



공개특허 10-2024-0090694

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0090694  
(43) 공개일자 2024년06월21일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C07K 14/005* (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)  
*A61P 7/04* (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C07K 14/005* (2013.01)  
*A61K 48/005* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2024-7016862(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2014년07월22일  
심사청구일자 없음
- (62) 원출원 특허 10-2022-7009734  
원출원일자(국제) 2014년07월22일  
심사청구일자 2022년04월20일
- (85) 번역문제출일자 2024년05월21일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2014/047670
- (87) 국제공개번호 WO 2015/013313  
국제공개일자 2015년01월29일
- (30) 우선권주장  
61/857,161 2013년07월22일 미국(US)  
61/985,365 2014년04월28일 미국(US)

- (71) 출원인  
더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아  
미국 펜실베니아 필라델피아 시빅 센터 블러바드  
3401 (우: 19104)
- (72) 발명자  
하이, 캐서린 에이.  
미국 19066 펜실베니아 메리온 스테이션 그린웨이  
레인 201  
야지씨오글루, 무스타파 엔.  
터키 카이로바/코카에리 소크. 에이-3 블로크  
디:7 450 구겔테페 코누트라리 악세 마할레시  
안젤라, 자비에르  
미국 19146 펜실베니아 필라델피아 몬트로즈 스트  
리트 1806
- (74) 대리인  
특허법인(유)남아이피그룹

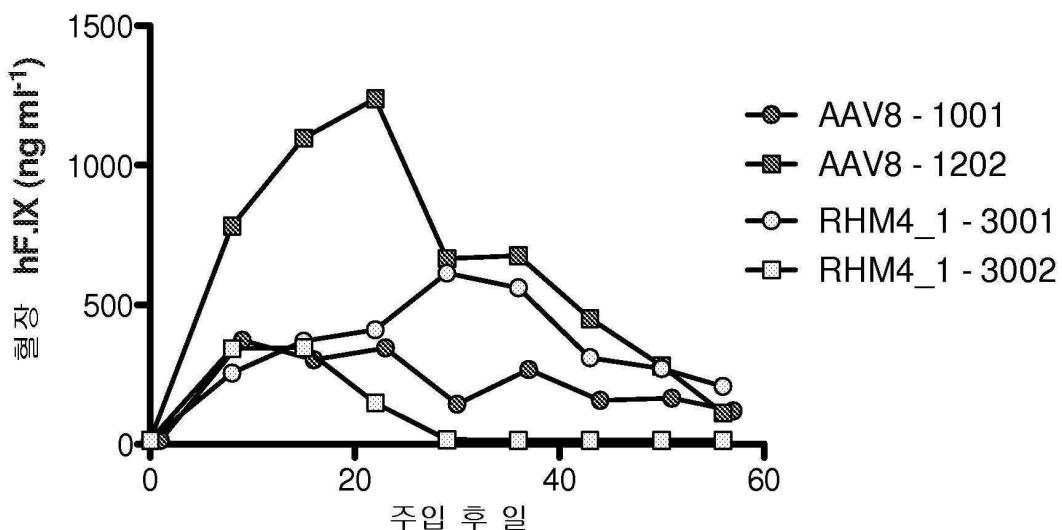
전체 청구항 수 : 총 56 항

(54) 발명의 명칭 변종 AAV 및 조성물, 세포, 기관 및 조직으로의 유전자 전이를 위한 방법 및 용도

### (57) 요약

본 발명은 아데노-관련 바이러스 (AAV) 혈청형 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터, 및 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 매개된 유전자 전이 방법 및 용도에 관한 것이다. 특히, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터는 치료학적 단백질 및 웨티드를 엔코딩하는 유전자의 발현 (전사)을 위한 세포, 조직 또는 기관에 대한 폴리뉴클레오티드, 및 억제 핵산 서열로서 작용하거나 이로 전사되는 폴리뉴클레오티드를 표적으로 한다.

**대 표 도** - 도6



(52) CPC특허분류

*A61P 7/04* (2018.01)  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*C12N 2750/14122* (2013.01)  
*C12N 2750/14143* (2013.01)  
*C12N 2830/008* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서의 아미노산 치환, 또는 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)에서 리신의 아르기닌으로의 아미노산 치환을 갖는 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 잔기가 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서 A, V, P 또는 N 아미노산에 상응한 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 서열이 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 서열이 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기 중 임의의 2개를 갖는 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 5

제 1항에 있어서, 서열이 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기 중 임의의 3개를 갖는 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 6

제 1항에 있어서, 서열이 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 및 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는 AAV 캡시드 서열.

#### 청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)을 포함하는 재조합 AAV 입자.

#### 청구항 8

제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)을 포함하는 재조합 AAV 입자로서, 입자가 벡터 게놈을 캡시드화시킨 재조합 AAV 입자.

#### 청구항 9

제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)을 포함하는 재조합 AAV 입자로서, 입자는 AAV 벡터 게놈을 캡시드화시킨 재조합 AAV 입자.

**청구항 10**

제 8항 또는 제 9항에 있어서, AAV 벡터 게놈이 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 AAV 입자.

**청구항 11**

이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포유동물 또는 포유동물의 세포로 전달 또는 전이시키는 방법으로서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV 입자를 상기 포유동물 또는 상기 포유동물의 세포에 투여하여 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포유동물 또는 포유동물의 세포 내로 전달 또는 전이시키는 것을 포함하는 방법.

**청구항 12**

제 11항에 있어서, 재조합 AAV 입자가 제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열, 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10), 또는 제 7항 내지 제 10항 중의 어느 한 항의 재조합 AAV 입자를 포함하는 방법.

**청구항 13**

제 11항 또는 제 12항에 있어서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 부여하는 발현 조정 요소에 작동가능하게 연결된 방법.

**청구항 14**

단백질 발현 또는 기능 결함이 있는 포유동물을 치료하는 방법으로서, (a) 결함 단백질 발현 또는 기능을 수정할 수 있는 폴리펩티드를 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 재조합 벡터 게놈을 포함하는 재조합 AAV 입자를 제공하는 단계로서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열이 상기 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 부여하는 발현 조정 요소에 작동가능하게 연결된 단계; 및 (b) 상당량의 재조합 AAV 입자를 포유동물에 투여하는 단계로서, 상기 폴리펩티드가 포유동물에 발현되는 단계를 포함하는 방법.

