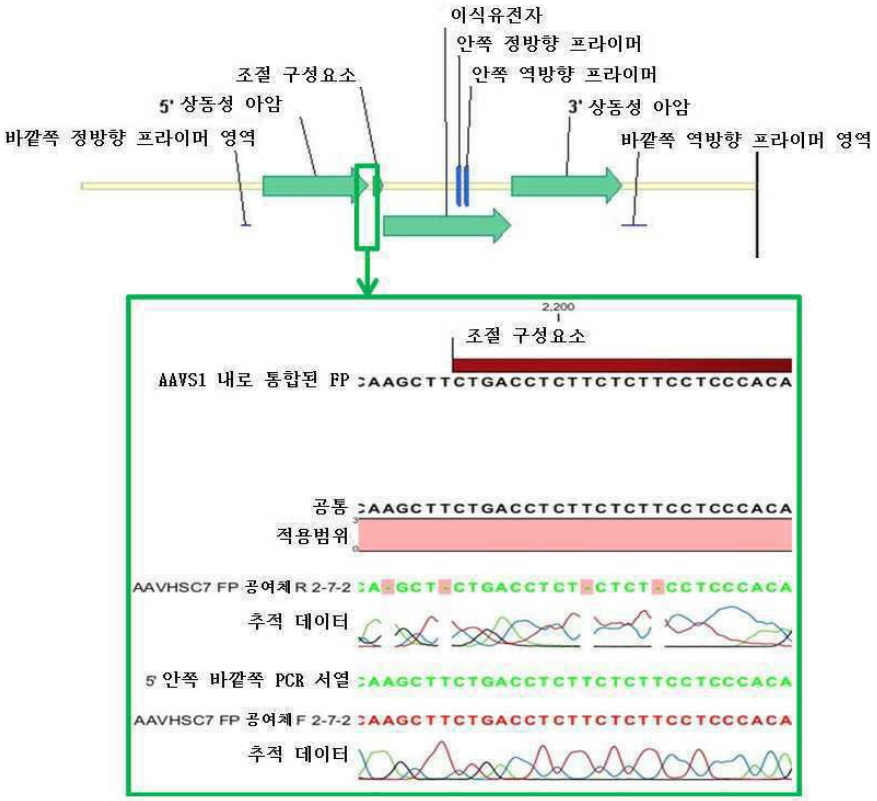
도면14


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
1,220
바깥쪽 정방향 프라이머
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
AAVHSC7 FP 공여체R 2-7-2
추적 데이터
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열

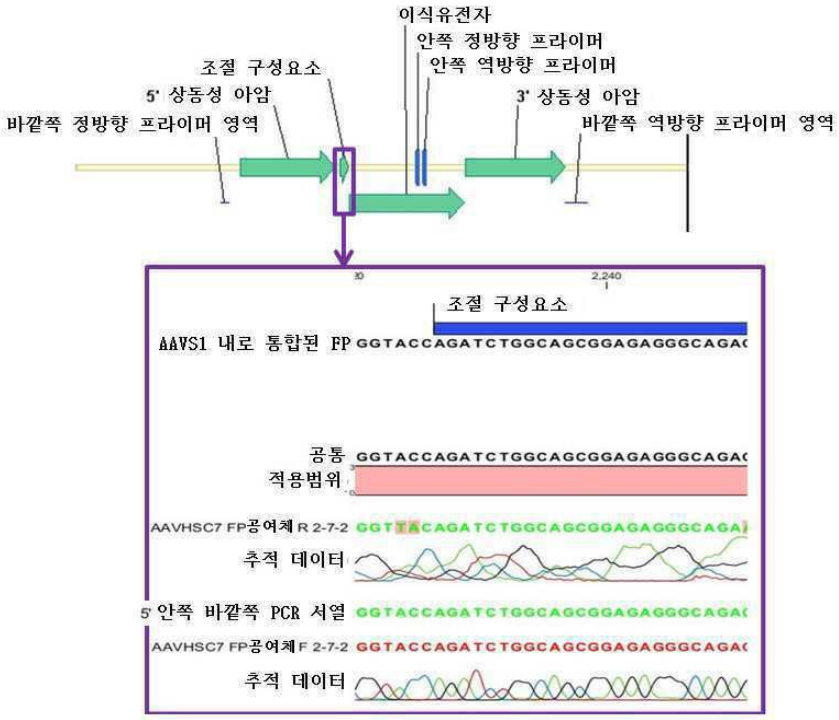
도면15


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
1,400
5' 상동성 아암
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
AAVHSC7 FP 공여체R 2-7-2
추적 데이터
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열

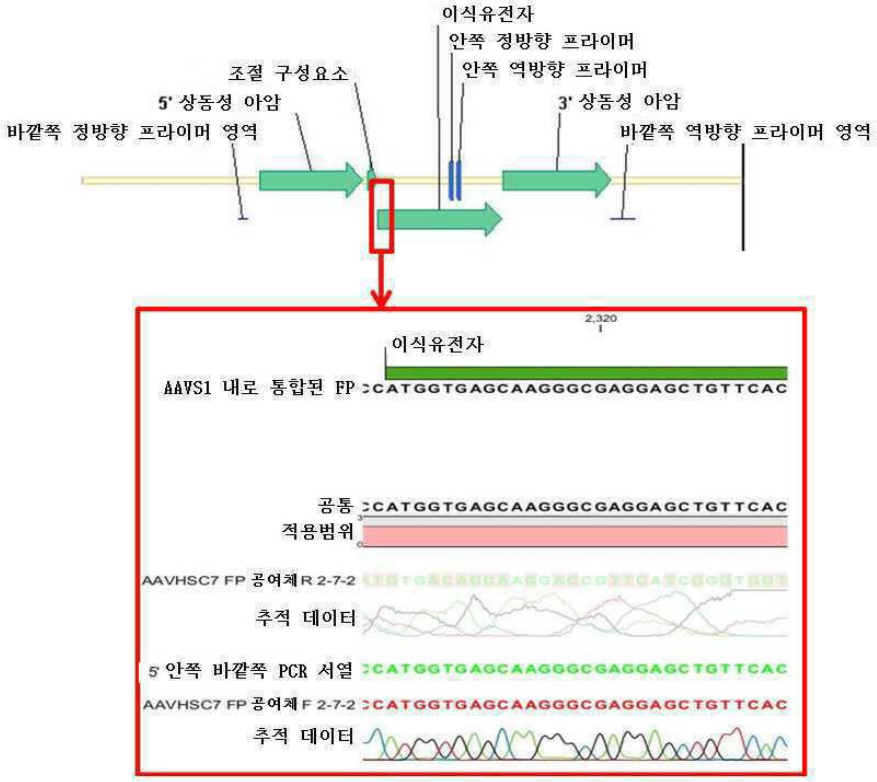
도면16


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
2,200
조절 구성요소
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
AAVHSC7 FP 공여체 R 2-7-2
추적 데이터
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열
AAVHSC7 FP 공여체 F 2-7-2
추적 데이터

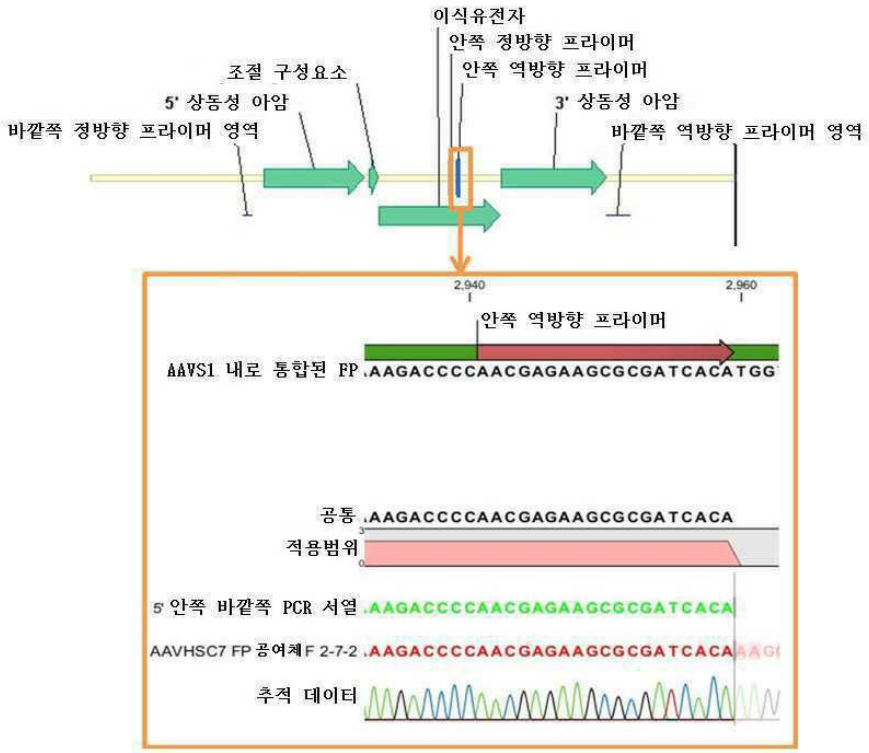
도면17


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
2,240
조절 구성요소
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
AAVHSC7 FP공여체 R 2-7-2
추적 데이터
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열
AAVHSC7 FP공여체 F 2-7-2
추적 데이터

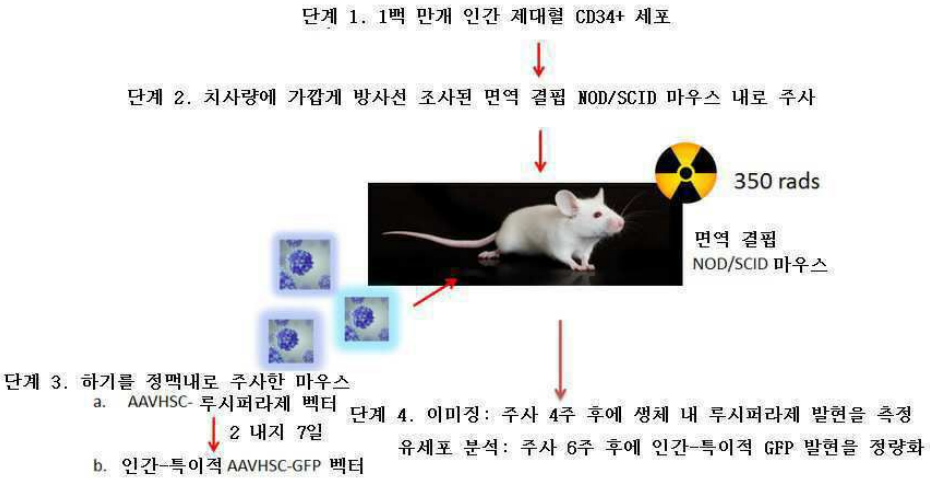
도면18


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
2,320
이식유전자
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
AAVHSC7 FP 공여체 R 2-7-2
추적 데이터
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열
AAVHSC7 FP 공여체 F 2-7-2
추적 데이터

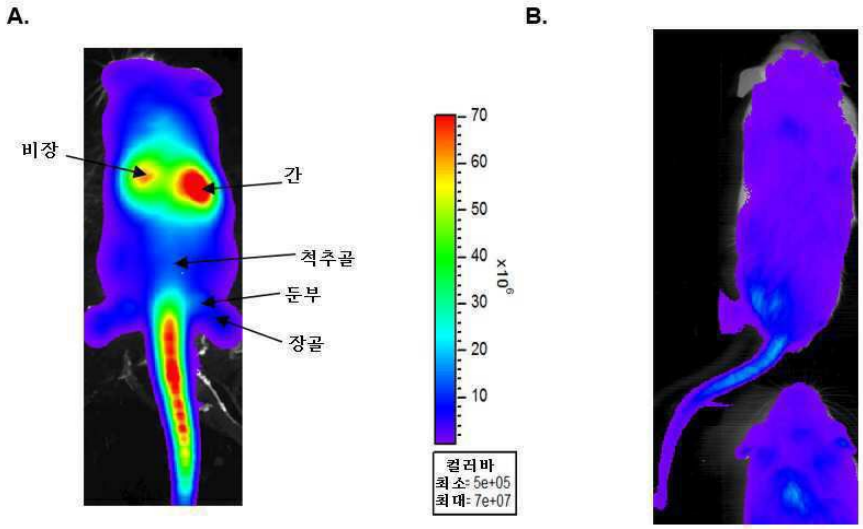
도면19


이식유전자
안쪽 정방향 프라이머
안쪽 역방향 프라이머
조절 구성요소
5' 상동성 아암
3' 상동성 아암
바깥쪽 정방향 프라이머 영역
바깥쪽 역방향 프라이머 영역
2,940
2,960
안쪽 역방향 프라이머
AAVS1 내로 통합된 FP
공통
적용범위
5' 안쪽 바깥쪽 PCR 서열
AAVHSC7 FP 공여체 F 2-7-2
추적 데이터

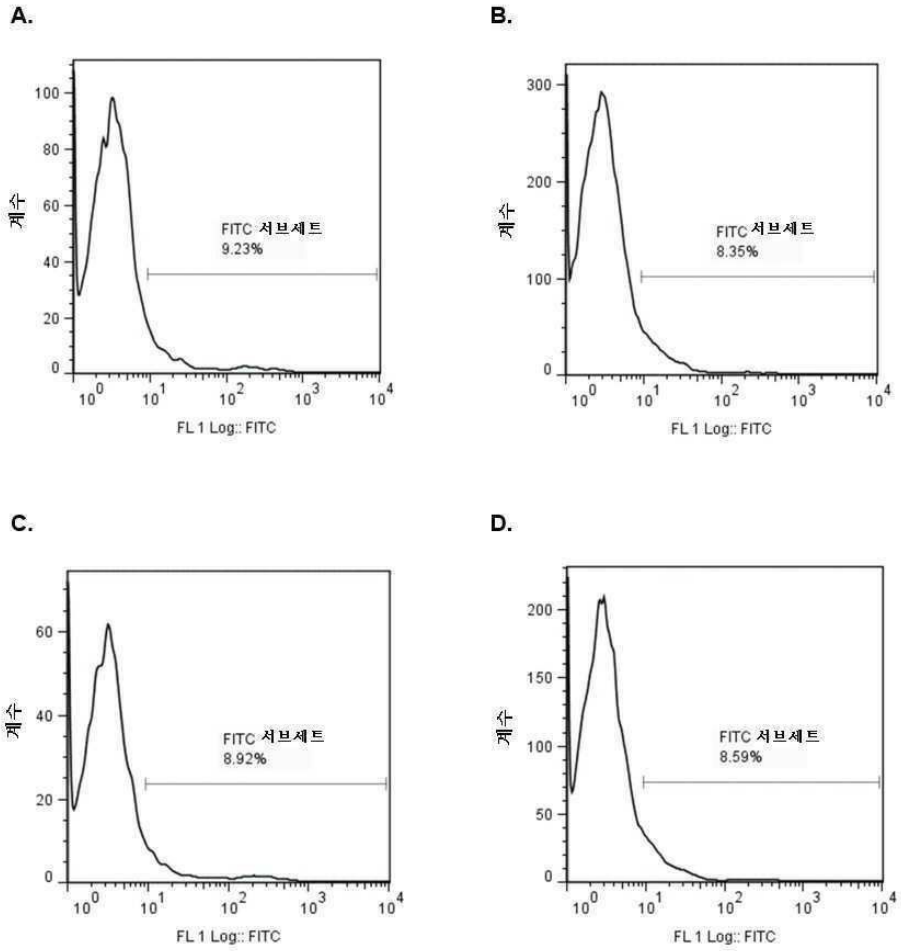
도면20


단계 1. 1백 만개 인간 제대혈 CD34+ 세포
단계 2. 치사량에 가깝게 방사선 조사된 면역 결핍 NOD/SCID 마우스 내로 주사
350 rads
면역 결핍
NOD/SCID 마우스
단계 3. 하기를 정맥내로 주사한 마우스
a. AAVHSC- 루시퍼라제 벡터
2 내지 7일
b. 인간-특이적 AAVHSC-GFP 벡터
단계 4. 이미징: 주사 4주 후에 생체 내 루시퍼라제 발현을 측정
유세포 분석: 주사 6주 후에 인간-특이적 GFP 발현을 정량화

