



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년03월12일

(11) 등록번호 10-1956885

(24) 등록일자 2019년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
**C12N 15/861** (2006.01) **A61K 48/00** (2006.01)  
 (21) 출원번호 10-2013-7023589  
 (22) 출원일자(국제) 2012년02월17일  
 심사청구일자 2017년02월15일  
 (85) 번역문제출일자 2013년09월06일  
 (65) 공개번호 10-2014-0046407  
 (43) 공개일자 2014년04월18일  
 (86) 국제출원번호 PCT/US2012/025550  
 (87) 국제공개번호 WO 2012/112832  
 국제공개일자 2012년08월23일  
 (30) 우선권주장  
 61/443,879 2011년02월17일 미국(US)  
 (56) 선행기술조사문헌  
 WO2010127097 A1

(73) 특허권자  
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실바니아  
 미국 19104 펜실바니아주 필라델피아 슈트 200 캐스트너트 스트리트 3160  
 (72) 발명자  
 윌슨 제임스 엠.  
 미국 펜실베니아 19342 글렌 밀스 폴브룩 레인 7  
 벨 크리스티 엘.  
 미국 펜실베니아 19103 필라델피아 체스트넛 스트리트 2400 아파트먼트 212  
 반덴베르그 루크 에이치.  
 미국 펜실베니아 19146 필라델피아 세인트 엘반스 스트리트 2131  
 (74) 대리인  
 특허법인와이에스장

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 조직 특이성 변경 및 AAV9-매개 유전자 전달 개선을 위한 조성물 및 방법

### (57) 요약

AAV9 세포 표면 결합 도메인을 함유하는 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV)의 바이러스 벡터의 표적화 및/또는 세포 흡수 효율을 변경하는 방법이 기술된다. 본 방법은 말단 시알산 잔기 및 전종단 β-갈락토스 잔기를 갖는 글리칸을 포함하는 클레이드 F 세포 표면 수용체를 개질하는 것을 포함한다. 이러한 개질은 세포 서브세트 내 AAV9 결합을 일시적으로 기능적으로 억제함으로써 벡터들을 재표적화하고, 이로써 벡터를 세포의 다른 서브세트로 재전송하는 것을 포함할 수 있다. 대안적으로, 이러한 개질은 세포를 뉴라미니다제로 처리함으로써 세포 표면 β-갈락토스를 노출하여 세포 흡수 효율을 증가시키는 것을 포함할 수 있다. 또한 AAV9 벡터 및 뉴라미니다제를 함유하는 조성물이 제공된다. 또한 고체 지지체에 연결된 β-갈락토스를 사용하여 AAV9를 정제하는 방법이 제공된다. 또한 갈락토스 결합 도메인이 변이된 돌연변이 AAV9 및 AAV9 갈락토스 결합 도메인이 조작된 AAV를 포함하는, 그 표적 특이성이 변경되도록 개질된 돌연변이 벡터들이 제공된다.

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

세포 표면  $\beta$ -갈락토스 수용체 결합 도메인을 갖는 세포 표면을 갖는 클레이드 F 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함하는, 유전자 송달용 조성물로서,

상기 유전자 송달용 조성물은

(a) 뉴라미니다제; 또는

(b) 렉틴

과의 조합에 사용하기에 적합하고,

상기 뉴라미니다제는 말단 시알산을 절단하고 전종단  $\beta$ -갈락토스를 말단  $\beta$ -갈락토스로 전환시키며, 상기 조합은 말단 시알산 및 전종단  $\beta$ -갈락토스를 갖는 세포 표면 글리칸을 갖는 세포를 갖는 대상에 사용하기에 적합하고,

상기 렉틴은 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기에 결합하고, 상기 조합은 말단  $\beta$ -갈락토스를 갖는 세포 표면 글리칸을 갖는 세포를 갖는 대상에 사용하기에 적합하고,

상기 AAV 벡터는 AAV 반전 말단 반복부 및 숙주 세포에서 그 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 갖는 미니유전자를 더 포함하는,

유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 뉴라미니다제는 상기 AAV 벡터의 투여 전에 대상의 전-치료로서의 사용을 위한 것이거나,

상기 AAV 벡터 및 상기 뉴라미니다제는 동시에 상기 대상에 송달되기 위한 것인,

유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 3

제2항에 있어서.

동시 송달을 위해, 상기 AAV 벡터 및 상기 뉴라미니다제를 위한 담체를 더 포함하는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 AAV 벡터와,

폐 내로 주입하기에 적합한, 말단 시알산 잔기 및 서브말단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 글리칸 개질용 조성물을 포함하는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 5

(a) 뉴라미니다제; (b) 세포 표면  $\beta$ -갈락토스 수용체 결합 도메인을 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 클레이드 F 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터로서, AAV 반전 말단 반복부 및 숙주 세포에서 그 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 갖는 미니유전자를 더 포함하는 벡터; 및 (c) 약학적으로 허용가능한 담체의 조합을 포함하는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 6

(a) 에리스리나 크리스타갈리(*Erythrina Cristagalli*) 렉틴 및 리시누스 코뮤니스 아글루티닌 I으로 구성되는 군으로부터 선택되는 렉틴; (b) 아데노-관련 바이러스(AAV) 클레이드 F 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터로서, AAV 반전 말단 반복부 및 숙주 세포에서 그 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 갖는 미니유전자를 더 포함하는 벡터; 및 (c) 약학적으로 허용가능한 담체의 조합을 포함하는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 7

제5항 또는 제6항에 있어서,

상기 클레이드가 적어도 AAV hu.14/AAV9, hu.31 및 hu.32를 포함하는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 8

제1항 내지 제3항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

AAV 벡터는 AAV9 캡시드를 포함하고, 상기 AAV9 캡시드는 vp1, vp2 및 vp3 단백질을 포함하고, 상기 vp3 단백질은 서열 번호 1의 203 내지 736 아미노산을 갖는 AAV9 vp3와 적어도 95% 동일한 것인, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 9

제8항에 있어서,

상기 뉴라미니다제가 AAV 송달 전에 대상에 송달을 위한 것인, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 10

제1항 내지 제3항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 뉴라미니다제는 박테리아 뉴라미니다제 또는 인간 뉴라미니다제로 구성되는 군으로부터 선택되는, 유전자 송달용 조성물.

#### 청구항 11

서열 번호 1의 위치를 기준으로 위치 271, 446 및 470으로 구성되는 군으로부터 선택되는 본래의 AAV9 아미노산이 알라닌으로 대체된 AAV9 캡시드를 갖는 벡터인, 야생형(wt) AAV9의 전도 기도를 형질도입시키는 본래의 능력이 감소 또는 제거되도록 개질된 재조합 AAV9 벡터.

#### 청구항 12

세포 표면  $\beta$ -갈락토스 수용체 결합 도메인을 갖는 클레이드 F 아데노-관련 바이러스(AAV) 유래 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 분리하는 방법으로서,

상기 방법은

클레이드 F AAV 유래 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터를 포함하는 샘플을 노출시켜 고체 지지체에 연결된  $\beta$ -갈락토스를 포함하는 분자와 접촉시키고, 이에 의해  $\beta$ -갈락토스에 대한 결합 부위를 갖는 정제 표적이 그 분자에 의해 선택적으로 결합되는 단계;

고체 지지체에 비특이적으로 결합된 샘플 유래 물질을 제거하기 위해 고체 지지체를 세척하는 단계; 및

고체 지지체로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계

를 포함하는, 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서,

분리된 바이러스 벡터를 농축하는 단계를 더 포함하는, 방법.

#### 청구항 14

제12항 또는 제13항에 있어서,

고체 지지체는 친화 크로마토그래피 칼럼에 로딩되는, 방법.

**청구항 15**

삭제

**청구항 16**

삭제

**청구항 17**

삭제

**청구항 18**

삭제

**청구항 19**

삭제

**청구항 20**

삭제

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

**청구항 24**

삭제

**청구항 25**

삭제

**청구항 26**

삭제

**청구항 27**

삭제

**청구항 28**

삭제

**청구항 29**

삭제

## 청구항 30

삭제

## 청구항 31

삭제

## 청구항 32

삭제

## 청구항 33

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] **연방적으로 후원된 연구 또는 개발에 관한 진술**

[0002] 본 발명은 국립 보건원에 의해 수여된 NHLBI P01 # P01-HL-059407 하에서 정부 지원에 의해 만들어진 것이다. 정부는 본 발명에 일정 권리가 있다.

## 배경 기술

[0003] 유전자 치료를 위해 평가된 첫 번째 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터는 혈청형 2(AAV2)에 기초한 것이며 생체내 (*in vivo*) 송달에 후속하여 다양한 체세포를 형질도입(transduce)하는 것으로 보여졌다[Z. Wu, et al (2006) Mol Ther, 14:316-327]. 유전자 치료의 첫 번째 임상적 성공 중 하나는 유전적 형태의 실명 환자에 망막하 주사하여 시각의 일부 측면들을 회복하는 데에 AAV2 벡터를 사용하였다[A. Kern, et al, (2003) J Virol, 77: 11072-11081; AM Maguire, et al, (2008) N Engl J Med, 358: 2240-2248]. 그러나 다른 질병의 치료에 AAV2 벡터를 적용하는 것은, 낮은 형질도입 효율 및 기존재하는 중화 항체 및 캡시드에 대한 T 세포 활성화와 같은 다양한 면역학적 문제로 인해 성공적이지 못하였다[Wu, et al, 상기 인용됨]. AAV2는 헤파린 설페이트(HS) 프로테오글리칸을 세포 인식을 위한 제1 수용체로서 사용하는 것으로 알려져 있다[Kern et al, 상기 인용됨]. 추가적인 벡터들이 AAV1 및 그 가까운 동류인 AAV6와 같은 다른 존재하는 혈청형 유래 AAV 캡시드에 기초하여 개발되었으며, 둘 다 증강된 근육 형질도입 및 시알화당단백에 의해 매개된 세포 결합을 나타내었다[Z. Wu et al, (2006) J Virol, 80:9093-9103; W. Xiao, et al, (1999) J Virol, 73: 3994-4003]. AAV5에 기초한 벡터들은 또한 N-연결된 시알산(SA)에 결합을 요구하며 뇌로의 직접 주사에 후속하여 CNS에서 증강된 형질도입을 나타내었다[RW Walters et al, (2001) J Biol Chem, 276: 20610-20616; BL Davidson, et al, (2000) Proc Natl Acad Sci USA, 97:3428-3432]. 인간 유전자 치료에 대한 AAV 벡터들의 잠재력은 인간 및 비-인간 영장류 조직에서 잠복계놈으로부터 크고 다양한 패밀리와 신규한 캡시드들을 발견함으로써 확장되었다. 이러한 확장된 패밀리의 AAV들은 모두 6개의 항원 클레이드를 걸쳐 120 가지를 넘는 계놈에 달한다[G. Gao et al, (2003) Proc Natl Acad Sci USA, 100:6081-6086; G. Gao, et al, (2004) J Virol, 78: 6381-6388; G Gao et al, (2002) Proc Natl. Acad Sci USA, 99: 11854-11859]. 수많은 AAV 캡시드에 대해 고해상도 X-선 결정 구조 및 저 해상도 동결-전자 현미경 재구축 이미지가 결정되었으며, 총 9개의 표면 노출된 다변이영역을 갖는 고 보존 코어 영역이 입증되었다[HJ Nam et al, (2007) J Virol, 81:12260-12271]. 이러한 신규한 내인성 캡시드에 기초한 벡터들의 평가는 면역적 후유증은 줄이면서도 실질적으로 높은 형질도입 효율을 성취하는 면에서 매우 유망하다[G. Gao et al, (2002) Proc Natl Acad. Sci, 상기 인용됨].

[0004] 아데노-관련 바이러스(AAV) 혈청형 9에 기초한 벡터들이 많은 기관에 생체내 유전자 송달을 위한 선도 후보로 출현하였다. AAV9는 심근증의 치료를 위한 심장 표적화[LT Bish, et al, (2008) Hum Gene Ther 19: 1359-1368] 및 척수성 근위축과 같은 질환을 치료를 위한 뉴런 표적화[S. Duque, et al, (2009) Mol Ther, 17: 1187-1196; KD Foust et al, (2009) Nat Biotechnol, 27: 59-65]에 상당히 유망한 것으로 보여졌다. AAV9는 또한 벡터의 효율적인 재-투여를 허용하도록 체액성 반응을 유발하지 않고 폐의 폐포 상피세포를 매우 효율적으로 형질도입한다[MP Limberis and JM Wilson, (2006) Proc Natl. Acad Sci. USA, 103: 12993-12998]. 그러나, 이러한 항

성(tropism)을 매개하는 수용체(들)는 아직 정의되지 않았다.

[0005] 숙주 내로 이식 유전자(transgene)의 표적화된 AAV-매개 송달을 위한 안전하고 효율적인 방법이 요망된다.

### 발명의 내용

[0006] 본 발명은 원하는 표적 세포상에서 AAV9 수용체의 이용가능성을 개질하고 벡터 효능을 개질하기 위한 약학적 접근을 제공한다. 이 접근은 말단  $\beta$ -갈락토스가 AAV9에 대한 일차 수용체라는 본 발명자의 발견에 의해 가능하였다. 나아가, 이 접근은 AAV9  $\beta$ -갈락토스 결합 도메인을 함유하는 다른 AAV에도 적용 가능한 것으로 예상된다.

[0007] 일 양태에서, 본 발명은 AAV9 유래 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 바이러스 벡터의 표적화 및/또는 세포 흡수 효율을 변경하는 방법을 제공한다. 이 방법은 벡터에 결합하는  $\beta$ -갈락토스 세포 표면 수용체의 이용가능성을 개질하는 조성물을 대상에 송달하는 단계를 포함한다.

[0008] 일 양태에서, 숙주 내 표적 세포의 세포 표면은 말단 시알산 잔기 및 전종단(penultimate)  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 글리칸을 함유하며, 글리칸은 본 발명에 의해  $\beta$ -갈락토스 잔기를 노출하도록 개질된다. 일 구현예에서, 본 방법은 AAV 바이러스 벡터를 대상에 뉴라미니다제와 조합하여 송달하는 단계를 포함하며, 그에 의해 뉴라미니다제는 글리칸 상의 말단 시알산을 절단하고,  $\beta$ -갈락토스의 이용가능성을 증가시켜 세포에 의한 AAV 흡수 효율을 증가시킨다. 대상은 뉴라미니다제로 전-처리될 수 있다. 일 구현예에서, 뉴라미니다제는 엑소-뉴라미니다제이다(즉, 절단을 위해 내부 시알산이 아닌 말단 시알산을 표적화한다).

[0009] 다른 구현예에서, AAV9에 대한 수용체(예컨대, 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 세포 표면 글리칸)를 갖는 제1 세포 서브세트 상의 노출된 세포 표면 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 기능적으로 제거함으로써 말단  $\beta$ -갈락토스를 갖는 제1 서브세트의 세포로부터 AAV9 벡터들이 재전송(redirected)되고, 이로써 AAV가 대상 내 말단  $\beta$ -갈락토스를 갖는 제2 세포 서브세트에 재표적화되고/되거나 제2 세포 서브세트와 접촉하는 AAV수가 증가됨으로써 이들 세포에 의한 흡수가 증가된다. 일 구현예에서, 제1 세포 서브세트를 기능적으로 제거하는 부분이 국소적으로 제1 세포 서브세트에 송달된다. 일 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스는 AAV9 세포 표면 수용체를 갖는 제1 세포 서브세트에서 효소적으로 제거되고, 이로써 상기 세포 서브세트에 의한 AAV 흡수를 경감하거나 제거하고, AAV9 수용체(말단  $\beta$ -갈락토스)를 갖는 대상 내 제2 세포 서브세트로 AAV를 재표적화한다. 일 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스는 갈락토스 분해효소를 제1 세포 서브세트에 AAV9 벡터들과 조합하여 송달함으로써 효소적으로 제거된다. 다른 구현예에서, 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기와 결합하는 렉틴이 대상에 송달되고, 이들 잔기들과 결합하여  $\beta$ -갈락토스가 차단된다.

[0010] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상에 뉴라미니다제 및 AAV 반전 말단 반복부 및 숙주 세포에서 그 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 갖는 미니유전자를 더 포함하는 AAV9 벡터를 포함하는 조합을 송달함으로써, 말단 시알산과 전종단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 표면 글리칸을 갖는 세포에서 AAV9 벡터의 유전자 송달을 증가시키는 방법을 제공한다.

[0011] 일 양태에서, 조성물은 돌연변이 AAV9 벡터를 더 제공하며, 이 벡터에서 야생형(wt) AAV9의 전도 기도(conducting airway)에 형질도입하는 본래의 능력은 실질적으로 감소하거나 제거되지만 간이나 심장 형질도입은 wtAAV9와 유사하게 유지된다. 일 구현예에서, 돌연변이 AAV는 470번 위치의 본래의 아미노산(Asn)이 대체된 AAV9 캡시드를 가진다. 일 예에서, 이 대체물은 알라닌이다. 다른 구현예에서, 돌연변이 AAV는 446번 위치의 천연 아미노산(Tyr)이 대체된 AAV9 캡시드를 가진다. 일 예에서, 이 대체물은 알라닌이다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 AAV는 271번 위치의 본래의 아미노산(Asp)이 대체된 AAV9 캡시드를 가진다. 일 예에서, 아미노산은 알라닌으로 대체된다.

[0012] 다른 양태에서, 본 발명은 271번, 446번 및 470번 위치의 하나 이상의 아미노산을 알라닌 또는 다른 아미노산, 즉 바람직하게는 작은비하전 측쇄를 갖는 아미노산으로 개질함으로써, AAV9 벡터가 간이나 심장을 형질도입할 수 있는 능력은 보유하면서 기도 상피를 표적화하지 않도록(de-targeting)하는 방법을 제공한다. 다른 구현예에서, 아미노산은 결합 부위의 구조에 영향을 미치지 않는 메틸기를 갖는 작은 측쇄를 갖는다.

[0013] 추가적인 양태에서, 본 발명은 AAV9 갈락토스 결합 도메인을 함유하도록 조작된 AAV 캡시드를 갖는 AAV 벡터를 제공한다. 일 구현예에서, 조작된 AAV 캡시드는 AAV9의 Y446, N470, A472 및 V472와 모 AAV9의 상응하는 아미노산 위치에 삽입된 AAV9의 D271, N272, 및 W503을 함유한다.

[0014] 또 다른 구현예에서, 본 방법은 AAV9 유래 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 바이러스 벡터를 단리하는 방법을 제공한다. 이 방법은 (a) AAV9 유래 캡시드를 갖는 AAV 바이러스 벡터를 포함하는 샘플을 고체 지지체에

연결된  $\beta$ -갈락토스를 포함하는 분자와의 접촉에 노출시키는 단계로써, 이에 의해  $\beta$ -갈락토스에 대한 결합 부위를 갖는 정제 표적이 그 분자에 의해 선택적으로 결합되는 단계; (b) 고체 지지체에 비특이적으로 결합된 샘플 유래 물질을 제거하기 위해 고체 지지체를 세척하는 단계; 및 (c) 고체 지지체로부터 바이러스 벡터를 분리하는 단계를 포함한다.

[0015] 추가적 구현예에서, 본 발명은 (a) 뉴라미니다제, (b) AAV9 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 및 (c) 약학적으로 허용가능한 담체의 조합을 포함하는 조성물을 제공한다. 벡터는 추가적으로 AAV 반전 말단 반복부 및 숙주 세포 내에서 그 발현을 지시하는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 이중 유전자를 갖는 미니유전자를 포함한다.

[0016] 더 추가적인 구현예에서, 본 발명은 (a) 렉틴, (b) AAV9 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터, 및 (c) 약학적으로 허용가능한 담체의 조합을 포함하는 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 이들 양태들 및 다른 양태들은 후술하는 본 발명의 상세한 설명으로부터 용이하게 명확해질 것이다.

### 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1a 내지 1c는 시알산(SA)이 없는 글리칸에의 AAV 결합 연구 결과를 제공한다. 도 1a는 각 세포 유형 또는 효소 처리에 대한 N 및 O-연결 글리칸의 도식도이다. 도 1b는 뉴라미니다제(NA) 처리에 의해 SA가 Pro-5 세포의 표면에서 제거되고, 벡터들을 NA-처리 및 미처리 세포에 적용하였을 때 그 결합을 평가한 결과를 나타낸 것이다. 빈 AAV9 캡시드가 465개의 상이한 글리칸에 대한 결합을 위해 평균 상대 형광 단위(RFU로 나타냄)에 기초하여 스크리닝되었으며, AAV9에 결합하는 상위 5개의 글리칸이 동정되었다(미도시). 도 1c는 상위 5개 글리칸의 구조 및 이들을 대표하는 모식도를 도시한 것이다. %CV: 퍼센트로 표시된 변동계수(평균에 대한 데이터 표준편차의 비율)

도 2a 내지 2f는 CHO 세포의 결합 및 형질도입에 대한 AAV9의 갈락토스 의존성 연구 결과를 나타낸 것이다. ffluc를 발현하는 AAV 2, 6 또는 9를 Pro-5, Lec-2 또는 Lec-8 세포에 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하고 총 DNA를 단리하여 결합된 게놈 카피를 qPCR로 측정하거나(도 2a) 또는 세포를 37°C에서 48시간 동안 인큐베이션하고 ffluc 발현을 분석하였다(도 2b). AAV 결합(도 2c) 또는 형질도입(도 2d)에 대해 경쟁하는 다양한 렉틴의 존재하에, AAV2 및 AAV9를 NA-처리 Pro-5 세포에 적용하였다. RCA는 세포에 대한 독성으로 인해 형질도입 연구에 사용되지 않았다. AAV2 및 AAV9를 NA 또는 NA 및  $\beta$ -갈락토스 분해효소(NA 및  $\beta$ -gal) 처리된 Pro-5 세포에 첨가하고 AAV 결합(도 2e) 및 형질도입(도 2f)을 평가하였다. ffluc, 개통벌레 루시페라제; RLU, 상대 광 단위.

도 3a 및 3b는 갈락토스 결합에 요구되는 AAV9 캡시드 아미노산 연구 결과를 나타낸 것이다. 도 3a. 갈락토스 결합에 책임있는 아미노산을 확인하기 위해, 하전 또는 극성 측쇄를 함유하는 AAV9 고유한 특정 아미노산들을 알라닌(A)으로 변이시켰다. 14개의 돌연변이 벡터들을 구축하였고, 새로운 아미노산-알라닌(A)이 후속하는 본래의 아미노산 및 이의 특정 위치에 따라 명명하였다. 돌연변이들을 AAV9와 비교하여 Pro-5, Lec-2, 및 Lec-8 세포들에 대한 결합에 대해 테스트하였다. 벡터를 각 세포주에 첨가하고( $5 \times 10^9$  GC) 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세척후, 전체 DNA를 단리하여 정량 PCR로 결합된 벡터 GC를 결정하였다. N470는 AAV9 갈락토스 결합에 필수적인 것으로 결정되었다. 도 3b. 후속하여, N470에 가깝게 위치한 19개의 아미노산을 알라닌으로 변이시키고 AAV9 갈락토스 결합에 대한 효과를 검사하였다. 또한, 비극성 아미노산 A472 또는 V473를 세린이나 아스파르트산으로의 돌연변이를 함유하는 네 개의 다른 돌연변이들을 제조하였다. 이들 돌연변이 벡터들의 결합을 전술한 바와 같이 평가하였다. D271, N272, Y446, 및 W503는 A472 및 V473과 마찬가지로 AAV9 갈락토스 결합에 중요한 것으로 밝혀졌다. 데이터는 평균 + SD로 나타내었다.