**청구항 15**

제 11항, 제 12항 또는 제 14항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가

```

MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNGL
DKGEPVNAADAAALEHDKAYDQLQAGDNPYLRYNHADAEFQERLQEDTSFGGNLGRAV
FQAKKRVLGPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRLNFGQTGDS
ESVPDPQPIGEPPAGPSGLSGTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
ITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQR
LINNNWGFPRPKRLNFKNFNIQVKEVTNQNEGTKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQG
CLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHS
SYAHSQSLLRMLNPLIDQYLYYLNSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPC
YRQQRVSTTLSQNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMF
GKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALP

GMVVQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQ
AKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQTTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRP
IGTRYLTRNL,

```

또는 이에 대한 1-50개 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 90% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 VP1 서열;

TAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKQQPAKKRLNFGQTGDSESVPDPQPIGEPPAGPSGLG  
 SGTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYK  
 QISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNI  
 QVKEVTQNEGTKTIANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTL  
 NNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYL  
 YYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAW  
 TGATKYHLNGRDSLNVPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTS  
 EEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKI  
 PHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEW  
 ELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL,

또는 이에 대한 1-50개 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 90% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 VP2 서열; 및 /또는

MAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQIS  
 NGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDWQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNEGTKTIANNLSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIQYGYLTLNN  
 GSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYLYY  
 LSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTG  
 ATKYHLNGRDSLNVPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEE  
 EIKTTNPVATEQYGVVADNLQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPH  
 TDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWL  
 QKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL,

또는 이에 대한 1-50개 아미노산 치환, 결실 또는 부가와 90% 또는 그 초과의 서열 동일성을 갖는 VP3 서열을 포함하는 방법.

#### 청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서의 아미노산 치환, 또는 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)에서 리신의 아르기닌으로의 아미노산 치환을 포함하는 방법.

#### 청구항 17

제 16항에 있어서, 잔기가 VP1 캡시드 서열의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서 A, V, P 또는 N 아미노산에 상응하는 방법.

#### 청구항 18

제 15항에 있어서, VP1 캡시드 서열이 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는 방법.

#### 청구항 19

제 15항에 있어서, VP1 캡시드 서열이 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기 중 임의의 2개를 갖는 방법.

#### 청구항 20

제 15항에 있어서, VP1 캡시드 서열이 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미

노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기 중 임의의 3개를 갖는 방법.

### 청구항 21

제 15항에 있어서, VP1 캡시드 서열이 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 및 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는 방법.

### 청구항 22

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2, 또는 VP3 서열과 95% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 지닌 AAV를 포함하는 방법.

### 청구항 23

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2 또는 VP3 서열과 96% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 24

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2 또는 VP3 서열과 97% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 25

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2 또는 VP3 서열과 98% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 26

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2 또는 VP3 서열과 99% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 27

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 하나 이상의 VP1, VP2 또는 VP3 서열과 99.5% 또는 그 초과의 동일성을 갖는 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 28

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 재조합 AAV 입자가 도 3에 제시된 AAV-Rh74, AAV-Rh74에 관련된 AAV 벡터 또는 AAV-Rh74, 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)의 VP1, VP2, 또는 VP3 서열을 포함하는 방법.

### 청구항 29

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 상기 단백질이 포유동물에 대한 치료학적 효과를 갖는 수준으로 발현되는 방법.

### 청구항 30

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터가 Rh74, AAV2 또는 AAV8 혈청형과 비교하여 간세포에 대한 증가된 향성(tropism)을 갖는 방법.

### 청구항 31

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 이종 폴리뉴클레오티드 서열 또는 상기 단백질이 상기 포유동물의 세포, 조직 또는 기관에서 발현되는 방법.

**청구항 32**

제 31항에 있어서, 세포가 분비 세포를 포함하는 방법.

**청구항 33**

제 31항에 있어서, 세포가 내분비 세포를 포함하는 방법.

**청구항 34**

제 31항에 있어서, 세포가 간세포, 신경 세포, 아교 세포, 망막 세포, 상피 세포, 폐 세포 또는 전능성, 만능성 또는 다능성 줄기 세포를 포함하는 방법.

**청구항 35**

제 31항에 있어서, 상기 포유동물의 조직 또는 기관이 간, 뇌, 중추신경계, 척수, 눈, 망막 또는 폐를 포함하는 방법.

**청구항 36**

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 불충분한 양의 단백질, 또는 결합 또는 비정상 단백질을 생성하는 방법.

**청구항 37**

제 36항에 있어서, 단백질이 CFTR (낭성 섬유종 막횡단 조절 단백질), 혈액 응고 인자 (인자 XIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 VIII, 인자 VIIa, 단백질 C, 등), 기능 획득 혈액 응고 인자, 항체, 망막색소상피-특이적 65 kDa 단백질 (RPE65), 에리트로포이에틴, LDL 수용체, 지질단백질 리파제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제,  $\beta$ -글로빈,  $\alpha$ -글로빈, 스펙트린,  $\alpha$ -안티트립신, 아데노신 테아미나제 (ADA), 금속 수송체 (ATP7A 또는 ATP7), 설파미다제, 라이소좀 축적 병 관련 효소 (ARSA), 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -25 글루코세 레브로시다제, 스팽고마이엘리나제, 라이소좀 핵소사미니다제, 분지쇄 케토산 테하드로게나제, 호르몬, 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 1 또는 2, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 신경 성장 인자, 신경영양 인자-3 및 -4, 뇌-유래 신경영양 인자, 아교세포 유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 사이토킨,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 인터페론- $\gamma$ , 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨 12, 과립구-대식세포 집락자극인자, 림포 톡신, 자살 유전자 생성물, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제, 시토신 테아미나제, 디프테리아 독소, 시토크롬 P450, 테옥시시티딘 키나제, 종양 괴사 인자, 약물 내성 단백질, 종양 억제제 단백질 (예를 들어, p53, Rb, Wt-1, NF1, 폰 힙펠-린도우 (VHL), 선종성 결장풀립증 (APC)), 면역조절 특성을 갖는 웨პ티드, 면역허용원성 또는 면역원성 웨პ티드 또는 단백질 트레지토프(Tregitope) 또는 hCDR1, 인슐린, 글루코키나제, 구아닐레이트 시클라제 2D (LCA-GUCY2D), Rab 에스코트 단백질 1 (범맥락막위축), LCA 5 (LCA-레베르실린(Lebercillin)), 오르니틴 케토산 아미노트랜스퍼라제 (우곡상 위축), 레티노쉬신(Retinoschisin) 1 (X-연결된 망막층간분리 (Retinoschisis)), USH1C (아서 증후군 1C), X-연결된 색소성 망막염 GTP아제 (XLRP), MERTK (RP의 AR 형: 색소성 망막염), DFNB1 (코넥신 26 난청), ACHM 2, 3 및 4 (색맹), PKD-1 또는 PKD-2 (다낭 신장병), TPP1, CLN2, 라이소좀 축적 병의 원인이 되는 유전자 생성물 (예를 들어, 설파타제, N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 카텝신 A, GM2-AP, NPC1, VPC2, 스팽고리피드 활성인자 단백질, 또는 게놈 편집을 위한 하나 이상의 아연 핑거 누클레아제, 또는 게놈 편집을 위한 복구 주형으로서 사용된 도너 서열을 포함하는 방법).

**청구항 38**

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열이 폴리웨პ티드, 웨პ티드 또는 단백질을 엔코딩하는 유전자를 포함하는 방법.