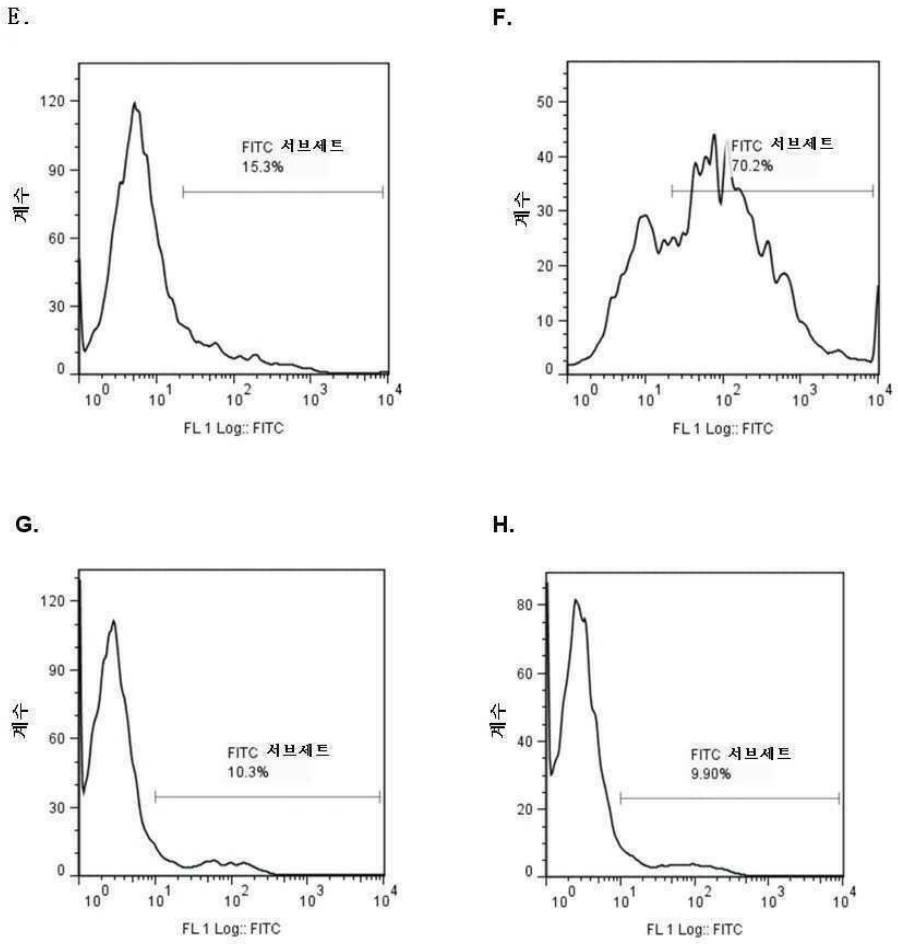
도면21


A.
B.
비장
간
척추골
둔부
장골
70
60
50
40
30
20
10
x10⁶
컬러바
최소= 5e+05
최대= 7e+07

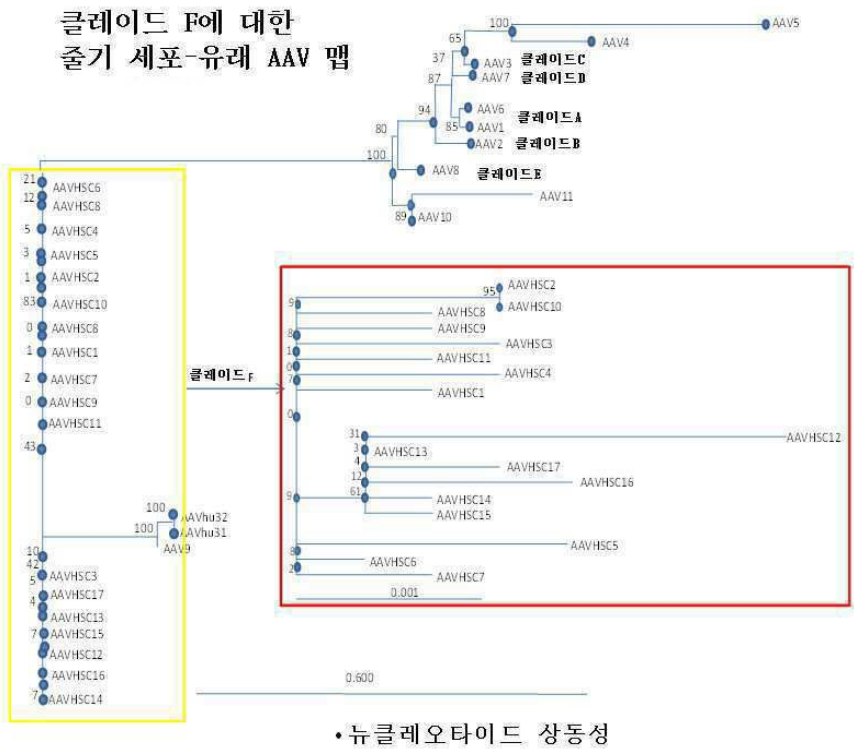
도면22ad



도면22eh


E.
FITC 서브세트
15.3%
계수
FL 1 Log:: FITC
F.
FITC 서브세트
70.2%
계수
FL 1 Log:: FITC
G.
FITC 서브세트
10.3%
계수
FL 1 Log:: FITC
H.
FITC 서브세트
9.90%
계수
FL 1 Log:: FITC

도면23

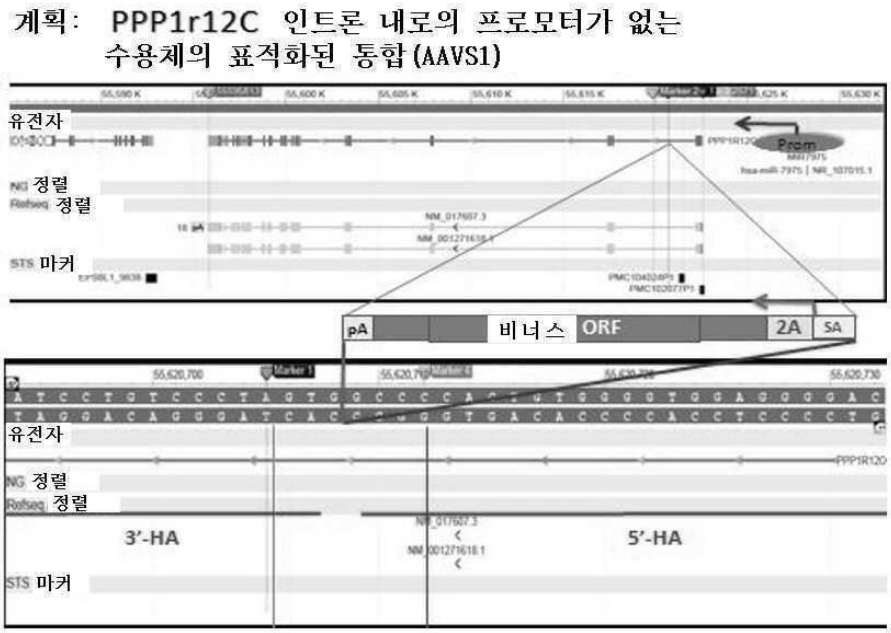


• 뉴클레오타이드 상동성

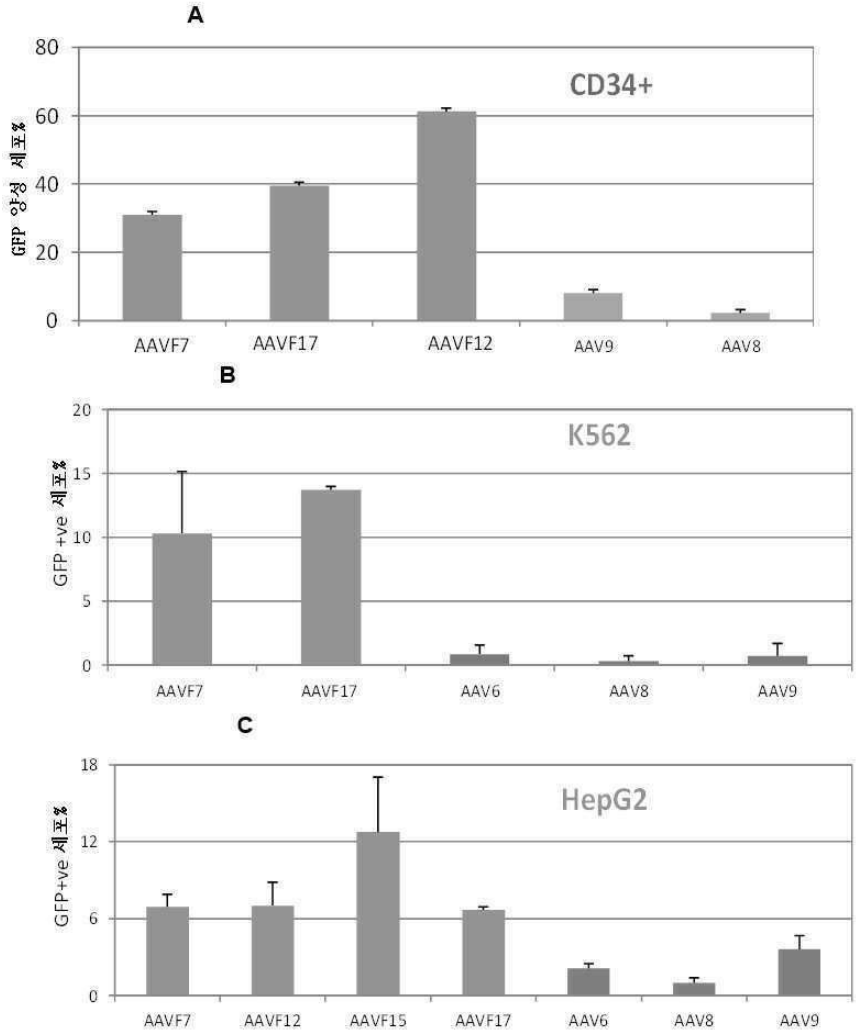
도면24



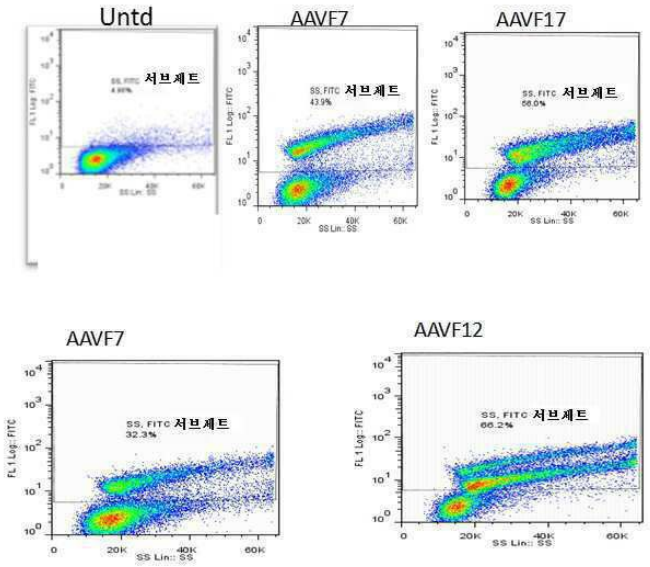
도면25



도면26ac

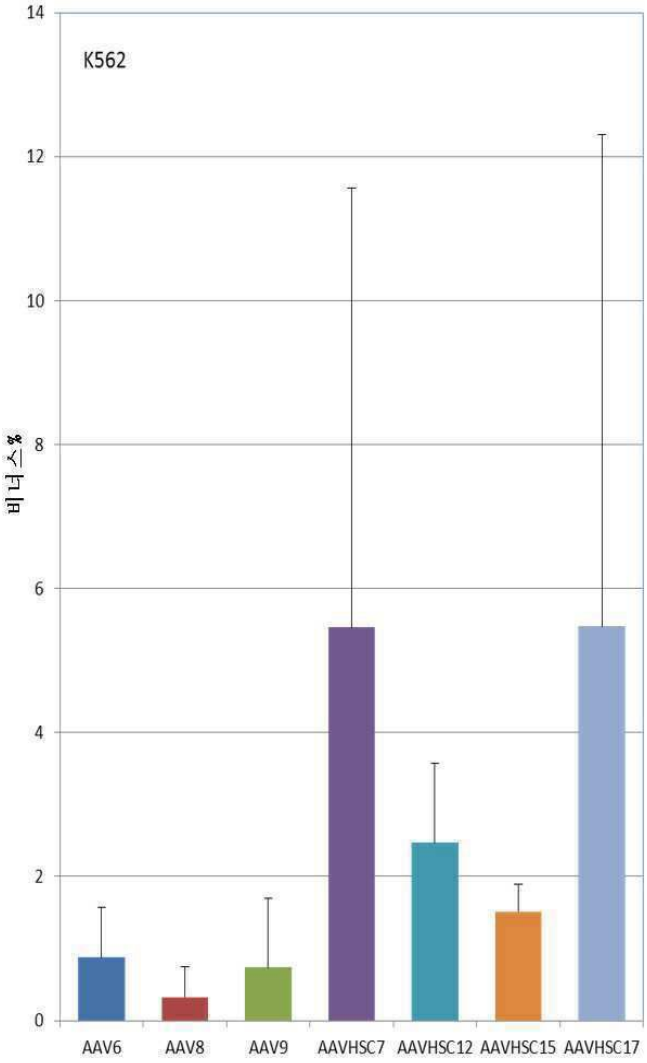

A
CD34+
GFP 양성 세포%
80
60
40
20
0
AAVF7
AAVF17
AAVF12
AAV9
AAV8
B
K562
GFP +ve 세포%
20
15
10
5
0
AAVF7
AAVF17
AAV6
AAV8
AAV9
C
HepG2
GFP+ve 세포%
18
12
6
0
AAVF7
AAVF12
AAVF15
AAVF17
AAV6
AAV8
AAV9

도면26d

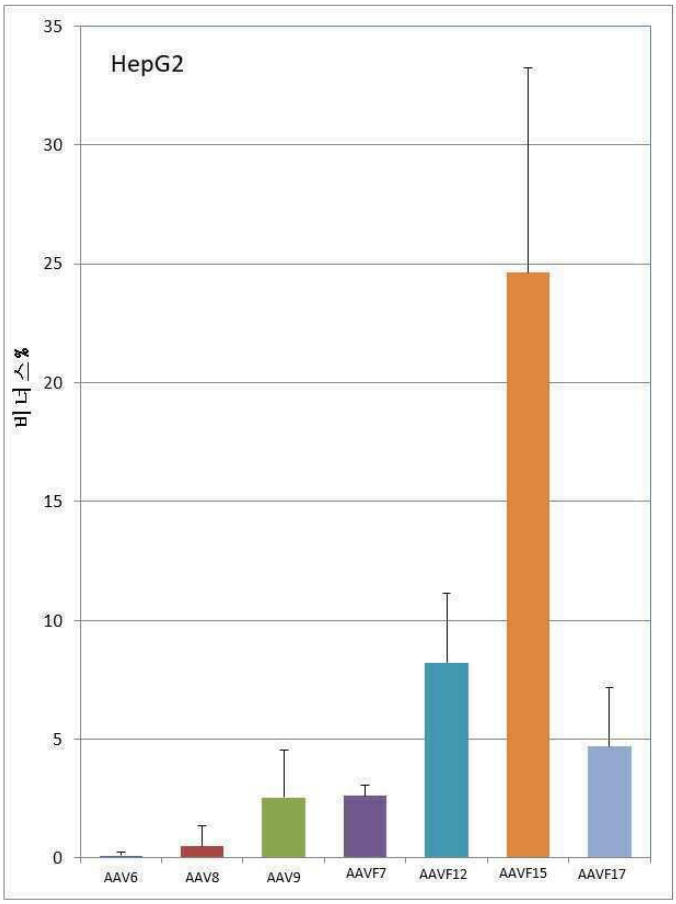


- AAVF는 1차 CD34+ 세포에서 효율적인 유전자 표적화를 매개한다
- 인간 백혈병 및 간 세포주에서 고효율 표적화가 관찰된다
- AAVF 편집은 DNA 합성이 필요하지 않다