도 4a 및 4b는 돌연변이 벡터들의 시험관 내(*in vitro*) 형질도입 효율을 나타낸 것이다. 갈락토스 결합능력을 상실한 다섯개의 돌연변이(N470A, D271A, N272A, Y446A 및 W503A), 뿐만 아니라 갈락토스 결합을 보유한 두개의 돌연변이(S469A 및 E500A) 및 AAV9 대조 벡터는 모두 ffluc를 발현하며, 이들을 109 GC/웰(MOI= 104)로 Lec-2(도 4a) 또는 Pro-5 세포(도 4b)에 첨가하였으며, 48시간 후 ffluc 발현을 측정하였다. 데이터는 평균 + SD로 나타내었다. RLU, 상대 광 단위.

도 5는 rAAV2/9 주입 후 코에서 이식 유전자 발현에 대한 뉴라미니다제 전-처리 효과의 생체 내 연구 결과를 보여주는 선 그래프이다. 결과는 1, 3, 7, 14, 21 및 28일(감염후 일수(시간))에서 비강 내 루시페린에 의해 영상화된 루시페라제의 총 방사속(초당 포톤(p/s))으로 나타내었다.



## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 표적 세포 상에서 AAV9 수용체의 이용가능성을 개질하고 벡터 효능을 개질하기 위한 약학적 접근이 기술된다. 이 접근은 말단  $\beta$ -갈락토스가 AAV9에 대한 일차 수용체라는 본 발명자의 발견에 의해 가능하였다. 편의를 위해 본 명세서 전체로, AAV9를 참조하여 기술된다. 그러나, 세포 표면 말단  $\beta$ -갈락토스에 대한 AAV9 캡시드 결합 도메인을 함유하는 다른 AAV 또는 세포 표면 말단  $\beta$ -갈락토스에 대한 다른 AAV 캡시드 결합 도메인을 함유하는 AAV(예, 클레이드 F 유래 다른 AAV)를 치환할 수 있는 것이 이해될 것이다. 또한, 본 방법 및 본 명세서에 기재된 조성물은 바이러스 입자인 벡터(즉, 바이러스 벡터의 흡수에 후속하여 숙주 세포에 전달되는 게놈 서열이 그 안에 패키징된 AAV 캡시드)뿐만 아니라 빈 AAV9 캡시드(그 안에 패키징된 서열이 없는 무손상 AAV 캡시드)에 유용하다. 나아가, 본 발명은 야생형 및 조작된 캡시드 양자에 이용가능한 것으로 예상된다.
- [0020] 일 구현예에서, 가변 영역 I에 의해 형성된 AAV 캡시드의 2-배 및 5-배축(axis)을 향하는 돌출부의 외측 표면에 포켓을 포함하는, AAV9 갈락토스 결합 도메인을 함유하도록 조작된 AAV 캡시드를 갖는 AAV 벡터가 제공된다. 일 구현예에서, 조작된 AAV 캡시드는 AAV9의 Y446(가변 영역(VR) IV 바로 직전의 보존 도메인), N470(VR IV), A472(VR IV) 및 V473(VR IV) 및 모 AAV9의 상응하는 아미노산 위치에 삽입된 AAV9의 D271(VR I), N272(VR I), 및 W503(VR V)을 함유한다. 모 AAV는 하나 이상의 이들 아미노산들을 본래 가질 수 있으나, 갈락토스와 본래 결합하거나 이들 모든 아미노산을 본래 함유하지는 않는다. 예를 들면, Y446, D271, 및 N272는 많은 혈청형 사이에 보존되나; N470은 그렇지 않다. 따라서, 개질된 AAV 캡시드는 단지 (AAV9의 위치 번호에 기초하여) N470의 조작을 필요로 할 수 있다. 그러나, 그러한 AAV 캡시드는 AAV9 결합 도메인을 제공하기 위해 상기 하나 이상의 아미노산의 조작을 요구할 수 있다. 일 구현예에서, 조작된 AAV9는 야생형이 시알산 결합력을 가지는 AAV에서 유래되나, 갈락토스의 조작으로 인해, 이제는 입체 장애로 인해 시알산 결합력이 없다.
- [0021] 다른 양태에서, 본 발명은 271, 446, 및 470번(가변 영역 IV) 위치의 하나 이상의 아미노산을 알라닌 또는 다른 아미노산으로 개질함으로써, AAV9 벡터가 간이나 심장을 형질도입하는 능력은 보유하면서 기도 상피를 표적화하지 않도록 하는 방법을 제공한다. 일 구현예에서, 야생형 아미노산을 대체하는 아미노산은 작고, 비하전된 측쇄를 가진 아미노산이다. 다른 구현예에서, 아미노산은 메틸기를 가진 작은 측쇄를 가지며, 예컨대 Val, Ile 및 Leu이다. 또 다른 구현예에서, 갈락토스 결합 기능을 제거하는 방식으로 결합 부위의 구조에 영향을 미치지 않는 다른 적당한 아미노산이 선택되며, 예컨대 Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asp, Gln, Cys, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp이다. 일 구현예에서, 아미노산은 Pro를 배제한 그룹에서 선택된다.
- [0022] 또한, 전도 기도 세포, 심장 및 간을 표적화하는 wt AAV9와 상이한 표적화 효율을 갖는 돌연변이 AAV9 벡터들이 제공된다. 일 예에서, 이러한 돌연변이 AAV9 벡터는 271, 446 및 470번 위치에서 하나 이상의 아미노산이 알라닌 또는 다른 아미노산으로 개질됨으로써 간 및 심장을 형질도입하는 능력은 보유하면서 기도 상피를 표적화하지 않는다. 일 구현예에서, 야생형 아미노산을 치환하는 아미노산은 작고, 비하전된 측쇄를 가진 아미노산이다. 다른 구현예에서, 아미노산은 메틸기를 가진 작은 측쇄를 가지며, 예컨대 Val, Ile 및 Leu이다. 또 다른 구현예에서, 갈락토스 결합 기능을 제거하는 방식으로 결합 부위의 구조에 영향을 미치지 않는 다른 적당한 아미노산이 선택되며, 예컨대 Arg, His, Lys, Asp, Glu, Ser, Thr, Asp, Gln, Cys, Ala, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Tyr, Trp이다. 일 구현예에서, 아미노산은 Pro를 배제한 그룹에서 선택된다.
- [0023] 일 구현예에서, 본 발명은 야생형(wt) AAV9의 전도 기도를 형질도입하는 본래의 능력은 실질적으로 감소되거나 제거되나, 간이나 심장 형질도입은 wtAAV9와 유사하게 유지되는 돌연변이 AAV9 벡터를 제공한다. 일 구현예에서, 돌연변이 AAV는 470번 위치의 본래 아미노산(Asn)이 치환된 AAV9 캡시드를 갖는다. 일 예에서, 대체제는 알라닌이다. 다른 구현예에서, 돌연변이 AAV는 446번 위치의 본래 아미노산(Tyr)이 치환된 AAV9 캡시드를 갖는다. 일 예에서, 대체제는 알라닌이다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 AAV는 271번 위치의 본래 아미노산(Asp)이 치환된 AAV9 캡시드를 갖는다. 일 예에서, 아미노산은 알라닌으로 치환된다.
- [0024] I. 정의
- [0025] 클레이드(clade F)는 계통발생적으로 AAV9, hu.14/AAV9[GenBank Accession No. AY530579], hu.31[AY530596] 및 hu.32[GenBank Accession No. AY530597]에 관련된 일군의 AAV며, 이는 AAV vp1 아미노산 서열의 정렬에 기초하여, 적어도 75%(적어도 1000개의 복제물에서)의 부트스트랩값 및 0.05 이하의 포아송 보정 거리 측정에 의해 이웃-연결 알고리즘(Neighbor-Joining algorithm)을 사용하여 결정된다. 이웃-연결 알고리즘은 문헌에 상세히 기재되어 있다. 예를 들면, M. Nei and S. Kumar, *Molecular Evolution and Phylogenetics*(Oxford University Press, New York (2000) 참조. 이러한 알고리즘을 시행하기 위해 사용될 수 있는 컴퓨터 프로그램이 이용가능하



다. 예를 들면, MEGA v2.1 프로그램은 개질된 Nei-Gojobori 방법을 시행한다. 이 기술 및 컴퓨터 프로그램 및 AAV vp1 캡시드 단백질의 서열을 사용하여, 당업자는 용이하게 선택된 AAV가 본 명세서에서 확인된 클레이드 중 하나에 함유되는지, 다른 클레이드에 함유되는지, 또는 이들 클레이드 바깥에 있는지 결정할 수 있다.

[0026] 클레이드 F AAV는 자연적으로 출현하는 AAV vp1 캡시드일 수 있다. 그러나, AAV는 자연적으로 출현하는 AAV에 제한되지 않는다. 클레이드는 비-자연적으로 출현하는 AAV를 포함할 수 있으며, 비제한적으로, AAV vp1 아미노산 서열의 정렬을 기초하여, 적어도 75%(적어도 1000개의 복제물에서) 및 0.05 이하의 포아송 보정 거리 측정에 의해 이웃-연결 알고리즘을 사용하여 결정시, 계통발생적으로 관련된 재조합, 개질되거나 변경된, 조작된, 키메라, 하이브리드, 합성, 인공 등의 AAV를 포함한다.

[0027] 다른 구현예에서, 재조합 AAV는 세포 표면 말단  $\beta$ -갈락토스에 결합하는 AAV9의 결합 도메인을 함유하도록 조작된 캡시드를 갖는 클레이드 F AAV가 아닌 다른 클레이드로부터 유래할 수 있다.

[0028] 다른 구현예에서, 본 발명에 사용되는 AAV는 AAV9 vp3 단백질(서열 번호 1의 203 내지 736번 아미노산)과 적어도 95% 동일하고, AAV9 vp2 단백질(서열 번호 1의 약 138 내지 736번 아미노산)과 적어도 95% 동일하며/거나, 전장 AAV9 vp1 캡시드(서열 번호 1의 1 내지 736 또는 2 내지 736번의 아미노산)와 적어도 95% 동일한 캡시드를 포함하는 AAV 벡터이다. 다른 구현예에서, AAV는 야생형 AAV9(서열 번호 1)의 vp1, vp2 및/또는 vp3에 약 96%, 약 97%, 약 98%, 또는 약 99%이며,  $\beta$ -갈락토스에 대한 AAV9 세포 표면 결합 도메인을 포함한다. vp3 도메인은 대부분의 가변 영역을 함유하므로, AAV가 AAV9의 vp1에 대해 95% 동일성을 가지고, AAV9의 vp3에는 더 높은 동일성을 가질 수 있음은 당업자는 이해할 것이다. 일 구현예에서, AAV 벡터를 제조하는데 사용된 AAV는 AAV9 vp1, vp2 및/또는 vp3에 100% 동일한 캡시드를 갖는다. 또 다른 구현예에서, AAV 벡터를 제조하는데 사용된 AAV는 본 명세서에 정의된 하나 이상의 돌연변이를 함유하는 것을 제외하고는 통상의 AAV9 캡시드를 가진다.

[0029] 용어 "실질적으로 상동" 또는 "실질적으로 유사"는 아미노산 또는 그 단편과 관련하여, 적합한 아미노산 삽입 또는 결실을 가지고 다른 아미노산(또는 그 상보 가닥)과 최적으로 정렬되었을 때, 정렬된 서열의 적어도 약 95% 내지 99%의 아미노산 서열 동일성이 있다는 것을 지칭한다. 바람직하게, 상동성은 전장 서열, 또는 그 단백질, 예컨대 캡 단백질, rep 단백질, 또는 적어도 8개의 아미노산 길이, 또는 더욱 바람직하게 적어도 15개의 아미노산 길이인 그 단편에 걸쳐 존재한다. 적합한 단편의 예들이 본 명세서에서 기술된다.

[0030] 용어 "고도로 보존된"은 적어도 80% 동일성, 바람직하게는 적어도 90% 동일성 및 더욱 바람직하게는 97%를 넘는 동일성을 의미한다. 동일성은 당업자에 공지된 알고리즘과 컴퓨터 프로그램의 수단에 의해 당업자에 의해 용이하게 결정된다.

[0031] 일반적으로 두 상이한 아데노-관련 바이러스 사이의 "동일성", "상동성" 또는 "유사성"과 관련하여, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬"된 서열에 관해 결정된다. "정렬"된 서열 또는 "정렬"은 종종 기준 서열과 비교하여 결실 또는 부가 염기 또는 아미노산에 대한 정정(correction)을 포함하는 다수의 핵산서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다. 용어 "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성" 또는 "동일 퍼센트"는 핵산 서열의 맥락에서 최대 상응으로 정렬 시 동일한 두 서열내 잔기를 지칭한다. 서열 동일성 비교 길이는 게놈의 전장에 걸쳐 있을 수 있으며, 유전자 코딩 서열의 전장 또는 적어도 약 500 내지 5000 뉴클레오타이드의 단편이 요망된다. 그러나, 작은 단편간의 동일성, 예컨대 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 통상 적어도 약 20 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드간의 동일성도 또한 요망될 수 있다. 유사하게, "퍼센트 서열 동일성"은 전장 단백질 또는 그 단편에 걸쳐 아미노산 서열에 대해 용이하게 결정될 수 있다. 적합하게 단편은 적어도 약 8개의 아미노산 길이이며, 약 700개의 아미노산까지일 수 있다. 적합한 단편의 예가 본 명세서에 기술된다.

[0032] 정렬은 임의의 다양한 공개되거나 상업적으로 시판되는 다수 서열 정렬 프로그램을 사용하여 수행된다. 그러한 프로그램의 예는 "Clustal W", "CAP Sequence Assembly", "MAP" 및 "MEME"를 포함하며, 이들은 인터넷 상의 웹 서버를 통해 접근될 수 있다. 이러한 프로그램의 다른 공급원은 당업자에 공지되어 있다. 대안적으로 벡터 NTI 유틸리티도 또한 사용된다. 또한 전문한 프로그램에 함유된 것들을 포함하여, 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하는데 사용될 수 있는 당업계에 공지된 수많은 알고리즘이 있다. 다른 예로서, 폴리 뉴클레오타이드 서열이 GCG Version 6.1 프로그램인 Fasta<sup>TM</sup>를 사용하여 비교될 수 있다. Fasta<sup>TM</sup>는 정렬 및 쿼리 및 서치 서열간 최상의 중복 영역의 퍼센트 서열 동일성을 제공한다. 예를 들면, 핵산 서열간 퍼센트 서열 동일성은 본 명세서에 참조로 포함되는 GCG Version 6.1에 제공된 바와 같은 디폴트 파라미터들(단어 크기 6 및 점수 매트릭스에 대한 NOPAM 인자)로 Fasta<sup>TM</sup>를 사용하여 결정될 수 있다. 다수 서열 정렬 프로그램은 또한 아미노산 서열을 위해 이용

될 수 있는데, 예를 들면, "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램이다. 당업자는 필요한대로 이 세팅을 변경할 수 있지만 일반적으로, 임의의 이들 프로그램은 디폴트 세팅에서 사용된다. 대안적으로, 당업자는 적어도 기준 알고리즘 및 프로그램에 의해 제공되는 수준의 동정 또는 정렬을 제공하는 다른 알고리즘 또는 컴퓨터 프로그램을 사용할 수 있다. 예를 들면, JD Thomson *et al*, (1999) Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 참조.

- [0033] 용어 "혈청형(serotype)"은 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV에 대한 구분이다. 혈청학적 구별은 다른 AAV와 비교하여 AAV에 대한 항체간의 교차-반응성 결핍을 기초로 결정된다. 교차-반응성은 통상적으로 중화 항체 어세이에서 측정된다. 이 어세이를 위해 아데노-관련 바이러스를 사용하여 토끼 또는 기타 적합한 동물 모델 내 특정 AAV에 대해 다클론 혈청이 생성된다. 이 어세이에서, 특정 AAV에 대해 생성된 혈청이 이후 동일하거나(동종) 또는 이종 AAV를 중화하는 능력을 검사한다. 50% 중화를 달성하는 희석이 중화 항체 역가로 간주된다. 만약 두 개의 AAV에 대해 이종 역가를 상동 역가로 나누어 얻은 몫이 상호적으로 16보다 적다면 이 두 벡터들은 동일 혈청형으로 간주된다. 역으로, 만약 상동 역가에 대한 이종 역가의 비율이 상호적으로 16 이상이면 두 AAV는 다른 혈청형으로 간주된다.
- [0034] 본 명세서에서, "말단"  $\beta$ -갈락토스는 입체구조적으로 이용가능하거나 그렇지 않다면 AAV9 갈락토스 결합 도메인에 대한 결합에 이용가능하게 노출된 야생형 결합 부위를 갖는 AAV9에 대한 세포 표면 수용체이다.
- [0035] 달리 특정되지 않는 한, 용어 "약"은 숫자의 변경에 사용될 때,  $\pm$  10%의 변동을 의미한다.
- [0036] 본 명세서 및 청구항 전반에서, 용어 "포함하는(comprising)" 및 "포함하는(including)"은 다른 성분, 요소, 정수(integer), 단계 등을 포함하는 것이다. 반면, 용어 "이루어지는(consisting)"과 그의 변형들은 다른 성분, 요소, 정수, 단계 등을 배제하는 것이다.
- [0037] II. 처리 요법
- [0038] 일 양태에서, 본 발명은 AAV9 캡시드를 갖는 아데노-관련 바이러스(AAV) 바이러스 벡터의 표적화 및/또는 세포 흡수 효율을 변경하는 방법을 제공한다. 본 방법은 AAV9-기반 송달 용제에 결합하는  $\beta$ -갈락토스의 이용가능성을 개질하는 조성물을 대상에 송달하는 단계를 포함한다. 일 구현예에서, 원하는 표적 세포 표면은 말단 시알산 잔기 및 전종단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 글리칸을 함유하며, 글리칸은 본 발명에 의해  $\beta$ -갈락토스 잔기를 노출하도록 개질된다.
- [0039] 일 구현예에서, 본 방법은 AAV 바이러스 벡터를 뉴라미니다제(NA)와 조합하여 대상에 송달하는 단계로써, 이에 의해 뉴라미니다제가 세포 표면의 말단 시알산을 절단하고 세포에 의한 AAV 흡수 효율을 증가시키는 단계를 포함한다. 대상은 뉴라미니다제로 전-처리될 수 있다.
- [0040] 전-처리는 AAV9-매개 치료 전에 대상에 처리제(예, 뉴라미니다제)가 송달되는 것을 의미한다. 통상적으로, 이는 AAV9-매개 치료의 투여전에 전-처리를 투여하는 것을 수반한다. 그러나, 임의의 구현예에서, AAV9 벡터에 의해 인코딩된 이식 유전자는 전-처리에 후속하여 활성화되는 조절가능한 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 그러한 구현예에서, AAV9 벡터는 전-처리 투여전, 또는 실질적으로 동시에 투여되나 구성 프로모터를 위한 활성화제의 투여는 전-처리에 후속한다.
- [0041] 뉴라미니다제는 시알리다제로도 알려져 있으며, 절단을 위해 시알산을 특이적으로 표적화하며, 상업적으로 구입하거나 다양한 공급원으로부터 취득할 수 있다. 일 구현예에서, 뉴라미니다제는 엑소-뉴라미니다제이며, 즉, 절단을 위해 내부 시알산이 아닌 말단 시알산을 특이적으로 표적화한다. 일 구현예에서, 엑소-뉴라미니다제는 말단 시알산 잔기의  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 3)-,  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 6)-,  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 8)-글리코사이드 연결의 가수분해에 기능한다. 본 발명에 유용한 뉴라미니다제의 예는 예를 들어, 박테리아 뉴라미니다제, 바이러스 및 포유류 뉴라미니다제를 포함한다. 뉴라미니다제(아실-뉴라미닐 하이드로라제: EC3.2.1.18)는 비제한적으로 아스로박터 유레아파시엔스(*Arthrobacter ureafaciens*), 비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*), 클로스트리듐 퍼프린젠스(*Clostridium perfringens*), 또는 포유류 공급원을 포함하는 그러나 이에 제한되지 않는, 임의의 공급원으로부터, 유래될 수 있다. 일 구현예에서, 뉴라미니다제는 비브리오 콜레라 유래 뉴라미니다제 III형(Sigma)과 같은 박테리아 뉴라미니다제이다. 그러나 다른 뉴라미니다제 유형이 선택될 수 있다. 다른 구현예에서, 바이러스 뉴라미니다제, 예를 들면, 인플루엔자 뉴라미니다제가 선택될 수 있다. 또 다른 구현예에서 포유류 뉴라미니다제가, 예컨대 인간, 설치류, 유인원 또는 다른 포유류 공급원 중에서 선택될 수 있다.
- [0042] 뉴라미니다제는 액체로 제제화되거나 또는 예를 들면, 통상의 약제학적 부형제와 혼합되어, 예를 들면, 뉴라미

니다제가 생분해성 또는 생침식성 매트릭스에 끼워 넣어지거나 혼합되는 것을 포함하여 고체로 제제화될 수 있다. 매트릭스는 시간 방출 매트릭스일 수 있다. 이들 매트릭스는 당업자에 잘 알려져 있다. 뉴라미니다제는 주사 또는 설하 경로로 투여될 수 있다. 일 구현예에서, 용제는 불활성 용기 내에 함유된 수성 용액(예, 완충 식염수를 포함하는 식염수 또는 다른 적합한 액체 담체)이다. 다른 변경으로, 본 조성물은 좌약 형태이다. 액체 형태의 본 조성물은 정맥, 근육내 및 피하 경로, 설하 또는 경비 경로를 포함하는 표준 방법을 통해 투여될 수 있다. 일 구현예에서 담체는 0.9% 염화 나트륨 내 0.1% 내지 0.4% 페놀(USP)이다.

[0043] 뉴라미니다제는 예컨대 약 300U 내지 약 5000U의 뉴라미니다제의 용량으로 투여될 수 있으며, 이는 용량당 약 15mg 내지 250mg의 뉴라미니다제와 동가이다. 대안적으로, 약 0.0001mg 내지 0.01mg 범위와 같은 낮은 용량도 사용될 수 있다. 대안적으로, 이들 두 범위 사이의 함량, 예컨대 0.01mg 내지 약 250mg이 사용될 수 있다.

[0044] 일 구현예에서, 본 발명은 AAV-매개 유전자 송달을 제공하며, 여기에서 AAV9 바이러스 벡터(또는 클레이드 F 또는 AAV9 세포(갈락토스) 결합 도메인을 갖는 벡터) 및 뉴라미니다제는 실질적으로 동시에 대상에 송달된다. 뉴라미니다제는 AAV 벡터와 별개로 제제화되고/되거나 상이한 경로로 그러나 실질적으로 동시에 송달될 수 있다. 대안적으로, AAV 바이러스 벡터는 뉴라미니다제를 더 포함하는 담체 내에서 대상에 송달된다.

[0045] 비록 신체가 뉴라미니다제와 같은 효소를 자연적으로 제거하여 그 효과가 단지 일시적일 것으로 예상되지만, 일 구현예에서, 임의의 오래 지속되는 뉴라미니다제 효과를 증화하기 위해 뉴라미니다제 저해제가 송달될 수 있다. 적합한 뉴라미니다제 저해제는 당업계에 알려져 있으며, 상업적으로 이용가능한 항-바이러스 약물, 예를 들어 오셀타미비르(oseltamivir)(타미플루(tamiflu)), 자나미비르(zanamivir)(리렌자(relenza)), 라니마비르(lanimavir)(이나비르(inavir)) 및 페라미비르(peramivir)를 포함할 수 있다. 오셀타미비르와 같은 전신적 뉴라미니다제 저해제를 위한 통상적인 투여량 요법은 처방된 바와 같이, 경구로 약 75 mg 1일 2회 5일이상이다. 그러나, 본 발명에서의 사용을 위해서, 더 짧은 용량 요법, 예컨대 1~2일 및/또는 더 소량 또는 더 다량의 일일 용량이 바람직할 수 있다. 대안적으로 폐-관련 적용을 위해서는 자나미비르와 같은 흡입 뉴라미니다제 저해제가 바람직할 수 있다. 이 약물에 대한 일반적인 용량은 처방된 바와 같이 흡입으로 10 mg 1일 2회 5일 이상이다. 그러나, 본 발명에서의 사용을 위해서, 더 짧은 용량 요법, 예컨대 1~2일 및/또는 더 소량 또는 더 다량의 일일 용량이 바람직할 수 있다. 대안적으로, 다른 유형의 뉴라미니다제 저해제가 선택될 수 있다.