**청구항 39**

제 38항에 있어서, 유전자가 CFTR (낭성 섬유종 막횡단 조절 단백질), 혈액 응고 인자 (인자 XIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 VIII, 인자 VIIa, 단백질 C, 등), 기능 획득 혈액 응고 인자, 항체, 망막색소상피-특이적 65 kDa 단백질 (RPE65), 에리트로포이에틴, LDL 수용체, 지질단백질 리파제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제,  $\beta$ -글로빈,  $\alpha$ -글로빈, 스펙트린,  $\alpha$ -안티트립신, 아데노신 테아미나제 (ADA), 금속 수송체 (ATP7A 또는 ATP7),

설파미다제, 라이소좀 축적 병 관련 효소 (ARSA), 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -25 글루코세 레브로시다제, 스팽고마이엘리나제, 라이소좀 핵소사미니다제, 분지쇄 케토산 데히드로게나제, 호르몬, 성장 인자, 인슐린-유사 성장 인자 1 또는 2, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 신경 성장 인자, 신경영양 인자 -3 및 -4, 뇌-유래 신경영양 인자, 아교세포 유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 사이토킨,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 인터페론- $\gamma$ , 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨 12, 과립구-대식세포 집락자극인자, 램포 톡신, 자살 유전자 생성물, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제, 시토신 테아미나제, 디프테리아 독소, 시토크롬 P450, 테옥시시티딘 키나제, 종양 괴사 인자, 약물 내성 단백질, 종양 억제제 단백질 (예를 들어, p53, Rb, Wt-1, NF1, 폰 힙펠-린도우 (VHL), 선종성 결장풀립증 (APC)), 면역조절 특성을 갖는 웨티드, 면역허용원성 또는 면역원성 웨티드 또는 단백질 트레지토프, 또는 hCDR1, 인슐린, 글루코키나제, 구아닐레이트 시클라제 2D (LCA-GUCY2D), Rab 에스코트 단백질 1 (범맥락막위축), LCA 5 (LCA-레베르실린), 오르니틴 케토산 아미노트랜스퍼라제 (우곡상 위축), 레티노쉬신 1 (X-연결된 망막충간분리), USH1C (아셔 증후군 1C), X-연결된 색소성 망막염 GTP아제 (XLRP), MERTK (RP의 AR 형: 색소성 망막염), DFNB1 (코넥신 26 난청), ACHM 2, 3 및 4 (색맹), PKD-1 또는 PKD-2 (다낭 신장병), TPP1, CLN2, 라이소좀 축적 병의 원인이 되는 유전자 생성물 (예를 들어, 설파타제, N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 카텝신 A, GM2-AP, NPC1, VPC2, 스팽고리피드 활성인자 단백질, 또는 게놈 편집을 위한 하나 이상의 아연 평거 누클레아제, 또는 게놈 편집을 위한 복구 주형으로서 사용된 도너 서열을 포함하거나 엔코딩하는 방법.

#### 청구항 40

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열이 억제 핵산을 포함하는 방법.

#### 청구항 41

제 40항에 있어서, 억제 핵산이 마이크로-RNA (miRNA), siRNA, shRNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 안티센스 RNA 또는 트리플렉스 형성 RNA를 포함하는 방법.

#### 청구항 42

제 40항에 있어서, 억제 핵산이 병원성 유전자, 병원성 유전자의 전사체, 또는 폴리뉴클레오티드 반복 질환과 관련된 유전자 전사체, 헌팅턴 (HTT) 유전자, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증 관련 유전자 (아트로핀 1, ATN1); 척수구근 근 위축증에서 X 크로모솜 상의 안드로겐 수용체, 인간 아탁신-1, -2, -3, 및 -7, Ca<sub>v</sub>2.1 P/Q 전압-의존성 칼슘 채널 ((CACNA1A)에 의해 엔코딩됨), TATA-결합 단백질, 아탁신(Ataxin) 8 반대 가닥 (또한, ATXN80S로도 공지됨), 척수소뇌성 실조증에서 세린/트레오닌-단백질 포스파타제 2A 55 kDa 조절 서브유닛 B 베타 아이소형 (타입 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), 취약성 X 증후군에서 FMR1 (취약성 X 정신 지체 1), 취약성 X-관련 진전/운동실조 증후군에서 FMR1 (취약성 X 정신 지체 1), FMR1 (취약성 X 정신 지체 2) 또는 취약성 XE 정신 지체에서 AF4/FMR2 패밀리 멤버 2; 근긴장성 이영양증에서 미오토닌-단백질 키나제 (MT-PK); 프리이드라이 히 운동실조에서 프라탁신; 근위축성 측삭 경화증에서 슈퍼옥시드 디스무타제 1 (SOD1) 유전자의 돌연변이체; 파킨슨병 및/또는 알츠하이머병의 발병기전과 관련된 유전자; 아포지질단백질 B (APOB) 및 프로단백질 전환효소 섭틸리신/客栈 타입 9 (PCSK9), 하이퍼콜로에스테르올레미아; HIV 감염에서 전사 유전자의 HIV Tat (인간 면역 결핍 바이러스 트랜스작용 인자); HIV 감염에서 HIV TAR, HIV TAR (인간 면역결핍 바이러스 트랜스작용 인자 반응) 요소 유전자; HIV 감염에서 C-C 캐모킨 수용체 (CCR5); 라우스 육종 바이러스 (RSV) 감염에서 RSV 뉴클레오 캡시드 단백질, C 형 간염 바이러스 감염에서 간-특이적 마이크로RNA (miR-122); p53, 급성 신장 손상 또는 이식기능부전 신장 이식 또는 신장 손상 급성 신부전; 진행성 재발 또는 전이성 고형 악성 종양에서 단백질 키나제 N3 (PKN3); LMP2, 또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 9 (PSMB 9)로도 공지된 LMP2, 전이성 흑색종; LMP7 (또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 8 (PSMB 8)로도 공지됨), 전이성 흑색종; MECL1 (또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 10 (PSMB 10)로도 공지됨), 전이성 흑색종; 고형 종양에서 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 고형 종양에서 키네신 스판들 단백질, 만성 골수성 백혈병에서 아폽토시스 억제인자 B-세포 CLL/림프종 (BCL-2); 고형 종양에서 리보뉴클레오티드 환원효소 M2 (RRM2); 고형 종양에서 푸린; 간 종양에서 폴로-유사 키나제 1 (PLK1), C 형 간염 감염에서 디아실글리세롤 아실트랜스퍼라제 1 (DGAT1), 가족성 선종성 용종증에서 베타-카테닌; 베타2 아드레날린성 수용체, 녹내장; 당뇨병성 망막부종 (DME) 또는 노인성 황반 변성에서 DNA 손상-유도성 전사 4 단백질로서 또한 공지된 RTP801/Redd1; 노인성 황반 변성 또는 맥락막 혈관신생에서 혈관 내피 성장 인자 수용체 I (VEGFR1), 비동맥형 협혈성 시신경증에서 카스파제 2; 선천성 손발톱 비대증에서 케라틴 6A N17K

돌연변이체 단백질; 인플루엔자 감염에서 인플루엔자 A 바이러스 계놈/유전자 서열; 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 감염에서 SARS 코로나바이러스 계놈/유전자 서열; 호흡기 세포융합 바이러스 감염에서 호흡기 세포융합 바이러스 계놈/유전자 서열; 에볼라 감염에서 에볼라 필로바이러스 계놈/유전자 서열; B형 및 C형 간염 감염에서 B형 및 C형 간염 바이러스 계놈/유전자 서열; HSV 감염에서 단순 포진 바이러스 (HSV) 계놈/유전자 서열, 콕사키바이러스 B3 감염에서 콕사키바이러스 B3 계놈/유전자 서열; 원발성 근긴장이상에서 토르신 A (TOR1A)와 같은 유전자의 병원성 대립 유전자 침묵 (대립 유전자-특이적 침묵), 이식에 특이적인 pan-클래스 I 및 HLA-대립 유전자; 또는 상염색체성의 우세하게 유전된 색소성 망막염 (adRP)에서 돌연변이체 로돕신 유전자 (RHO)에 결합되는 방법.