도면26e

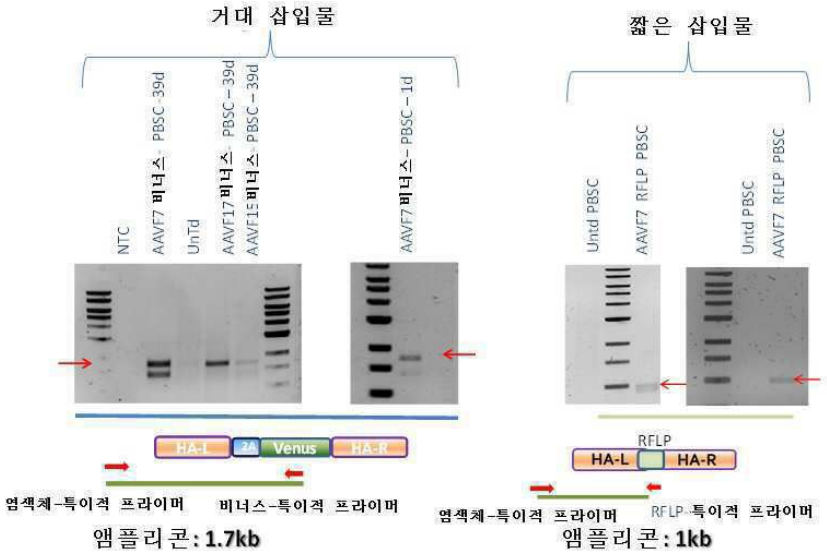

K562
14
12
10
8
6
4
2
0
비닉스%
AAV6
AAV8
AAV9
AAVHSC7
AAVHSC12
AAVHSC15
AAVHSC17

도면26f


HepG2
비너스%
35
30
25
20
15
10
5
0
AAV6
AAV8
AAV9
AAVF7
AAVF12
AAVF15
AAVF17

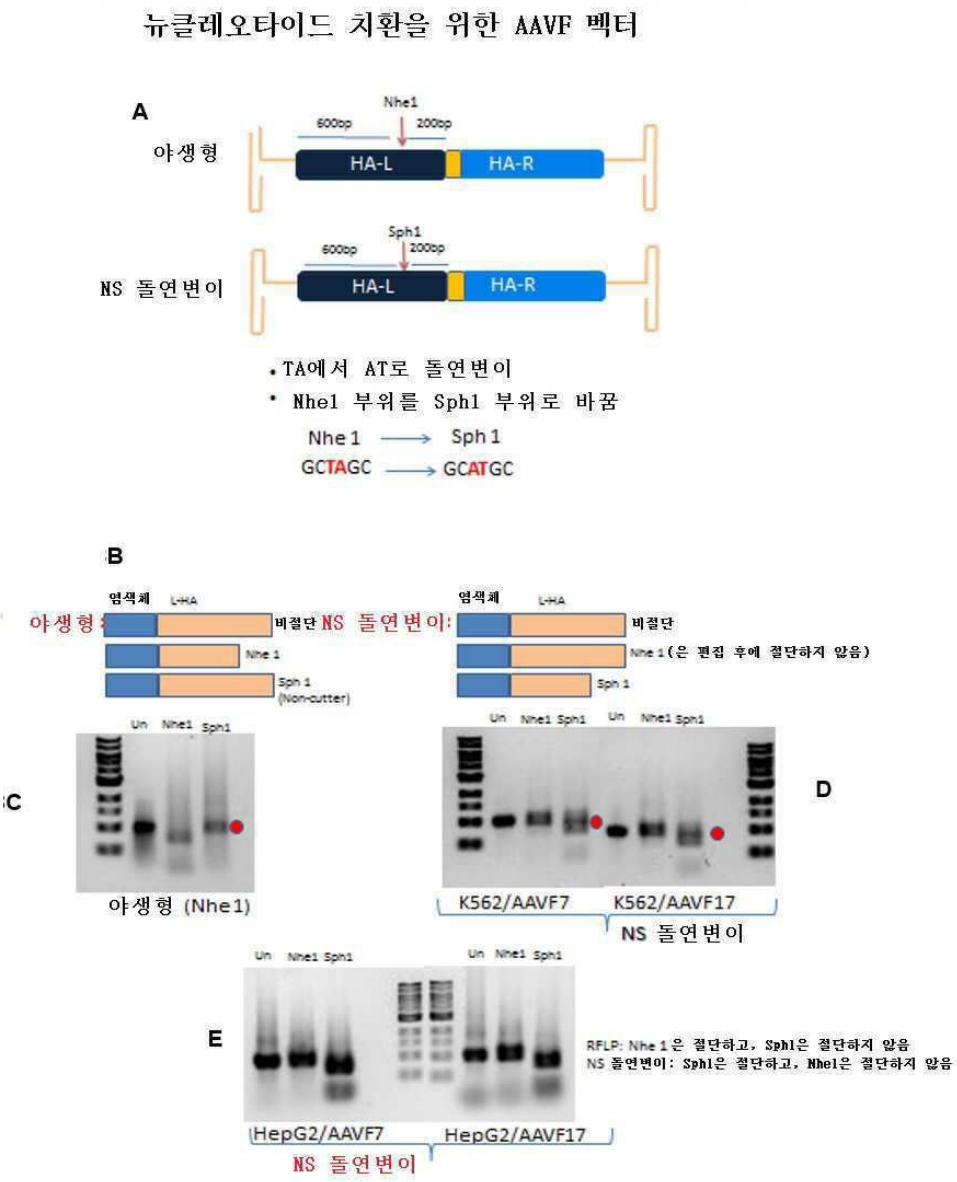
도면27

AAVF 벡터는 CD34+ 세포 내 AAVS1 좌위 내로의 거대 ORF의 통합을 표적화함

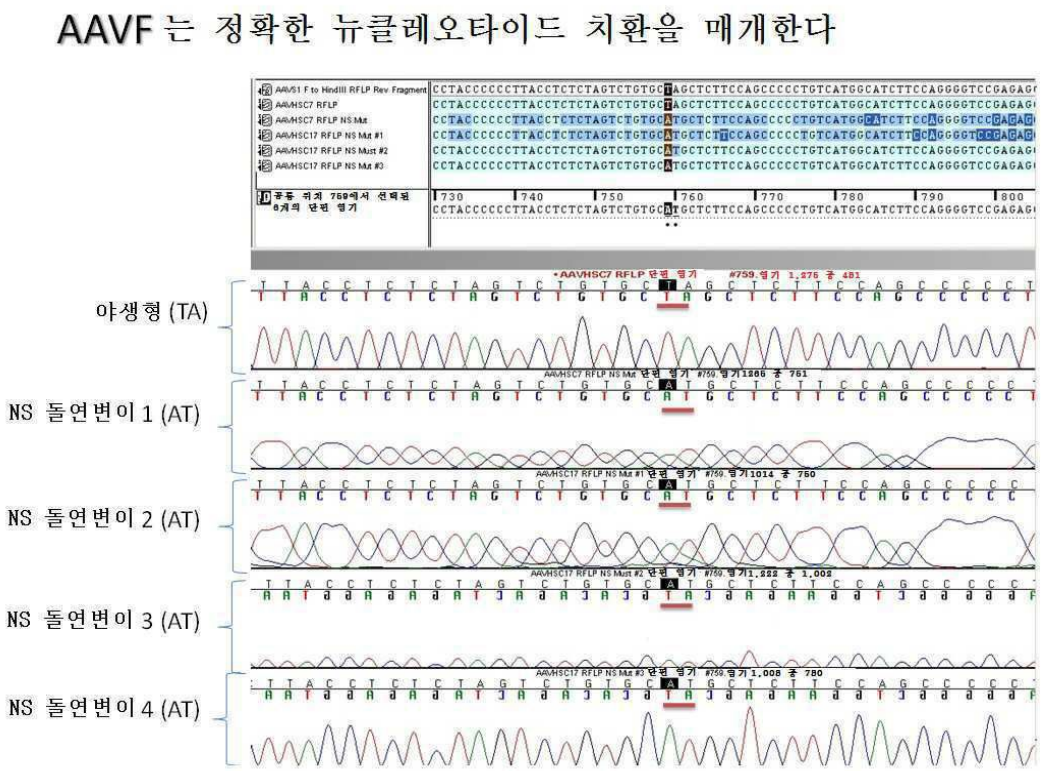


HA-L: 5'-상동성 아암
HA-R: 3'-상동성 아암
NTC: 주형 제어 없음
Untd: 비형질도입 세포

도면28


뉴클레오타이드 치환을 위한 AAVF 벡터
A
야생형
Nhe1
600bp
200bp
HA-L
HA-R
NS 돌연변이
Sph1
600bp
200bp
HA-L
HA-R
• TA에서 AT로 돌연변이
• Nhe1 부위를 Sph1 부위로 바꿈
Nhe 1 → Sph 1
GCTAGC → GCATGC
B
염색체
L-HA
야생형
비절단
Nhe 1
Sph 1
(Non-cutter)
NS 돌연변이
비절단
Nhe 1 (은 편집 후에 절단하지 않음)
Sph 1
C
Un
Nhe1
Sph1
야생형 (Nhe1)
D
K562/AAVF7
K562/AAVF17
NS 돌연변이
E
HepG2/AAVF7
HepG2/AAVF17
NS 돌연변이
RFLP: Nhe 1은 절단하고, Sph1은 절단하지 않음
NS 돌연변이: Sph1은 절단하고, Nhe1은 절단하지 않음

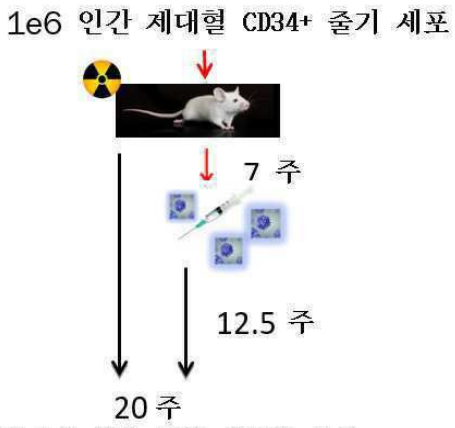
도면29



도면30

	GFP+ BrdU- (비분열 세포)	GFP+BrdU+ (분열 세포)
AAVHSC7	**12**	14.6
AAVHSC17	**6.15**	6.9
AAV9	**4.31**	3.73
AAV8	**1.37**	0.839

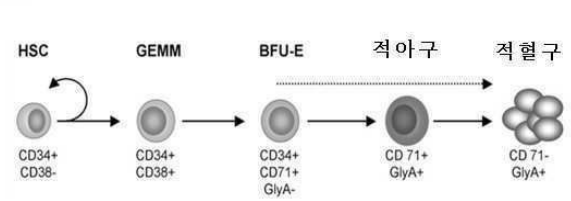
도면31



골수 및 비장에서 인간 혈액 계통의 분석

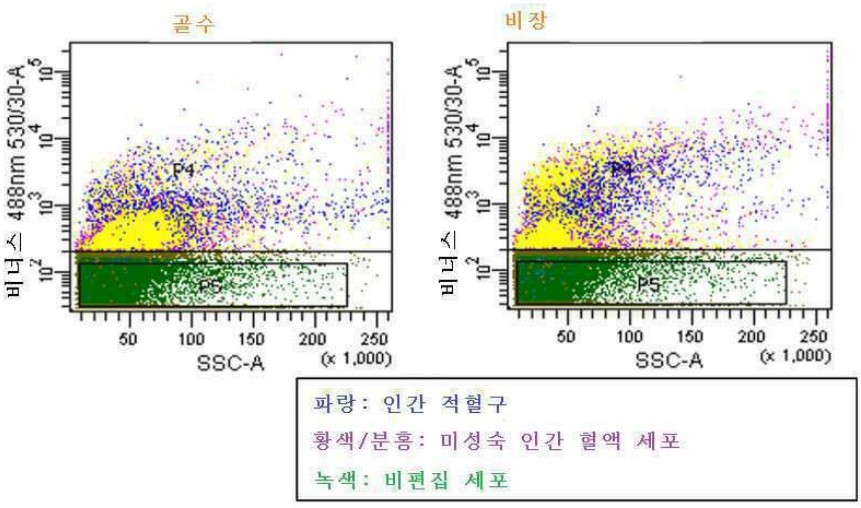
- 유동 분석
- 유동 분류
- 비너스, CD34+, 글리코A+(적혈구)

A



B

도면31c



도면32a

	실험	1A	1B	2A	2A	2B	2B	3	3
		AAVF7	AAVF17	AAVF7	AAVF7	AAVF17	AAVF17	AAVF17	AAVF17
		CD45+VEN+*	CD45+VEN+*	CD45+VEN+*	CD34+VEN+*	CD45+VEN+*	CD34+VEN+*	글리코A+VEN+*	CD34+VEN+*
비너스에 대한 TX 후 주수		1	1	1	1	1	1	7	7
채취를 위한 비너스 후 주수		5	5	6	6	6	6	12.5	12.5
채취를 위한 TX 후 주수		6	6	7	7	7	7	19	19
	VBM	32.4	14.7	32.4	54.9	14.7	49.9	ND	ND
	FBM	11.2	9.49	9.49	20.3	11.2	26.8	99.4	75.5
	SPLN	15.9	24.8	15.9	71.1	24.8	82	99.2	58.1

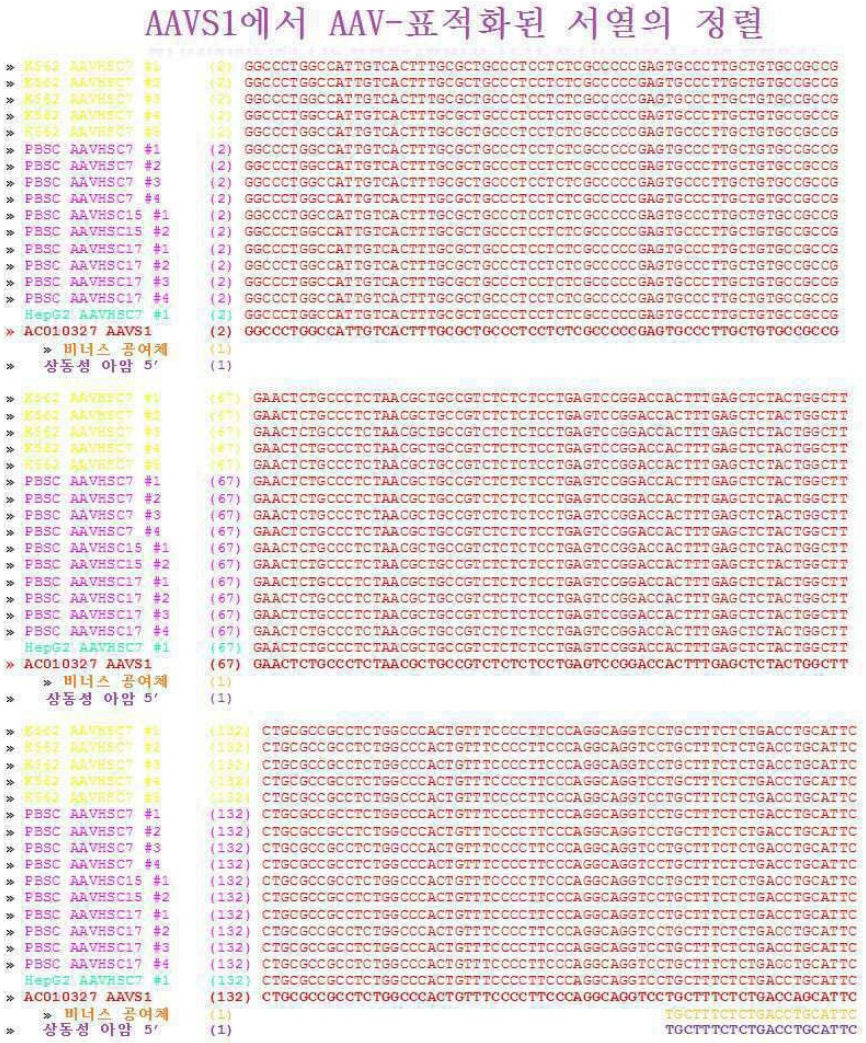
도면32b

비너스 양성%	중간 기간	중간 기간	중간 기간	중간 기간	장기간	장기간
	AAVF7	AAVF7	AAVF17	AAVF17	AAVF17	AAVF17
구획	CD34+	CD45+	CD34+	CD45+	CD34+	GlycoA+
척추골 골수	54.9	32.4	49.9	14.7	ND*	ND*
대퇴부 골수	20.3	9.49	26.8	11.2	75.5	99.4
비장	71.1	15.9	82	24.8	58.1	99.2