[0046] 다른 양태에서, AAV9에 대한 수용체(예, 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기를 갖는 세포 표면 글리칸)을 갖는 제1 세포 서브세트 상에서 노출된 세포 표면  $\beta$ -갈락토스 잔기를 기능적으로 제거함으로써 AAV 벡터들은 클레이드 F 수용체를 가진 제1 세포 서브세트로부터 재전송되고, 이로써 AAV는 클레이드 F 수용체를 갖는 대상 내 제2 세포 서브세트에 재표적화되고/되거나 제2 세포 서브세트와 접촉하는 AAV 수가 증가됨으로써 이들 세포에 의한 흡수가 증가된다. 일 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스는 AAV 세포 표면 수용체를 갖는 제1 세포 서브세트 상에서 효소적으로 제거됨으로써 상기 세포 서브세트에 의한 AAV 흡수가 감소 또는 제거되고 AAV9 수용체를 갖는 대상 내 제2 세포 서브세트에 AAV를 재표적화시킨다.

[0047] 일 구현예에서, 제1 세포 서브세트의 표면 상에서 결합 도메인을 기능적으로 차단하는 부분(moiety)이 국소적으로 제1 세포 서브세트에 송달된다. 통상적으로 이 차단 효과는 송달 부위에 가깝게 위치하는 세포에 비교적 국소적으로 잔존한다. 예컨대, 국소 송달은, 예컨대, 흡입, 경비 적하, 관절내 직접 주사 또는 눈으로의 직접 송달뿐만 아니라 당업계 공지된 기타 다양한 방법에 의해 달성될 수 있다.

[0048] 화합물은 갈락토스 분해효소, 렉틴, 또는 기타 차단 부분의 효과를 제거하기 위해 송달될 수 있다. 예컨대, 항- $\beta$ -갈락토스 분해효소가 대상에 송달될 수 있다. 예컨대 GT-2558[US 제4,497,797호] 또는 페닐 에틸-베타-D-티오갈락토피라노사이드[PETG]와 같은 화합물이 사용될 수 있다. 대안적으로 다른 부분이  $\beta$ -갈락토스 분해효소 또는 렉틴의 소실을 촉진하기 위해 송달될 수 있다. 그러나 그 부분(예, 갈락토스 분해효소)이 대상의 신체에 의해 용이하게 제거되는 것이 예상된다.

[0049] 일 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스는 갈락토스 분해효소를 AAV 벡터들과 조합하여 제1 세포 서브세트에 송달함으로써 효소적으로 제거된다. 다양한  $\beta$ -갈락토스 분해효소가 사용될 수 있다. 일 구현예에서, 이소형 1, [GLB1, RefSeq: NM\_000404; UniProt P16278]이 사용될 수 있다. 적합한  $\beta$ -갈락토스 분해효소는 또한 예를 들어, 뉴잉글랜드 바이오랩, 로슈 어플라이드 사이언스 및 시그마 알드리치(*E. Coli* 공급원 유래)로부터 상업적으로 이용가능하다. 이 효소는 뉴라미니다제에 대해 전술된 바와 같이 제제화 및 송달될 수 있다.  $\beta$ -갈락토스 분해효소의 용량은 용량 당 약 0.0001mg 내지 약 250mg, 또는 약 0.001mg 내지 약 100mg의 범위로 사용될 수 있다. 이러한 용량은 필요에 따라 또는 요망되는 대로 조정될 수 있다.  $\beta$ -갈락토스 분해효소는 갈락토스를 절단하고 갈락토스가 절단된 세포에 의한 AAV9 흡수를 상당히 감소시키거나 실질적으로 제거시킴으로써 기능한다. 이러한



방식으로 AAV9 벡터는 세포 표면 갈락토스를 보유하는 다른 세포로 재전송된다.

[0050] 다른 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스 잔기, 특히 말단  $\beta$ -갈락토스 잔기에 결합하는 렉틴이 본 명세서에 기술된 AAV 벡터와 조합되어 대상에 송달된다. 유용한 렉틴들 중 갈슘-의존성(C형) 렉틴, 예를 들어 인간 청소제 수용체 C형 렉틴(SRCL) 및 인간 대식세포 갈슘-의존성(C형) 렉틴을 들 수 있다. 다른 유용한 렉틴은 에리스리나 크리스타갈리(*Erythrina Cristagalli*) 렉틴(ECL) 및 대식세포 갈락토스 렉틴(MGL)을 포함한다. 또 다른 렉틴은 렉틴 땅콩 아글루티닌 또는 맥아 아글루티닌을 포함할 수 있다. 다수의 이들 렉틴이 문헌에 기술되어 있고/있거나 상업적 공급원(예, 벡터랩)으로부터 취득될 수 있다. 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 렉틴은 적합한 액체 담체 내에 제제화될 수 있으며, 200 내지 10,000 $\mu$ g/ml의 범위로 포함되며, 예컨대 200 내지 5000 $\mu$ g/ml, 예를 들어, 200 내지 3000 $\mu$ g/ml, 예를 들어, 200 내지 2000 $\mu$ g/ml, 예를 들어, 200 내지 1500 $\mu$ g/ml의 범위의 렉틴이 포함될 수 있다.

[0051] 또 다른 구현예에서, 항-말단 갈락토스 항체가 대상에 송달될 수 있다.

[0052] 본 명세서에 기술된 것과 같은 AAV9-기반 벡터들 및 기타 AAV 벡터들의 제법이 공지되어 있다. 예를 들어, 본 발명에 참조로 포함된 US 공개 특허 출원 제2007/0036760호(2007년 2월 15)를 참조한다. 본 발명은 AAV9 또는 다른 클레이드 F AAV 아미노산 서열의 용도에 한정되지 않고, 예컨대 화학적 합성, 다른 합성 기술, 또는 다른 방법을 포함하는 당업계에 공지된 다른 방법에 의해 생성된 말단  $\beta$ -갈락토스 결합을 함유하는 펩타이드 및/또는 단백질을 포함한다. 본 명세서에 제공된 임의의 AAV 캡시드 서열은 다양한 기술을 사용하여 용이하게 생성될 수 있다. 적합한 제조 기술은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들면, Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press(Cold Spring Harbor, NY)를 참조한다. 대안적으로 펩타이드는 잘 알려진 고체상 펩타이드 합성법(Merrifield, (1962) J. Am. Chem. Soc., 85:2149; Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis(Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62)에 의해서도 합성될 수 있다. 이들 또는 다른 적합한 제조 방법은 당업자의 지식범위 내에 있으며 본 발명을 제한하는 것이 아니다.

[0053] 본 명세서에 기술된 것(예,  $\beta$ -갈락토스에 대한 세포 결합 도메인을 갖는 AAV)과 같은 재조합 아데노-관련 바이러스(AAV)를 생성하는 방법은 알려져 있다. 이러한 방법은 AAV 캡시드를 인코딩하는 핵산 서열; 기능성 rep 유전자; 최소한 AAV 반전 말단 반복부(ITR) 및 이식 유전자로 이루어진 미니유전자; 및 AAV 캡시드 단백질 내로 이 미니 유전자의 패키징을 허용하는 충분한 헬퍼 기능자들을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 포함한다.

[0054] AAV 미니유전자를 AAV 캡시드 내에 패키징하기 위해 숙주 세포내에서 배양될 필요가 있는 성분들은 숙주 세포에 트랜스로 제공될 수 있다. 대안적으로, 임의의 하나 이상의 필요 성분(예, 미니유전자, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능자)는 당업자에 알려진 방법을 사용하여 하나 이상의 필요한 성분을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는 그러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 조절하에 필요 성분(들)을 함유할 것이다. 그러나, 필요 성분(들)은 항시성 프로모터의 조절하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 항시성 프로모터의 예가 이식 유전자와 함께 사용되기 적합한 조절 요소의 논의에서 본 명세서에 제공된다. 또 다른 대체에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 항시성 프로모터하에 선택되는 성분(들) 및 기타 하나 이상의 유도성 프로모터의 조절하에 선택되는 성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들면, 293 세포(항시성 프로모터의 조절하에 E1 헬퍼 기능자 함유)에서 유래되거나 유도성 프로모터의 조절하에 rep 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 또 다른 안정한 숙주 세포가 당업자에 의해 생성될 수 있다.

[0055] 본 발명의 rAAV을 제조하기 위해 요구되는 미니유전자, rep 서열, cap 서열 및 헬퍼 기능자는 그 안에 운반되는 서열을 전달하는 임의의 유전 요소의 형태로 숙주 세포의 패키징에 송달될 수 있다. 이 선택된 유전 요소는 본 명세서에 기술된 방법들을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 송달될 수 있다. 본 발명의 임의의 구현예를 구축하기 위해 사용되는 본 방법은 핵산 조작 분야의 당업자에 알려져 있으며 유전 공학, 재조합 공학 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어 Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY를 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온(virion)을 생성하는 방법도 잘 알려져 있으며, 적합한 방법의 선택은 본 발명의 제한이 아니다. 예를 들어 K. Fisher et al, (1993) J. Virol., 70:520-532 및 US 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0056] 달리 명시되지 않는 한, AAV ITR, 및 본 명세서에 기술된 다른 선택되는 AAV 성분들은 임의의 AAV 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 이들 ITR 또는 기타 AAV 성분들은 당업자에 이용될 수 있는 기술에 의해 AAV 서열로부터 용이하게 분리될 수 있다. 이러한 AAV는 분리되거나, 학술적, 상업적 또는 공적 공급원(예, 아메리칸 타입 컬처 컬렉션, Manassas, VA)으로부터 취득될 수 있다. 대안적으로 AAV 서열은, 문헌 또는 예를 들어 GenBank® PubMed

® 등과 같은 데이터베이스에서 입수될 수 있는 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 기타 적합한 수단을 통해 수득할 수 있다.

[0057] A. 미니유전자

[0058] 미니유전자는 최소한 이식 유전자 및 그 조절 서열, 및 5' 및 3' AAV 반전 말단 반복부(ITR)로 구성된다. 일 구현예에서, AAV 혈청형 2의 ITR이 사용된다. 그러나, 다른 적합한 공급원 유래의 ITR도 선택될 수 있다. 캡시드 단백질 내로 패키징되고 선택된 숙주 세포 내로 송달되는 것은 이 미니유전자이다.

[0059] 1. 이식 유전자

[0060] 이식 유전자는 그 측면에 배치된 벡터 서열에 이중인 핵산서열로서, 이식 유전자는 관심 폴리펩티드, 단백질 또는 기타 산물을 인코딩한다. 이 핵산 코딩서열은 이식 유전자 전사, 번역 및/또는 숙주 세포내 발현을 허용하는 방식으로 조절 성분에 작동가능하게 연결된다.

[0061] 이식 유전자 서열의 조성물은 생성되는 벡터가 사용될 용도에 의존한다. 예를 들어, 이식 유전자 서열의 일 유형은 발현 시 검출가능한 신호를 생성하는 리포터 서열을 포함한다. 이 코딩 서열은 그 발현을 구동하는 조절 요소와 함께, 효소적, 방사능적, 비색적, 형광 또는 다른 분광학적 어세이, 형광 활성 세포 분류 어세이 및 효소 결합 면역 흡착 어세이(ELISA), 방사성면역어세이(RIA) 및 면역조직화학적염색을 포함하는 면역학적 어세이를 포함하는 통상적인 수단에 의해 검출가능한 신호를 제공한다. 그러나, 바람직하게 이식 유전자는 단백질, 펩티드, RNA, 효소, 우성 음성 돌연변이(dominant negative mutation), 또는 촉매 RNA와 같은 생물학 및 의학에 유용한 산물을 인코딩하는 비-마커 서열이다. 바람직한 RNA 분자는 tRNA, dsRNA, 리보솜 RNA, 촉매 RNA, siRNA, 작은 헤어핀 RNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 및 안티센스 RNA를 포함한다. 유용한 RNA 서열의 일 예는 치료되는 대상 내 표적 핵산 서열의 발현을 저해하거나 소멸시키는 서열이다. 통상적으로 적합한 표적 서열은 암 표적 및 바이러스 질병을 포함한다. 예컨대, 이러한 표적의 예로 암 표적 및 하기 면역원과 관련한 섹션에서 확인된 바이러스를 참조한다.

[0062] 이식 유전자는 유전자 결함을 정정하거나 경감하기 위해 사용될 수 있으며, 이 결함은 정상 유전자가 정상 수준 이하로 발현되거나 기능성 유전자 산물이 발현되지 않는 결함들을 포함할 수 있다. 대안적으로 이식 유전자는 세포유형 또는 숙주내에 본래 발현되지 않는 산물을 세포에 제공할 수 있다. 바람직한 유형의 이식 유전자 서열은 숙주 세포에 발현되는 단백질 또는 폴리펩티드 치료제를 인코딩한다. 본 발명은 다수의 이식 유전자 사용을 더 포함한다. 특정 상황에서, 단백질의 각 서브유닛을 인코딩하거나 또는 상이한 펩티드 또는 단백질을 인코딩하기 위해 상이한 이식 유전자가 사용될 수 있다. 이는 예컨대 면역 글로불린, 혈소판-유래 성장 인자 또는 디스트로핀 단백질에 대한 것과 같이 단백질 서브유닛을 인코딩하는 DNA 크기가 큰 경우, 바람직하다. 세포가 다수-서브유닛 단백질을 생산하기 위해서, 세포는 각 상이한 서브유닛을 함유하는 재조합 바이러스로 감염된다. 대안적으로 단백질의 상이한 서브유닛이 동일한 이식 유전자에 의해 인코딩될 수 있다. 이 경우, 단일 이식 유전자가 각 서브유닛을 인코딩하는 DNA를 포함하며, 각 서브유닛에 대한 DNA는 내부 리보자임 엔트리 부위(IRES)에 의해 분리된다. 이는 각 서브유닛을 인코딩하는 DNA 크기가 작을 때, 예컨대 서브유닛을 인코딩하는 DNA와 IRES 전체 크기가 5 킬로베이스 미만인 경우 바람직하다. IRES 대신, DNA는 번역후 이벤트에서 자가-절단하는 2A 펩티드를 인코딩하는 서열로 단리될 수 있다. 예를 들면, ML Donnelly, et al., (Jan 1997) J. Gen. Virol., 78(Pt 1):13-21; S. Furler, S et al., (June 2001) Gene Ther., 8(11):864-873; H. Klump, et al., (May 2001) Gene Ther., 8(10):811-817을 참조한다. 이 2A 펩티드는 IRES에 비해 상당히 작아 간격이 제한 인자인 경우 사용되기에 매우 적합하다. 종종, 이식 유전자가 크고, 다수-서브유닛으로 이루어져 있거나 두개의 이식 유전자가 함께 송달되는 경우, 원하는 이식 유전자(들) 또는 서브유닛을 운반하는 rAAV가 공동 투여되어, 이들이 생체내에서 연쇄체화(concatamerization)되어 단일 벡터 계통을 형성하도록 할 수 있다. 이러한 구현예에서, 제1 AAV는 단일 이식 유전자를 발현하는 발현 카세트를 운반하고, 제2 AAV는 숙주 세포 내에서 공동-발현되기 위한 상이한 이식 유전자를 발현하는 발현 카세트를 운반할 수 있다. 그러나, 선택된 이식 유전자는 임의의 생물학적으로 활성인 산물 또는 기타 산물, 예를 들면, 연구에 바람직한 산물을 인코딩할 수 있다.

[0063] 적합한 이식 유전자는 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 이식 유전자의 선택은 본 발명의 제한으로 간주되지 않는다.

[0064] 2. 조절요소(Regulatory Elements)

[0065] 미니유전자에 대해 전술한 주 요소 이외에, 벡터는 또한 본 발명에 의해 생산된 바이러스로 감염되거나 플라스미드 벡터에 의해 세포 감염된 세포에서 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 이식 유전자에 작동가능

하게 연결된 통상의 조절 요소들을 포함할 수 있다. 본 명세서에서, "작동가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자에 인접하는 발현 조절 서열 및 관심서열을 조절하기 위해 먼 거리에서 또는 트랜스로 작용하는 발현 조절 서열 모두를 포함한다.

[0066] 발현 조절 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호 같은 효율적인 RNA 프로세싱 신호; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증강하는 서열(예, 코작 공통 서열(Kozak consensus sequence)); 단백질 안정성을 증강하는 서열; 및 요망되는 경우, 인코딩된 산물의 분비를 증강하는 서열을 포함한다. 본래의, 항시성, 유도성 및/또는 조직-특이적 프로모터들을 포함하여, 다수의 발현 조절 서열들이 당업계에 공지되어 있으며 사용될 수 있다.

[0067] 항시성 프로모터의 예는, 비제한적으로, (선택적으로 RSV 인핸서와 함께) 레트로바이러스 로우스 사코마 바이러스(retroviral Rous sarcoma virus, RSV) LTR 프로모터, (선택적으로 CMV 인핸서와 함께) 시토메갈로바이러스(cytomegalovirus, CMV) 프로모터[예를 들면 Boshart et al., (1985) 세포, 41:521-530 참조], SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터,  $\beta$ -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나아제(PGK) 프로모터 및 EF1 프로모터[Invitrogen]를 포함한다. 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 허용하며, 외인적으로 공급된 화합물, 온도와 같은 환경적 요인 또는 예컨대 급성 주기, 세포의 특정 분화상태 또는 오직 복제되고 있는 세포 내와 같은 특정 생리학적 상태에 의해 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은, 제한 없이, 인비트로젠, 클론테크 및 아리아드를 포함하는 다양한 상업적 공급원으로부터 이용가능하다. 많은 다른 시스템이 기술되어 있으며, 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인적으로 공급된 화합물에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터, 텍사메타손(Dex)-유도 마우스 유선암 바이러스(MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템[국제특허공개 제WO 98/10088호]; 엑디손 곤충 프로모터[No et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351], 테트라사이클린-억제성 시스템[Gossen et al., (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551], 테트라사이클린-유도성 시스템[Gossen et al., (1995) Science, 268:1766-1769, 또한, Harvey et al., (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., 2:512-518 참조], RU486-유도성 시스템[Wang et al., (1997) Nat. Biotech., 15:239-243 and Wang et al., (1997) Gene Ther., 4:432-441] 및 라파마이신-유도성 시스템[Magari et al., (1997) J. Clin. Invest., 100:2865-2872]을 포함한다. 본 맥락에서 유용할 수 있는 다른 유형의 유도성 프로모터는 특정 생리적 상태, 예컨대, 온도, 급성 주기, 세포의 특정 분화상태에 의해 조절되거나 또는 복제되고 있는 세포 내에서만 조절되는 것들이다.

[0068] 다른 구현예에서, 이식 유전자를 위한 본래의 프로모터가 사용될 것이다. 본래의 프로모터는 이식 유전자의 발현이 본래의 발현을 모방하는 것이 요망되는 경우 바람직할 것이다. 본래의 프로모터는 이식 유전자의 발현이 일시적으로 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 하는 경우에 사용될 수 있다. 추가적 구현예에서, 다른 본래의 발현 조절 요소, 예컨대 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 코작 공통 서열도 본래의 발현을 모방하기 위해 사용될 수 있다.

[0069] 이식 유전자의 다른 구현예는 조직-특이적 프로모터에 작동가능하게 연결된 유전자를 포함한다. 예를 들면, 골격근내 발현이 요망될 때, 근육에서 활성인 프로모터가 사용되어야 한다. 이들은 골격  $\beta$ -액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나아제를 인코딩하는 유전자 유래 프로모터뿐만 아니라 자연적으로 존재하는 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다(Li et al., (1999) Nat. Biotech., 17:241-245 참조). 조직-특이적인 프로모터의 예는 특히 간 (알부민, Miyatake et al., (1997) J. Virol., 71:5124-32; B형 간염 바이러스 코어 프로모터, Sandig et al., (1996) Gene Ther., 3:1002-9; 알파-페토프로테인 (AFP), Arbutnot et al., (1996) Hum. Gene Ther., 7:1503-14), 뼈 오스테오칼신 (Stein et al., (1997) Mol. Biol. Rep., 24:185-96); 뼈 시알로프로테인 (Chen et al., (1996) J. Bone Miner. Res., 11:654-64), 림프사이트 (CD2, Hansal et al., (1998) J. Immunol., 161:1063-8; immunoglobulin heavy chain; T cell receptor chain), 신경-특이적 에놀라제(NSE)와 같은 신경 프로모터 (Andersen et al., (1993) Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15), 신경 필라멘트 경쇄 유전자 (Piccioli et al., (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5), 및 신경-특이적 vgf 유전자 (Piccioli et al., (1995) Neuron, 15:373-84)에 대해 알려져 있다.

[0070] 이식 유전자, 프로모터/인핸서, 및 5' 및 3' AAV ITR의 조합은 본 명세서에서 편의상 "미니유전자"로 지칭된다. 본 발명의 교시로 이러한 미니유전자의 디자인은 통상적인 기술 수단 의해 만들어질 수 있다.

[0071] 3. 숙주 세포 패키징으로 미니유전자의 송달

[0072] 미니유전자는 숙주 세포로 송달되는 임의의 적합한 벡터, 예를 들어 플라스미드 상에서 운반될 수 있다. 본 발명에서 유용한 플라스미드는 선택적으로 원핵 세포, 포유류 세포 또는 이들 모두에서 복제 및 통합



(integration)에 적당하도록 조작될 수 있다. 플라스미드(또는 5' AAV ITR-이중 분자-3' AAV ITR을 운반하는 다른 벡터들)는 진핵 및/또는 원핵 생물에서 미니유전자 및 이들 시스템을 위한 선택 마커의 복제를 허용하는 서열을 함유한다. 선택가능한 마커 또는 리포터 유전자는 특히 제네틴신, 히그로마이신 또는 푸리마이신 저항성을 인코딩하는 서열을 포함할 수 있다. 플라스미드는 또한 암피실린 저항성과 같이 박테리아 세포 내에서 벡터 존재를 신호화하는데 사용될 수 있는 특정 선택가능한 리포터 또는 마커 유전자를 포함할 수 있다. 플라스미드의 다른 성분은 복제 오리진(origin) 및 앰플리콘(amplicon), 예컨대 엡스테인 바 바이러스(Epstein Barr virus) 핵 항원을 채용하는 앰플리콘 시스템을 포함할 수 있다. 이 앰플리콘 시스템 또는 다른 유사한 앰플리콘 성분은 세포에서 고 카피 에피솜 복제를 허용한다. 바람직하게는, 미니유전자를 운반하는 분자가 세포 내로 세포감염되며, 거기에서 일시적으로 존재할 수 있다. 대안적으로 (5' AAV ITR-이중 분자-3' AAV ITR을 운반하는) 미니유전자는 염색체로 또는 에피솜으로서 숙주 세포의 게놈 내로 안정하게 통합될 수 있다. 특정 구현예에서, 미니유전자는 다수 카피로, 선택적으로 머리-대-머리, 머리-대-꼬리 또는 꼬리-대-꼬리 연쇄체로 존재할 수 있다. 적합한 세포감염 기술은 공지되어 있고, 숙주 세포에 미니유전자를 송달하는데 용이하게 사용될 수 있다.