#### 청구항 43

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 폐 질환 (예를 들어, 낭성 섬유증), 출혈성 질환 (예를 들어, 억제제 함유 또는 비함유 혈우병 A 또는 혈우병 B), 지중해빈혈, 혈액 질환 (예를 들어, 빈혈), 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 중근위축측삭경화증 (ALS), 간질, 라이소좀 축적병, 구리 또는 철 축적병 (예를 들어, 월슨병 또는 멘케스병) 라이소좀 산 리파제 결핍증, 신경성 또는 신경퇴행성 질환, 암, 타입 1 또는 타입 2 당뇨병, 고세병, 혈관병, 아데노신 테아미나제 결핍증, 대사 결함 (예를 들어, 글리코겐 축적 병), 망막 변성증 (예컨대, RPE65 결핍증, 범맥락막위축, 및 기타 안구 질환), 고형 기관 질환 (예를 들어, 뇌, 간, 신장, 심장), 또는 감염성 바이러스 (예를 들어, B형 및 C형 간염, HIV, 등), 박테리아 또는 진균류 질환을 갖는 방법.

#### 청구항 44

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 발현 조정 요소가 항시성 또는 조절성 조정 요소를 포함하는 방법.

#### 청구항 45

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 발현 조정 요소가 조직-특이적 발현 조정 요소 또는 프로모터를 포함하는 방법.

#### 청구항 46

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, AAV 벡터가 정맥내, 동맥내, 근내, 피하내, 경구, 삼관내에 의해, 카테터를 통해, 진피, 두개-내, 흡입을 통해, 강-내 또는 점막으로 전달되는 방법.

#### 청구항 47

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 인간인 방법.

#### 청구항 48

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 AAV-Rh74 이외의 AAV 혈청형에 대해 혈청반응 양성인 방법.

#### 청구항 49

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 AAV 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 또는 AAV11에 대해 혈청반응 양성인 방법.

#### 청구항 50

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 포유동물이 AAV-Rh74에 대해 혈청반응 음성 또는 혈청반응 양성인 방법.

#### 청구항 51

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 빈 캡시드 AAV를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 52**

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, 제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)을 포함하는 빈 캡시드 또는 빈 캡시드 AAV-Rh74를 투여하는 것을 추가로 포함하는 방법.

**청구항 53**

제 52항에 있어서, VP1, VP2 또는 VP3 서열이 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 보존적 아미노산 치환, 비보존적 아미노산 치환, 또는 보존적 아미노산 치환과 비보존적 아미노산 치환을 갖는 방법.

**청구항 54**

제 11항, 제 12항 또는 제 14항 중의 어느 한 항에 있어서, AAV 입자가 약제 조성물을 포함하는 방법.

**청구항 55**

제 54항에 있어서, 약제 조성물이 빈 캡시드 AAV를 포함하는 방법.

**청구항 56**

제 54항에 있어서, 약제 조성물이 제 1항 내지 제 6항 중의 어느 한 항의 AAV 캡시드 서열 또는 RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)을 포함하는 빈 캡시드 또는 빈 캡시드 AAV-Rh74를 포함하는 방법.

**발명의 설명****기술 분야**

[0001] 관련 출원에 대한 교차-참조

[0002] 본 출원은 2014년 4월 28일 출원된 미국 가출원 번호 61/985,365 및 2013년 7월 22일 출원된 미국 가출원 번호 61/857,161의 우선권을 청구하며, 이들 출원 모두는 그 전체가 본원에 참조로 통합된다.

**배경 기술****도입**

[0004] 바람직한 유전자의 부재 또는 결함 (기능 손실) 또는 바람직하지 않은 또는 결함 유전자의 발현 또는 (기능 획득)에 의해 초래된 유전 질환은 다양한 질병으로 이어진다. 기능 손실 유전 질환의 한 예는 응고 인자 VIII (FVIII, A형 혈우병) 또는 인자 IX (FIX, B형 혈우병)의 결핍에 의해 초래된 유전성 출혈 장애인 혈우병이다. 기능 획득 유전 질환의 한 예는 헌팅턴병으로서, 뉴론 내부에 축적되어 특히, 기저핵 및 대뇌피질에서 뉴론의 점착적 파괴로 이어지는 돌연변이된 단백질을 엔코딩하는 병적 "HTT" 유전자 (헌팅턴 단백질 엔코딩)에 의해 초래되는 질병이다.

[0005] 혈우병에 대한 최근 치료는 출혈이 발생하는 경우 필요에 따라 또는 예방적으로 재조합 응혈 인자의 정맥내 투여로 이루어진다. 그러나, 이러한 치료학적 접근법은 수개의 단점 예컨대, 반복 투입의 필요성, 치료 비용, 항-치료학적 인자 면역 반응의 발생 위험 및 잠재적으로 치명적인 출혈 위험을 갖는다. 이러한 제한은 혈우병에 대한 유전자-기반 치료법의 개발을 촉발시킨다. 이를 위해, 혈우병은 유전자 전이 기반 치료법에 이상적인데, 1) 정상의 단지 1% 초과의 수준도 이미 표현형을 중증에서 중등증으로 변화시킬 수 있으며, 100%의 수준이 임의의 부작용과 관계되지 않기 때문에 치료학적 윈도우가 매우 넓으며; 2) 치료학적 전이유전자의 조직 특이적 발현이 엄격하게 요구되지 않으며; 3) 치료학적 효율의 끝점 측정에 상당한 경험이 있기 때문이다. 게다가, 응고 인자의 간 발현은 응고 인자 자체에 대한 면역학적 내성을 유발시켜, 응고 인자에 대한 잠재적으로 해로운 면역 반응의 가능성을 감소시키는 것으로 입증되었다.

[0006] 현재, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터는 선택되는 유전자 전이 벡터로서 인식되는데, 이들이 생체내에서 유전자 절단에 가장 안전하고 효율적인 프로파일을 갖기 때문이다. 지금까지 분리된 AAV 혈청형 중에서, AAV2 및 AAV8은 중증 B형 혈우병이 발병된 인간의 간을 표적화하는데 이용되었다. 두 벡터 모두는 효율적으로

작업하고, AAV8의 경우, 치료학적 전이유전자의 장기간 발현이 기록되었다. 인간에서의 최근 데이터는 AAV 벡터로의 간의 표적화는 치료학적 수준의 FIX 전이유전자의 장기간 발현을 달성함을 보여주었다.