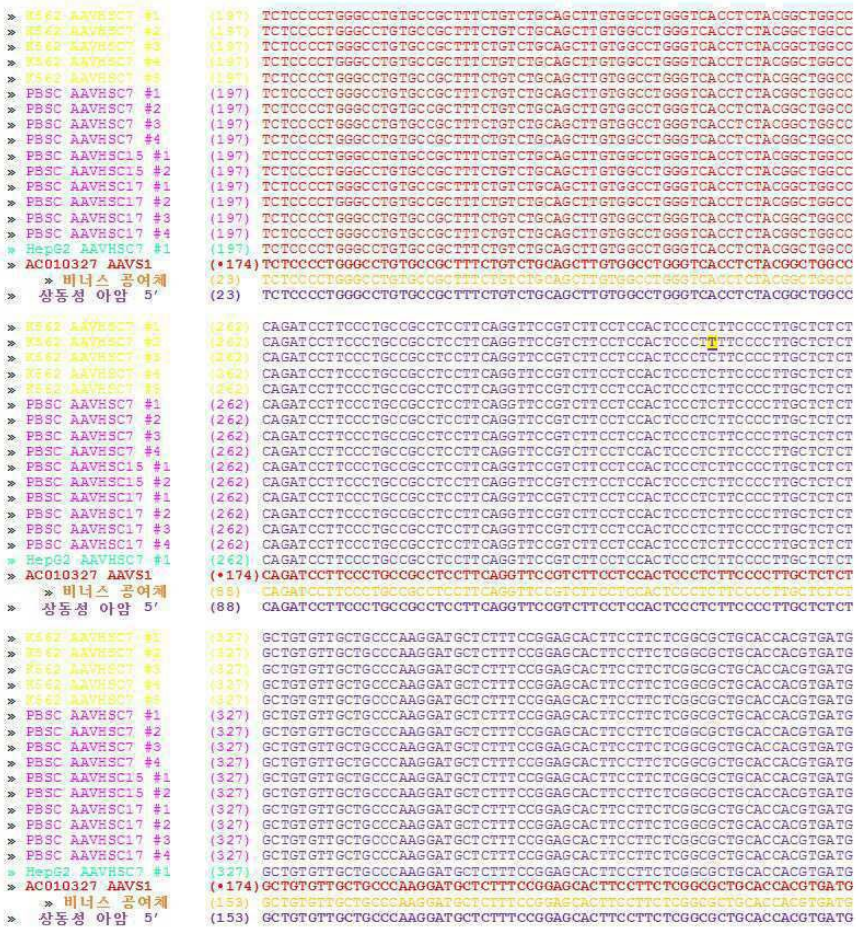
* ND: 실행하지 않음

도면33a

AAVF 벡터에 의한 PPP1R12C의 인트론 내로의 비너스의 염색체 삽입을 나타내는 서열 분석



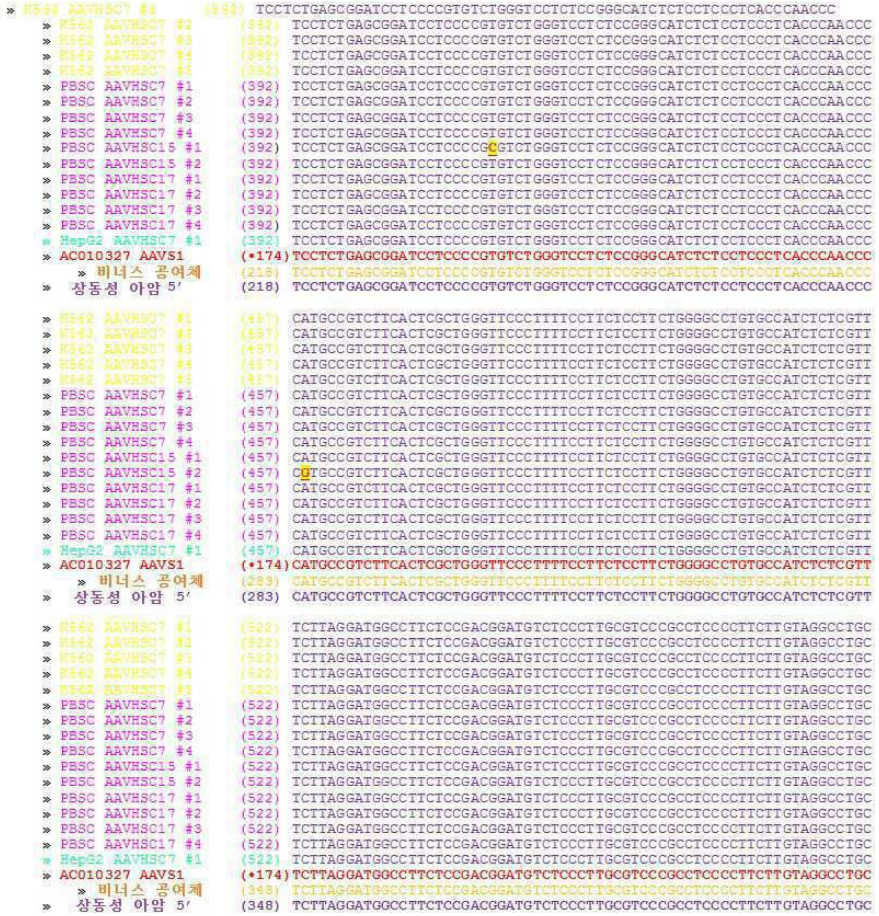
도면33b


» K562 AAVHSC7 #1 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» K562 AAVHSC7 #2 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» K562 AAVHSC7 #3 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» K562 AAVHSC7 #4 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» K562 AAVHSC7 #5 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC7 #1 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC7 #2 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC7 #3 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC7 #4 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC15 #1 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC15 #2 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC17 #1 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC17 #2 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC17 #3 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» PBSC AAVHSC17 #4 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AC010327 AAVS1 (•174) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» 비너스 공여체 (23) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» 상동성 아암 5′ (23) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC

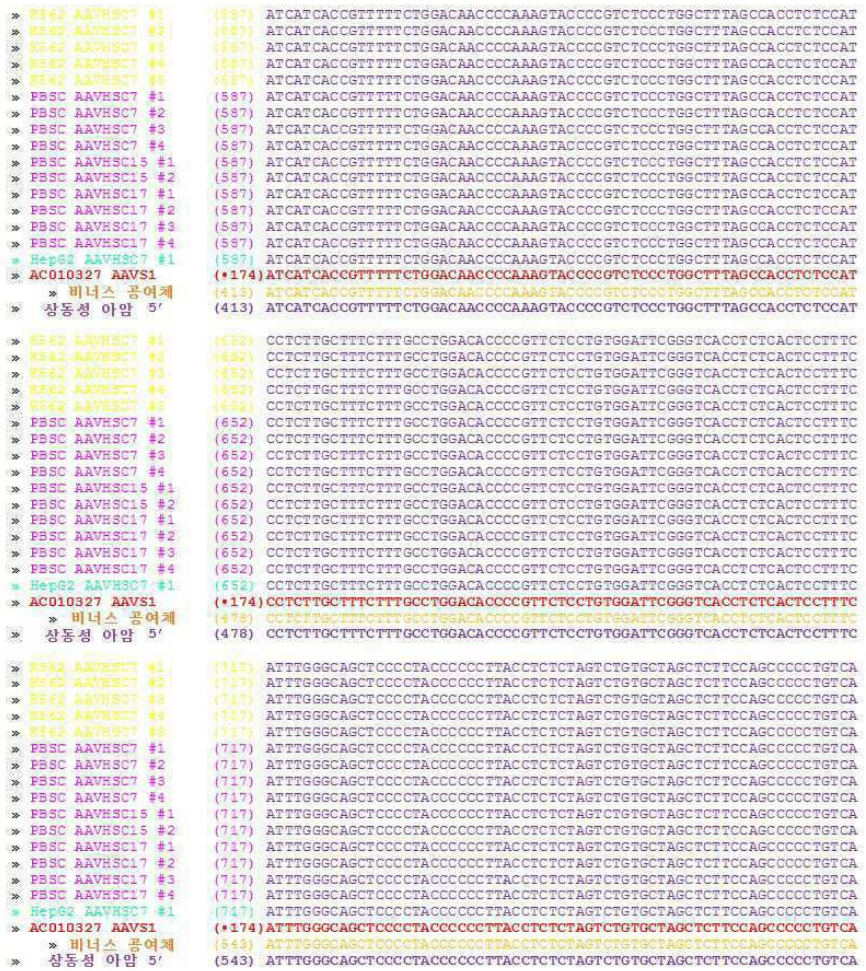
» K562 AAVHSC7 #1 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» K562 AAVHSC7 #2 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTTTTCCCCTTGCTCTCT
» K562 AAVHSC7 #3 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» K562 AAVHSC7 #4 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» K562 AAVHSC7 #5 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC7 #1 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC7 #2 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC7 #3 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC7 #4 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC15 #1 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC15 #2 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC17 #1 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC17 #2 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC17 #3 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» PBSC AAVHSC17 #4 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» HepG2 AAVHSC7 #1 (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AC010327 AAVS1 (•174) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» 비너스 공여체 (88) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» 상동성 아암 5′ (88) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT

» K562 AAVHSC7 #1 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» K562 AAVHSC7 #2 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» K562 AAVHSC7 #3 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» K562 AAVHSC7 #4 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» K562 AAVHSC7 #5 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC7 #1 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC7 #2 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC7 #3 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC7 #4 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC15 #1 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC15 #2 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC17 #1 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC17 #2 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC17 #3 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» PBSC AAVHSC17 #4 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AC010327 AAVS1 (•174) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» 비너스 공여체 (153) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» 상동성 아암 5′ (153) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG

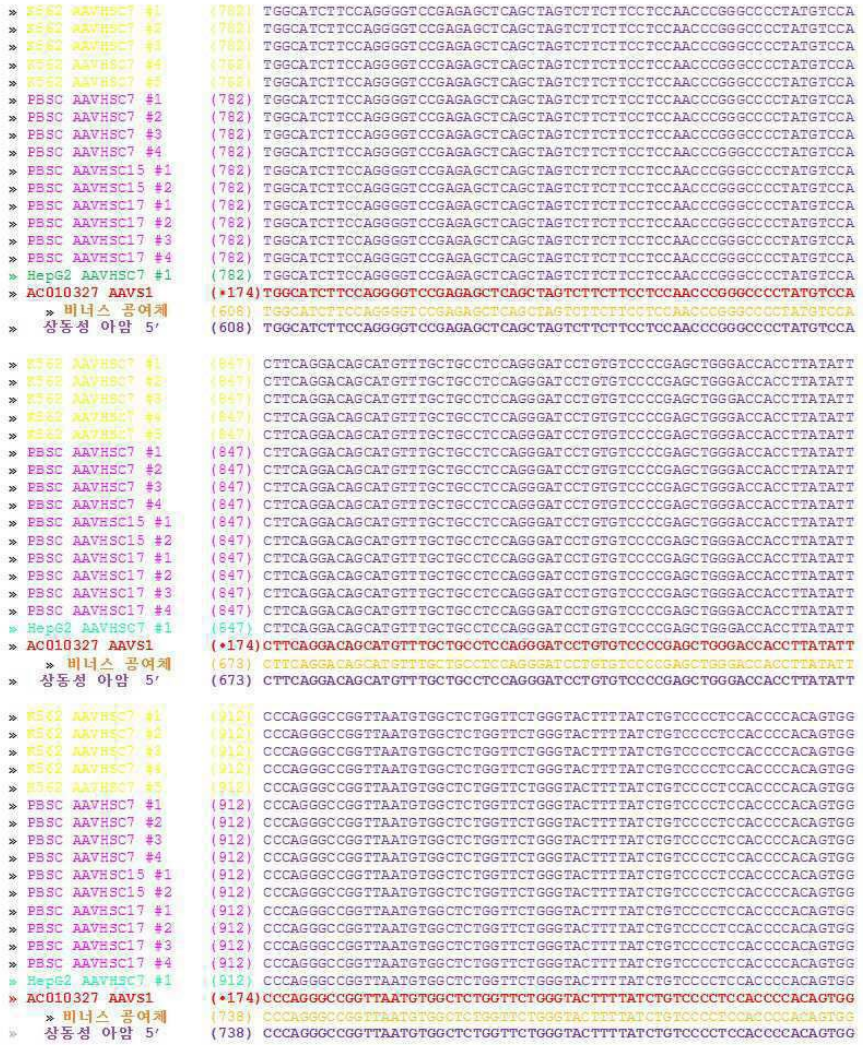
도면33c



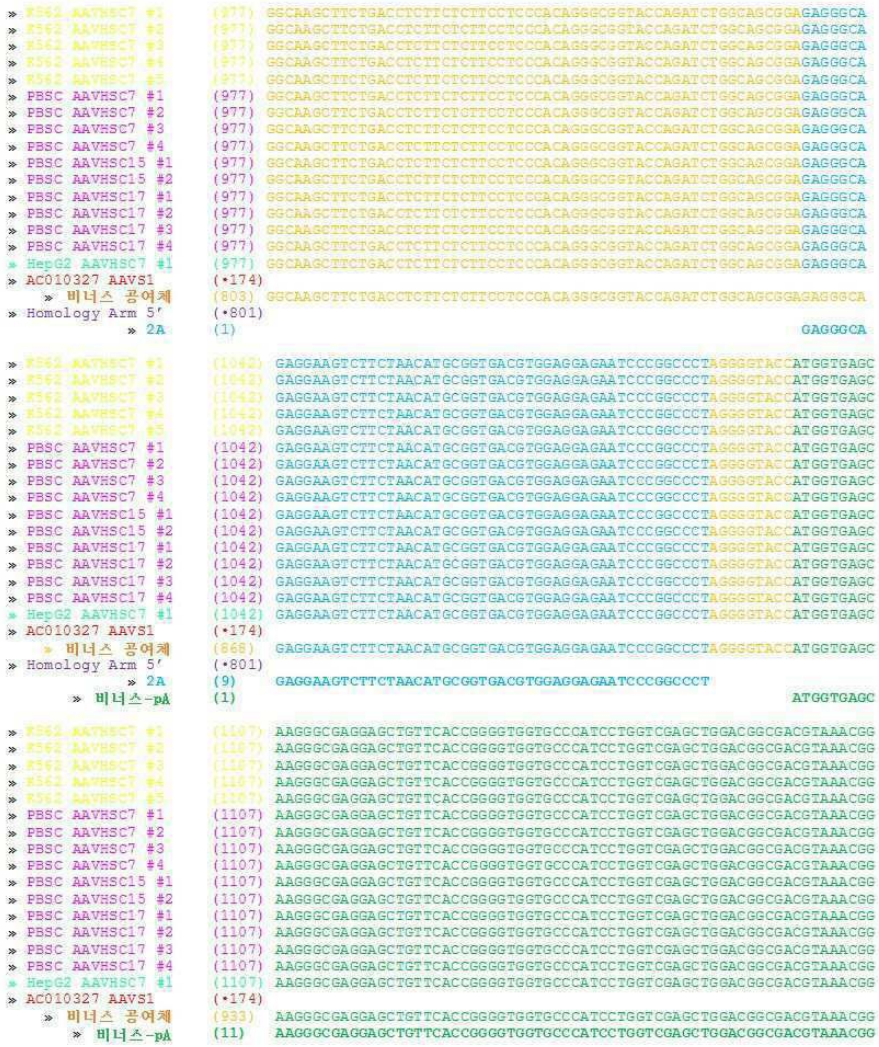
도면33d


» RS62 AAVHSC7 #1 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RS62 AAVHSC7 #2 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RS62 AAVHSC7 #3 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RS62 AAVHSC7 #4 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RS62 AAVHSC7 #5 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC7 #1 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC7 #2 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC7 #3 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC7 #4 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC15 #1 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC15 #2 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC17 #1 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC17 #2 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC17 #3 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» PBSC AAVHSC17 #4 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» HepG2 AAVHSC7 #1 (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AC010327 AAVS1 (•174)ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» 비너스 공여체 (413) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» 상동성 아암 5′ (413) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RS62 AAVHSC7 #1 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RS62 AAVHSC7 #2 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RS62 AAVHSC7 #3 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RS62 AAVHSC7 #4 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RS62 AAVHSC7 #5 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC7 #1 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC7 #2 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC7 #3 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC7 #4 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC15 #1 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC15 #2 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC17 #1 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC17 #2 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC17 #3 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» PBSC AAVHSC17 #4 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AC010327 AAVS1 (•174)CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» 비너스 공여체 (478) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» 상동성 아암 5′ (478) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RS62 AAVHSC7 #1 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» RS62 AAVHSC7 #2 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» RS62 AAVHSC7 #3 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» RS62 AAVHSC7 #4 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» RS62 AAVHSC7 #5 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC7 #1 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC7 #2 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC7 #3 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC7 #4 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC15 #1 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC15 #2 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC17 #1 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC17 #2 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC17 #3 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» PBSC AAVHSC17 #4 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» HepG2 AAVHSC7 #1 (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AC010327 AAVS1 (•174)ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» 비너스 공여체 (543) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» 상동성 아암 5′ (543) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA

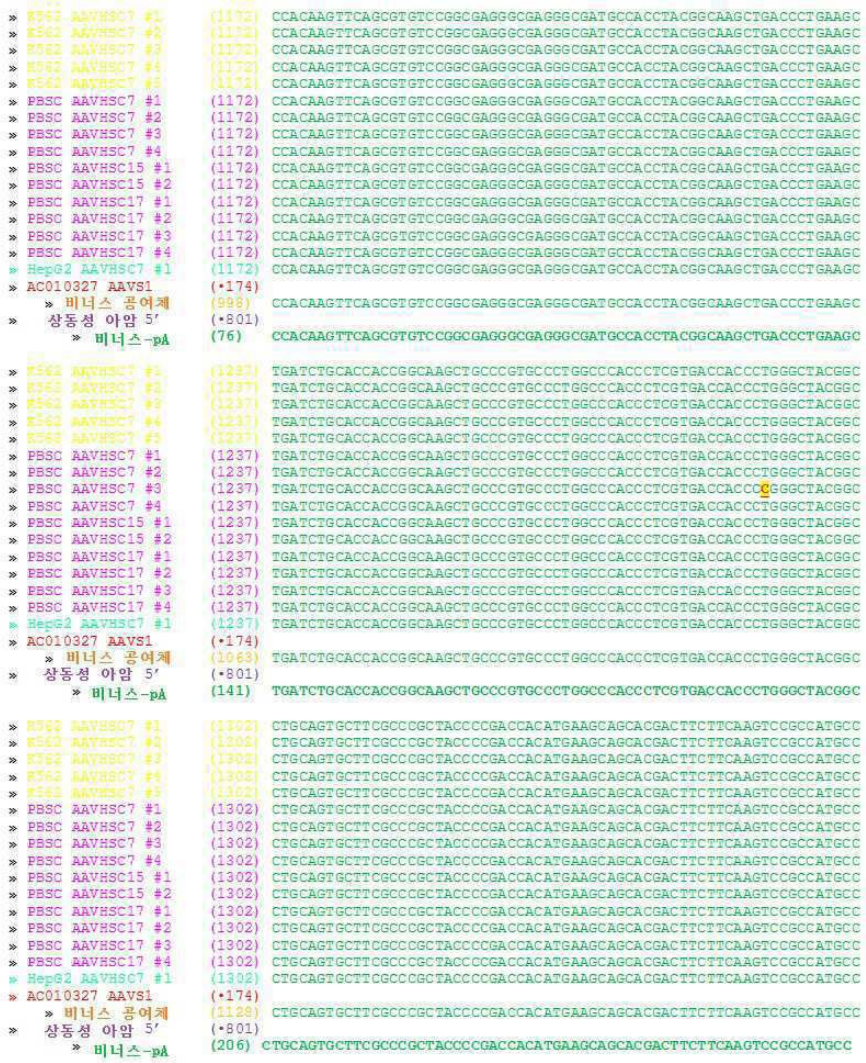
도면33e


» PBSC AAVHSC7 #1 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC7 #2 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC7 #3 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC7 #4 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC15 #1 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC15 #2 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC17 #1 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC17 #2 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC17 #3 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC17 #4 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» HepG2 AAVHSC7 #1 (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AC010327 AAVS1 (•174) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» 비너스 공여체 (608) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» 상동성 아암 5′ (608) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» PBSC AAVHSC7 #1 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #2 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #3 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #4 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #5 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #1 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #2 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #3 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #4 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC15 #1 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC15 #2 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC17 #1 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC17 #2 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC17 #3 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC17 #4 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» HepG2 AAVHSC7 #1 (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AC010327 AAVS1 (•174) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» 비너스 공여체 (673) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» 상동성 아암 5′ (673) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» PBSC AAVHSC7 #1 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #2 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #3 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #4 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #5 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #1 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #2 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #3 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC7 #4 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC15 #1 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC15 #2 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC17 #1 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC17 #2 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC17 #3 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» PBSC AAVHSC17 #4 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AC010327 AAVS1 (•174) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» 비너스 공여체 (738) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» 상동성 아암 5′ (738) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG

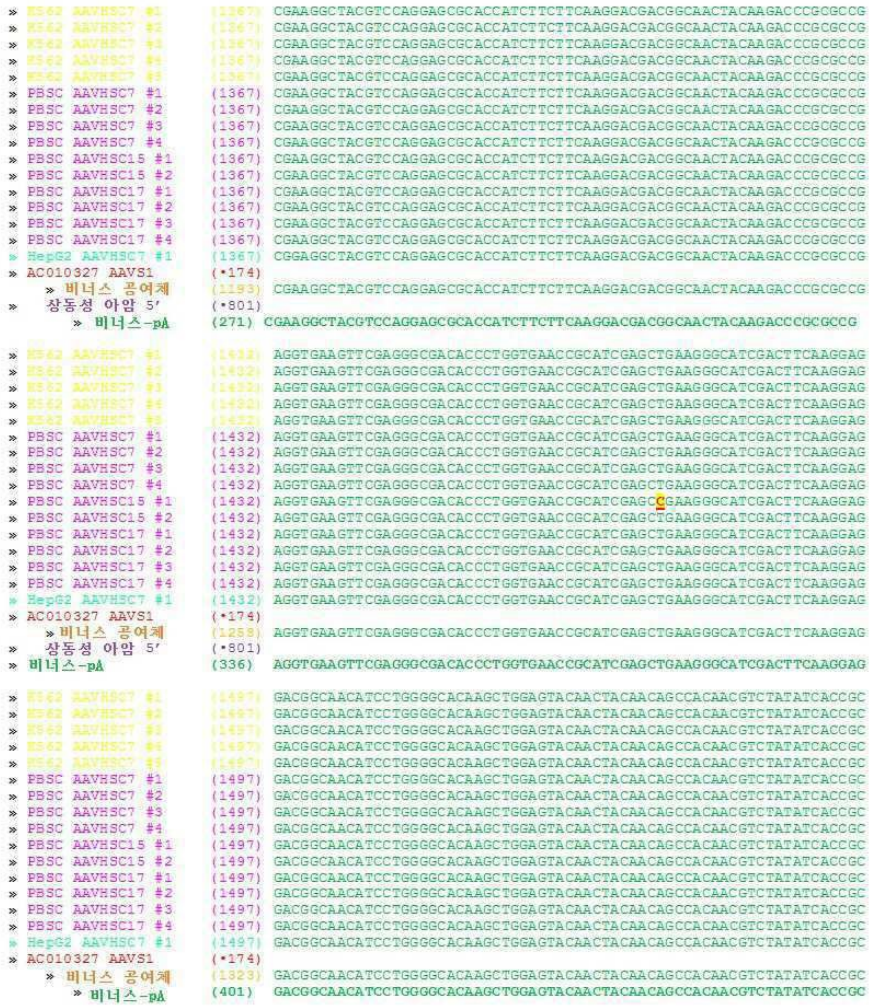
도면33f


» K562 AAVHSC7 #1 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» K562 AAVHSC7 #2 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» K562 AAVHSC7 #3 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» K562 AAVHSC7 #4 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» K562 AAVHSC7 #5 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC7 #1 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC7 #2 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC7 #3 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC7 #4 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC15 #1 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC15 #2 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC17 #1 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC17 #2 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC17 #3 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» PBSC AAVHSC17 #4 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» HepG2 AAVHSC7 #1 (977) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (803) GGCAAGCTTCTGACCTCTTCTCTTCCTCCCACAGGGCGGTACCAGATCTGGCAGCGGAGAGGGCA
» Homology Arm 5′ (•801)
» 2A (1) GAGGGCA
» K562 AAVHSC7 #1 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» K562 AAVHSC7 #2 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» K562 AAVHSC7 #3 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» K562 AAVHSC7 #4 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» K562 AAVHSC7 #5 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1042) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (868) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCTAGGGGTACCATGGTGAGC
» Homology Arm 5′ (•801)
» 2A (9) GAGGAAGTCTTCTAACATGCGGTGACGTGGAGGAGAATCCCGGCCCT
» 비너스-pA (1) ATGGTGAGC
» K562 AAVHSC7 #1 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» K562 AAVHSC7 #2 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» K562 AAVHSC7 #3 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» K562 AAVHSC7 #4 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» K562 AAVHSC7 #5 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC7 #1 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC7 #2 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC7 #3 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC7 #4 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC15 #1 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC15 #2 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC17 #1 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC17 #2 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC17 #3 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» PBSC AAVHSC17 #4 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1107) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (933) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG
» 비너스-pA (11) AAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTCGAGCTGGACGGCGACGTAAACGG

도면33g


» R562 AAVHSC7 #1 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» R562 AAVHSC7 #2 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» R562 AAVHSC7 #3 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» R562 AAVHSC7 #4 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» R562 AAVHSC7 #5 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1172) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (998) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» 상동성 아암 5′ (•801)
» 비너스-pA (76) CCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGC
» R562 AAVHSC7 #1 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» R562 AAVHSC7 #2 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» R562 AAVHSC7 #3 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» R562 AAVHSC7 #4 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» R562 AAVHSC7 #5 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1237) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1063) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» 상동성 아암 5′ (•801)
» 비너스-pA (141) TGATCTGCACCACCGGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGGGCTACGGC
» R562 AAVHSC7 #1 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» R562 AAVHSC7 #2 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» R562 AAVHSC7 #3 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» R562 AAVHSC7 #4 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» R562 AAVHSC7 #5 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1302) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1128) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC
» 상동성 아암 5′ (•801)
» 비너스-pA (206) CTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCC

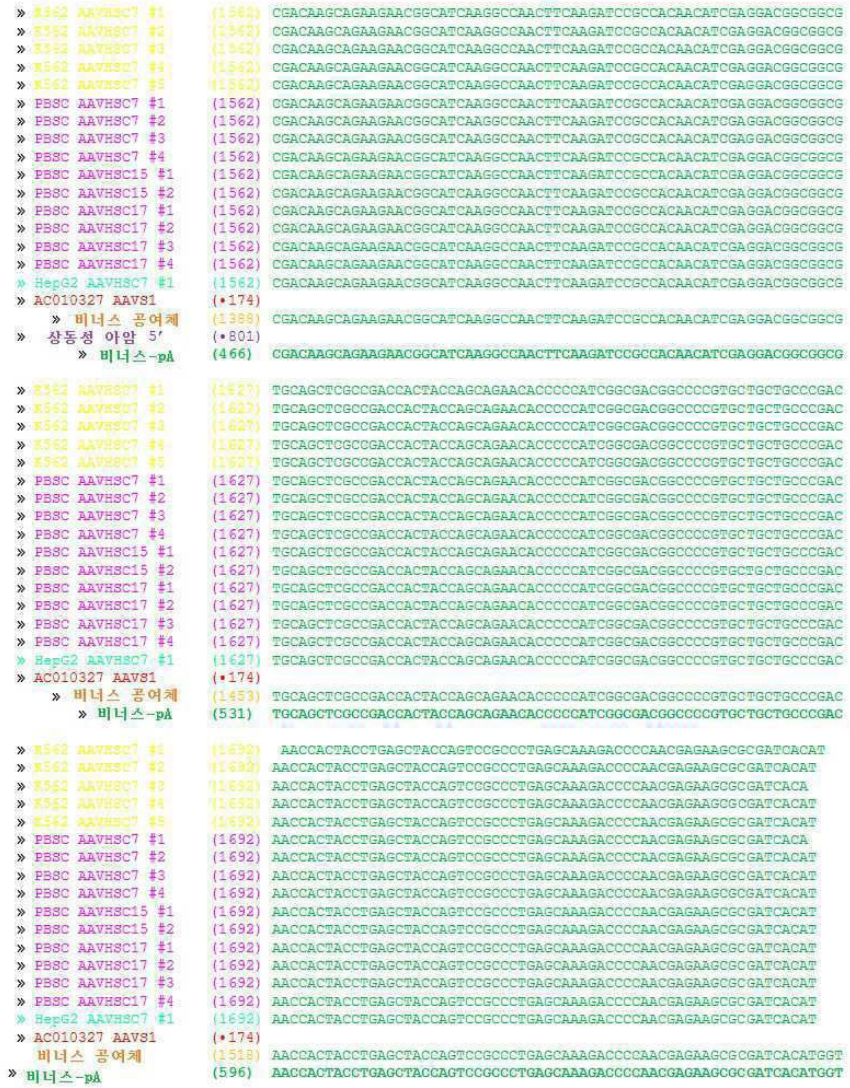
도면33h


» K562 AAVHSC7 #1 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» K562 AAVHSC7 #2 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» K562 AAVHSC7 #3 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» K562 AAVHSC7 #4 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» K562 AAVHSC7 #5 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC7 #1 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC7 #2 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC7 #3 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC7 #4 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC15 #1 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC15 #2 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC17 #1 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC17 #2 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC17 #3 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» PBSC AAVHSC17 #4 (1367) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1367) CGGAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1193) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG
» 상동성 아암 5′ (•801)
» 비너스-pA (271) CGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCG

» K562 AAVHSC7 #1 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» K562 AAVHSC7 #2 (1402) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» K562 AAVHSC7 #3 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» K562 AAVHSC7 #4 (1402) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» K562 AAVHSC7 #5 (1402) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC7 #1 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC7 #2 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC7 #3 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC7 #4 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC15 #1 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCGGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC15 #2 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC17 #1 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC17 #2 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC17 #3 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» PBSC AAVHSC17 #4 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1432) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1258) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG
» 상동성 아암 5′ (•801)
» 비너스-pA (336) AGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAG

» K562 AAVHSC7 #1 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» K562 AAVHSC7 #2 (1467) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» K562 AAVHSC7 #3 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» K562 AAVHSC7 #4 (1467) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» K562 AAVHSC7 #5 (1467) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1497) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1329) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC
» 비너스-pA (401) GACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACTACAACAGCCACAACGTCTATATCACCGC

도면33i


» K562 AAVHSC7 #1 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» K562 AAVHSC7 #2 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» K562 AAVHSC7 #3 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» K562 AAVHSC7 #4 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» K562 AAVHSC7 #5 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC7 #1 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC7 #2 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC7 #3 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC7 #4 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC15 #1 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC15 #2 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC17 #1 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC17 #2 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC17 #3 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» PBSC AAVHSC17 #4 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1562) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1388) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» 상동성 아암 5' (•801)
» 비너스-pA (466) CGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCGGCG
» K562 AAVHSC7 #1 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» K562 AAVHSC7 #2 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» K562 AAVHSC7 #3 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» K562 AAVHSC7 #4 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» K562 AAVHSC7 #5 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC7 #1 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC7 #2 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC7 #3 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC7 #4 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC15 #1 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC15 #2 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC17 #1 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC17 #2 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC17 #3 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» PBSC AAVHSC17 #4 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1627) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» AC010327 AAVS1 (•174)
» 비너스 공여체 (1453) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» 비너스-pA (531) TGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGAC
» K562 AAVHSC7 #1 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» K562 AAVHSC7 #2 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» K562 AAVHSC7 #3 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
» K562 AAVHSC7 #4 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» K562 AAVHSC7 #5 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC7 #1 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACA
» PBSC AAVHSC7 #2 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC7 #3 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC7 #4 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC15 #1 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC15 #2 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC17 #1 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC17 #2 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC17 #3 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» PBSC AAVHSC17 #4 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» HepG2 AAVHSC7 #1 (1692) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACAT
» AC010327 AAVS1 (•174)
비너스 공여체 (1518) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGT
» 비너스-pA (596) AACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGT

도면34a

AAVF 벡터에 의한 PPP1R12C의 인트론 1 내로의 짧은 서열의 염색체 삽입을 보여주는 서열 분석

```
                                1                                                                 65
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» RFLP 벡터 서열            (1)
» AC010327 AAVS1            (2) GGCCCTGGCCATTGTCACTTTGCGCTGCCCTCCTCTCGCCCCCGAGTGCCCTTGCTGTGCCGCCG
» 상동성 아암 5′            (1)
» 상동성 아암 3′            (1)
                               66                                                                130
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1     (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2     (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1    (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2    (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3    (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4    (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» RFLP 벡터 서열           (1)
» AC010327 AAVS1           (67) GAACTCTGCCCTCTAACGCTGCCGTCTCTCTCCTGAGTCCGGACCACTTTGAGCTCTACTGGCTT
» 상동성 아암 5′           (1)
» 상동성 아암 3′           (1)
                               131                                                               195
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1     (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2     (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1    (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2    (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3    (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4    (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCCTGCTTTCTCTGACCTGCATTC
» RFLP 벡터 서열           (1)                                                 TGCTTTCTCTGACCAGCATTC
» AC010327 AAVS1           (132) CTGGGCCGCCTCTGGCCCACTGTTTCCCCTTCCCAGGCAGGTCC
» 상동성 아암 5′           (1)                                                 TGCTTTCTCTGACCAGCATTC
» 상동성 아암 3′           (1)
                               196                                                               260
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1     (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2     (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1    (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2    (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3    (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4    (197) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» RFLP 벡터 서열           (23)  TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» AC010327 AAVS1           (•174)
» 상동성 아암 5′           (23) TCTCCCCTGGGCCTGTGCCGCTTTCTGTCTGCAGCTTGTGGCCTGGGTCACCTCTACGGCTGGCC
» 상동성 아암 3′           (1)
```

도면34b

```
                                  261                                                 325
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (262) CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» RFLP 벡터 서열            (88)  CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» AC010327 AAVS1            (•174)
» 상동성 아암 5′            (88)  CAGATCCTTCCCTGCCGCCTCCTTCAGGTTCCGTCTTCCTCCACTCCCTCTTCCCCTTGCTCTCT
» 상동성 아암 3′            (1)
                                  326                                                 390
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (327) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» RFLP 벡터 서열            (153) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» AC010327 AAVS1            (•174)
» 상동성 아암 5′            (153) GCTGTGTTGCTGCCCAAGGATGCTCTTTCCGGAGCACTTCCTTCTCGGCGCTGCACCACGTGATG
» 상동성 아암 3′            (1)
                                  391                                                 455
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (392) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» RFLP 벡터 서열            (218) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» AC010327 AAVS1            (•174)
» 상동성 아암 5′            (218) TCCTCTGAGCGGATCCTCCCCGTGTCTGGGTCCTCTCCGGGCATCTCTCCTCCCTCACCCAACCC
» 상동성 아암 3′            (1)
                                  456                                                 520
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (457) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» RFLP 벡터 서열            (283) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» AC010327 AAVS1            (•174)
» 상동성 아암 5′            (283) CATGCCGTCTTCACTCGCTGGGTTCCCTTTTCCTTCTCCTTCTGGGGCCTGTGCCATCTCTCGTT
» 상동성 아암 3′            (1)
```

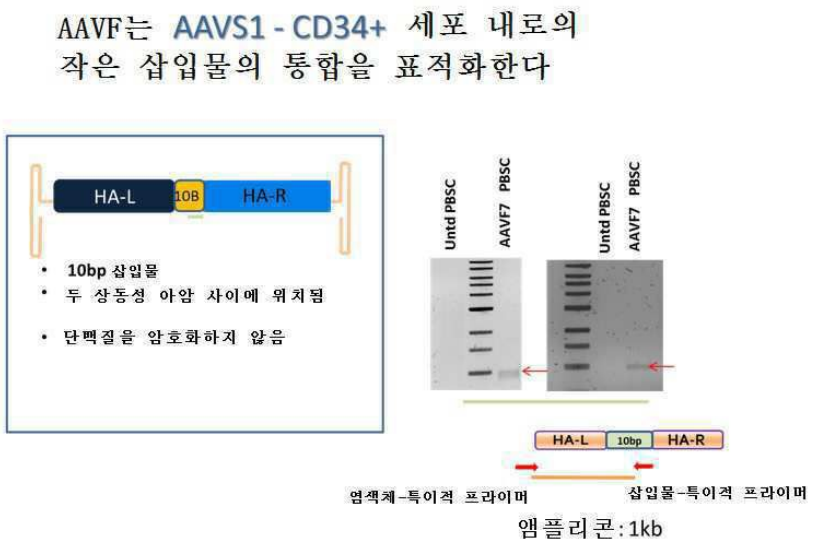
도면34c

```
                                521                                                585
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (522) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» RFLP 벡터 서열            (348) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (348) TCTTAGGATGGCCTTCTCCGACGGATGTCTCCCTTGCGTCCCGCCTCCCCTTCTTGTAGGCCTGC
» 상동성 아암 3′            (1)
                                586                                                650
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCCGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (587) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» RFLP 벡터 서열            (413) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (413) ATCATCACCGTTTTTCTGGACAACCCCAAAGTACCCCGTCTCCCTGGCTTTAGCCACCTCTCCAT
» 상동성 아암 3′            (1)
                                651                                                715
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCCCTCACTCCTTTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (652) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» RFLP 벡터 서열            (478) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (478) CCTCTTGCTTTCTTTGCCTGGACACCCCGTTCTCCTGTGGATTCGGGTCACCTCTCACTCCTTTC
» 상동성 아암 3′            (1)
                                716                                                780
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (717) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» RFLP 벡터 서열            (543) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (543) ATTTGGGCAGCTCCCCTACCCCCCTTACCTCTCTAGTCTGTGCTAGCTCTTCCAGCCCCCTGTCA
» 상동성 아암 3′            (1)
```

도면34d

```
                                781                                                                 845
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCGCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (782) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» RFLP 벡터 서열            (608) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (608) TGGCATCTTCCAGGGGTCCGAGAGCTCAGCTAGTCTTCTTCCTCCAACCCGGGCCCCTATGTCCA
»  상동성 아암 3′           (1)
                                846                                                                 910
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (847) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» RFLP 벡터 서열            (673) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (673) CTTCAGGACAGCATGTTTGCTGCCTCCAGGGATCCTGTGTCCCCGAGCTGGGACCACCTTATATT
»  상동성 아암 3′           (1)
                                911                                                                 975
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (912) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» RFLP 벡터 서열            (738) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (738) CCCAGGGCCGGTTAATGTGGCTCTGGTTCTGGGTACTTTTATCTGTCCCCTCCACCCCACAGTGG
»  상동성 아암 3′           (1)
                                976                                                                1040
» AAVHSC7 RFLP PBSC #1      (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGG
» AAVHSC7 RFLP PBSC #2      (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #1     (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #2     (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGA
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #3     (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGG
» AAVHSC7 RFLP HepG2 #4     (977) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGG
» RFLP 벡터 서열            (803) GGCAAGCTTTACTAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTTCCTA
» AC010327 AAVS1            (•174)
»  상동성 아암 5′           (•801)
»  상동성 아암 3′           (1)              TAGGGACAGGATTGGTGACAGAAAAGCCCCATCCTTAGGCCTCCTCCTTCCTA
>> Hind III                      AAGCTT
```

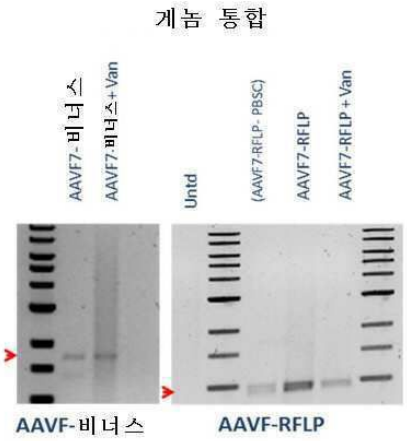
도면35



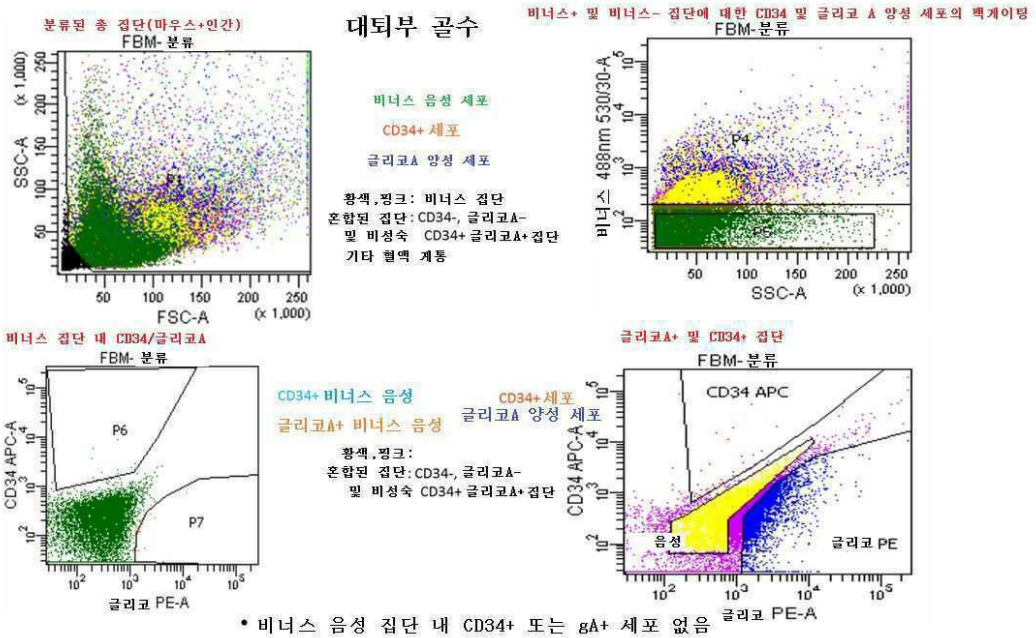
도면36

GFP 발현 (세포%)