[0073] 일반적으로, 미니유전자를 포함하는 벡터를 세포감염으로 송달할 때, 벡터는 약  $1 \times 10^4$  세포 내지 약  $1 \times 10^{13}$  세포, 또는 약  $1 \times 10^5$  세포에 대해 약  $5\mu\text{g}$  내지 약  $100\mu\text{g}$  DNA, 약  $10\mu\text{g}$  내지 약  $50\mu\text{g}$  DNA의 함량으로 전달된다. 그러나 숙주 세포에 대한 벡터 DNA의 상대적 함량은, 선택된 벡터, 송달 방법 및 선택된 숙주 세포와 같은 인자들을 고려하여 조정될 수 있다.

[0074] B. 숙주 세포 패키징

[0075] 미니유전자 이외에, 숙주 세포는 숙주세포 내에서 본 발명의 신규한 AAV 캡시드 단백질(또는 그 단편을 포함하는 캡시드 단백질)의 발현을 구동하는 서열 및 미니유전자에서 발견되는 AAV ITR의 공급원과 동일한 공급원 또는 상호-보완 공급원의 rep 서열을 함유한다. 숙주 세포 패키징은 또한 본 발명의 rAAV를 패키징하기 위해 헬퍼 기능자를 필요로 한다. 이러한 헬퍼 기능자는 당업계에 잘 알려져 있으며, 본 명세서에서 중복설명하지 않는다. 유사하게, AAV 캡시드를 갖는 적합한 벡터들을 제조하는 방법이 공지되어 있다[예를 들면, 미국 공개 특허 출원 제US 제2007/0036760호 참조].

[0076] 따라서, 본 발명은 본 발명의 신규한 AAV의 핵산 및 아미노산 서열을 사용하여 생성된 벡터들을 더 제공한다. 이러한 벡터들은 치료적 분자의 송달 또는 백신 요법에 사용되기 위한 것을 포함하는 다양한 목적을 위해 유용하다. 특히 치료적 분자의 송달을 위해 요망되는 것은 본 발명의 신규한 AAV의 캡시드를 함유하는 재조합 AAV이다. 본 발명의 신규한 AAV 서열을 함유하는 이들 또는 다른 벡터 구축체는 백신요법, 예를 들면, 사이토카인의 공동-송달 또는 면역원 그 자체의 송달을 위해 사용될 수 있다.

[0077] 따라서 공지된 기술로 당업자는 AAV 클레이드 F 캡시드, AAV9 캡시드 및/또는 AAV9  $\beta$ -갈락토스 결합 도메인을 포함하는 AAV 캡시드를 갖는 벡터를 갖는 rAAV를 생성할 수 있다. 일 구현예에서, 단일 AAV 유래의 전장 캡시드, 예를 들면 hu.14/AAV9[서열 번호 1]가 사용될 수 있다. 다른 구현예에서, 다른 선택된 AAV 또는 동일 AAV의 이중(즉, 비-인접하는) 부분에서 온 서열과 프레임 내에서 융합된 하나 이상의 AAV9 캡시드 단편(예, AAV9  $\beta$ -갈락토스 결합 도메인을 함유하는 단편)을 함유하는 전장 캡시드가 생성될 수 있다. 또 다른 구현예에서, 돌연변이 AAV9 캡시드를 갖는 벡터 또는 AAV9 갈락토스 결합 도메인을 함유하도록 조작된 AAV는 유사한 기술을 사용하여 조립된다.

[0078] 전술한 재조합 벡터들은 공개된 방법에 따라 숙주 세포에 송달될 수 있다. 바람직하게는, 생리학적으로 적합한 담체 내에 현탁된 rAAV는 인간 또는 비인간 포유류 환자에 투여될 수 있다. 적합한 담체는 전달 바이러스가 지시된 적응증을 고려하여 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들면, 하나의 적합한 담체는 식염수를 포함하며, 이는 다양한 완충액(예, 인산 완충식염수)으로 제제화될 수 있다. 다른 예시적 담체는 멸균 식염수, 락토스, 수크로스, 칼슘 포스페이트, 젤라틴, 텍스트란, 아가, 펙틴, 땅콩유, 참기름 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 발명의 제한이 아니다.

[0079] 선택적으로, 본 발명의 본 조성물은 rAAV 및 담체(들) 이외에, 보존제 또는 화학적 안정제와 같은 다른 통상의 약제학적 성분들을 함유할 수 있다. 적합한 예시적 보존제는 클로로부탄올, 포타슘 소르베이트, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학적 안정제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0080] 벡터들은 세포를 세포감염시키고, 과도한 부작용없이, 또는 의학분야의 당업자에 의해 결정될 수 있는 의학적으로 허용가능한 생리학적 효과와 함께 치료적 혜택을 제공하기 위해, 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공

하기에 충분한 함량으로 투여된다. 통상적이고 약학적으로 허용가능한 투여 경로는, 비제한적으로, 원하는 기관(예, 폐, 심장, 또는 뇌)에의 직접 송달, 경구, 흡입, 경비, 기관지내, 동맥내, 안구내, 정맥내, 근육내, 피하, 진피내, 및 다른 비경구 투여경로를 포함한다. 필요한 경우 투여경로는 조합될 수 있다.

[0081] 바이러스 벡터의 용량은 치료될 병태, 환자의 나이, 체중 및 건강과 같은 요인에 일차적으로 의존하고, 따라서 환자 간에 다양할 수 있다. 예를 들면, 바이러스 벡터의 치료학적으로 효과적인 인간 용량은 일반적으로 약  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{16}$  농도의 게놈 바이러스 벡터를 함유하는 용액 약 0.1mL 내지 약 100mL의 범위이다. 대기관(예, 폐, 골격근, 심장 또는 폐), 또는 중추신경계(예, 뇌)로의 송달을 위한 바람직한 인간 용량은 약 1 내지 100mL의 부피에서 1 kg 당 약  $5 \times 10^{10}$  내지  $5 \times 10^{13}$  AAV 게놈일 수 있다. 눈(예, 망막)으로의 송달을 위한 바람직한 용량은 약 0.1mL 내지 1mL의 부피에서 약  $5 \times 10^9$  내지  $5 \times 10^{12}$  게놈 카피이다. 용량은 임의의 부작용에 대한 치료학적 혜택이 균형을 이루도록 조절될 수 있으며, 이러한 용량은 재조합 벡터가 채용되는 치료적 응용에 의존하여 다양할 수 있다. 바이러스 벡터들, 바람직하게 미니유전자를 함유하는 AAV 벡터들을 야기하는 용량 빈도를 결정하기 위해 이식 유전자의 발현 수준이 모니터링될 수 있다.

[0082] AAV9-기반 벡터들에 대한 예에서 나타낸 바와 같이 세포 형질도입은 말단 SA가 효소적으로 제거되었을 때 증가하였으며, 이는 SA에 대해 가장 공통적으로 관찰된 전중단 모노사카라이드인 갈락토스가 AAV9 형질도입을 매개함을 제안한다. 이는 통상적인 도입 모드인 말단 시알산(SA)을 갖는 글리칸에 의해 흡수되는 수많은 다른 AAV 혈청형과 대비된다. 말단 SA에 의한 AAV9-기반 벡터들의 흡수는 당단백질 생물 발생 및 텍틴 간섭 연구에 관련된 효소가 결핍된 세포들에서 확인되었다. 말단 갈락토스를 갖는 글리칸에 대한 AAV9 결합은 글리칸 결합 어세이에서 증명되었다. 폐-지향 유전자 전달을 위한 이 경로의 관련성은 AAV9 벡터를 뉴라미니다제와 함께 마우스 폐로 공동-주입함으로써 입증되었으며, 이는 전도 기도 상피세포의 정단 표면에서의 말단 갈락토스의 노출 및 낭포성 섬유증에 대한 유전자 치료의 관련 표적인 이들 세포의 벡터-매개 형질도입의 실질적 증가를 초래하였다.

[0083] 본 발명의 AAV-함유 벡터들에 의해 송달되기 위한 치료적 산물 및 면역성 산물의 예가 하기에 제공된다. 이들 벡터들은 본 명세서에 기술된 바와 같은 다양한 요법에 사용될 수 있다. 부가적으로 이들 벡터들은 원하는 요법에서 하나 이상의 다른 벡터들 또는 활성 성분들과 조합하여 송달될 수 있다.

[0084] 예를 들면, 적합한 이식 유전자는 전도 기도 상피 세포를 포함하는 폐로 우선적으로 표적화되는 것들을 포함할 수 있다. 이러한 이식 유전자는 낭포성 섬유증 치료에 유용한 것들, 예컨대 하나 이상의 미니-CFTR 유전자[L. Zhang *et al.*, (Aug 18 1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95(17):10158-63]를 포함하는 **낭포성 섬유증** 경막 전도도 조절자(CFTR) 유전자를 포함할 수 있다. 유사하게, COPD 및 다른 폐 질환 치료에 유용한 예컨대 항-염증성 사이토카인 또는 다른 분자를 포함하는 다른 폐 병태의 치료를 위한 유전자가 사용될 수 있다.

[0085] 다른 예에서, 망막 및/또는 눈의 질환을 치료하는데 유용한 이식 유전자는 보다 일반적으로 예컨대, (레베르션 천흑암시(LCA) 치료를 위한) 망막 색소 상피-특이적 65kDa 단백질(RPE65), (예, 황반변성 및 당뇨망막병 치료를 위한) *bPDE* 및 *AIPL1* 색소 상피-유래 인자(PEDF), (예, 습성 연령-관련 황반변성(AMD)치료를 위한) 예컨대, 항-혈관 내피 성장인자(VEGF)를 포함하는 항-혈관형성인자 뿐만 아니라 색소성 망막염 및 LCA, 및 추체간체이영양과 관련된 기타 유전자와 같은 선택된 것들을 포함할 수 있다.

[0086] 또 다른 예에서, 예컨대, 류마티스성 관절염과 같은 관절 질환의 치료에 유용한 이식 유전자가 선택될 수 있다. 이러한 이식 유전자는 예를 들어, 암피사인자(TNF) 알파 또는 인터루킨 1(IL-1) 차단제, 예컨대, 항-TNF 알파 단일클론 항체, 용해성 TNF 알파 수용체, IL-1의 용해성 수용체 II형, IL-1 수용체 길항제(IL-1Ra), 항-염증성 사이토카인(예, IL-4, IL-10, IL1)일 수 있다. 이러한 길항제는 예를 들어 항체 또는 Fab, 또는 이들의 기능성 단편 또는 기타 부분일 수 있다.

[0087] 또 다른 유전자는 특히, 예를 들어 파킨슨병, 알츠하이머 질환 및 축적 장애를 포함하는 중추신경계와 관련된 다양한 병태; 선천적 심장 질환에 관련된 치료적 유전자(예, SERCA2a, 안지오프이오텐-1(Ang1) 및 Ang2); 전신적 리소좀성 축적 장애에 관련된 유전자; 및 근육 쇠약 장애(예, 디스트로핀, 미니-디스트로핀)의 치료에 유용한 것들을 포함할 수 있다.

[0088] 이식 유전자에 의해 인코딩되는 또 다른 유용한 치료적 산물은 원하는 적응증을 위해 선택될 수 있다. 이러한 이식 유전자는 비제한적으로, 인슐린, 글루카곤, 성장 호르몬(GH), 부갑상선 호르몬(PTH), 성장 호르몬 방출 인자(GRF), 난포자극 호르몬(FSH), 황체 호르몬(LH), 인간 융모생식선자극호르몬(hCG), 혈관내피성장인자(VEGF),

안지오프로이테틴, 안지오프로테틴, 과립구집락자극인자(GCSF), 에리스로포이테틴(EPO), 결합조직 성장인자(CTGF), 염기성 섬유모세포 성장 인자(bFGF), 산성 섬유모세포 성장 인자(aFGF), 표피 성장 인자(EGF), 혈소판-유래 성장 인자(PDGF), 인슐린 성장 인자 I 및 II(IGF-I 및 IGF-II), TGF  $\alpha$ , 액티빈, 인히빈을 포함하는 전환성장인자  $\alpha$  슈퍼패밀리 중 임의의 하나, 또는 뼈 형태형성 단백질(BMP) BMP 1 내지 15 중 임의의 하나, 성장인자의 헤레굴린/뉴레굴린/ARIA/neu 분화 인자(NDF) 패밀리 중 임의의 하나, 신경 성장 인자(NGF), 뇌-유래 신경영양 인자(BDNF), 뉴로트로핀 NT-3 및 NT-4/5, 섬모 신경영양 인자(CNTF), 아교 세포주 유래 신경영양 인자(GDNF), 뉴투린, 아그린, 세마포린/콜라핀 패밀리 중 임의의 하나, 네트린-1 및 네트린-2, 간세포 성장 인자(HGF), 에프린, 노진, 소닉 헤드게호그 및 티로신 하이드록실라제를 포함하는 호르몬, 성장 및 분화인자를 포함한다.

[0089] 다른 유용한 이식 유전자 산물은, 비제한적으로, 트롬보포이테틴(TPO), (예컨대, IL-2, IL-4, IL-12 및 IL-18을 포함하는) 인터루킨(IL) IL-1 내지 IL-25, 단백질 화학주성 단백질, 백혈병 저해 인자, 과립구-대식세포 집락 자극 인자, Fas 리간드, 암 괴사 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 인터페론  $\alpha$ ,  $\beta$ , 및  $\gamma$  줄기세포 인자, flk-2/flt3 리간드와 같은 사이토카인 및 림포카인을 포함하는 면역 시스템을 조절하는 단백질을 포함한다. 면역 시스템에 의해 생성되는 유전자 산물 또한 본 발명에 유용하다. 이들은, 비제한적으로, 면역글로불린 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE, 키메라 면역글로불린, 인간화 항체, 단쇄 항체, T 세포 수용체, 키메라 T 세포 수용체, 단쇄 T 세포 수용체, 클래스 I 및 클래스 II MHC 분자뿐만 아니라 조작된 면역글로불린 및 MHC 분자를 포함한다. 유용한 유전자 산물은 또한 보체 조절 단백질, 막 보조인자 단백질(MCP), 붕괴촉진 인자(DAF), CR1, CF2 및 CD59과 같은 보체 조절 단백질들을 포함한다.

[0090] 또 다른 유용한 유전자 산물은 호르몬, 성장인자, 사이토카인, 림포카인, 조절 단백질 및 면역 시스템 단백질을 위한 수용체 중 임의의 하나를 포함한다. 본 발명은 저밀도 지질단백질(LDL) 수용체, 고밀도 지질단백질(HDL) 수용체, 초저밀도 지질단백질(VLDL) 수용체, 및 청소제 수용체를 포함하는 콜레스테롤 조절 및/또는 지질 가감을 위한 수용체를 포함한다. 본 발명은 또한 글루코코르티코이드 수용체 및 에스트로젠 수용체를 포함하는 스테로이드 호르몬 수용체 슈퍼패밀리의 멤버, 비타민 D 수용체 및 기타 핵 수용체와 같은 유전자 산물을 포함한다. 또한, 유용한 유전자 산물은 전사 인자들 예컨대 jun, fos, max, mad, 혈청 반응 인자(SRF), AP-1, AP2, myb, MyoD 및 미오제닌, ETS-box 함유 단백질, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, CCAAT-box 결합 단백질, 인터페론 조절 인자(IRF-1), 윌름즈 종양 단백질, ETS-결합 단백질, STAT, GATA-box 결합 단백질(예, GATA-3), 및 익상 헬릭스 단백질들의 포크헤드 패밀리 등을 포함한다.

[0091] 다른 유용한 유전자 산물은 카바모일 신테타제 I, 오르니틴 트랜스카바밀라제, 아르기노숙시네이트 신테타제, 아르기노숙시네이트 리아제, 아르기나제, 푸마릴아세트아세테이트 하이드로라제, 페닐알라닌 하이드록실라제, 알파-1 안티트립신, 글루코스-6-포스파타제, 포르포빌리노젠 데아미나제, 시스타티온 베타-신타제, 분지쇄 케토산 데카복실라제, 알부민, 이소발레틸-coA 데하이드로게나제, 프로피오닐 CoA 카복실라제, 메틸 말로닐 CoA 유타제, 글루타릴 CoA 데하이드로게나제, 인슐린, 베타-글리코시다제, 피루베이트 카복실레이트, 간 포스포릴라제, 포스포릴라제 키나제, 글리신 데카복실라제, H-단백질, T-단백질, 낭포성 섬유증 경막 조절자(CFTR) 서열, 및 디스트로핀 유전자 산물[예, 미니- 또는 마이크로-디스트로핀]을 포함한다. 또 다른 유용한 유전자 산물은 예를 들면 효소 활성 결핍에서 기인되는 다양한 병태에 유용한 효소 대체 치료에 유용할 수 있는 효소들을 포함한다. 예를 들면, 만노오스-6-포스페이트를 함유하는 효소(예,  $\beta$ -글루쿠로니다제(GUSB)를 인코딩하는 것을 포함하는 적합한 유전자)는 리소좀성 축적병의 치료에 사용될 수 있다.

[0092] 다른 유용한 유전자 산물은 혈우병 B(인자 IX 포함) 및 혈우병 A(인자 VIII 및 헤테로다имер의 경쇄 및 중쇄 및 B-결실 도메인과 같은 변형체 포함; 미국 특허 제6,200,560호 및 미국특허 제6,221,349호)를 포함하는 혈우병 치료에 사용되는 것들을 포함한다. 인자 VIII 유전자는 2351개의 아미노산들을 코딩하며 단백질은 6개의 도메인을 가지고 있으며, 이들은 아미노에서 말단 카복시 말단으로 A1-A2-B-A3-C1-C2로 지칭된다[Wood et al., (1984) Nature, 312:330; Vehar et al., (1984) Nature 312:337; and Toole et al., (1984) Nature, 342:337]. 인간 인자 VIII은 세포 내에서 가공되어 주로 A1, A2 및 B 도메인 함유 중쇄 및 A3, C1 및 C2 도메인 함유 경쇄를 포함하는 헤테로다имер를 생산한다. 단쇄 폴리펩티드 및 헤테로다имер 양쪽 모두 혈장 내에서 비활성 전구체로 순환하다가 A2 및 B 도메인간 트롬빈 절단에 의해 활성화되어, B 도메인을 방출하고 A1 및 A2 도메인으로 이루어진 중쇄가 생성된다. B 도메인은 단백질의 활성화된 응혈원 형태에서는 결실된다. 또한, 비변성 단백질(native protein)에서, B 도메인 측면의 두 폴리펩티드 사슬("a" 및 "b")은 2가 칼슘 양이온에 결합된다.

[0093] 일부 구현예에서, 미니유전자는 10 아미노산 신호 서열을 인코딩하는 인자 VIII 중쇄의 첫 57 염기쌍 및 인간 성장 호르몬(hGH) 폴리아데닐화 서열을 포함한다. 대체 구현예에서, 미니유전자는 A3, C1 및 C2 도메인뿐 아니라 A1 및 A2 도메인, 및 B 도메인의 N-말단에서 온 5개의 아미노산, 및/또는 B 도메인의 C-말단의 85개의 아미



노산을 더 포함한다. 또 다른 구현예에서, 인자 VIII 중쇄 및 경쇄를 인코딩하는 핵산이 B 도메인의 14개의 아미노산을 코딩하는 42 개의 핵산에 의해 분리된 단일 미니유전자에 제공된다[미국 특허 제6,200,560호].

[0094] 본 명세서에 사용된 바와 같이, 치료적 유효량은 대상의 혈액이 응고되는데 필요한 시간을 감소시키는데 충분한 양의 인자 VIII를 생산하는 AAV 벡터의 함량이다. 일반적으로 인자 VIII의 정상 수준의 1% 미만을 갖는 심각한 혈우병 환자는 비-혈우병 환자의 약 10분에 비교하여 60분이 넘는 전혈 응고 시간을 갖는다.

[0095] 본 발명은 임의의 특정 인자 VIII 서열로 제한되지 않는다. 많은 천연 및 재조합 형태의 인자 VIII가 단리 및 생성되었다. 인자 VIII의 천연형 및 재조합 형태의 예는 미국 특허 제5,563,045호, 미국 특허 제5,451,521호, 미국 특허 제5,422,260호, 미국 특허 제5,004,803호, 미국 특허 제4,757,006호, 미국 특허 제5,661,008호, 미국 특허 제5,789,203호, 미국 특허 제5,681,746호, 미국 특허 제5,595,886호, 미국 특허 제5,045,455호, 미국 특허 제5,668,108호, 미국 특허 제5,633,150호, 미국 특허 제5,693,499호, 미국 특허 제5,587,310호, 미국 특허 제5,171,844호, 미국 특허 제5,149,637호, 미국 특허 제5,112,950호, 미국 특허 제4,886,876호; 국제 특허 공개 WO 94/11503, WO 87/07144, WO 92/16557, WO 91/09122, WO 97/03195, WO 96/21035, 및 WO 91/07490; 유럽 특허 출원 EP 제0 672 138호, EP 제0 270 618호, EP 제0 182 448호, EP 제0 162 067호, EP 제0 786 474호, EP 제0 533 862호, EP 제0 506 757호, EP 제0 874 057호, EP 제0 795 021호, EP 제0 670 332호, EP 제0 500 734호, EP 제0 232 112호, 및 EP 제0 160 457호; Sanberg et al., (1992) XXth Int. Congress of the World Fed. Of Hemophilia and Lind et al., (1995) Eur. J. Biochem., 232:19)을 포함하는 많은 특허 및 과학 문헌에서 발견될 수 있다.

[0096] 전술한 인자 VIII를 코딩하는 핵산 서열은 재조합 방법을 사용하거나 그 서열을 포함하는 것으로 알려져 있는 벡터에서 서열을 얻음으로써 취득될 수 있다. 나아가, 원하는 서열은 페놀 추출 및 cDNA 또는 게놈 DNA의 PCR과 같은 표준 기술을 이용하여 세포 및 이를 함유하는 조직에서 직접 단리할 수 있다[예, Sambrook et al을 참조한다]. 뉴클레오타이드 서열은 또한 클로닝보다 합성적으로 제조될 수 있다. 전체 서열은 표준 방법으로 제조된 중첩 올리고 뉴클레오타이드로부터 조립되고 완전한 코딩 서열로 조립될 수 있다[예, Edge, (1981) Nature 292:757; Nambari et al, (1984) Science, 223:1299; and Jay et al, (1984) J. Biol. Chem. 259:6311 참조].

[0097] 나아가, 본 발명은 인간 인자 VIII에 한정되지 않는다. 실제, 본 발명은 비제한적으로 반류동물(예, 개, 고양이 및 말), 가축(예, 소, 염소 및 양), 실험 동물, 수중 포유류, 큰 고양이를 포함하는 인간 이외의 동물 유래의 인자 VIII를 포섭하도록 의도된다.

[0098] AAV 벡터들은 그 자체는 생물학적으로 활성은 아니나, 대상에 투여 시 혈액 응고 시간을 개선하거나 회복시키는 인자 VIII의 단편을 코딩하는 핵산을 함유할 수 있다. 예를 들면, 위에서 논의한 바와 같이, 인자 VIII 단백질은 두 개의 폴리펩티드 사슬, 즉 가공중 절단되는 B-도메인에 의해 분리되는 중쇄 및 경쇄를 포함한다. 본 발명에 의해 입증된 바와 같이, 인자 VIII 중쇄 및 경쇄로 수여자 세포에 공동-형질도입하는 것은 생물학적으로 활성인 인자 VIII의 발현을 이끈다. 대부분의 혈우병 환자들이 사슬중 하나(예, 중쇄 또는 경쇄)에만 변이나 결실을 함유하므로, 다른 사슬을 공급하기 위해 환자에서 결함 있는 사슬만을 투여하는 것이 가능할 수 있다.