[0007] 이들 데이터가 유망하지만, 인간 (야생형 AAV에 있어서 천연 숙주)에서 낮은 혈청학적 유병률 및 간에 있어서 높은 향성을 갖는 AAV 혈청형의 확인은 1) 항-AAV 캡시드 면역 반응을 촉발할 위험성을 감소시킬 가능성이 있는 가장 낮은 벡터 용량으로 간에서 전이유전자 발현의 치료학적 수준을 달성하는데 있어서 기본이 되며; 2) 독특한 혈청학적 유병률을 갖는 대안적인 AAV 혈청형은, 독특한 혈청학적 유병률을 갖지 못한다면 AAV에 대한 이미 존재하는 체액성 면역으로 인해 AAV 유전자 전이에 대해 자격을 갖추지 못할 그러한 환자 군집의 치료를 혼용할 것이다. 본 발명은 이러한 필요를 논의하고 추가적인 이점을 제공한다.

### 발명의 내용

#### 요약

[0009] 본 발명은 아데노-관련 바이러스 (AAV) 혈청형 AAV-Rh74 벡터, 및 관련된 AAV 벡터 및 바이러스 입자를 제공한다. 이러한 벡터는 다른 세포 유형 중에서 간세포를 표적으로 하는 AAV-Rh74를 포함한다. 폴리뉴클레오티드 서열 전달을 위한 벡터로서, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터는 세포에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 추진한다. 단백질 예컨대, 치료학적 적용을 위한 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드는 투여 후 치료학적 수준으로 발현될 수 있다.

[0010] 효소적 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터는 AAV-Rh74 변종을 포함한다. 특정 캡시드 변종은 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO: 1)의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서 아미노산 치환을 갖는 Rh74 캡시드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 잔기는 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO: 1)의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202 번 중 어느 하나에서 A, V, P 또는 N 아미노산에 상응한다. 더욱 특정 양태에서, 캡시드 서열은 RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195에서 A 잔기; 아미노산 위치 199 번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201 번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는다. 추가의 더욱 특정 양태에서, 캡시드 서열은 하기 중 임의의 2개, 3개 또는 전체 4개를 갖는다: RH74 VP1 캡시드 서열 (SEQ ID NO:1)의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기.

[0011] 본 발명의 재조합 AAV 입자는 임의의 캡시드 변종의 AAV 캡시드 서열 예컨대, RHM4-1 (SEQ ID NO:5), RHM15-1 (SEQ ID NO:6), RHM15-2 (SEQ ID NO:7), RHM15-3/RHM15-5 (SEQ ID NO:8), RHM15-4 (SEQ ID NO:9) 또는 RHM15-6 (SEQ ID NO:10)를 포함한다. 특정 구체예에서, 재조합 AAV 입자는 벡터 계놈 (예를 들어, 바이러스 벡터 예컨대, AAV 벡터 계놈)을 캡시드화시키거나 패키징한다. 이러한 본 발명의 재조합 AAV 입자는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 또한 포함하는 바이러스 (예를 들어, AAV) 벡터 계놈을 포함한다.

[0012] AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 매개된 폴리뉴클레오티드 전이는 임상전 및 임상 세팅에서 최근 연구된 수개의 기타 혈청형 중에서 현저하게 더 높은 단백질 발현 수준을 유도하였다. 특히, AAV-Rh74는 마우스 및 B형 혈우병 개 들 모두에서 간 형질도입을 위한 절대 표준인 AAV8에 적어도 필적하거나 이보다 우수한 효율로 폴리뉴클레오티드를 간으로 표적화시킨다 (예를 들어, 도 1 및 2 참조). AAV-Rh74 변종 예컨대, 예를 들어, 캡시드 변종 RHM4-1 (SEQ ID NO:5)은 마우스에서 Rh74 AAV보다 탁월하게 그리고, AAV8에 필적하거나 이보다 탁월한 효율로 폴리뉴클레오티드를 간으로 표적화시킨다 (예를 들어, 도 5 참조). 또한, 인간의 영장류에서의 데이터는 AAV-Rh74 및 AAV-Rh74 변종 예컨대, RHM4-1이 hFIX의 매개하는 간-유래된 발현에서 AAV8보다 대략 2배 더 강력함을 보여준다 (예를 들어, 도 4 및 6 참조).

[0013] 따라서, AAV-Rh74 및 AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)은 바람직하거나 치료학적 이점을 제공하는 단백질을 발현시키기 위해 폴리뉴클레오티드 예컨대, 유전자 코딩 서열은 물론 바람직하지 않은 또는 결합 유전자의 발현을 감소시키거나 억제하는 억제성 뉴클레오티드를 전달하여 다양한 질병을 치료하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, AAV-Rh74 및 AAV-Rh74캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)은 벡터로서 세포, 조직 및 기관 예컨대, 간에 치료학적 유전자 (예를 들어, FIX, FVIII)를 전달하여 혈우병 A, B 등을 치료하는데 이용될 수 있다. 이러한 AAV-Rh74 및 AAV-Rh74캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1) 벡터는 또한, 광범위한 기타 대사 또는 혈장 단백질 결핍을 위한 또는 기타 치료학적 목적을 위한 유전자 예컨대, 비제한적으로, 간에서 계놈 편집을 수행하기 위한 아연 평거 뉴클레아제를 엔코딩하는 유전자를 전달하기 위해, 및 간염 바이러스 감염의 치료를 위한 알파-인터페론과 같은 면역조절제의 국소 (간) 전달을 위해, 또는 혈류에서 치료학적 전이유전자 생성물의 간 형질도입 또는 존재가 필요한 임의의 질환을 사실상 치료 (이는 간 발현을 위한 전이유전자를 표적화함으로

써 달성될 수 있음)하기 위해 이용될 수 있다.

[0014] 시험관내, 생체외 및 생체내에서 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)에 의한 폴리뉴클레오티드의 세포로의 효율적인 전달 이외에, 인간에서 항-AAV-Rh74 항체의 유병률은 항-AAV2 항체보다 낮으며, 항-AAV8 항체의 것과 상이하다 (표 1). 낮은 혈청학적 유병률로 인해, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 (캡시드) 변종 (예를 들어, RHM4-1)은 그렇지 않다면 유전자 전이에 대해 적합하지 않을 더 높은 백분율의 인간 예를 들어, 기타 AAV 혈청형(예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, 등등)에 대해 혈청반응 양성일 수 있는 인간에 이용될 수 있다. 또한, AAV-Rh74 및 관련된 벡터 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)을 포함하는 AAV-Rh74 변종이 높은 역가로 효율적으로 생성될 수 있다 (표 2). 따라서, AAV-Rh74 및 관련된 벡터는 더 높은 유병률의 임상 질병에 대해 많은 양으로 생성될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따르면, 재조합 AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, (캡시드화, 패키지) AAV 벡터 계놈을 포함하는 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자가 제공된다. 일 구체예에서, 재조합 AAV 벡터는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 AAV 벡터 계놈은 AAV-Rh74 캡시드 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)에 의해 캡시드화되거나 패키징된다.

[0016] (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 계놈을 포함하는 본 발명의 재조합 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 (캡시드) 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 전사된 후 단백질로 번역될 수 있다. 대안적으로, 이종 폴리뉴클레오티드는 그 자체에서 기능 또는 활성을 갖는 전사체 (예를 들어, 억제 핵산으로서)로 전사될 수 있다.