	24H	48H
AAVF7	18.5	15.2
AAVF17	31.6	26.4
AAV6	0	ND
AAV8	0	ND
AAV9	2.81	ND

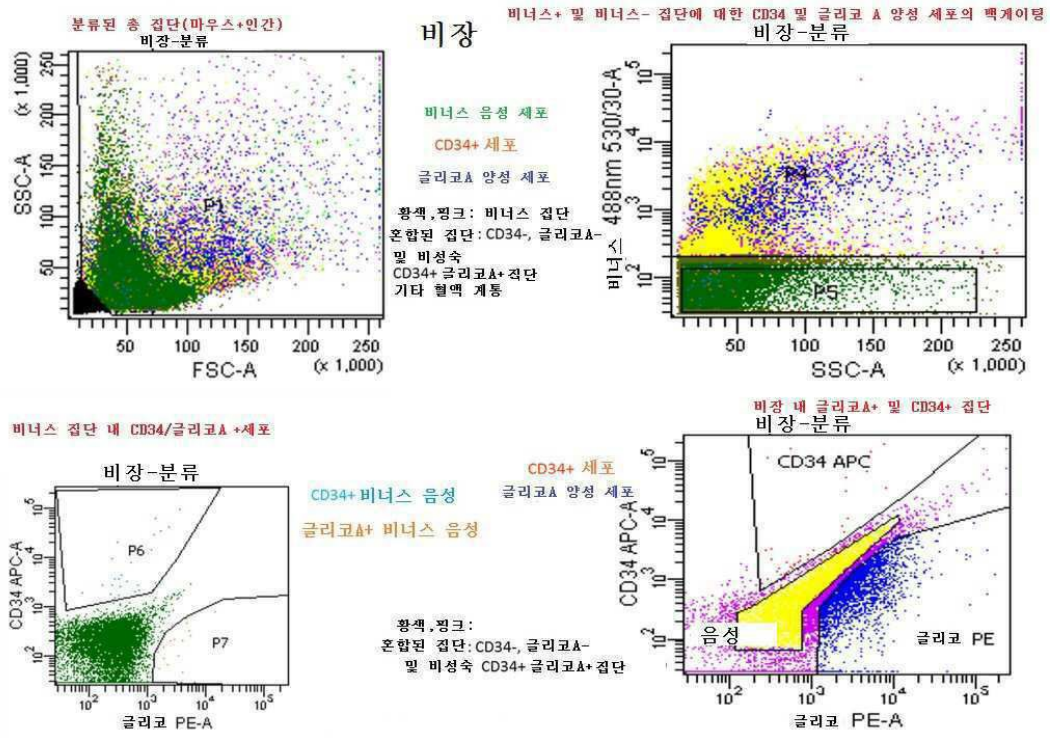


도면37

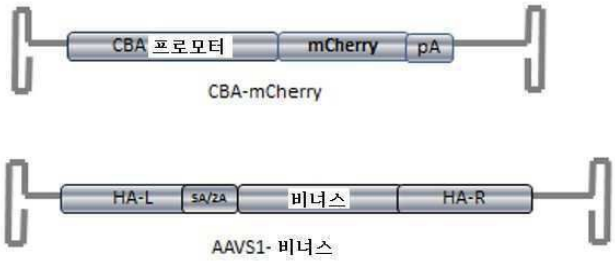


• 비너스 음성 집단 내 CD34+ 또는 gA+ 세포 없음
• 대부분의 gA+ 세포는 비너스를 발현시킴

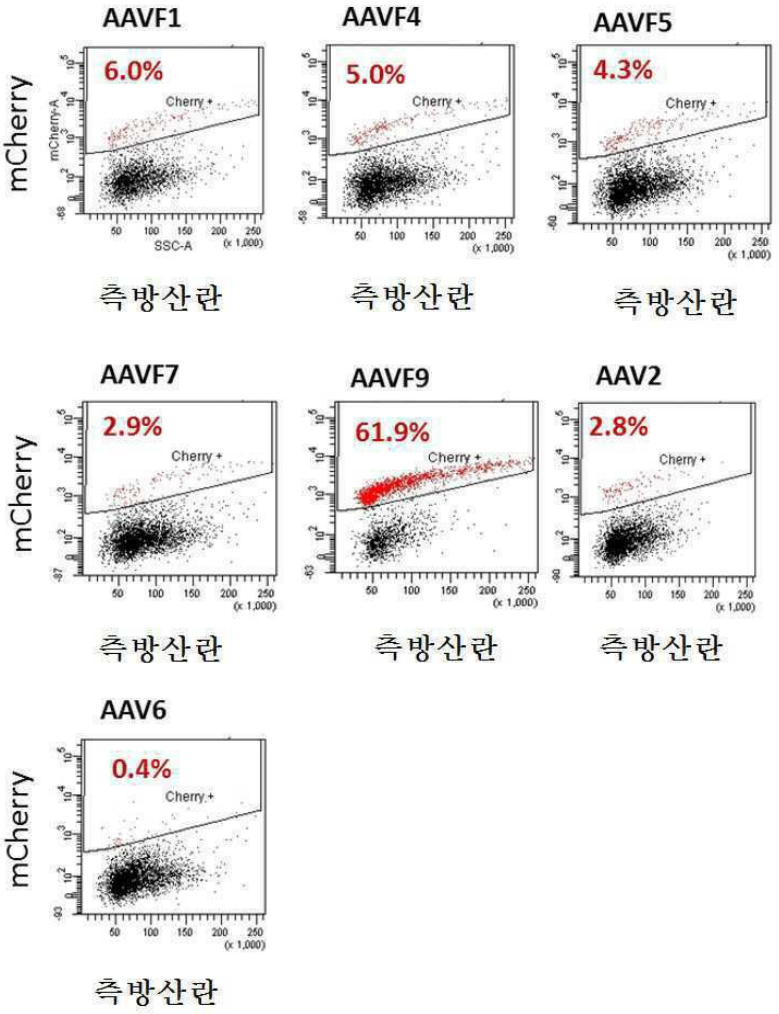
도면38


분류된 총 집단(마우스+인간)
비장-분류
SSC-A (x 1,000)
FSC-A (x 1,000)
P1
비장
비너스 음성 세포
CD34+ 세포
글리코A 양성 세포
황색,핑크: 비너스 집단
혼합된 집단: CD34-, 글리코A-
및 비성숙
CD34+ 글리코A+집단
기타 혈액 계통
비너스+ 및 비너스- 집단에 대한 CD34 및 글리코 A 양성 세포의 백게이팅
비장-분류
비너스 488nm 530/30-A
SSC-A (x 1,000)
P4
P5
비너스 집단 내 CD34/글리코A +세포
비장-분류
CD34 APC-A
글리코 PE-A
P6
P7
CD34+ 비너스 음성
글리코A+ 비너스 음성
CD34+ 세포
글리코A 양성 세포
황색,핑크:
혼합된 집단: CD34-, 글리코A-
및 비성숙 CD34+ 글리코A+집단
비장 내 글리코A+ 및 CD34+ 집단
비장-분류
CD34 APC
음성
글리코 PE
CD34 APC-A
글리코 PE-A

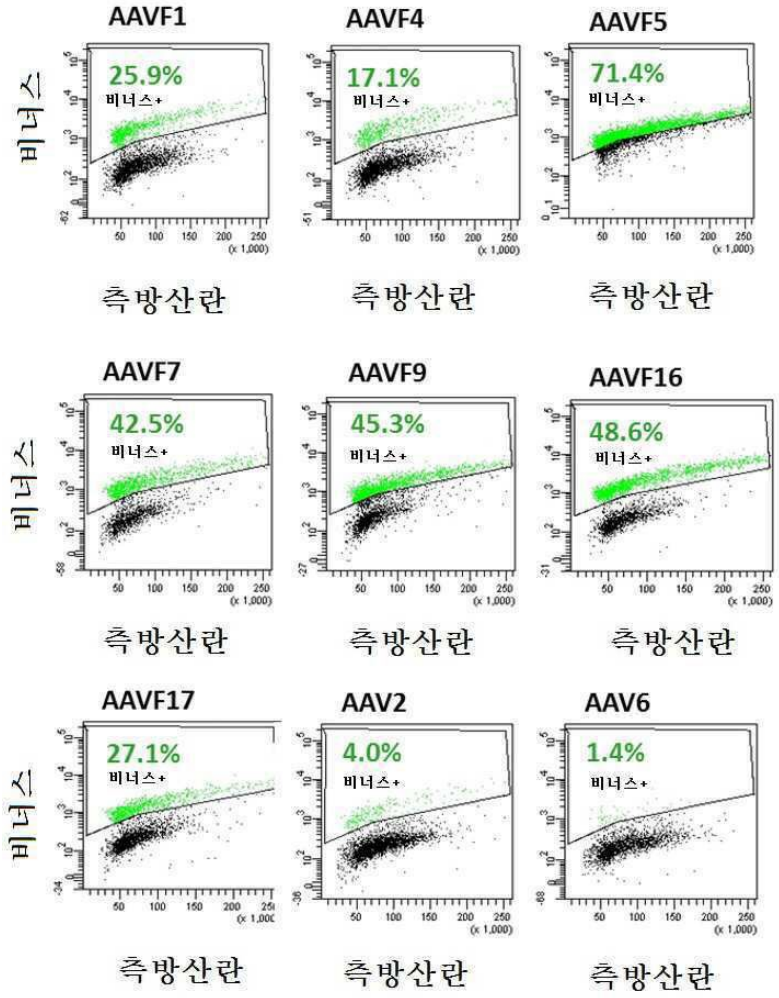
도면39


CBA 프로모터
mCherry
pA
CBA-mCherry
HA-L
SA/2A
비너스
HA-R
AAVS1- 비너스

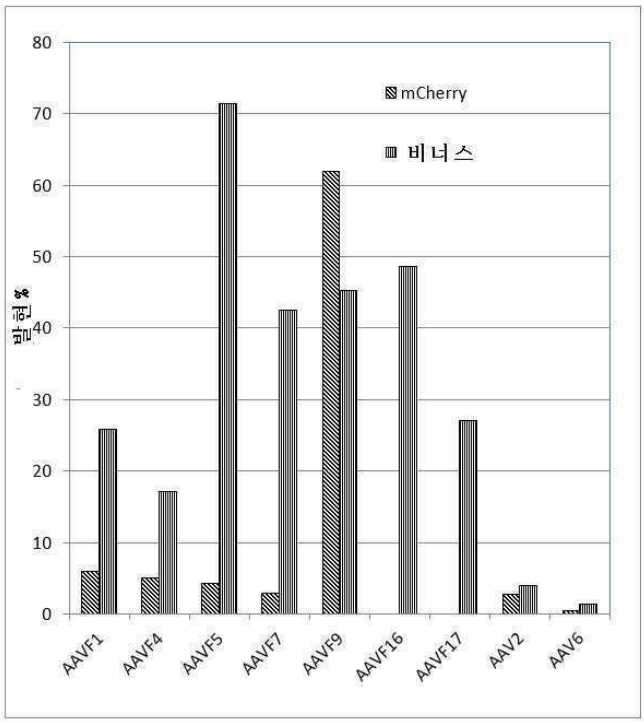
도면40a


AAVF1
6.0%
Cherry +
mCherry
mCherry-A
SSC-A
(x 1,000)
측방산란
AAVF4
5.0%
Cherry +
측방산란
AAVF5
4.3%
Cherry +
측방산란
AAVF7
2.9%
Cherry +
mCherry
측방산란
AAVF9
61.9%
Cherry +
측방산란
AAV2
2.8%
Cherry +
측방산란
AAV6
0.4%
Cherry +
mCherry
측방산란

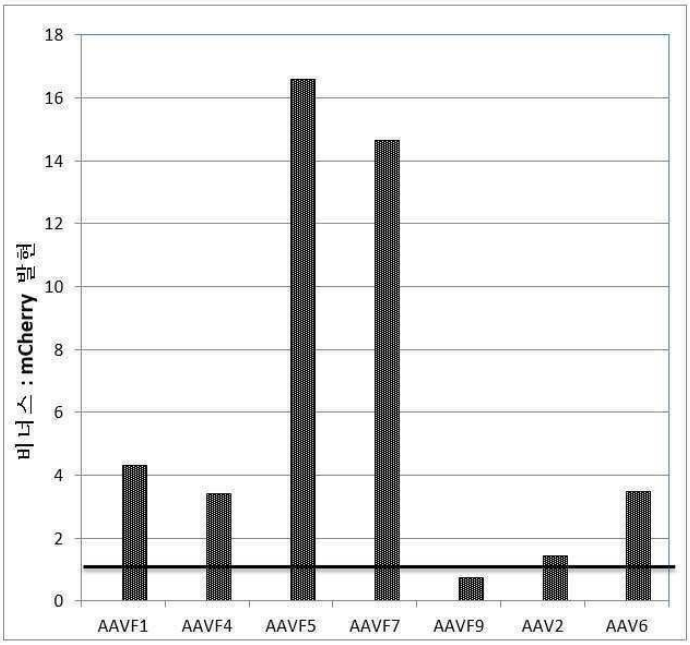
도면40b


AAVF1
25.9%
비너스+
AAVF4
17.1%
비너스+
AAVF5
71.4%
비너스+
비너스
측방산란
AAVF7
42.5%
비너스+
AAVF9
45.3%
비너스+
AAVF16
48.6%
비너스+
AAVF17
27.1%
비너스+
AAV2
4.0%
비너스+
AAV6
1.4%
비너스+
(x 1,000)

도면40c



도면40d



서 열 목 록

SEQUENCE LISTING

<110> CITY OF HOPE

<120> ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR VARIANTS FOR HIGH EFFICIENCY GENOME EDITING AND METHODS THEREOF

<130> IPA170265-US-D1

<150> US 62/054,899

<151> 2014-09-24

<150> US 62/063,587

<151> 2014-10-14

<150> US 62/209,862

<151> 2015-08-25

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> adeno-associated AAV9

<400> 1

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 2

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 2

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

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

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

340 345 350

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

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540

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

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

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

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

<210> 3
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> novel AAV isolate
<400> 3
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 4

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Ile Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn

260 265 270

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

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

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

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

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

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Tyr Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

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

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

<210> 5
<211> 736
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 5

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Asp
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

<210> 6

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 6

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Leu Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

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

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

Gln Val Lys Glu Val Thr Asp Asn Asn Gly Val Lys Thr Ile Ala Asn
325 330 335
Asn Leu Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Asp Tyr Gln Leu
340 345 350
Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Glu Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro
355 360 365
Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asp
370 375 380

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

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

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Ser Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

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

Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655
Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 7

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 7

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

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

725 730 735

<210> 8
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> novel AAV isolate
<400> 8
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Val Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

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

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

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

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

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 9

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 9

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

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

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

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

<210> 10
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220><223> novel AAV isolate
<400> 10
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Cys Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

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

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

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

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 11

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 11

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

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

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

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

180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Gly Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 12

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 12

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

Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95

Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140

Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160

Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

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

195 200 205

Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270

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

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

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

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

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525

Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590

Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His
610 615 620
Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Met
625 630 635 640
Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala
645 650 655

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 13

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 13

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

Asp Pro Pro Thr Ala Phe Asn Lys Asp Lys Leu Asn Ser Phe Ile Thr
660 665 670
Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln

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

<210> 14
<211> 736
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate
<400> 14
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Ala Leu Lys Pro Gly Ala Pro Gln Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro

115 120 125

Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175
Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190

Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255

Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285
Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn
290 295 300
Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile
305 310 315 320

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

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

Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe
385 390 395 400
Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Gln Phe Ser Tyr Glu
405 410 415
Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu
420 425 430
Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495
Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510

Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575

Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln
580 585 590
Thr Gly Trp Val Gln Asn Gln Gly Ile Leu Pro Gly Met Val Trp Gln
595 600 605
Asp Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His

610 615 620

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

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

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

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

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

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

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

<210> 15

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 15

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

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

20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln His Gln Asp Asn Ala Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45

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

Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575

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

580 585 590

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

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

<210> 16

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 16

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Gly Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp
65 70 75 80
Gln Gln Leu Lys Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala
85 90 95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly
100 105 110

Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Leu Leu Glu Pro
115 120 125
Leu Gly Leu Val Glu Glu Ala Ala Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg
130 135 140
Pro Val Glu Gln Ser Pro Gln Glu Pro Asp Ser Ser Ala Gly Ile Gly
145 150 155 160
Lys Ser Gly Ala Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr
165 170 175

Gly Asp Thr Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro
180 185 190
Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Ser Leu Thr Met Ala Ser Gly Gly Gly
195 200 205
Ala Pro Val Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser
210 215 220
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile
225 230 235 240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu
245 250 255
Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Ser Thr Ser Gly Gly Ser Ser Asn Asp Asn
260 265 270
Ala Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg
275 280 285

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

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

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

Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser
435 440 445
Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser
450 455 460
Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro
465 470 475 480
Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn
485 490 495

Asn Asn Ser Glu Phe Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys
515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly

530 535 540

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 17

<211> 736

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 17

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

Phe Glu Asn Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu

420 425 430

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

435 440 445

Lys Thr Ile Asn Gly Ser Gly Gln Asn Gln Gln Thr Leu Lys Phe Ser

450 455 460

Val Ala Gly Pro Ser Asn Met Ala Val Gln Gly Arg Asn Tyr Ile Pro

465 470 475 480

Gly Pro Ser Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Val Thr Gln Asn

485 490 495

Asn Asn Ser Glu Ile Ala Trp Pro Arg Ala Ser Ser Trp Ala Leu Asn
500 505 510
Gly Arg Asn Ser Leu Met Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys

515 520 525
Glu Gly Glu Asp Arg Phe Phe Pro Leu Ser Gly Ser Leu Ile Phe Gly
530 535 540
Lys Gln Gly Thr Gly Arg Asp Asn Val Asp Ala Asp Lys Val Met Ile
545 550 555 560
Thr Asn Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Ser
565 570 575
Tyr Gly Gln Val Ala Thr Asn His Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ala Gln

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

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

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

<210> 18

<211> 2211

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 18

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc 60

gagtggtggg ctttgaaacc tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac 120

aacgctcgag gtcttgtgct tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac 180

aagggggagc cggtcaacgc agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac 240

cagcagctca aggccggaga caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc 300

caggagcggc tcaaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag 360

gccaaaaaga ggcttcttga acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct 420

ggaaagaaga ggcctgtaga gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc 480

aaatcgggtg cacagcccgc taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag 540

tcagtcccag accctcaacc aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct 600

cttacaatgg cttcaggtgg tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga 660

gtgggtagtt cctcgggaaa ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc 720

accaccagca cccgaacctg ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc 780

tccaacagca catctggagg atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc 840

tgggggtatt ttgacttcaa cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga 900

ctcatcaaca acaactgggg attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt 960

caggtcaaag aggttacgga caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc 1020

acggtccagg tcttcacgga ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac 1080

gagggctgcc tcccgccgtt cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg 1140

acgcttaatg atggaagcca ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc 1200

ccgtcgcaaa tgctaagaac gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta 1260

cctttccata gcagctacgc tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc 1320

gaccaatact tgtactatct ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg 1380

ctaaaattca gtgtggccgg acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct 1440

ggacccagct accgacaaca acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa 1500

tttgcttggc ctggagcttc ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct 1560

ggacctgcta tggccagcca caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct 1620

ttaatttttg gcaaacaagg aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata 1680

accaacgaag aagaaattaa aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg 1740

gccacaaacc accagagtgc ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga 1800

atacttccgg gtatggtttg gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc 1860

aaaattcctc acacggacgg caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg 1920

aagcacccgc ctcctcagat cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg 1980

gccttcaaca aggacaagct gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc 2040

gtggagatcg agtgggagct gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag 2100

tacacttcca actattacaa gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta 2160

tatagtgaac cccgccccat tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta a 2211