[0099] 다른 유용한 유전자 산물은 삼입, 결실 또는 아미노산 치환을 함유하는 비-천연적으로 발생하는 아미노산 서열을 갖는 키메릭 또는 하이브리드 폴리펩티드와 같은 비-천연적으로 발생하는 폴리펩티드를 포함한다. 예를 들면 단쇄 조각된 면역글로불린은 특정 면역억제 환자에게 유용하다. 다른 유형의 비-천연적으로 발생하는 유전자 서열은 안티센스 분자 및 리보자임과 같은 촉매적 핵산을 포함하며, 표적의 과발현을 경감하는데 사용될 수 있다.

[0100] 유전자 발현의 감소 및/또는 조절은 특히 암이나 전선과 같이 과증식 세포를 특징으로 하는 과증식 병태의 치료에 바람직하다. 표적 폴리펩티드는 정상 세포에 비해 과증식 세포에 배타적으로 또는 높은 수준으로 생성되는 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원은 myb, myc, fyn과 같은 암유전자 및 전위 유전자 bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk 및 EGRF에 의해 인코딩되는 폴리펩티드를 포함한다. 표적 항원으로서 암유전자 산물이외에, 항암치료 및 방어요법을 위한 표적 폴리펩티드는 B 세포 림프종에 의해 만들어지는 항체의 가변영역, 및 일부 구현예에서 자가 면역 질환을 위한 표적 항원으로도 사용되는 T 세포 림프종의 T 세포 수용체의 가변영역을 포함한다. 단일 클론 항체 17-1A에 의해 인식되는 폴리펩티드 및 플레이트 결합 폴리펩티드를 포함하는 암 세포에서 고수준으로 발견되는 폴리펩티드와 같은 다른 암-관련 폴리펩티드가 표적 폴리펩티드로 사용될 수 있다.

[0101] 다른 적합한 치료적 폴리펩티드 및 단백질은 세포 수용체 및 "자가"-지향 항체를 생성하는 세포를 포함하는 자가면역과 관련된 표적에 대해 광범위한 기초 방어 면역 반응을 수여함으로써 자가면역질환 및 장애로 고통받는 개인을 치료하는데 유용할 수 있는 것들을 포함한다. T 세포 매개 자가 면역질환은 류마티스성 관절염(RA), 다

발경화증(MS), 쇼그렌 증후군, 유육종증, 인슐린 의존성 당뇨병(IDDM), 자가면역 갑상선염, 반응성 관절염, 강직 척추염, 공피증, 다발근육염, 피부근육염, 건선, 혈관염, 베게너 육아종증, 크론병 및 케양성 대장염을 포함한다. 이들 각 질병들은 내인성 항원에 결합하는 T 세포 수용체(TCR)를 특징으로 하며 자가 면역 질환과 관련된 염증 전달체계(cascade)를 개시한다.

[0102] 표적 세포에 송달하기 위한 또 다른 산물들이 당업자에 알려져 있다.

[0103] III. 단리 및 정제 방법

[0104] 본 발명은 고체 지지체에 부착된  $\beta$ -갈락토스를 사용하여 AAV9를 단리 및 검출하는 방법을 제공한다. 본 발명은  $\beta$ -갈락토스에 대한 결합 부위를 갖는 다른 클레이드 F AAV 또는  $\beta$ -갈락토스에 대한 결합 부위를 함유하는 소위 "공 AAV9 캡시드"(그 안에 패키징된 유전자 서열이 없는 무손상 캡시드 단백질)의 정제에 용이하게 적용될 수 있다. 예를 들면, AAV9 부분을 함유하는 것들과 같은 키메라 AAV 캡시드 또는  $\beta$ -갈락토스 결합 부위를 갖는 다른 클레이드 F 캡시드 단백질을 함유하는 AAV 벡터들이 본 발명에 따라 검출, 분리 및 단리될 수 있음이 이해될 것이다. 본 명세서 전반에서 편의상, 이들 바이러스 벡터들 및 본 명세서에 기술된 것과 같은  $\beta$ -갈락토스에 특이적인 결합 부위를 갖는 다른 단백질은 "정제 표적"으로 지칭된다. 진술한 바와 같이, 이 부분에서 AAV9에 대한 지칭은 약칭의 목적으로 사용되며  $\beta$ -갈락토스에 대한 결합 부위를 갖는 다른 AAV 캡시드를 배제하지 않음이 이해될 것이다.

[0105] 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여, 고염 용액으로의 용출 또는 인큐베이션에 의한 특이적으로 결합된 바이러스(또는 "공 캡시드 단백질")의 제거는  $\text{CsCl}_2$  침전으로 달성되는 것보다 더 바람직한 순도의 AAV9를 효과적으로 회수한다. 또한, 이 기술은 신속하고, 특별한 장비를 요구하지 않으며 쉽게 스케일-업할 수 있다. 본 발명은 나아가, 본 명세서에 기술된 방법을 사용하여 AAV9 캡시드(패키징된 바이러스 입자를 가지거나 "빈"것이든 어떤 것이든)를 단리 및 검출하는데 유용한 키트를 제공하며, 이는 바이러스 벡터들의 정제 및 검출을 위해 단일 단계 친화 칼럼 및 선택적으로 가시적으로 검출가능한 마커 시스템을 사용한다.

[0106] 일 구현예에서, 본 방법은 정제 표적을 단리하는 방법을 제공한다. 본 방법은 정제 표적을 포함하는 샘플을 고체 지지체에 연결된  $\beta$ -갈락토스를 포함하는 분자와의 접촉에 노출시킴으로써  $\beta$ -갈락토스 결합 부위를 갖는 정제 표적이 그 분자에 의해 특이적으로 결합되는 단계를 포함한다. 그후, 고체 지지체는 세척되어 고체 지지체에 비-특이적으로 결합된 물질을 샘플로부터 제거한다. 이후 정제표적은 고체 지지체에서 분리될 수 있다. 선택적으로, 고체 지지체로부터 단리된 정제 표적은 추후 사용을 위해 농축된다. 일 구현예에서, 고체 지지체는 친화 크로마토그래피 칼럼에 로딩된다.

[0107] 본 발명은 AAV9 세포 결합 도메인을 갖는 AAV 또는 클레이드 F AAV 유래 캡시드를 갖는 바이러스 벡터들의 분리 및 단리에 적합하다. 이들 AAV는  $\beta$ -갈락토스에 특이적으로 결합하는 캡시드의 능력에 의해 이들 바이러스가 제조되는 배양물 내 발견되는 물질로부터 분리될 수 있다. 본 발명의 방법은 클레이드 F AAV 또는 AAV9 세포 결합 도메인을 갖는 AAV를 헬퍼-의존성 제조 배양물에서 분리 및 단리하는 과정에서 유용한데, 그러한 배양물 내 발견되는 아데노바이러스인 AAV1 및 다른 바이러스 또는 세포성 물질들은  $\beta$ -갈락토스에 특이적으로 결합하지 않기 때문이다.

[0108] 본 발명에서 사용되기 위해, 하나 이상의  $\beta$ -갈락토스 분자는 본 발명에 정의된 바와 같은 고체 지지체에 직접 또는 간접적(예, 적합한 링커를 통해)으로 결합될 수 있다. 대안적으로  $\beta$ -갈락토스는 고체 지지체에 (직접 또는 간접적으로) 결합될 수 있는 단백질성, 당성 및 화학적 부분들을 포함하는 다양한 분자에서 발견될 수 있다. AAV9, 다른 클레이드 F, 또는 AAV9 세포 결합 도메인을 함유하는 키메라 AAV와 효과적으로 결합하기 위해, 그러한 분자는 말단(엑소) 갈락토스를 함유한다.  $\beta$ -갈락토스 함유 분자의 예는 말단  $\beta$ -갈락토스를 갖는 글리칸이다. 이러한 분자는 상업적 공급원으로부터 획득하거나, 다양한 천연, 합성, 재조합 또는 기타 적합한 방법에 따라 제조될 수 있다.

[0109]  $\beta$ -갈락토스의 화학적 합성은 본 기술분야에 잘 알려져 있으며, 예컨대 알파-아미노기의 TBOC 또는 FMOC 보호이다(Coligan, et al., Current Protocols in Immunology, Wiley Interscience, 1991, Unit 9 참조). 대안적으로, 펩티드는 또한 잘 공지된 고체상 펩티드 합성법에 의해 합성될 수 있다(Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1962); Stewart and Young, Solid Phase Peptide Synthesis (Freeman, San Francisco, 1969) pp. 27-62 참조). 대안적으로, 하나 이상의  $\beta$ -갈락토스 부분을 갖는 화학 분자가 사용될 수 있으며 그 화학 분자가 고체 지지체에 부착되게 할 수 있다. 또 다른 대안으로서, 정제에 사용되기 위한 고체 지지체는 하나, 또는 바람직하게 하나 이상의  $\beta$ -갈락토스 부분을 함유하도록 화학적 또는 다른 방법으로 개질될 수 있다. 이러한  $\beta$ -

갈락토스 부분은 고체 지지체에, 예를 들어 공유 결합 또는  $\beta$ -갈락토스의 정제 표적에의 결합과 비특이적으로 결합된 물질의 제거를 건디는 다른 적합한 결합에 의해 직접 연결될 수 있다. 대안적으로,  $\beta$ -갈락토스 부분은 예를 들어  $\beta$ -갈락토스의 지지체에의 결합을 촉진하는 부분에 의해 고체 지지체에 간접적으로 연결될 수 있다. 이러한 부분은 단백질, 화학적 부분 또는 기타 적합한 링커일 수 있다.  $\beta$ -갈락토스 또는 말단  $\beta$ -갈락토스-함유 부분을 연결하는 적합한 방법은 당업계에 공지되어 있으며, 고체 지지체 제조자들로부터 입수할 수도 있다.

[0110] 본 명세서에서, 용어 "고체 지지체"는  $\beta$ -갈락토스 또는 말단  $\beta$ -갈락토스(들)를 함유하는 분자가 결합될 수 있는 겔, 레진, 비드, 분말 및 다른 고체를 포함하는 임의의 물질을 지칭하며,  $\beta$ -갈락토스 분자는  $\beta$ -갈락토스의 정제 표적에의 결합과 비특이적으로 결합된 물질의 제거를 건딜 수 있도록 고체 지지체에 결합된다. 적합한 고체 지지체의 예는 세파로즈, 아가로즈, 교차-결합된 아가로즈, 혼합 아가로즈-폴리아크릴아미드 또는 폴리아크릴레인으로 구성된 레진; 비드(마이크로비드 포함); 실리콘; 유리; 마이크로셀; 마이크로캡슐; 마이크로타이터 플레이트; 및 바이오칩을 포함한다. 유용한 지지체는 특히 1999년 6월 3일 공개된 국제특허공개 WO 제99/27351호; 1999년 6월 3일 공개된 국제특허공개 WO 제99/27140호; 미국 특허 제6,096,273호; 2000년 3월 16일 공개된 국제특허공개 제WO 00/14197호에 기술된 것들을 포함한다.

[0111] 다양한 마이크로비드가 알려져 있으며, 미국 특허 제6,074,884호; 제5,945,293호; 및 제5,658,741호에 기술된 아미노텍스트란 비드를 포함한다. 아미노텍스트란-코팅 모노분산된 자성 페라이트 콜로이드 분산액[미국 특허 제5,240,640호]; 금속[미국 특허 제5,248,772호]; 폴리스티렌[미국 특허 제5,466,609호; 미국 특허 제5,707,877호; 미국 특허 제5,639,620호; 미국 특허 제5,776,706호], 및 폴리스티렌-금속[미국 특허 제5,552,086호; 미국 특허 제5,527,713호] 입자들이 본 발명에 따른 고체 지지체로서 채용될 수 있다. 다른 유형의 고체 지지체는 아미노텍스트란 코팅을 오버레이한 콜로이드-크기의 금속 고체층을 갖는 전술한 코팅된 기질을 함유할 수 있다. 금/은 콜로이드 코팅된 폴리스티렌-아미노텍스트란 비드, 그 제조, 특성분석 및 전혈내 백혈구의 서브군락의 분석에의 사용이 기술되어 있다. 예, 미국 특허 제5,248,772호; 미국 특허 제5,552,086호; 미국 특허 제 5,945,293호; O. Siiman and A. Burshteyn, J. Phys. Chem., 104:9795-9810 (2000); 및 O. Siiman et al, Cytometry, 41:298-307 (2000) 참조. 이러한 코팅된 기질에 대한 대체물은, 미국 특허 제5,639,620호에 기재된 바와 같이 EDAC 커플링에 의해 아미노텍스트란으로 코팅된 카복시-기능화된 폴리스티렌 입자를 코어 기질로 채용한다. 이들 또는 다른 고체 지지체들이 당업계에 공지되어 있으며, 다양한 상업적 공급원으로부터 입수가 가능하며, 비제한적인 예로 특히 아머삼 파마시아(업술라, 스웨덴); 피어스; 바이오래드(리치몬드, VA), 및 맥만 쿨터를 포함한다.

[0112] 일 구현예에서, 고체 지지체는 활성화된 세파로즈로 이루어진다. CnBr-활성화 세파로즈는 아머삼 파마시아사에서 구매할 수 있다. 그러나, 다른 공급원의 세파로즈 및 활성화된 세파로즈가 알려져 있으며, 활성화 방법 및 활성화 화합물들도 공지되어 있다. 적합한 활성화된 세파로즈의 예는 CnBr-, 카보닐디이미다졸-, 글루타르알데하이드-, 하이드록시숙신이미드- 및 토실 클로라이드-활성화 세파로즈를 포함한다.

[0113]  $\beta$ -갈락토스 또는  $\beta$ -갈락토스를 포함하는 분자를 고체 지지체에 결합시키기 위한 방법은 공지된 방법 중에서 선택될 수 있다. 이러한 방법은 또한 고체 지지체 제조자에 의해 제공될 수도 있다. 일 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스-연결된 고체 지지체는 표적의 분리, 단리 및/또는 정제를 위해 친화 칼럼에 로딩된다. 이 구현예에서, 정제 표적을 함유하는 샘플(예, AAV 제조 배양물 유래 용해물)을 칼럼을 통해 흐르게 하여 정제 표적이  $\beta$ -갈락토스-연결된 고체 지지체에 특이적으로 결합되도록 한다. 그후, 칼럼을 세척하여 특이적으로 결합된 정제 표적은 보유하면서, 비특이적으로 결합된 물질을 제거한다. 바람직하게, 세척 시약은 식염수 또는 생리학적 pH로 완충된 또 다른 적합한 시약(예, 인산 완충식염수)이다. 이후 칼럼은 정제 표적을 제거하는 조건하에 추가의 세척 단계를 시행한다. 적합하게 용출 시약은 고농도의 염을 함유하는 용액이다. 하나의 적합한 예는 약 0.1M 이상의 농도의 NaCl 함유 인산 완충 식염수 용액이다. 다른 적합한 용액은 인산 완충식염수 및 약 0.4M 이상의 NaCl을 함유한다. 이러한 정보를 보고, 당업자는 유사한 효과를 나타내는 대체 염 용액을 용이하게 선택할 수 있다. 대안적으로 용출 시약은 임의의 적합한 산성 시약 또는 그 염일 수 있다(예, 약 1 내지 약 5 범위의 낮은 pH를 갖는 시약). 그러한 시약의 예는 특히 아세트산(예, 1mM) 및 소듐 아세테이트와 같은 그 염, 및 0.1M 글리신(pH 3)과 같이 본 발명의 당업자에게 명백한 것들을 포함한다. 정제 표적(예, AAV9 세포 결합 도메인을 갖는)의 용출에 후속하여, AAV는 통상의 기술에 의한 농축의 대상이 될 수 있다.

[0114] 다른 구현예에서,  $\beta$ -갈락토스-연결된 고체 지지체는 정제 표적을 함유하는 샘플과 인큐베이션될 수 있다. 그러한 구현예에서, 샘플은 단리된 단백질이 제조된 세포 배양물에서 온 용해물을 함유하는 용액일 수 있다. 대안적으로 샘플은 대상으로부터의 생물학적 샘플, 또는 적합한 희석제와 혼합된 대상으로부터의 생물학적 샘플일 수 있다. 본 발명의 "대상으로부터의 생물학적 샘플"은, 다른 체액들 중에서도 특히, 형성된 체부가 세포, 특히 혈



액 세포인 전혈, 혈장 또는 혈청을 포함하는 임의의 샘플을 포함할 수 있다. 이러한 샘플은 원심분리 등과 같은 그러한 유형의 기타 샘플을 조작하기 위한 통상의 방법으로 정제될 수 있다. 이러한 "대상으로부터의 생물학적 샘플"은 샘플의 농도를 조정하기 위해, 또는 분석을 위한 샘플 준비를 위해, 라벨 화합물 및/또는 선택적으로 버퍼 또는 희석제와 혼합될 수 있다. 또 다른 대안적으로, 생물학적 샘플은 조직 샘플일 수 있으며,  $\beta$ -갈락토스 연결된 고체 지지체는 조직 샘플과 인큐베이션하기 위한 적합한 버퍼 또는 다른 희석제와 혼합될 수 있다.

[0115] 다른 구현예에서, 본 발명은 정제 표적 분리에 유용한 키트를 제공한다. 이 키트는 특히 바이러스 벡터들(예, 클레이드 F, 또는 그 캡시드에 AAV9-세포 결합 도메인을 함유하는 AAV 벡터) 제조에 사용되기에 특히 적합하다.

[0116] 통상적으로, 이러한 키트는  $\beta$ -갈락토스 또는  $\beta$ -갈락토스 함유 분자가 연결된 고체 지지체를 함유한다. 이러한 고체 지지체는 전술한 것들로부터 선택될 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 고체 지지체는 샘플과 인큐베이션하기 위한 비드 또는 겔이다. 다른 바람직한 구현예에서, 고체 지지체를 친화 칼럼(예, 액체 크로마토그래피 칼럼) 내에 로딩하고, 샘플을 칼럼에 통과시킨다

[0117] 또한, 본 발명의 키트는 세척 시약, 용출 시약 및 농축 시약을 포함하여 원하는 시약들을 또한 포함할 수 있다. 이러한 시약들은 본 명세서에 기술된 시약 및 통상의 농축 시약 중에서 용이하게 선택될 수 있다. 바람직한 일 구현예에서, 세척 시약은 인산 완충식염수(PBS)와 같은 생리적 pH로 완충된 등장성 식염수 용액이며; 용출 시약은 0.4M NaCl 함유 PBS이며, 농축 시약 및 장비이다. 예를 들면, 당업자는 폴리에틸렌글리콜(PEG), 또는  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  와 같은 시약 또는 여과 장비와 같은 장비가 유용할 것을 인식할 수 있다. 예를 들면 100 K 멤브레인을 갖는 여과 장비는 rAAV를 농축할 것이다.

[0118] 이들 키트는 추가적으로 샘플을 유지 또는 보존하는데 필요한 시약들을 함유할 수 있다. 더 중요하게, 키트는 경쟁적 어세이를 수행하고 대조군 제조를 위한 지시를 함유한다. 또한 키트 내에는 샘플을 위한 적합한 희석제와 버퍼, 신호 비교를 위한 지시 차트, 일회용 장갑, 오염제거 지시, 적용 스틱 또는 용기 및 샘플 준비 컵등이 제공될 수 있다. 키트는 바람직하게는 또한 필요한 버퍼 물질 또는 배지를 요구되는 대로 함유할 수 있다. 당업자는 임의의 특이적 수용체 및 표적 세포에 대해 환자에 본 방법을 수행하는데 필요한 성분 및 정보를 가지는 임의의 수의 키트를 조립할 수 있으며, 그 결합 부위에 대한 결과를 정상과 비교할 수 있다.

[0119] 또 다른 구현예에서, 본 발명은 샘플 내 정제 표적(예, AAV9)의 존재를 검출하는데 유용한 키트를 제공한다. 전술한 성분을 함유하는 것 이외에, 그러한 키트는 정제 표적의 분자에의 결합을 육안으로 검출할 수 있게 하는 마커 시약도 포함할 수 있다. 이 키트는 대상으로부터의 생물학적 샘플, 예컨대 혈액에서의 정제 표적의 검출에 특히 적합하다. 이러한 유형의 키트는 전술한  $\beta$ -갈락토스-연결 지지체 및 시약들을 함유하는 것 이외에, 육안으로 검출가능한 마커를 더 포함할 수 있다.

[0120] 용어 "마커"는 일반적으로, 분자, 바람직하게는 단백질성 분자를 지칭하나, 작은 화학적 분자, 바람직하게 육안으로 검출가능한 것들을 지칭한다. 일 예에서, 이들 마커는 레이저로 여기 시 특정 파장의 검출가능한 신호를 방출함으로써 검출을 가능하게 한다. 피코빌리단백질, 탠덤 염료, 특정 형광 단백질, 작은 화학적 분자 및 다른 수단으로 검출가능한 특정 분자는 모두 이들 분석에서 마커로 간주될 수 있다. 예컨대, Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 6th Ed., R.P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR (1996)에 나열된 마커들 참조.

[0121] 본 발명에 유용한 피코빌리단백질의 예는 피코시아닌, 알로피코시아닌(APC), 알로피코시아닌 B, 피코에리스린(PE) 및 바람직하게 R- 피코에리스린이다. PE는 현재 이용가능한 가장 밝은 형광 염료 중 하나이다. PE는 항체에 콘쥬게이트되어 형광 플레이트 어세이에서 인터루킨-4를 검출하는데 사용되어 왔으며(MC Custer and MT Lotze, (1990) J. Immunol. Meth., 128, 109-117), 적합한 신호를 산출한 유일한 시험된 형광단으로 밝혀졌다. 탠덤 염료는 피코빌리단백질 및 다른 염료로 형성될 수 있는 비-천연적으로 발생하는 분자이다. 예컨대, 미국 특허 제4,542,104호 및 미국 특허 제5,272,257호를 참조. 본 발명에 유용한 탠덤 염료의 예는 피코에리스로시아닌 또는 PC5(PE-Cy5, 피코에리스린-시아닌 5.1; 여기, 486-580nm, 방출, 660-680nm)[A.S. Waggoner et al, (1993) Ann. N.Y. Acad. Sci., 677:185-193 및 미국 특허 제5,171,846호] 및 ECD(피코에리스린-텍사스 레드; 여기, 486-575nm, 방출, 610-635nm)[미국 특허 제4,542,104호 및 미국 특허 제5,272,257호]이다. 다른 공지 탠덤 염료는 PE-Cy7, APC-Cy5, 및 APC-Cy7[M. Roederer et al, (1996) Cytometry, 24:191-197]이다. 탠덤 염료, PC5 및 ECD는 염료의 이미노티올란 활성화와 관련된 수 개의 방법에 의해 단일클론 항체에 성공적으로 직접 콘쥬게이트되었다. 본 방법에 추가적인 수의 마커(표지된 리간드)들을 추가하기 위해 본 발명에서 리간드에 직접 콘쥬게이션되고 피코빌리단백질 또는 탠덤 염료와 함께 사용될 수 있는 또 다른 마커는 여기 시 550nm 미만의 파장을 방출하는 소분자를 포함한다. 그러한 분자는 피코빌리단백질의 방출과 중첩되지 않는다. 그러한 마커의

일 예는 형광 이소티오시아네이트(FITC)이다. 다른 마커들은 전술한 핸드북에 기술되어 있다. 본 방법에서 추가적인 색을 제공하기 위해 채용될 수 있는 다른 마커는 녹색 형광 단백질 및 청색 형광단백질로 알려진 단백질들이며; 또한 자외선에 의해 여기 시 방출하는 마커들도 유용할 수 있다. 빌리단백질 및 탠덤 염료는 쿨터 인터내셔널 주식회사(마이애미, FL), 몰레큘러 프로브 Inc.(유진, OR) 및 프로자임 Inc.(산 리안드로, CA)를 포함하여 다양한 공급원으로부터 상업적으로 이용 가능하다. 다른 마커나 전술한 표지들도 알려진 공급원으로부터 상업적으로 입수할 수 있다.