[0017] 다양한 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 치료학적 단백질을 엔코딩한다. 특정 양태에서, 단백질은 혈액 응고 인자 (예를 들어, 인자 XIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 VIII, 인자 VIIa, 또는 단백질 C), CFTR (낭성섬유종 막횡단 조절 단백질), 항체, 망막색소상피-특이적 65 kDa 단백질 (RPE65), 에리트로포이에틴, LDL 수용체, 지질단백질 리파제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제,  $\beta$ -글로빈,  $\alpha$ -글로빈, 스펙트린,  $\alpha$ -안티트립신, 아데노신 테아미나제 (ADA), 금속 수송체 (ATP7A 또는 ATP7), 설파미다제, 라이소좀 축적 병 관련 효소 (ARSA), 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -25 글루코세레브로시다제, 스핑고마이엘리나제, 라이소좀 헥소사미니다제, 분지쇄 케토산 데히드로게나제, 호르몬, 성장 인자 (예를 들어, 인슐린-유사 성장 인자 1 및 2, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 신경 성장 인자, 신경영양 인자 -3 및 -4, 뇌-유래 신경영양 인자, 아교세포 유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 등), 사이토킨 (예를 들어,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 인터페론- $\gamma$ , 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨 12, 과립구-대식세포 집락자극인자, 립포톡신, 등), 자살 유전자 생성물 (예를 들어, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제, 시토신 테아미나제, 디프테리아 독소, 시토크롬 P450, 데옥시시티딘 키나제, 종양 괴사 인자, 등), 약물 내성 단백질 (예를 들어, 암 치료에 사용된 약물에 대한 내성을 제공하는 단백질), 종양 억제제 단백질 (예를 들어, p53, Rb, Wt-1, NF1, 폰 힙펠-린도우 (VHL), 선종성 결장폴립증 (APC)), 면역조절 특성을 갖는 웹티드, 면역허용원성 또는 면역원성 웹티드 또는 단백질 트레지토프 (Tregitope), 또는 hCDR1, 인슐린, 글루코키나제, 구아닐레이트 시클라제 2D (LCA-GUCY2D), Rab 에스코트 단백질 1 (범맥락막위축), LCA 5 (LCA-레베르실린(Lebercillin)), 오르니틴 케토산 아미노트랜스퍼라제 (우곡상위축), 레티노쉬신(Retinoschisin) 1 (X-연결된 망막충간분리(Retinoschisis)), USH1C (아서 증후군 1C), X-연결된 색소성 망막염 GTP아제 (XLRP), MERTK (RP의 AR 형: 색소성 망막염), DFNB1 (코넥신 26 난청), ACHM 2, 3 및 4 (색맹), PKD-1 또는 PKD-2 (다낭 신장병), TPP1, CLN2, 라이소좀 축적 병의 원인이 되는 유전자 결핍 (예를 들어, 설파타제, N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 트랜스퍼라제, 카텝신 A, GM2-AP, NPC1, VPC2, 스핑고리피드 활성인자 단백질, 등), 계놈 편집을 위한 하나 이상의 아연 평거 누클레아제, 또는 계놈 편집을 위한 복구주형으로서 사용된 도너 서열이다.

[0018] 추가의 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 치료학적 단백질을 엔코딩하며, 이는 이어서 대상체에 존재하는 (내인성) 바람직하지 않은 또는 비정상적 (기능이상) 단백질의 발현 또는 기능을 억제한다. 추가의 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 전사되는 경우, 억제 핵산 (예를 들어, 억제 RNA)으로 전사되는 폴리뉴클레오티드이다. 더욱 특정 양태에서, 억제 핵산은 단일-가닥 서열이거나, 이중- 또는 삼중-가닥 서열을 형성한다. 추가적인 더욱 특정 양태에서, 억제 핵산은 마이크로-RNA (miRNA), siRNA, shRNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 안티센스 RNA 또는 트리플렉스 형성 RNA이다.

[0019] 추가의 더욱 특정 양태에서, 억제 핵산은 헌팅턴 (HTT) 유전자, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증 관련 유전자

(예를 들어, 아트로핀 1, ATN1); 척수구근 근 위축증에서 X 크로모솜 상의 안드로겐 수용체, 인간 아탁신 (Ataxin)-1, -2, -3, 및 -7, Ca<sub>v</sub>2.1 P/Q 전압-의존성 칼슘 채널 ((CACNA1A)에 의해 엔코딩됨), TATA-결합 단백질, 아탁신 8 반대 가닥 (opposite strand) (또한, ATXN80S로도 공지됨), 척수소뇌성 실조증에서 세린/트레오닌-단백질 포스파타제 2A 55 kDa 조절 서브유닛 B 베타 아이소형 (타입 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), 취약성 X 증후군에서 *FMR1* (취약성 X 정신 지체 1), 취약성 X-관련 진전/운동실조 증후군에서 *FMR1* (취약성 X 정신 지체 1), *FMR1* (취약성 X 정신 지체 2) 또는 취약성 XE 정신 지체에서 AF4/FMR2 패밀리 멤버 2; 근긴장성 이영양증에서 미오토닌-단백질 키나제 (MT-PK); 프리이드라이히 운동실조에서 프라탁신; 근위축성 측삭 경화증에서 슈퍼옥시드 디스무타제 1 (SOD1) 유전자의 돌연변이체; 파킨슨병 및/또는 알츠하이머병의 발병기전과 관련된 유전자; 아포지질단백질 B (APOB) 및 프로단백질 전환효소 섭틸리신/캐신 타입 9 (PCSK9), 하이퍼콜로에스테르 올레미아; HIV 감염에서 전사 유전자의 HIV Tat (인간 면역결핍 바이러스 트랜스작용 인자); HIV 감염에서 HIV TAR, HIV TAR (인간 면역결핍 바이러스 트랜스작용 인자 반응) 요소 유전자; HIV 감염에서 C-C 캐모킨 수용체 (CCR5); 라우스 육종 바이러스 (RSV) 감염에서 RSV 뉴클레오캡시드 단백질, C 형 간염 바이러스 감염에서 간-특이적 마이크로RNA (miR-122); p53, 급성 신장 손상 또는 이식기능부전 신장 이식 또는 신장 손상 급성 신부전; 진행성 재발 또는 전이성 고형 악성 종양에서 단백질 키나제 N3 (PKN3); LMP2, 또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 9 (PSMB 9)로도 공지된 LMP2, 전이성 흑색종; LMP7 (또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 8 (PSMB 8)로도 공지됨), 전이성 흑색종; MECL1 (또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 10 (PSMB 10)로도 공지됨), 전이성 흑색종; 고형 종양에서 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 고형 종양에서 키네신 스펀들 단백질, 만성 골수성 백혈병에서 아폽토시스 억제인자 B-세포 CLL/림프종 (BCL-2); 고형 종양에서 리보뉴클레오티드 환원효소 M2 (RRM2); 고형 종양에서 푸린 (Furin); 간 종양에서 폴로-유사 키나제 1 (PLK1), C 형 간염 감염에서 디아실글리세롤 아실트랜스페라제 1 (DGAT1), 가족성 선종성 용종증에서 베타-카테닌; 베타2 아드레날린성 수용체, 녹내장; 당뇨병성 망막부종 (DME) 또는 노인성 황반 변성에서 DNA 손상-유도성 전사 4 단백질로서 또한 공지된 RTP801/Redd1; 노인성 황반 변성 또는 맥락막 혈관신생에서 혈관 내피 성장 인자 수용체 I (VEGFR1), 비동맥형 허혈성 시신경증에서 카스파제 2; 선천성 손발톱 비대증에서 케라틴 6A N17K 돌연변이체 단백질; 인플루엔자 감염에서 인플루엔자 A 바이러스 계놈/유전자 서열; 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 감염에서 SARS 코로나바이러스 계놈/유전자 서열; 호흡기 세포융합 바이러스 감염에서 호흡기 세포융합 바이러스 계놈/유전자 서열; 에볼라 감염에서 에볼라 필로바이러스 계놈/유전자 서열; B형 및 C형 간염 감염에서 B형 및 C형 간염 바이러스 계놈/유전자 서열; HSV 감염에서 단순 포진 바이러스 (HSV) 계놈/유전자 서열, 콜사키바이러스 B3 감염에서 콜사키바이러스 B3 계놈/유전자 서열; 원발성 근긴장이상에서 토르신 A (TOR1A)와 같은 유전자의 병원성 대립 유전자 침묵 (대립 유전자-특이적 침묵), 이식 특이적 pan-클래스 I 및 HLA-대립 유전자; 상염색체성의 우성 유전된 색소성 망막염 (adRP)에서 돌연변이체 로돕신 유전자 (RHO)의 발현을 억제하거나; 상기 억제 핵산은 임의의 상기 유전자 또는 서열의 전사체에 결합한다.