<210> 19

<211> 4679

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 19

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcctggagg ggtggagtcg tgacgtgaat tacgtcatag 180

ggttagggag gtcctgtatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat 240

gtggtcacgc tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga 300

ggtttgaacg cgcagccgcc atgccggggt tttacgagat tgtgattaag gtccccagcg 360

accttgacga gcatctgccc ggcatttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg 420

aatgggagtt gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga 480

ccgtggccga gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc 540

cggaggccct tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttccac atgcacgtgc 600

tcgtggaaac caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg 660

aaaaactgat tcagagaatt taccgcggga tcgagccgac tttgccaaac tggttcgcgg 720

tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc 780

ccaattactt gctccccaaa acccagcctg agctccagtg ggcgtggact aatatggaac 840

agtatttaag cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaacg gttggtggcg cagcatctga 900

cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatcccaat tctgatgcgc 960

cggtgatcag atcaaaaact tcagccaggt acatggagct ggtcgggtgg ctcgtggaca 1020

aggggattac ctcggagaag cagtggatcc aggaggacca ggcctcatac atctccttca 1080

atgcggcctc caactcgcgg tcccaaatca aggctgcctt ggacaatgcg ggaaagatta 1140

tgagcctgac taaaaccgcc cccgactacc tggtgggcca gcagcccgtg gaggacattt 1200

ccagcaatcg gatttataaa attttggaac taaacgggta cgatccccaa tatgcggctt 1260

ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagt tcggcaagag gaacaccatc tggctgtttg 1320

ggcctgcaac taccgggaag accaacatcg cggaggccat agcccacact gtgcccttct 1380

acgggtgcgt aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg 1440

tgatctggtg ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc 1500

tcggaggaag caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctcggcccag atagacccga 1560

ctcccgtgat cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga 1620

ccttcgaaca ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc 1680

tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttc cggtgggcaa 1740

aggatcacgt ggttgaggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa 1800

gacccgcccc cagtgacgca gatataagtg agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc 1860

agccatcgac gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat 1920

gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga 1980

atcagaattc aaatatctgc ttcactcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttcccg 2040

tgtcagaatc tcaacccgtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc 2100

atcatatcat gggaaaggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt 2160

tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat 2220

cttccagatt ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtggtg gaagctcaaa 2280

cctggcccac caccaccaaa gcccgcagag cggcataagg acgacagcag gggtcttgtg 2340

cttcctgggt acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaagggaga gccggtcaac 2400

gaggcagacg ccgcggccct cgagcacgac aaagcctacg accggcagct cgacagcgga 2460

gacaacccgt acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaaagaa 2520

gatacgtctt ttgggggcaa cctcggacga gcagtcttcc aggcgaaaaa gagggttctt 2580

gaacctctgg gcctggttga ggaacctgtt aagacggctc cgggaaaaaa gaggccggta 2640

gagcactctc ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct 2700

gcaagaaaaa gattgaattt tggtcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag 2760

cctctcggac agccaccagc agccccctct ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc 2820

agtggcgcac caatggcaga caataacgag ggcgccgacg gagtgggtaa ttcctcggga 2880

aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag cacccgaacc 2940

tgggccctgc ccacctacaa caaccacctc tacaaacaaa tttccagcca atcaggagcc 3000

tcgaacgaca atcactactt tggctacagc acccctttggg ggtattttga cttcaacaga 3060

ttccactgcc acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggattc 3120

cgacccaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat 3180

gacggtacga cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcaggtgtt tactgactcg 3240

gagtaccagc tcccgtacgt cctcggctcg gcgcatcaag gatgcctccc gccgttccca 3300

gcagacgtct tcatggtgcc acagtatgga tacctcaccc tgaacaacgg gagtcaggca 3360

gtaggacgct cttcatttta ctgcctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga 3420

aacaacttta ccttcagcta cacttttgag gacgttcctt tccacagcag ctacgctcac 3480

agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcatcgacc agtacctgta ttacttgagc 3540

agaacaaaca ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaaggc ttcagttttc tcaggccgga 3600

gcgagtgaca ttcgggacca gtctaggaac tggcttcctg gaccctgtta ccgccagcag 3660

cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc 3720

aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccggccat ggcaagccac 3780

aaggacgatg aagaaaagtt ttttcctcag agcggggttc tcatctttgg gaagcaaggc 3840

tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcatgatta cagacgaaga ggaaatcagg 3900

acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc 3960

aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttccagg catggtctgg 4020

caggacagag atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga 4080

cattttcacc cctctcccct catgggtgga ttcggactta aacaccctcc tccacagatt 4140

ctcatcaaga acaccccggt acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt 4200

gcttccttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg 4260

cagaaggaaa acagcaaacg ctggaatccc gaaattcagt acacttccaa ctacaacaag 4320

tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt 4380

ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgtta atcaataaac cgtttaattc 4440

gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta 4500

gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc 4560

actccctctc tgcgcgctcg ctcgctcact gaggccgggc gaccaaaggt cgcccgacgc 4620

ccgggctttg cccgggcggc ctcagtgagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaa 4679

<210> 20

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 20

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atgactgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcaactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 21

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 21

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggggcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacgggcgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tggaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 22

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 22

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggactcg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattgac aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcggactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 23

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 23

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcctccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

atccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccag gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 24

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 24

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacgg gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 25

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 25

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acctagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaagaaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaacac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 26

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 26

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cgatcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacgtacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 27

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 27

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agtagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

atttcggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 28

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 28

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct cgggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggaact 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 29

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 29

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtctttcag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcatgtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctggagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 30

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 30

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgccacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgctg ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacatga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca atgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcctggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc atggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 31

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 31

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 32

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 32

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagcg 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 33

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 33

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcgcgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 34

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 34

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgactgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgac aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggga cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa attgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccagtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattgcaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 35

<211> 2601

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> novel AAV isolate

<400> 35

ccatcgacgt cagacgcgga agcttcgatc aactacgcgg acaggtacca aaacaaatgt 60

tctcgtcacg tgggcatgaa tctgatgctg tttccctgca gacaatgcga gagactgaat 120

cagaattcaa atatctgctt cactcacggt gtcaaagact gtttagagtg ctttcccgtg 180

tcagaatctc aacccgtttc tgtcgtcaaa aaggcgtatc agaaactgtg ctacattcat 240

cacatcatgg gaaaggtgcc agacgcttgc actgcttgcg acctggtcaa tgtggacttg 300

gatgtctgtg tttctgaaca ataaatgact taaaccaggt atggctgccg atggttatct 360

tccagattgg ctcgaggaca accttagtga aggaattcgc gagtggtggg ctttgaaacc 420

tggagcccct caacccaagg caaatcaaca acatcaagac aacgctcgag gtcttgtgct 480

tccgggttac aaataccttg gacccggcaa cggactcgat aaggggggagc cggtcaacgc 540

agcagacgcg gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac cagcagctca aggccggaga 600

caacccgtac ctcaagtaca accacgccga cgccgagttc caggagcggc tcaaagaaga 660

tacgtctttt gggggcaacc tcgggcgagc agtcttccag gccaaaaaga ggcttcttga 720

acctcttggt ctggttgagg aagcggctaa gacggctcct ggaaagaaga ggcctgtaga 780

gcagtctcct caggaaccgg actcctccgc gggtattggc aaatcgggtg cacagcccgc 840

taaaaagaga ctcaatttcg gtcagactgg cgacacagag tcagtcccag accctcaacc 900

aatcggagaa cctcccgcag ccccctcagg tgtgggatct cttacaatgg cttcaggtgg 960

tggcgcacca gtggcagaca ataacgaagg tgccgatgga gtgggtagtt cctcgggaaa 1020

ttggcattgc gattcccaat ggctgggggа cagagtcatc accaccagca cccgaacctg 1080

ggccctgccc acctacaaca atcacctcta caagcaaatc tccaacagca catctggagg 1140

atcttcaaat gacaacgcct acttcggcta cagcaccccc tgggggtatt ttgacttcaa 1200

cagattccac tgccacttct caccacgtga ctggcagcga ctcatcaaca acaactgggg 1260

attccggcct aagcgactca acttcaagct cttcaacatt caggtcaaag aggttacgga 1320

caacaatgga gtcaagacca tcgccaataa ccttaccagc acggtccagg tcttcacgga 1380

ctcagactat cagctcccgt acgtgctcgg gtcggctcac gagggctgcc tcccgccgtt 1440

cccagcggac gttttcatga ttcctcagta cgggtatctg acgcttaatg atggaagcca 1500

ggccgtgggt cgttcgtcct tttactgcct ggaatatttc ccgtcgcaaa tgctaagaac 1560

gggtaacaac ttccagttca gctacgagtt tgagaacgta cctttccata gcagctacgc 1620

tcacagccaa agcctggacc gactaatgaa tccactcatc gaccaatact tgtactatct 1680

ctcaaagact attaacggtt ctggacagaa tcaacaaacg ctaaaattca gtgtggccgg 1740

acccagcaac atggctgtcc agggaagaaa ctacatacct ggacccagct accgacaaca 1800

acgtgtctca accactgtga ctcaaaacaa caacagcgaa tttgcttggc ctagagcttc 1860

ttcttgggct ctcaatggac gtaatagctt gatgaatcct ggacctgcta tggccagcca 1920

caaagaagga gaggaccgtt tctttccttt gtctggatct ttaatttttg gcaaacaagg 1980

aactggaaga gacaacgtgg atgcggacaa agtcatgata accaacgaag aagaaattaa 2040

aactactaac ccggtagcaa cggagtccta tggacaagtg gccacaaacc accagagtgc 2100

ccaagcacag gcgcagaccg gctgggttca aaaccaagga atacttccgg gtatggtttg 2160

gcaggacaga gatgtgtacc tgcaaggacc catttgggcc aaaattcctc acacggacgg 2220

caactttcac ccttctccgc tgatgggagg gtttggaatg aagcacccgc ctcctcagat 2280

cctcatcaaa aacacacctg tacctgcgga tcctccaacg gccttcaaca aggacaagct 2340

gaactctttc atcacccagt attctactgg ccaagtcagc gtggagatcg agtgggagct 2400

gcagaaggaa aacagcaagc gctggaaccc ggagatccag tacacttcca actattacaa 2460

gtctaataat gttgaatttg ctgttaatac tgaaggtgta tatagtgaac cccgccccat 2520

tggcaccaga tacctgactc gtaatctgta attgcttgtt aatcaataaa ccgtttaatt 2580

cgtttcagtt gaactgcggc c 2601

<210> 36

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV2 5' ITR

<400> 36

ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc 60

cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgcag agagggagtg 120

gccaactcca tcactagggg ttcct 145

<210> 37

<211> 145

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV2 3' ITR

<400> 37

aggaacccct agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctcactgagg 60

ccgggcgacc aaaggtcgcc cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc 120

gagcgcgcag agagggagtg gccaa 145

<210> 38

<211> 167

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV5 5' ITR

<400> 38

ctctcccccc tgtcgcgttc gctcgctcgc tggctcgttt gggggggtgg cagctcaaag 60

agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg ccccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa 120

cgcgacaggg gggagagtgc cacactctca agcaaggggg ttttgta 167

<210> 39

<211> 167

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV5 3' ITR

<400> 39

tacaaaacct ccttgcttga gagtgtggca ctctcccccc tgtcgcgttc gctcgctcgc 60

tggctcgttt gggggggtgg cagctcaaag agctgccaga cgacggccct ctggccgtcg 120

cccccccaaa cgagccagcg agcgagcgaa cgcgacaggg gggagag 167

<210> 40

<211> 621

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> AAV2 Rep

<400> 40

Met Pro Gly Phe Tyr Glu Ile Val Ile Lys Val Pro Ser Asp Leu Asp
1 5 10 15

Glu His Leu Pro Gly Ile Ser Asp Ser Phe Val Asn Trp Val Ala Glu
20 25 30

Lys Glu Trp Glu Leu Pro Pro Asp Ser Asp Met Asp Leu Asn Leu Ile
35 40 45

Glu Gln Ala Pro Leu Thr Val Ala Glu Lys Leu Gln Arg Asp Phe Leu
50 55 60

Thr Glu Trp Arg Arg Val Ser Lys Ala Pro Glu Ala Leu Phe Phe Val
65 70 75 80

Gln Phe Glu Lys Gly Glu Ser Tyr Phe His Met His Val Leu Val Glu
85 90 95

Thr Thr Gly Val Lys Ser Met Val Leu Gly Arg Phe Leu Ser Gln Ile
100 105 110

Arg Glu Lys Leu Ile Gln Arg Ile Tyr Arg Gly Ile Glu Pro Thr Leu
115 120 125

Pro Asn Trp Phe Ala Val Thr Lys Thr Arg Asn Gly Ala Gly Gly Gly
130 135 140

Asn Lys Val Val Asp Glu Cys Tyr Ile Pro Asn Tyr Leu Leu Pro Lys
145 150 155 160

Thr Gln Pro Glu Leu Gln Trp Ala Trp Thr Asn Met Glu Gln Tyr Leu
165 170 175

Ser Ala Cys Leu Asn Leu Thr Glu Arg Lys Arg Leu Val Ala Gln His
180 185 190

Leu Thr His Val Ser Gln Thr Gln Glu Gln Asn Lys Glu Asn Gln Asn
195 200 205

Pro Asn Ser Asp Ala Pro Val Ile Arg Ser Lys Thr Ser Ala Arg Tyr
210 215 220
Met Glu Leu Val Gly Trp Leu Val Asp Lys Gly Ile Thr Ser Glu Lys
225 230 235 240
Gln Trp Ile Gln Glu Asp Gln Ala Ser Tyr Ile Ser Phe Asn Ala Ala
245 250 255
Ser Asn Ser Arg Ser Gln Ile Lys Ala Ala Leu Asp Asn Ala Gly Lys
260 265 270

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

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

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

450 455 460

Glu Val Lys Asp Phe Phe Arg Trp Ala Lys Asp His Val Val Glu Val
465 470 475 480
Glu His Glu Phe Tyr Val Lys Lys Gly Gly Ala Lys Lys Arg Pro Ala
485 490 495
Pro Ser Asp Ala Asp Ile Ser Glu Pro Lys Arg Val Arg Glu Ser Val
500 505 510
Ala Gln Pro Ser Thr Ser Asp Ala Glu Ala Ser Ile Asn Tyr Ala Asp
515 520 525

Arg Tyr Gln Asn Lys Cys Ser Arg His Val Gly Met Asn Leu Met Leu
530 535 540
Phe Pro Cys Arg Gln Cys Glu Arg Met Asn Gln Asn Ser Asn Ile Cys
545 550 555 560
Phe Thr His Gly Gln Lys Asp Cys Leu Glu Cys Phe Pro Val Ser Glu
565 570 575
Ser Gln Pro Val Ser Val Val Lys Lys Ala Tyr Gln Lys Leu Cys Tyr
580 585 590

Ile His His Ile Met Gly Lys Val Pro Asp Ala Cys Thr Ala Cys Asp
595 600 605
Leu Val Asn Val Asp Leu Asp Asp Cys Ile Phe Glu Gln
610 615 620