[0122] 이들 마커를 사용하는 본 방법은 당업자에게 매우 명백할 것이며,  $\beta$ -갈락토스-연결 고체 지지체를 접촉하기 전에 마커 존재하에 샘플을 인큐베이션하는 단계를 포함할 수 있다. 대안적으로, 마커는 고체 지지체에 결합될 수 있다. 또 다른 대체예로, 마커는 고체 지지체로부터 특이적으로 결합된 정제 표적을 제거하는 세척 단계 후에 정제 표적을 함유하는 용출액에서 인큐베이션될 수 있다. 마커 및 검출 시스템의 선택은 본 발명의 제한이 아니다. 본 발명에 의해 제공된 키트는 본 명세서에 기술된 본 방법을 수행하는데 유용하다.

[0123] 후술하는 실시예는 단지 예시적인 것이며, 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 의도되지 않는다.

#### [0124] IV. 실시예

#### [0125] 실시예 1 - 세포 결합 및 형질도입 어세이

##### [0126] A. 결합 어세이

[0127] 결합 어세이를 위해, 150cm<sup>2</sup> 플라스크로부터 세포들을 긁어내어 96-웰 플레이트상에 100 $\mu$ l 내 혈청-프리(SF) 배지 내 5x10<sup>5</sup> 세포/웰로 시딩하였다. AAV 벡터들은 펜 벡터([http://www.med.upenn.edu/gtp/-vector\\_core.shtml](http://www.med.upenn.edu/gtp/-vector_core.shtml))에 전술된 대로 제조하였으며, 100 $\mu$ l 내 SF 배지 내 5x10<sup>9</sup> 게놈 카피(GC)/웰로 첨가하고, 4℃에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 세포들을 SF 배지로 3회 세척하고 200 $\mu$ l PBS에 재현탁하였다. QIAamp DNA 미니 키트(QIAGEN)를 사용하여 전체 DNA를 추출하였다. 세포-결합 GC를 리얼-타임 PCR로 정량하였다. 사용된 프라이머 및 프로브는 벡터 게놈의 SV40 폴리A 서열에 상보적이었다. F 프라이머: AGCAATAGCATCACAAATTCACAA[서열 번호 2]; R 프라이머: CCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTT[서열 번호 3]; TaqMan 프로브: 6FAM-AGCATTTTTTCTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTG[서열 번호 4] AMRA. 세포 형질도입 어세이를 위해, 세포를 10<sup>5</sup> 세포/웰로 흑색 벽의 투명 바닥 96-웰 플레이트에 밤새 시딩하였다. 이후 플레이트를 4℃에서 15분간 두고, 100 $\mu$ l 내 SF 배지에 ffLuc 발현 AAV 벡터 10<sup>9</sup> GC를 첨가한 후 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 이후 세포를 SF 배지로 3회 세척하였다. 혈청을 함유하는 따뜻한 배지를 보충하고 세포들을 37℃에서 48시간 동안 인큐베이션하였다. ffLuc 발현은 웰당 150  $\mu$ g/ml D-루시페린 기질을 첨가하고 루미노미터로 상대 광 단위/초 (RLU/s)를 측정함으로써 모니터링하였다.

##### [0128] B. 세포 형질도입 어세이

[0129] 세포 형질도입 어세이를 위해 150cm<sup>2</sup> 플라스크로부터 세포들을 긁어내어 5 x10<sup>5</sup> 세포/웰로 흑색 벽의 투명 바닥 96-웰 플레이트에 밤새 시딩하였다. 이후 플레이트 4℃에서 15분간 두고, 100 $\mu$ l 내 SF 배지 내 ffLuc 발현 AAV 벡터 10<sup>9</sup> GC를 추가한 후 1시간 동안 4℃에서 인큐베이션하였다. 이후 세포를 SF 배지로 3회 세척하였다. 혈청을 함유하는 따뜻한 배지를 보충하고 세포들을 37℃에서 48 시간 동안 인큐베이션하였다. ffLuc 발현은 웰당 150  $\mu$ g/ml D-루시페린 기질을 첨가하고 루미노미터로 상대 광 단위/초(RLU/s)를 측정함으로써 모니터링하였다.

##### [0130] C. 생체내 실험

[0131] 50 $\mu$ l PBS 내 100 mU NA와 함께 또는 NA 없는 AAV. NA는 벡터 주입 1시간 전 또는 동시에 투여하였다. 투여 21일 후 전술한 방법[Bell, et al, Histochem Cell Biol, 124 (6): 2427-35 (2005)]에 의해, 폐에서의 nLacZ 유전자 발현을 검사하였다. 폐 섹션을 100x 및 200x 배율에서 검사하였다. 전도 기도 내 LacZ 양성 세포는 200x 배율 뷰필드 당 양성 세포수를 계수함으로써 정량하였다. 케타민/자일라진으로 마우스를 마취하고 30 $\mu$ l PBS 내 100mU NA 및 대조로 PBS 단독을 경비로 주입하였다. 1시간 후 전술한 방법(Bell, 2005, 상기 인용됨)으로 폐를 수확하고 냉(-20℃) 아세톤에서 5분간 섹션을 고정하였다. 이후 폐 섹션을 카보-프리TM 차단 용액(Vector laboratories)로 차단하고 15 $\mu$ g/ml 로다민 표지 리시누스 코뮤니스 아글루티닌 I(RCA I) 및 7.5 $\mu$ g/ml 형광 표지된 삼부쿠스 니그라 렉틴(SNA)과 함께 실온에서 30분간 인큐베이션하였다. 이후 슬라이드를 PBS 내에서 2회 세척하고 DAPI(Vector laboratories)와 함께 벡타설드에 마운팅하였다. 와이드 필드(200x) 및 공초점 현미경

(Zeiss LSM 510 confocal microscope) 둘다로 이미지를 취하였다. 근육, 심장, 간 및 뇌 RCA 염색을 위해 미처리 마우스에서 기관이 제거되고 전술한 바와 같이 색인을 염색하였다. 뇌의 CD31 염색을 위해, 48개의 슬라이드를 래트 항-CD31 일차 항체(BD Pharmingen)와 함께 인큐베이션하고 이후 형광 표지 항-래트 2차 항체(Vector laboratories) 및 로다민 표지 RCA와 함께 인큐베이션하였다. 폐의  $\alpha$ -튜불린 염색을 위해 슬라이드를 전술한 바와 같이 처리하되, 색인은 4% 파라포름알데하이드에서 고정하고 마우스 항- $\alpha$ -튜불린 일차 항체(Sigma)로 염색하고, 이후 형광 표지 말 항-마우스 2차 항체(Vector laboratories) 및 로다민 표지 RCA로 염색하였다. 이미지는 400x 배율에서 취하였다. 통계학적 유의성은 스튜던트 양측 T 검정(Student's 2-tailed t test)를 사용하여 결정하였다. P 값이 0.001 미만인 경우 유의한 것으로 간주되었다. 데이터는 평균  $\pm$  SD로 나타내었다.

[0132] 실시예 2 - 글리코시다제 처리 및 렉틴 경쟁.

[0133] Pro-5 세포는 100 $\mu$ l SF 배지 내 비브리오 콜레라(Sigma) 유래 NA 유형 III 50mU/ml로, 대조 세포는 배지 만으로, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 동안 처리하였다. 이후 일부 세포는 부가적으로 50 $\mu$ l 반응 버퍼(Sigma) 내 60mU/ml  $\beta$ -(1,4)-갈락토스 분해효소로, 대조 세포는 반응 버퍼 만으로, 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 처리하였다. 이후 결합 및 형질도입 연구전에 세포들을 전술한 바와 같이 3회 세척하였다. 렉틴 경쟁 연구를 위해, Pro-5 세포는 먼저 NA로 처리하여 시알산을 제거하였다. 냉 SF 배지로 세포들을 세척하고, 렉틴을 100 $\mu$ l SF 배지 내 50 $\mu$ g/ml로 첨가하고, 또는 대조로서 배지만을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 15분간 인큐베이션하였다. 이후 렉틴 용액을 제거하고, AAV 벡터(결합 어세이를 위해 5 $\times 10^9$  및 형질도입 어세이를 위해 10 $^9$  GC) 및 50 $\mu$ g/ml 렉틴 혼합물 또는 대조로 벡터 단독을 첨가하고, 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후 세포들을 세척하고, 전술한 바와 같이 AAV 결합 또는 형질도입에 대해 분석하였다. 이 연구에서 사용된 렉틴은 갈락토실( $\beta$ -1,4)-N-아세틸글루코사민과 결합하는 에리스리나 크리스타갈리 렉틴(ECL), 말단 갈락토스 잔기에 결합하는 리시누스 코뮤니스 아글루티닌 I(RCA I), N-아세틸글루코사민과 결합하며 시알산을 통해 상호작용하는 맥아 아글루티닌(WGA), ( $\alpha$ 1,3) 및 ( $\alpha$ 1,6) 만노오스와 결합하는 히페아스트롬 하이브리드 렉틴(HHL),  $\alpha$ -갈락토스와 결합하는 그리포니아 심플리시폴리아 렉틴 I 이소렉틴 B4(GSL B4) 및  $\alpha$ -결합 푸코오스와 결합하는 로투스 테트라고놀로부스 렉틴(LTL)(Vector Laboratories)를 포함한다.

[0134] 실시예 3 - AAV9의 글리칸 결합 특이성 스크리닝

[0135] 글리칸 마이크로어레이(GMA) 결합 연구를 위해 AAV9의 바이러스 유사 입자(VLP)를 전술한 바와 같이 Bac-대-Bac 배컬로바이러스 발현 시스템/Sf9 발현 시스템을 사용하여 제조하고[Mitchell, et al, 2004, PLoS Biol 2(8): E234], 기능성 글리코믹스를 위한 컨소시움(CFG; an NIH National Institute of General Medicine Science Initiative)의 코어 D 및 H에 의해 개발된 고속대량(high-throughput) 글리칸 마이크로어레이로 스크리닝하였다. 인쇄된 어레이(포유류 인쇄된 어레이[PA]V4.1, <http://www.functional-glycomics.org/static/consortium/resources/resourcecoreh14.shtml>)는 465개의 상이한 천연 및 합성 포유류 글리칸으로 구성되었으며, 아민-기능화된 글리칸 또는 글리칸 콘쥬게이트를 아민-반응성 N-하이드록시수신이미드-활성화된 유리 슬라이드에 공유 연결시키는 아민 커플링을 사용하여 생성된 상이한 연결 및 개질을 갖는 시알화된 당을 포함하였다. 글리칸 또는 글리코콘쥬게이트 당 6개의 복제물을 함유하는 인쇄된 슬라이드를 AAV9 VLP 200 $\mu$ g/ml와 인큐베이션한 후, ADK9 즉 캡시드 단일클론 항체(Jurgen Kleinschmidt 제공, German Cancer Research Centre, Heidelberg, Germany)를 결합된 캡시드에 오버레이하고, 검출을 위해 FITC-표지 2차 항체(5 $\mu$ g/ml로) 가하였다. 형광 강도를 ScanArray 5000 공초점 스캐너(Perkin Elmer Inc.)를 사용하여 검출하였다. IMAGEGENE 이미지 분석 소프트웨어(BioDiscovery, El Segundo, CA)를 사용하여 이미지를 분석하였다. 각 글리칸에 대한 상대 결합은 최고 및 최저값을 빼고 산출한 6개의 복제물 중 4개의 평균 상대 형광 단위(RFU)로 나타내었다. 결합 데이터는 두 개의 선택 기준을 사용하여 분석하였다: (I) 최고 RFU값을 갖는 글리칸의 평균의 3 표준 편차내인 글리칸 및 (II) 평균 RFU값을 산출하는데 사용된 4개의 복제물의 RFU 값들 사이의 변동계수(%CV)가 20% 미만인 글리칸(% CV = 변동계수는 퍼센트로 표현된 평균에 대한 데이터의 표준 편차의 비율로 정의됨). 글리칸 어레이 데이터의 생성에 관련된 정보는 하기 URL/어세션 사이트의 공개 웹사이트에서 이용 가능 하다: [http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen\\_3528](http://www.functionalglycomics.org/glycomics/HServlet?operation=view&sideMenu=no&psId=primscreen_3528). 이 데이터 세트에 포함된 것은 원 데이터(raw data), 정규화된 데이터, 샘플 주석, 실험 디자인, 글리칸 어레이 및 실험 프로토콜 주석(accession id primscreen\_3528)이다.

[0136] 결과

[0137] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 수개의 전술된 AAV(혈청형 1, 2, 5 및 6) 및 신규의 AAV 혈청형 7, 8, 9 및 rh32.33를 엑소- $\beta$ -시알리다제(뉴라미니다제, NA)로 처리 또는 비처리하여, 유전자학 및 글리코실화 생화학의



연구를 위해 사용되는 CHO 세포주 Pro-5에의 결합에 대해 스크리닝 하였다. 제1 세대 AAV들에 대한 결과는 예상 하였던 바와 같이 NA 전-처리(도 1a)가 AAV2의 결합에 아무런 영향을 나타내지 않았으며, AAV1, AAV5, 및 AAV6 의 결합은 최소한 2 로그로 감소하였다(도 1b). 신규 AAV에 대한 연구는 AAV7, 8, 및 rh32.33의 결합에 대한 NA 처리 효과를 보여주는데 실패한 반면, AAV9은 결합에 있어 예기치 못한 2.5 로그 증가를 나타내었다(도 1b).

[0138] 본 발명자들은 올리고사카라이드상의 말단 SA의 존재가 AAV9에 대한 결합을 저해하거나 또는 SA의 제거가 결합 을 증가시켰던 분자를 노출시킨 것으로 추측하였다. 가장 가능한 후보는 대부분의 SA-풍부 글리칸상의 전종단 모노사카라이드인  $\beta$ -1,3 또는  $\beta$ -1,4 갈락토스일 것으로 고려되었다(도 1a). 이 가설은 초기에는 렉틴 저항성 으로 인해 글리코실화에 관련된 각종 효소들이 결핍된 모 CHO 세포주 Pro-5의 체세포 돌연변이들[SK Patnaik and P. Stanley (2006) *Methods Enzymol* 416:159-182]을 사용하여 탐구되었다. Lec-2는 CMP-SA 골지 수송자에서 결핍되어 말단 SA가 없는 전체량의 N 및 O-글리칸을 가지고 있다(도 1a). Lec-8은 UDP-Gal 골지 수송자가 결핍되어 SA 및 갈락토스 사카라이드가 모두 없는 N- 및 O-글리칸을 생성한다(도 1a). 개통벌레 루시퍼라제 (ffLuc)를 발현하는 AAV 2, 6, 및 9에 기반하는 벡터들을 Pro-5, Lec-2 및 Lec-8 세포들과 인큐베이션하고 결합 및 형질도입에 대해 분석되었다(도 2a 및 도 2b). AAV2의 결합 및 형질도입은 이들 세 세포주 모두에서 동일 하였으며, AAV6 도입 촉진에 있어 SA의 중요성을 입증하는 전 연구에 기초하여 예상된 대로 Pro-5 세포에 비해 Lec-2 및 Lec-8 세포들에서는 AAV6의 경우 감소하였다. AAV9에 대하여, 결합 및 형질도입은 Lec-2에서 실질적으로 증가하였으나 Lec-8 세포에서 기저수준으로 감소하였으며, 이는 SA가 흡수를 저해한다기보다 말단  $\beta$ -갈락토 스에의 결합이 흡수를 촉진한다는 가설과 더 일치하였다. 형질도입과 결합의 일치는 말단 갈락토스에의 결합이 AAV9 형질도입에서 속도 제한 단계임을 제안한다. 시알산 제거의 영향은 형질도입보다 결합에 더 컸으며, 이는 도입후 단계들 역시 형질도입을 제한함을 제안한다.

[0139] AAV9 결합에서 말단 갈락토스의 역할이, NA로 전-처리된 후 상이한 특이성을 갖는 렉틴과 함께 공동-배양된 Pro-5 세포들에서 더 연구되었다(도 2c, 결합; 도 2d, 형질도입). AAV9의 결합을 차단한 렉틴들은 오직  $\beta$ -1,4 갈락토스를 인식하는 에리스리나 크리스타갈리 렉틴(ECL) 및 가장 높은 친화성을 보이는  $\beta$ -1,4 갈락토스를 갖 는 수 개의 유형의  $\beta$ -갈락토스 연결들을 인식하는 리시누스 코뮤니스 아글루티닌 I(RCA I)이었으며; AAV2 결합 에는 영향을 미치지 않았다.  $\alpha$ -갈락토스[그리포니아 심폴리시폴리아 렉틴 I 이소렉틴 B<sub>4</sub> (GSL B<sub>4</sub>)],  $\alpha$ -1,3 및  $\alpha$ -1,6 만노오스[히페아스트룸 하이브리드 렉틴 (HHL)] 및  $\alpha$ -푸코오스[로투스 테트라코놀로부스 렉틴 (LTL)]를 인식하는 렉틴들은 AAV2 또는 AAV9의 결합을 저해하지 않았다. 맥아 아글루티닌(WGA)은 갈락토스에 공통적으로 결합하는 N-아세틸글루코사민과의 상호작용에 의해 AAV9 결합에 약간 영향을 가진다. AAV2 및 AAV9 형질도입의 렉틴 저해는 세포에 독성이 있어 유용한 정보를 주지 않는 RCA를 제외한 결합 결과를 확인하였다.

[0140] AAV9 흡수의 글리칸 특이성의 최종 확인은 말단 SA를 절단하는 NA 또는 NA 및  $\beta$ -갈락토스 사카라이드 모두를 제거하는 NA 및  $\beta$ -갈락토스 분해효소( $\beta$ -gal)로 전-처리된 Pro-5 세포에서 수행되었다(도 1a). AAV2와의 결합 및 형질도입은 효소전-처리에 영향을 받지 않았으며 반면 NA는 전술한 바와 같이 AAV9의 형질도입을 증강시켰고, 그 효과는  $\beta$ -gal로의 후속처리에 의해 반전되었다(도 2e 및 도 2f).

[0141] AAV9의 글리칸-캡시드 상호작용은 각 글리칸에 대해 6개의 복제물을 포함하는 465개의 상이한 천연 및 합성 포 유류 글리칸으로 구성된 글리칸 마이크로레이를 사용하여 더 탐구되었다. 유사한 전략이 생화학적 및 분자 접 근으로 결정된 바와 같이 AAV1의 시알화 글리칸에의 결합을 검증하기 위해 사용되었다(Wu *et al.*, 2006, *J Virol*, 80: 9093-9103). 우리의 분석에서, 각 글리칸은 어레이 내 4개의 복제물에 대한 평균  $\pm$  1 SD (6개의 복 제물 내 최고 및 최저 결합은 제거되었다)의 면에서 상대 형광 단위(RFU)로 측정된 결합에 대해 평가되었다. 4 개의 복제물 내 변이는 %CV로 평가되었으며, %CV는 20 미만인 경우 낮다고 간주되었다. AAV9 캡시드에 대한 특 이적 결합 친화성을 갖는 글리칸의 선택은 두 개의 독립적인 기준에 기초하였다: RFU에 의해 측정된 높은 전체 총 결합 및 %CV로 평가되는 4개의 복제물간 낮은 변이. 최고 결합 글리칸은 최고 결합 글리칸 415의 3 S.D. 내 에 속하는 평균 RFU값을 갖는 것들로 임의로 정의되었다. 높은 결합 친화성 기준을 만족하는 네 개의 글리칸 중 에, 세 개는 20 미만의 %CV로 측정되는 높은 특이성을 나타내었다. 이들 세 개의 글리칸, 415, 297 및 399는 AAV9 결합에 대한 잠재적 수용체로 간주될 수 있는 충분한 친화성과 특이성을 입증하였다. 총 결합 및 결합의 특이성에 기초하여 AAV9에 대한 결합에 대해 특이적인 것으로 선택된 이들 세 글리칸은 모두  $\beta$ -1,4 연결(415 및 399) 또는  $\beta$ -1,3 연결(297)을 갖는 말단 갈락토스(Gal)를 갖는 것으로 나타났다. 각 글리칸은 그 구조내 GalNAc에 Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3)GlcNAc 연결된  $\beta$ 1-3 또는  $\beta$ 1-6를 함유하였으며, 이는 AAV9에의 결합을 위한 시 알산 결핍 글리칸의 구조적 맥락을 제안한다. 결합 데이터와 세포 기초 결합/형질도입 시험의 조화는 AAV9 향성 에 있어 말단  $\beta$ -갈락토스 연결의 역할을 확인한다.