[0020] 본 발명의 재조합 AAV 벡터 및 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 계놈을 포함하는 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자와 같은 AAV-Rh74 벡터는 시스 또는 트랜스로 작용하는 추가적인 요소를 포함한다. 특정 구체예에서, 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV) 벡터 및/또는 AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 계놈을 포함하는 AAV-Rh74 (캡시드) 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자는 또한, 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 5' 또는 3' 말단 측면에 인접한 하나 이상의 역방향 말단 반복부 (ITR) 서열; 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 추진하는 발현 조절 서열 (예를 들어, 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 전사에 기여하는 프로모터 또는 인핸서 예컨대, 항시성 또는 조절성 조정 요소, 또는 조직-특이적 발현 조정 요소); 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 3'에 위치한 폴리-아데닌 서열; 선택 마커 (예를 들어, 항생제 내성 예컨대, 카나마이신 내성을 제공하는 단백질); 및/또는 복제 오리진을 갖는다.

[0021] 본 발명의 재조합 AAV 벡터 및 AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 계놈을 포함하는 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자를 포함하는 AAV-Rh74 변종은 또한 추가적인 요소를 포함할 수 있다. 일 구체예에서, 재조합 벡터 계놈은 이종 폴리뉴클레오티드 서열 및 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 약 4.7Kb 미만의 길이를 갖는다. 추가의 특정 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 4.7Kb 미만의 길이를 가지며, 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 내부에 위치한다. 추가의 특정 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 합쳐질 경우, 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열의 총 합친 길이가 약 3.0-5.5Kb, 또는 약 4.0-5.0Kb, 또는 약 4.3-4.8Kb이 되는 길이를 갖는다.

[0022] 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 벡터의 기능 또는 활성을 방지하지 않도록 임의의 요망되는 위치에

서 벡터 서열에 위치할 수 있다. 일 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR 사이에 위치하지 않는다. 또 다른 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR 내부에 위치한다. 추가의 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR에 근접하여 위치한다. 추가의 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열 예를 들어, 게놈 핵산 내부의 인트론에 대한 유사체는 이종 폴리뉴클레오티드 서열 내부에 위치한다.

[0023] 따라서, 다양한 구체예에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 AAV ITR 서열에 근접하여 위치하거나; 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 내부에 위치하거나; 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 외부에 위치하거나; 2개의 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열이 존재하는데, 제 1 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 내부에 위치하며, 제 2 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 외부에 위치한다.

[0024] 더욱 특정 양태에서, 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 내부에 위치할 때, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은, 상기 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 조합되는 경우, 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열의 전체 합친 길이가 약 3.0-5.5Kb, 약 4.0-5.0Kb, 또는 약 4.3-4.8Kb가 되는 길이를 갖는다. 다른 더욱 특정 양태에서, 2개의 아데노-관련 바이러스 (AAV) ITR 서열 외부에 위치할 때, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 4.7Kb 초과, 약 5.0-10.0Kb, 또는 약 6.0-8.0Kb의 길이를 갖는다.

[0025] 다양한 추가의 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 약 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000, 또는 8,000-9,000 개 뉴클레오티드 길이의 서열이다.

[0026] 전형적으로, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 불활성이거나 무해하며, 기능 또는 활성을 갖지 않는다. 다양한 특정 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 박테리아 폴리뉴클레오티드 서열이 아니며, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 단백질 또는 웨티드를 엔코딩하는 서열이 아니며, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열, AAV 역방향 말단 반복부 (ITR) 서열, 발현 조정 요소, 복제 오리진, 선택 마커 또는 폴리-아데닌 (폴리-A) 서열 중 임의의 서열과 구별되는 서열이다.

[0027] 다양한 추가적인 특정 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 관련되거나 관련되지 않은 인트론 서열이다. 특정 양태에서, 인트론 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열 내부에 위치한다. 다른 특정 양태에서, 인트론이 또한 이종 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 엔코딩되는 단백질을 엔코딩하는 게놈 DNA와 같은 게놈 DNA에 존재하기 때문에 인트론 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 관련된다.

[0028] 본 발명의 재조합 AAV 벡터 및 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 게놈을 포함하는 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1) 입자와 같은 AAV-Rh74 변종은 세포 내부에 포함될 수 있다. 이러한 구체예에서, 세포는 바이러스 (AAV) 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 생성하도록 용해된 헬퍼 세포, 또는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 발현시키는 것이 요망되는 표적 세포를 포함할 수 있다.

[0029] 본 발명의 재조합 AAV 벡터 및 AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 게놈을 포함하는 AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1) 입자는 약제 조성물 내에 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 및 바이러스 입자 예컨대, AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 게놈을 포함하는 AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)의 대상체로의 투여에 유용하다.

[0030] 본 발명의 재조합 AAV 벡터 및 AAV-Rh74 벡터 및 관련된 AAV 벡터 예컨대, (캡시드화, 패키지) 재조합 AAV 벡터 게놈을 포함하는 AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1) 입자는 다양한 방법 및 용도에 사용될 수 있다. 따라서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 유기체 또는 세포 예컨대, 포유동물 또는 포유동물의 세포로 전달 또는 전이하기 위한 방법 및 용도가 제공된다.