- [0142] 본 명세서에 기술된 바와 같이, 전도 기도의 AAV9로의 형질도입이 NA를 함유한 제형으로 마우스 기도를 전-처리 함으로써 증강될 수 있는지 결정하기 위해 마우스에서 연구가 수행되었다. 세포주와의 시험관내 연구에 기초했으며 SA에 대한 결합에 의존한 것일 수 있는[Z. Wu, et al., (2006) *J Virol* 80:9093-9103], 전 연구에서 효율적인 전도 기도의 생체내 형질도입[MP Limberis, et al., (2009) *Mol Ther* 17:294-301]을 나타낸 AAV6를 투여한 마우스에 대해 비교가 이루어졌다. NA 부재 AAV9의 폐 송달은 폐포 제한된 형질도입의 예측된 패턴을 입증하였으며; AAV9 투여 시 또는 1 시간 전 NA의 폐로의 투여는 폐포 및 전도 기도 상피 세포 모두에서 고수준 형질도입을 나타내는 매우 상이한 패턴을 산출하였다. AAV6로 얻어진 전도 기도의 고수준 형질도입은 NA 처리된 동물에서는 완전히 없어졌는데, 이는 생체내 형질도입이 SA에의 결합에 의존함을 확인한다. 글리칸 구조의 풍부성 및 분포상에서 NA의 기도 송달의 결과는 폐 색션들을 말단 갈락토스 잔기(RCA) 또는 말단 SA 잔기(SNA)와 결합하는 형광표지 렉틴으로 염색함으로써 직접 연구되었다. NA 처리전, RCA로의 염색은 폐포 세포 및 전도 기도의 기저 배측 영역에 제한되었다. 유사한 패턴이 SNA에도 관찰되었는데 다만 전도 기도의 정단 표면도 염색되었다. NA로의 처리는 전도 기도 상피 세포의 염색에 가장 놀라운 결과를 나타내었는데, RCA에 대해서는 상당히 증가하였고 SNA에 대해서는 적당히 감소하였다.
- [0143] RCA 결합이 세포막으로 위치되는지 또는 그 위의 점액층에 위치되는지 여부를 결정하기 위해 고해상 현미경 연구가 수행되었다. 기도 정단 표면 상피세포 유래 섬모를 묘사하는  $\alpha$ -튜불린의 면역-위치화와 함께 RCA 염색의 공동-위치화를 위해 NA를 전-처리한 동물에서 유래된 폐 색션을 평가하였다. 이들 연구는 NA 전-처리된 폐의 전도 기도에서 상피 세포의 세포 표면의 RCA 결합을 입증하였다.
- [0144] AAV 벡터들의 혈관내(IV) 투여에 후속하는 형질도입에 대한 가장 큰 장애는 인접 내피 및 미세순환의 기저판의 물리적 장벽이다. 한 예외가 간이며, 이는 유창모 내피를 함유하여 혈액내 백터의 간세포로의 직접적인 접근을 허용한다. AAV9는 이 장벽을 부분적으로 극복하여 골격 및 심장 근육, 및 더 적은 정도로 중추신경계 세포에 표적화가 가능하다는 점에서 독특하다(Inagaki, K., S. et al. (2006), *Mol Ther* 14(1): 45-53.; Duque, et al., (2009) *Mol Ther* 17:1187-1196; K.D. Foust, et al., (2009), *Nat Biotechnol* 27:59-65). AAV9 벡터를  $10^{11}$  및  $10^{12}$  게놈 카피(GC)/마우스의 용량으로 IV 투여한 후 *lacZ* 형질도입을 분석하였다. 이는 RCA로의 염색을 통한 말단  $\beta$ -갈락토스의 존재와 상호관련되었다. 전술한 바와 같이, 간은 백터의 다소 낮은 용량에서도 효율적으로 형질도입된다[Vandendriessche, et al, 2007, *J Thromb Haemost* 5(1): 16-24]; 더 높은 백터 용량에서 효율적으로 심장 및 골격 근육을 형질도입하는 것이 가능하다[Inagaki, 2006, 위에 인용됨]. 골격 및 심장 조직 유래 근육 섬유 표면은 RCA와의 결합에 의해 입증된 바와 같이 고 수준의 말단  $\beta$ -갈락토스를 나타내었다. 비록 간 혈관의 내피 세포는 밝게 염색되었으나, 간세포는 저 수준의 RCA 결합을 나타내었다.
- [0145] 뇌 조직의 렉틴 결합연구는 내피 세포에 SNA가 아닌 RCA의 실질적인 결합으로 주목되었다. 이는 매우 흥미로운데, 비록 뇌에 직접 주사되었을 때는 AAV9 및 AAV5 모두 효율적인 형질도입이 성취되지만, 정맥 주사후에는 AAV9가 CNS 세포를 표적화하는 독특한 성질을 가지기 때문이다[B.L. Davidson, et al., (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:3428-3432; S.]. 치료제의 전신 투여후 CNS 송달의 주요한 장애는 내피세포의 독특하고 단단한 네트워크로 형성된 혈액뇌장벽이다. 내피세포를 통과하는 수용체 및 흡수-매개 세포전달작용(transcytosis) 경로는 이 장벽을 극복하기 위해 이용되어왔다. 뇌의 미세순환상 발견되는 고수준의 AAV9 수용체는 세포전달작용 경로를 통한 그 CNS 표적능에서 역할할 수 있다.
- [0146] AAV9 형질도입을 매개하는데 있어서 글리칸의 잠재적 역할이 이 연구의 초점이었는데, 이들이 보통 구성 성분 모노사카라이드에 대해 정교한 특이성을 가지며 종종 바이러스 감염에 대한 수용체로 기능하기 때문이다. 말단 시알산을 함유하는 글리칸과의 특이적 상호작용이 수 개의 다른 AAV 혈청형을 포함하는 많은 바이러스에 대해 기술되어 있다. 비록 노로바이러스가  $\alpha$ -갈락토스 연결에 의해 글리칸과 결합하지만(Zakhour, M., (2009), The alphaGal epitope of the histo-blood group antigen family is a ligand for bovine norovirus Newbury2 expected to prevent cross-species transmission. *PLoS Pathog* 5(7): e1000504.), AAV9에 의한 결합 및 형질도입이 말단  $\beta$ -갈락토스 연결을 통해 일어난다는 우리의 발견은 공지된 AAV들을 포함하여 어떤 다른 바이러스에 대해서도 기술된 바 없다.
- [0147] 글리칸 어레이 연구는 모두 말단  $\beta$ -갈락토스 연결을 함유하는 3개의 글리칸에 대한 AAV9의 특이적 결합을 입증하였으며, 이는 세 개의 독립적인 접근을 사용한 다수 세포주(즉, 글리코시다제 전-처리, 렉틴 경쟁 및 체세포 돌연변이)에서 기술된 바와 같이 형질도입에 있어서 이 사카라이드의 중요성을 확인한다. 이들 글리칸은 모두 그 구조 내에 GalNAc에  $\beta$ 1-3 또는  $\beta$ 1-6로 연결된 Gal  $\beta$ 1-4(Fuc  $\alpha$ 1-3) GlcNAc를 함유하며, 트레오닌을 경유하여 GalNAc을 통해 연결되었고, 비록 다른 유형의 연결에 연관된 글리칸과의 기능적 상호작용을 배제할 수 없지

만(Martha, J. D. 1999. O-Glycans. Essentials of Glycobiology. A. Varki, R. Cummings, J. Esko et al. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press: p. 101-113.), O-연결된 갈락토스 함유 글리칸이 AAV9에 결합할 수 있음을 가리킨다. 결합 데이터에 관한 중요한 통고는 형질도입을 매개하는 글리코실화 수용체의 측면에서 결합 친화성이 반드시 기능적 중요성과 상호 관련되지는 않는다는 것이다. 중요한 요전자 치료 벡터들에 대한 수용체는 시험관 내에서는 잘 특성화되어 있으나 생체내 형질도입에 대한 이들 수용체의 중요성은 아직 확인되지 않았다. 생체내 및 시험관 내 형질도입 간의 불일치의 한 예는 인간 아데노바이러스 5(Ad5)이다. 콕사키 바이러스 및 아데노바이러스 수용체(CAR)는 시험관 내 연구에 기초하여 Ad5 수용체로 단리되었으며, 후속하는 생체내 유전자 전달에서 CAR의 중요성을 확인하려는 시도에서 CAR-결합 제거된 Ad5가 사용되었다. 정맥 투여에 후속하여, CAR-결합 제거된 Ad5 벡터들의 형질도입 수준 및 간-선택적 프로파일은 Ad5와 유사하였으며, 이는 잠재적인 여분의 생체내 흡수 경로를 제안한다. Ad5 생체내 형질도입의 기전 연구는 혈액 응고인자의 존재가 비-CAR-의존성 경로를 통해 형질도입을 매개할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 비교하여, NA와 조합된 AAV9 벡터 및 후속하는 폐-지향 유전자 전달에 관한 우리 연구는 AAV9에 의한 전도 기도 상피 세포의 형질도입에 있어  $\beta$ -갈락토스 연결의 중요성을 직접적으로 확인하였다.

[0148] 폐를 제외한 조직 세포의 형질도입 및 후속 생체내 유전자 전달에 있어  $\beta$ -갈락토스 연결의 역할을 평가하는 것은, 상피 세포에 대한 직접적인 접근을 허용하는 기도에 벡터가 송달될 때에는 존재하지 않는 송달 장벽 때문에 더 복잡하다. 유전자 치료의 많은 임상 적용에 있어 투여 경로로 간주되는 AAV9의 IV 투여에 후속하는 형질도입은 이 점을 묘사한다. 대부분의 AAV 혈청형에 기초한 벡터들의 IV 주입은 주로 간세포에 제한된 형질도입을 초래하며, 이는 간 동양혈관(sinusoid)의 유창이 혈관 장벽을 제거하기 때문이다. 우리 연구에서, AAV9는  $\beta$ -갈락토스의 제한된 수준에 불구하고 간세포를 효율적으로 형질도입한다. 더 높은 용량의 AAV9는 혈관 장벽을 극복하고, 고수준의 세포 표면  $\beta$ -갈락토스 글리칸을 함유하는 심장 및 골격근육 섬유를 효과적으로 형질도입할 수 있다. 수개의 군에서 주목된 바와 같이, AAV9는 독특하게 뉴런의 제한된 형질도입을 허용하는 훨씬 강화된 혈액 뇌장벽을 횡단한다. 일부 혈액 구조의 내피세포 표면상의  $\beta$ -갈락토스 연결을 갖는 글리칸의 존재는, 뇌에서 보인 바와 같이, 아마도 세포전달작용의 과정을 통해 이 퇴거를 촉진하는데 관련될 수 있는것으로 추측되었다. 다양한 구조의 O-연결 글리칸에 대해 입증된 AAV9의 결합은 혈액 또는 점막 표면에서와 같은 비-세포 매개된 당단백질과의 상호작용이 벡터의 생-분포 및 형질도입 프로파일을 조절하는 것을 제안한다.

[0149] AAV9에 대한 일차 수용체 동정은 또한 폐의 전도 기도에서의 형질도입을 증강시키기 위한 약학적 접근을 개발하는데 유용하다. 이 효과는 특히 NA-제형화 벡터가 망막과 같은 조직 또는 관절과 같은 폐쇄 공간으로 직접 투여될 수 있을 때, AAV9의 다른 표적을 위해 달성될 수 있을 것으로 기대된다.

[0150] 실시예 5 - AAV9 캡시드의 갈락토스 결합 도메인의 동정

[0151] 이 연구에서, 우리는 갈락토스에 결합하는데 필요한 AAV9 캡시드의 특정 아미노산을 동정하는 것을 목적으로 하였다. 위치 지정 돌연변이 생성(site-directed mutagenesis) 및 세포 결합 어세이 및 컴퓨터 리간드 도킹 연구에 의해, 우리는 20면체 대칭 3-배축 근처 돌출 바닥에서 포켓을 형성하는 갈락토스 결합에 요구되는 5개의 아미노산을 발견하였다. 이들 아미노산의 중요성은 또한 마우스 폐에서의 생체내 연구에 의해 확인되었다. AAV9의 갈락토스 결합에 필요한 상호작용의 동정은 벡터 조작에 있어 진전을 이끌 수 있다.

[0152] 이 연구에서, 우리는 AAV9 캡시드 상의 갈락토스 결합 모티프를 동정하려고 하였다. 우리는 시험관 내 및 생체내 양쪽에서 갈락토스 결합을 위한 특정 아미노산의 필요성을 결정하기 위해 일련의 알려진 돌연변이를 생성하였다. 이는 AAV9 캡시드의 대칭 3-배축을 둘러싸는 돌출 바닥에서 갈락토스 결합 포켓의 발견으로 이끌었으며, 이는 또한 분자 도킹 연구에 의해 확인되었다.

[0153] A. 물질 및 방법

[0154] 1. 세포주.

[0155] 모든 세포주는 아메리칸 타입 컬처 컬렉션(ATCC)으로부터 획득하였다. 모세포주 Pro-5, 시알산 결핍 세포주 Lec-2, 및 갈락토스-결핍 세포주 Lec-8을 포함하여, 세개의 상이한 차이니즈 햄스터 난소(CHO) 세포주가 결합 및 형질도입 시험에 사용되었다. 이들 세포들을 리보뉴클레오사이드 및 데옥시 리보뉴클레오사이드(Invitrogen)와 10% 소태아 혈청(FBS) 및 1% 페니실린 /스트렙토마이신으로 보충한  $\alpha$ -최소 필수 배지( $\alpha$ -MEM)에서 배양하였다.

[0156] 2. 동물

[0157] 수컷 C57BL/6 마우스(6-8 주령)은 찰스 리버 래보라토리즈에서 구입하고, 펜실베이니아대학의 번역 리서치 실험실



의 동물 시설에 수용하였다. 모든 동물 과정들은 펜실베이니아 대학의 실험동물 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받았다.

[0158] 3. AAV9 돌연변이 생성 및 소규모 벡터 제조.

[0159] 도 3a 내지 3b에 표시한 바와 같이, 비극성 알라닌으로의 돌연변이를 위해 AAV9 캡시드 서열의 특정 하전 또는 극성 아미노산을 선택하였다. 아질런트 테크놀로지사의 쿼체인지 라이트닝 위치 지정 돌연변이 생성 키트를 사용하여 돌연변이 생성을 수행하였다. 후속하여 시험관내 결합 및 형질도입 어세이에 사용하기 위한 소규모 돌연변이 벡터 제조를 위해, 6-웰 플레이트( $9.6\text{cm}^2$ )에서 AAV2 *rep* 유전자 및 돌연변이 AAV9 *cap* 유전자를 발현하는 플라스미드, AAV2 반전 말단 반복부 측면에 배치된 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터로부터 발현되는 ffLuc 이식 유전자를 발현하는 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드(pAdΔF6)를 사용하여 HEK293 세포의 삼중 세포감염을 수행하였다. 72시간 후에 2ml 전체 배지내 세포 및 상등액을 수확하고 3회 동결/해동 사이클을 수행한 후, 3500 x g 에서 30분간 원심분리하여 세포 찌꺼기를 제거하였다. 벡터들의 역가(GC/ml)는 정량 PCR로 측정하였다.

[0160] 4. 생체내 연구를 위한 벡터 제조 및 정제

[0161] [http://www.med.upenn.edu/gtp/vector\\_core/production.shtml](http://www.med.upenn.edu/gtp/vector_core/production.shtml)에 기술된 Penn 벡터에 의해 생체내 사용을 위한 AAV 벡터들을 제조하고 정제하였다. 닭 β-액틴 프로모터 유래하고 AAV2 반전 말단 반복부 측면에 배치된 nLucZ를 발현하는 플라스미드를 AAV2 *rep* 유전자, AAV9 또는 돌연변이 *cap* 유전자를 인코딩하는 플라스미드 및 아데노바이러스 헬퍼 플라스미드(pAdΔF6)와 함께 HEK293 세포의 삼중 세포감염에 의해 패키징하였다. 벡터들은 이오디시놀(iodixinol) 구매 원심분리로 정제하고 역가는 정량 PCR로 측정하였다.

[0162] 5. 세포 결합 및 형질도입 어세이.

[0163] 결합 어세이를 위해, Pro-5, Lec-2, 및 Lec-8 세포를  $150\text{cm}^2$  플라스크로부터 긁어내어 96-웰 플레이트에  $100\mu\text{l}$  냉 혈청-프리 α-MEM 내  $5 \times 10^5$  세포/웰로 시딩하였다. 벡터들은  $100\mu\text{l}$  냉 α-MEM 내  $5 \times 10^9$  GC/웰로 첨가하고, 4°C에서 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후, 세포들을  $200\mu\text{l}$  α-MEM로 3회 세척하고  $200\mu\text{l}$  PBS에 재현탁하였다. QIAamp DNA 미니 키트(QIAGEN)를 사용하여 전체 DNA를 추출하고, 세포-결합 벡터 GC를 정량 PCR로 측정하였다. 형질도입 어세이를 위해,  $10^5$  세포/웰을 흑색 벽의 투명 바닥 96-웰 플레이트에 밤새 시딩하였다. 배지를 제거한 후, ffLuc를 발현하는 AAV 벡터( $10^9$  GC)를  $100\mu\text{l}$  완전 배지 내 세포에 추가한 후 48시간 동안 37°C에서 인큐베이션하였다. 이후 ffLuc 발현은 웰당  $100\mu\text{l}$  α-MEM 내  $150\mu\text{g/ml}$  D-루시페린 기질을 추가하고 루미노미터로 상대 광 단위/초(RLU/s)를 측정함으로써 결정하였다. 돌연변이 벡터들의 생체의 형질도입 효율을 도 4a 및 4b에 나타내었다.

[0164] 6. 마우스 폐의 형질도입

[0165] 실시예 3에 기술된 바와 같이, 케타민/자일라진으로 마우스를 마취하고  $30\mu\text{l}$  PBS 내 100mU NA를 경비로 주입하였다. 1시간 후,  $10^{11}$  GC의 AAV9 또는 nLucZ를 발현하는 돌연변이 벡터를  $50\mu\text{l}$  PBS에서 경비로 송달하였다. 투여 후 21일에, 폐내 β-gal 발현을 진술한 방법으로 검사하였다(상기 인용된 Bell, 2005). 폐 섹션은 100x 배율에서 검사하였다.

[0166] 7. 분자 도킹 연구에 의한 AAV9 캡시드 상의 갈락토스 결합 부위의 예측

[0167] 분자 도킹은 AAV9 캡시드 상의 갈락토스 결합부위를 예측하기 위해 분자 도킹 웹서버 패치독(<http://bioinfo3d.cs.tau.ac.il/PatchDock/index.html>) (Schneidman-Duhovny, et al., Nucleic Acids Res 33 (Web Server issue): W363-7 2005)를 이용하여 수행하였다. 인간 갈락틴-3에 결합된 갈락토스에 대한 x-선 결정 구조, PDB accession' 1A3K를 사용하여 갈락토스에 대한 좌표를 제공하였다(Seetharaman, et al., J Biol Chem, 273 (21): 13047-52 (1998)). AAV9 x-선 결정 구조에 대한 좌표(미공표 데이터)를 사용하여, VIPERdb 올리고머 생성기([http://viperdbscripps.edu/oligomer\\_multi.php](http://viperdbscripps.edu/oligomer_multi.php))(Carrillo-Tripp, Nucleic Acids Res, 37 (Database issue): D436-42 (2009)를 사용한 삼량체를 구축하였다. AAV9 삼량체에 대한 출력 PDB 파일을 잘라표면 접근가능하고 바이러스 캡시드 표면 루프의 구조적 통합성을 유지시키던 아미노산을 포함시켰다. 분자 도킹을 위해 입력 파일로서 잘린 AAV9 삼량체 PDB 파일에 포함된 아미노산은 N262-Y277, L435-G475 및 F501-M559이었다. 분자 도킹은 무방향 방식으로 수행하여, 갈락토스와 상호작용할 것 같은 AAV9 캡시드 상의 부위를 평가

하였다. 도킹은 또한 잘린 AAV9 삼량체 및 시알산을 사용하여 수행하였다. 시알산 수용체와 복합된 말 비염 A 바이러스에 대한 X-선 결정구조 PDB accession' 2XB0를 사용하여 시알산에 대한 좌표를 제공하였다(Fry, et al. J Gen Virol, 91(Pt8): 1971-7 (2010)).

[0168] B. 결과

[0169] 1. N470는 AAV9 갈락토스 결합에 필요하다.

[0170] 갈락토스 결합에 관련될 수 있는 AAV9 캡시드의 잠재적 아미노산을 동정하기 위하여, AAV9의 캡시드 아미노산 서열을 AAV 1, 2, 6, 7, 및 8과 같은 갈락토스와 결합하지 않는 다른 혈청형의 아미노산 서열에 정렬하고 어느 아미노산이 AAV9에 독특한 것인지 결정하였다. 이 정렬에 기초하여, 극성 또는 하전 측쇄를 갖는 14개의 아미노산을 비-극성 알라닌으로의 돌연변이를 위해 선택하고 AAV9 결합에 대한 영향을 검사하였다(도 3a). 이들 돌연변이 캡시드 구조체를 사용하여 소규모 제조 방법에 의해 벡터를 제조하였고 야생형 유형 AAV9와 유사한 역가를 산출하였다.

[0171] 이후 돌연변이 벡터들을 세 개의 상이한 CHO 세포주에 첨가하여 그 결합능을 평가하였다. 모 CHO 세포주 Pro-5, 이 세포주의 체세포 글리코실화 돌연변이들, Lec-2 및 Lec-8를 이들 실험에 사용하였다. Lec-2 세포는 시티딘 모노포스페이트-시알산 골지 수송자가 결핍되며 따라서 그 표면 글리칸 상에 시알산 잔기가 없어, 가장 일반적인 전중단 사카라이드인 갈락토스의 노출을 허용한다. Lec-8 세포는 우리딘 디포스페이트-갈락토스 골지 수송자가 결핍되며 결과적으로 그 표면 글리칸 구조 상에 갈락토스 사카라이드가 없다. 이들 CHO 세포주에 대한 벡터 결합을 검사할 때, 예상된 결과가 AAV9에 대해 관찰되었다. Pro-5 세포상에 저수준의 결합이 관찰되었으나, AAV9 결합에 자유로운 말단 갈락토스 잔기를 가진 Lec-2 세포에서는 100배 증가를 나타내었다. Lec-8 세포에의 결합은 세포-표면 갈락토스의 결핍으로 인해 다시 기저 수준으로 감소되었다. 14개의 돌연변이 벡터들 중 13개가 Lec-2 세포 상에서 증가된 결합의 경향을 나타내었고, 이는 이들이 갈락토스 결합능을 보유하는 것을 제안한다. 그러나, 470번 위치의 아스파라긴 잔기의 알라닌으로의 돌연변이(N470A)는 Lec-2 세포에의 결합을 Pro-5 및 Lec-8 세포에서 관찰된 수준으로 감소시켰다. 이는 N470이 갈락토스의 AAV9 결합에 요구되는 것을 가리킨다.

[0172] 2. N470에 가까이 위치한 부가적 아미노산이 AAV9 갈락토스 결합에 요구된다.

[0173] N470을 구조적으로 둘러싸는 아미노산도 갈락토스 결합에 기여하는 지를 결정하기 위해 부가적 AAV9 돌연변이를 생성하였다. 이 두번째 세트의 돌연변이는 비리온의 조립된 20번째 구조에서 서로 가깝게 접촉하는 VR I, IV, V, 및 VII를 포함하여 캡시드의 다수의 확정된 가변 영역(VR)에 걸쳐 아미노산을 표적화하였다. N470에 가까운 19개의 아미노산이 알라닌으로의 돌연변이를 위해 선택되었고(도 3b), 벡터들을 소규모 방법에 의해 제조하였다. 전과 같이 모든 돌연변이들은 AAV9 대조와 유사한 고 역가 벡터를 산출하였으며, 이는 돌연변이중 아무것도 캡시드 조립에 부정적인 영향을 미치지 않는 것을 제안한다. 이후 돌연변이 벡터들에 대해 Pro-5, Lec-2, 및 Lec-8 세포에 대한 결합능을 검사하였다(도 3b). 다시, AAV9는 Pro-5 및 Lec-8 세포에 비교하여 Lec-2 세포에 대한 결합에 있어 100배 증가의 예상된 결과를 보여주었다. 테스트된 돌연변이들 대부분 역시 이 표현형을 나타내었으나, 4개의 돌연변이는 Lec-2 세포에 대한 결합의 소실을 입증하였다. D271, N272, Y446, 또는 W503의 돌연변이는 모두 AAV9의 갈락토스 결합능을 폐지하였다.

[0174] 이들 19개의 알라닌 돌연변이들과 함께, 네 개의 다른 AAV9 위치 지정 돌연변이가 수행되었다. 비극성 아미노산 A472 및 V473는 N470 바로 옆에 위치하며 갈락토스 결합에 잠재적으로 역할할 수 있다. 이 아이디어를 검사하기 위해, A472 및 V473를 모두 극성 아미노산 세린 또는 하전 아미노산 아스파르트산으로 돌연변이시켰다. 소규모 방법에 의한 이들 벡터들의 구축은 성공적이었으며, 야생형 AAV9와 유사한 역가가 성취되었다. CHO 세포에 대한 이들 벡터들의 결합을 검사할 때, 이들 네 개의 모든 돌연변이(A472S, A472D, V473S, 및 V473D)가 Lec-2 세포 결합능을 잃었음이 관찰되었다. 이는 이들 비극성 잔기가 갈락토스 결합 영역의 형성에 필수적임을 제안하는데, 이들 영역에 극성 또는 전하를 첨가하는 것이 갈락토스와의 상호작용을 방해하기 때문이다.

[0175] 3. AAV9 돌연변이의 갈락토스 결합은 시험관 내 형질도입 효율을 나타낸다.

[0176] AAV9 돌연변이의 시험관내 형질도입을 평가하기 위해, 개통벌레 루시페라제(ffLuc)를 발현하는 벡터들을 Pro-5 및 Lec-2 세포에 첨가하였다. 갈락토스 결합을 잃은 5개의 돌연변이들(N470A, D271A, N272A, Y446A 및 W503A) 및 갈락토스 결합을 보유하는 두 개의 돌연변이(S469A 및 E500A) 및 AAV9 대조 벡터를 세포(MOI= 104)에 첨가하고, 48시간 후 ffLuc 발현을 평가하였다. 예상된 바와 같이, 갈락토스 결합능이 없는 돌연변이들은 AAV9, S469A 및 E500A에 비교하여 Lec-2 세포 형질도입에 있어 3배 이상의 감소를 나타내었다. W503A 및 N272A는 백그라운드 바로 위의 최저 형질도입 수준을 나타내었다. Pro-5 세포는 결합에 대한 풍부한 말단 갈락토스 잔기가 없기 때

문에, 이들 세포 상에서 전체 형질도입은 2배 내지 5배 낮았다. 그러나 여전히 Lec-2 세포에서 결정된 것과 유사한 형질도입 경향이 여전히 관찰되었다. 갈락토스 결합이 결핍된 돌연변이들은 최저 형질도입을 보였고, 갈락토스 결합을 보유한 두 개의 돌연변이들(S469A 및 E500A) 및 AAV9 대조 벡터는 더 높은 수준의 형질도입을 나타내었다. 그러나 E500A는 Pro-5 세포 상에서 AAV9 보다 약 2배 높은 발현을 보였으며, 이는 이들 벡터가 유리한 세포내 상호작용을 갖는 것을 제한한다.

[0177] 4. 갈락토스 결합이 결핍된 돌연변이 벡터들은 전도 기도 상피를 형질도입하지 않는다.

[0178] AAV9 벡터를 경비 투여하기 전 마우스에 뉴라미니다제(NA)의 경비 송달은 폐 전도 기도 상피의 효율적인 AAV9 형질도입을 허용한다. 이는 NA가 기도 세포의 글리칸 표면에서 말단 시알산 잔기를 절단하여 그 밑의 갈락토스 잔기를 노출시키고 AAV9 결합 및 형질도입이 가능하게 되기 때문이다. 갈락토스 결합이 결핍된 돌연변이 벡터들이 전도 기도 상피를 생체 내 형질도입할 수 있는지 여부가 연구되었다. 100mU NA 주입 1시간 후 마우스에 핵-표적 LacZ(nLacZ)을 발현하는 벡터들( $10^{11}$  GC)을 경비로 송달하고, 21일 후 폐를 제거하여  $\beta$ -gal 발현에 대해 염색하였다. 우리의 전 연구에 기초하여 예상된 바와 같이 AAV9 대조 벡터는 효율적인 전도 기도 형질도입을 나타내었다. 갈락토스 결합능을 상실한 다섯 개의 돌연변이(N470A, D271A, N272A, Y446A, 및 W503A)는 전도 기도 상피를 형질도입시킬 수 없었고, 추가적으로 갈락토스 생체 내 결합 불능을 나타내었다. 갈락토스 결합을 보유하는 S469A 및 E500A 돌연변이들은 AAV9와 유사한 효율적인 전도 기도 형질도입을 나타내었다.

[0179] 5. 결합에 필요한 아미노산들은 갈락토스와 상호작용을 지지하는 AAV9 캡시드 상에 포켓을 형성한다.

[0180] AAV9의 구조에 대한 지식을 이용하여, 캡시드 표면 상의 갈락토스 결합에 중요한 아미노산의 위치를 결정하였다. 분자 도킹 접근을 사용하여 AAV9 VP 삼량체 상의 갈락토스 결합 부위를 동정하였다. 상위 100개의 도킹 결과를 평가하여, 캡시드의 내부 표면 상에 갈락토스를 위치시킨 도킹 해법은 폐기하였다. 남은 13개의 해법은 모두 갈락토스를 N470와 가깝게 접촉하게 도킹하였으며, 13개 중 12개의 해법은 갈락토스를 N470 및 W503 사이에 도킹하였다. N470, D271, N272, Y446, 및 W503은 대칭의 3-배축을 둘러싸는 돌출부의 바닥에 포켓을 형성한다. 포켓은 2- 및 5-배축을 대면하는 돌출부의 외부 표면 및 VR I에 의해 형성된 2- 및 5-배축 사이에 작은 표면 돌출부에 의해 형성된다. AAV9는 결합 포켓을 함유하며, 이는 갈락토스 잔기가 어떻게 이 영역에 맞춰지는지를 더 묘사한다. 갈락토스 결합을 위해 중요한 것으로 밝혀진 비극성 A472 및 V473 아미노산은 결합 포켓의 바닥에 위치하고 따라서 갈락토스 사카라이드의 성공적인 삽입을 허용할 수 있다. 갈락토스 결합 부위의 흥미로운 특징은 결합에 중요한 것으로 보이는 아미노산들이 두 개의 상이한 단량체에서 유래한다는 것이고, 여기에서 Y446, N470, A472, 및 V473는 결합 포켓의 마루를 이루고, 결합 포켓의 지붕을 이루는 아미노산들 D271, N272 및 W503은 다른 기여 단량체에서 유래한다. 이는 오직 정확하게 조립된 캡시드만이 수용체에 결합하도록 보증하는 기전을 제공할 수 있다. 중요하게, 갈락토스 결합 포켓의 동정에 후속하여 시알산 분자를 동일한 캡시드 영역 내로 도킹하는 시도는, 입체 장애로 인해 이 글리칸이 포켓 내로 수용될 수 없다는 것을 보여주었다. 이러한 관찰은 AAV9에 의한 시알산 결합의 결핍과 일치한다.

[0181] C. 토의

[0182] AAV9의 세포 표면 글리칸 상호작용을 연구하는 전 실험들은 이 벡터가 갈락토스를 세포 수용체로서 사용함을 입증하였다. Pro-5, HEK293 및 Huh-7 세포를 포함하는 다수 세포주의 AAV9 결합 및 형질도입 분석은 NA를 이용한 세포 표면 글리칸으로부터 말단 시알산 잔기의 효소적 제거가 AAV9 결합의 상당한 증가를 이끔을 나타내었다. 이 증가는 AAV9 결합 및 형질도입을 촉진하는 하부 갈락토스 사카라이드의 노출에 인한 것이다. CHO 글리코실화 돌연변이 세포주 Lec-2 및 Lec-8, 및 렉틴 경쟁 어세이를 이용한 추가 연구는 갈락토스의 이러한 역할을 더욱 확인하였다. 부가적으로, 마우스에 경비 송달된 NA는 기도 세포의 표면 상에 말단 갈락토스 잔기의 증가, 및 이에 따른 AAV9 형질도입의 증가를 이끈다.

[0183] 본 연구의 목적은 갈락토스 결합에 요구되는 AAV9 캡시드의 아미노산을 동정하는 것이며, 우리는 그 아미노산이 N470, D271, N272, Y446 및 W503을 포함하는 것으로 결정하였다. AAV9의 갈락토스 결합 부위를 다른 갈락토스 결합 단백질과 비교시, 아미노산 구성에 있어 유사성이 발견되었다. 당과 방향성 잔기와의 상호작용은 탄수화물-결합 단백질의 결합부위에서 통상적이며 갈락토스-특이적 단백질에서도 발견되었다(Elgavish, et al., 1997, *Trends Biochem Sci* **22**(12): 462-7.; Sujatha, et al., 2005, *Biochemistry* **44**(23): 8554-62). 이들 잔기들은 사카라이드와 소수성 상호작용을 형성하며 또한 갈락토스를 글루코스와 같은 다른 당으로부터 구분하는데 관련된다(Elgavish, 1997; Sujatha, 2005). 이는 두 개의 방향성 잔기 Y446 및 W503을 함유하는 우리의 AAV9에 대한 매핑된 결합부위와도 일치한다. 부가적으로 많은 갈락토스 결합 단백질은 아스파라긴, 아스파르트산 및 글루타민을 포함하여 당의 하이드록실기와 수소결합을 형성함으로써 갈락토스 결합에 기여하는 것으로 보이는 극성

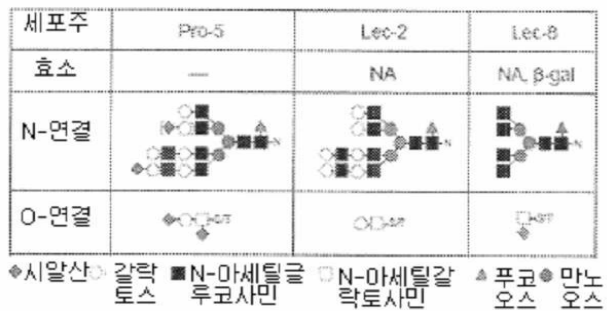
및 하전 아미노산을 함유한다(Montfort, et al., 1987, *J Biol Chem* **262**(11): 5398-403; Elgavish, 1997). AAV9 캡시드의 N470, D271 및 N272는 갈락토스와 유사한 상호작용을 형성하는 것으로 보인다. 다른 AAV 혈청형의 수용체 결합 도메인의 위치도 역시 결정되었다. AAV2의 HS 결합 부위는 5개의 아미노산으로 매핑되었다: R484, R487, R585, R588 및 K532(Kern, 2003 *J Virol* **77**(20): 11072-81.; Opie, 2003, *J Virol* **77**(12): 6995-7006). 이들 아미노산은 캡시드의 각 3-배 대칭-관련된 돌출부의 내면 상의 기초 패치를 형성한다. HS에 결합하는 것으로 보여진 AAV6 역시 AAV2에 대해 관찰된 바와 유사한 위치에, R485, R488, K528 및 K533을 포함하여 유사한 염기성 가지의 아미노산들을 함유하였다(Ng, et al., 2010, *J Virol* **84**(24): 12945-57). 또한, 돌연변이 생성 연구를 통해, K493, K459, R576 및 K531은 모두 AAV6 HS 결합에 필수적인 것으로 나타났고 이웃 위치에 존재한다. 3-배축을 둘러싸는 돌출부의 바닥에 위치하는 AAV9의 갈락토스 결합 도메인은 3-배축을 대면하는 안쪽 표면에 위치하는 AAV2 HS 결합 영역에 비교하여 이 구조의 반대 면 상에 있다. AAV6 HS 결합 잔기도 역시 돌출부의 바깥 벽에 위치하나 AAV9 갈락토스 결합 잔기에 비교하여 VR III 및 20면체 2-배축에 더 가까운 맞은편 상에 존재한다. 이러한 관찰은 나아가 상이한 AAV 혈청형에 대한 수용체 인식에서 아미노산 및 3-배축을 둘러싸는 돌출부를 조립하는 구조와 이 영역에 인접하는 잔기의 중요성을 묘사한다. 이는 또한 AAV 캡시드, 특히 표면 노출된 돌출부의 공통적인 구조적 다양성이 진화되어 각각의 형질도입 표현형의 중요한 결정자인 성공적인 감염을 위한 상이한 표면 분자의 이용을 가능케 하였다는 제안을 지지한다.

- [0184] AAV9는 잠재적으로 수용체 상호작용으로 설명될 수 있는 독특한 특성을 보인다. 예를 들면, AAV9는 정맥 주사후 혈액뇌장벽을 넘어 성체 및 신생 마우스 및 고양이의 척수내 운동 뉴런, 신생 마우스 뇌 내의 뉴런 및 성체마우스 뇌 내의 성상세포를 형질도입시킬 수 있다. 또한 AAV9는 비인간 영장류에서 검사 시 척수내 운동 뉴런 및 주로 뇌 내의 교질세포를 형질도입시켰다. 형광 선택 염색에 의해, 우리는 이전에 마우스 뇌 내의 혈관 표면에서 풍부한 갈락토스 발현을 관찰하였다. AAV9는 갈락토스를 사용하여 혈관계를 건너 세포전달작용을 촉진시킴으로써 중추신경계의 진입을 허용할 가능성이 있다. 갈락토스 결합 도메인의 다른 AAV 혈청형의 캡시드 상으로의 조작은 AAV9의 유전적 표현형의 전달 및 유전자 치료를 위한 새로운 벡터들의 개발을 허용할 것이다.
- [0185] 실시예 6 - NA 전-처리하는 마우스 비기도(nasal airway)에서의 AAV-매개 fLuc 발현을 개선한다.
- [0186] C57BL6 마우스(6~8 주령, 중량 20~25g, 수컷)는 케타민/자일라진 혼합물로 마취하였다. 이후 마우스에 비브리올레라 유래 뉴라미니다제(NA)(Sigma, N7885) 5 $\mu$ l을 각 비공마다 투여하였다(전체 NA 80~100mU). NA 전-처리후 10분 이내, 닭  $\beta$ -액틴 프로모터의 전사 조절하에서 개뿔벌레 루시페라제(ffLuc)를 발현하는 AAV9 벡터( $10^{11}$  GC 총 용량)를 PBS 내 희석한 두 개의 15 $\mu$ l 분취물로 주입하였다(비공당 15 $\mu$ l). 마우스를 회복하도록 하고, 벡터 접종후 24시간 후의 빠른 시간에 이식 유전자 발현(ffLuc)을 모니터하였다.
- [0187] 발광 이미지를 취할 때 마우스를 마취하고 루시페린을[양 비공내 비공당 15mg/ml D-루시페린 용액(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) 15 $\mu$ l] 투여하고, 루시페린 적용 5분 이내에 발현을 영상화하였다. 마우스는 3, 7, 14, 21 및 28일에서의 후속 영상화 과정을 위해 회복하도록 하였다.
- [0188] 결과는 도 5의 막대 차트에 도시된다. 이 데이터는 뉴라미니다제의 전-처리에 후속하는 비기도 내 개뿔벌레 루시페라제 유전자 발현이 약 2배 개선되는 것을 보여준다. 이러한 차이는 두 개의 별개의 경우에서 관찰되었다. 또한, 뉴라미니다제의 첨가가 유전자 발현의 신속한 개시 및 AAV9 벡터 주입 24시간 내 관찰되는 최고 유전자 발현을 초래하며, 이는 일주일 내 정상수준으로 감소되었다.
- [0189] 본 명세서에 인용된 모든 간행물, 특허문헌 및 유전자뱅크(GeneBank) 서열은 참조로 본 명세서에 삽입된다. 본 발명은 특히 바람직한 구현예를 참조하며 기술되었으나, 본 발명의 의미 내에서 변경이 이루어질 수 있다는 것이 이해되어야 할 것이다.

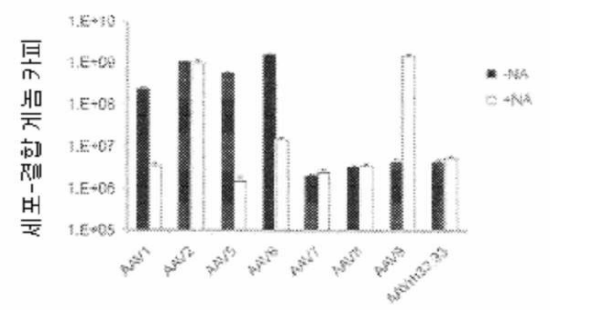


도면

도면1a



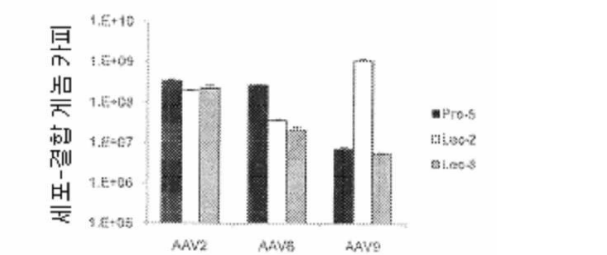
도면1b



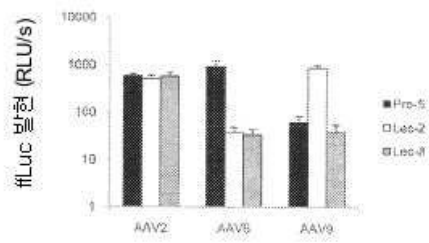
도면1c

번호	글리칸 구조	평균 RFU	4개의 변이	변동수	글리칸 모식도
415	Fucosyl-2Galβ1-4(Fucose1-3)GlcNAcβ1-2GalNAc-Sp14	833	75	12	
297	Galβ1-3(Neu5Ac2-3Galβ1-4(Fucose1-3)GlcNAcβ1-6)GalNAc-Sp14	580	110	19	
428	GalNAc1-3(Fucose1-2)Galβ1-3GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14	519	120	38	
399	Galβ1-4(Fucose1-3)GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14	482	84	17	
417	GalNAc1-3(Fucose1-2)Galβ1-4(Fucose1-3)GlcNAcβ1-3GalNAc-Sp14	307	29	6	

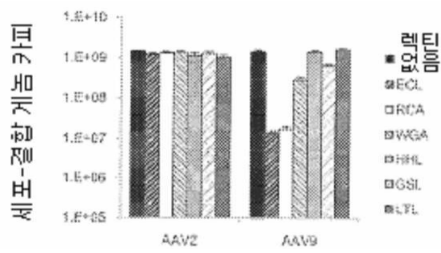
도면2a



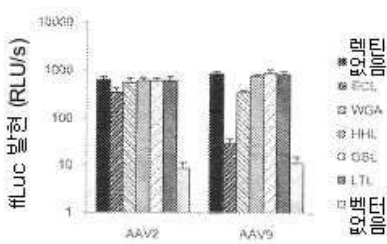
도면2b



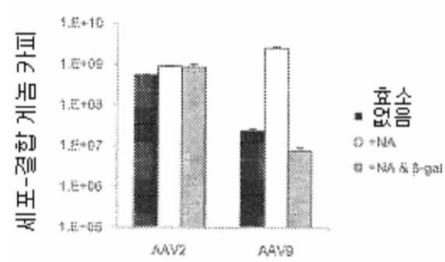
도면2c



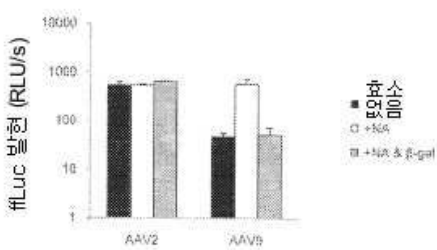
도면2d



도면2e

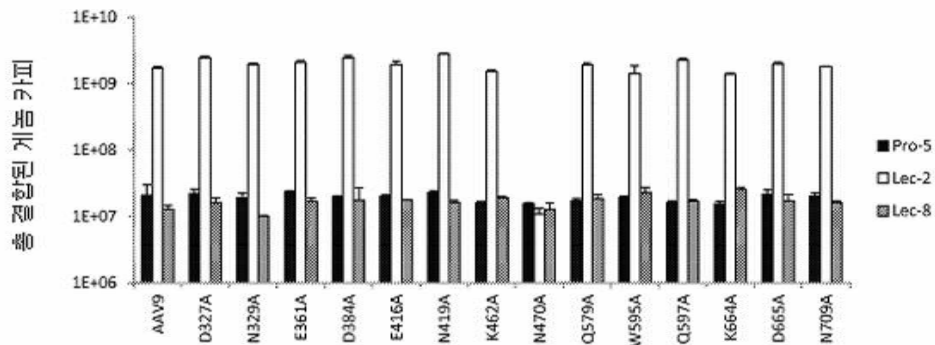


도면2f

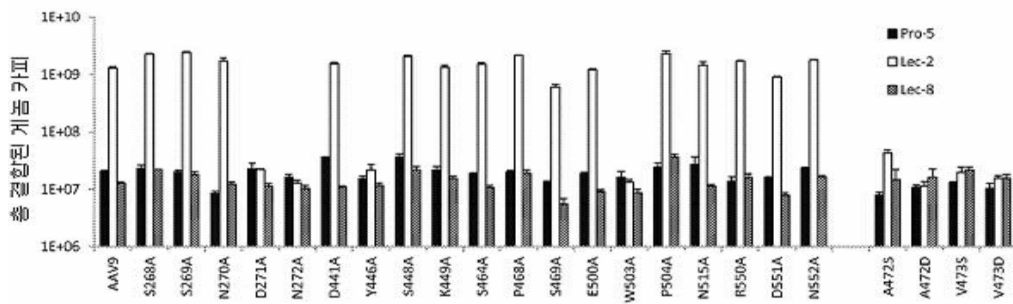




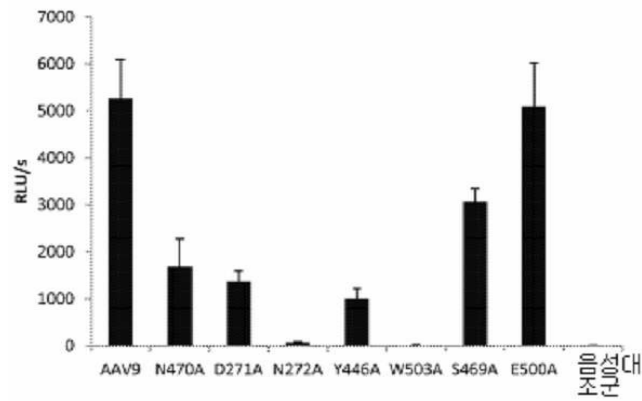
도면3a



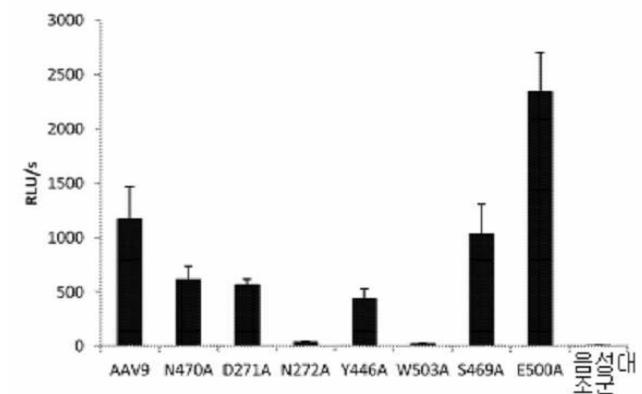
도면3b



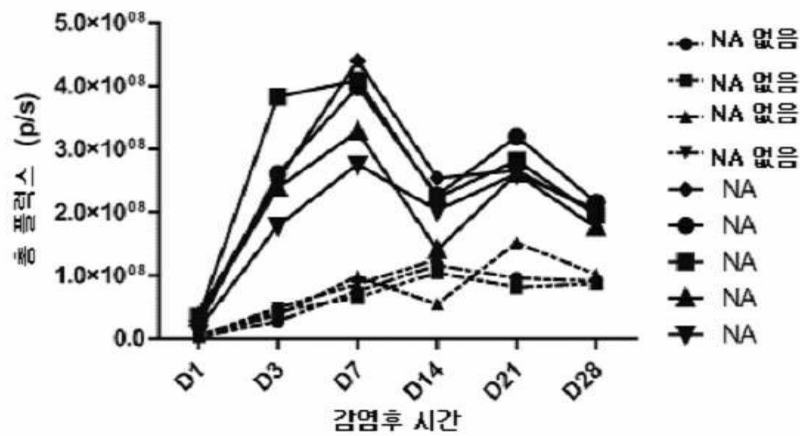
도면4a



도면4b



도면5



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania  
Wilson, James M.  
Bell, Christie L.  
Vandenberghe, Luc H.

<120> Compositions and Methods for Altering Tissue Specificity and  
Improving AAV9-Mediated Gene Transfer

<130> UPN-X5836PCT

<150> US 61/443,879

<151> 2011-02-17

<160> 4

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 736

<212> PRT

<213> Unknown

<220><223> capsid of hu.14/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
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
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> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> F primer based on homo sapiens

<400> 2

agcaatagca tcacaaatTT caca

25

<210> 3

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> R primer based on homo sapiens

<400> 3

ccagacatga taagatacat tgatgagtt

29

<210> 4

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> TaqMan probe based on homo sapiens

<400> 4

agcatttttt tcaatgcatt ctagttgtgg tttgtc

36