[0031] 일 구체예에서, 방법 또는 용도는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포유동물 또는 포유동물의 세포에 전달 또는 전이하는데 적합한 조건하에 (캡시드화, 패키지) 벡터 게놈을 포함하는 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)을 통

해) 입자를 포함하는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터를 포유동물 또는 포유동물의 세포에 투여하는 것을 포함한다. 일 양태에서, 방법 또는 용도는 이종 폴리뉴클레오티드의 포유동물 및/또는 세포로의 전이/전달을 허용한다. 또 다른 양태에서, 방법은 이종 폴리뉴클레오티드의 포유동물 및/또는 세포로의 전이/전달, 및 이종 폴리뉴클레오티드의 후속 전사를 허용하여 전사체를 형성한다. 추가의 양태에서, 방법은 이종 폴리뉴클레오티드의 세포로의 전이/전달, 전사체 형성을 위한 후속 전사 및 유전자 생성물 (단백질) 생성을 위한 후속 번역을 허용한다. 특히, 예를 들어, 마지막 2개 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 전사 및 선택적으로 전사체의 후속 번역을 부여하는 발현 조정 요소에 작동가능하게 연결된다.

[0032] 추가적인 구체예에서, 방법 또는 용도는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 대상체 (예를 들어, 포유동물) 또는 대상체 (예를 들어, 포유동물)의 세포로 전달 또는 전이시키기 위한 것이며, 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 입자, 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 또는 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 입자 또는 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자의 약제 조성물을 대상체 (예를 들어, 포유동물) 또는 대상체 (예를 들어, 포유동물)의 세포에 투여하여, 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 대상체 (예를 들어, 포유동물) 또는 대상체 (예를 들어, 포유동물)의 세포로 전달 또는 전이시키는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 방법 또는 용도는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, RHM4-1와 같은 캡시드 변종)) 입자, 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자, 또는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, RHM4-1와 같은 캡시드 변종)) 입자 또는 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자의 약제 조성물을 제공하고; 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, RHM4-1와 같은 캡시드 변종)) 입자, 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자, 또는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, RHM4-1와 같은 캡시드 변종)) 입자 또는 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자의 약제 조성물을 대상체 (예를 들어, 포유동물)에 투여하는 것을 포함하여, 내인성 단백질 (예를 들어, 바람직하지 않거나, 비정상이거나 기능이상 단백질)의 발현 또는 기능 감소를 필요로 하거나 단백질 발현 또는 기능을 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 포유동물)를 치료하기 위한 것이며, 여기에서 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 포유동물에서 발현되거나, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 대상체 (예를 들어, 포유동물)에서 내인성 단백질 (예를 들어, 바람직하지 않거나, 비정상이거나 기능이상 단백질)의 발현 또는 기능을 감소시키는 억제 서열 또는 단백질을 엔코딩한다.

[0033] 투여 또는 전달 방법 및 용도는 대상체와 양립가능한 임의의 모드를 포함한다. 특정 구체예에서, 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 입자 또는 복수의 이러한 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자(예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))는 정맥내, 동맥내, 근내, 피하내, 경구, 삼관내에 의해, 카테터를 통해, 진피, 두개-내, 흡입을 통해, 강-내 또는 점막으로 투여되거나 전달된다.

[0034] 대상체는 포유동물, 예컨대, 인간 및 비-인간 (예를 들어, 영장류)을 포함한다. 특정 구체예에서, 대상체는 이종 폴리뉴클레오티드 서열의 발현으로부터 이득이 있거나 이의 발현을 필요로 한다.

[0035] 본 발명에 따라서, 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드, 및 (캡시드화, 패키지) 재조합 벡터 (예를 들어, AAV)를 포함하는 바이러스 (예를 들어, AAV-RH74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자를 생성하는 방법이 제공된다. 일 구체예에서, 재조합 바이러스 또는 AAV 입자를 생성하는 방법은 패키징 헬퍼 세포 내에 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드를 도입하여 생산성 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 감염을 유도하고; 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 입자를 생산하기 위한 조건하에 헬퍼 세포를 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 바이러스 벡터가 오염 핵산을 포함하는 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자의 양이 감소된 재조합 바이러스 또는 AAV 입자를 생성하는 방법은, 패키징 헬퍼 세포 내로 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드를 도입시키고; 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자를 생성하기 위한 조건하에 헬퍼 세포를 배양하는 것을 포함하며, 여기에서 생성된 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자는, 재조합 바이러스 벡터에 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열이 부재하는 조건하에 생성된 오염 핵산을 함유하는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자의 수와 비교하

여, 오염 핵산을 함유하는 재조합 백터 계놈을 갖는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 입자의 수가 감소되었다. 특정 양태에서, 오염 핵산은 박테리아 핵산; 또는 이종 폴리뉴클레오티드 서열 또는 ITR, 프로모터, 인핸서, 복제 오리진, 폴리-아데닌 서열, 또는 선택 마커 이외의 서열이다.

[0036] 헬퍼 세포는 포유동물 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 헬퍼 세포는 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 바이러스 입자 (예를 들어, AAV 입자 예컨대, AAV-Rh74 및 관련 AAV 백터 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)) 내로 패키징하는 헬퍼 (예를 들어, AAV) 기능을 제공한다. 특정 양태에서, 헬퍼 세포는 AAV Rep 및/또는 Cap 단백질 (예를 들어, Rep78 및/또는 Rep68 단백질)을 제공하며; 헬퍼 세포는 Rep 및/또는 Cap 단백질 서열(들)을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)로 안정하게 또는 일시적으로 형질감염되며; 헬퍼 세포는 Rep78 및/또는 Rep68 단백질 폴리뉴클레오티드 엔코딩 서열(들)로 안정하게 또는 일시적으로 형질감염된다.

[0037] 본 발명의 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 플라스미드는 다양한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라를 포함하는 임의의 균주 또는 혈청형을 기반으로 할 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자는 전형적으로, AAV-Rh74 또는 관련 AAV 예컨대, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1)을 기반으로 하나, 또한 다양한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라를 포함한다. 대표적인 AAV 혈청형은 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11 및 Rh10 혈청형을 포함한다. 또한, 백터 계놈을 포함하는 본 발명의 재조합 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자는 다양한 혈청형, 혈청형의 혼합물 또는 다양한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라로부터의 캡시드 단백질 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10 혈청형의 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 게다가, 본 발명의 재조합 백터 (예를 들어, AAV), 서열, 플라스미드, 백터 계놈은 임의의 하나의 혈청형, 혈청형의 혼합물, 또는 다양한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라로부터의 요소를 포함할 수 있다. 다양한 구체예에서, 재조합 AAV 백터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh74 또는 Rh10 혈청형, 또는 임의의 상기 AAV 혈청형의 혼합물, 하이브리드 또는 키메라로부터 유래된 Cap, Rep 및/또는 ITR 서열을 포함한다.

### 도면의 간단한 설명

[0038] 도 1은 간-특이적 프로모터의 조정하에 FIX 전이유전자를 발현하는 AAV 백터가 꼬리 정맥을 통해 주입된 C57BL/6 마우스 (군 당 n=5)에서 인간 인자 IX (FIX) 혈장 수준을 보여준다. 백터 용량은 마우스당 2.5<sup>10</sup> 백터 계놈이다. FIX 전이유전자 생성물 (FIX 단백질) 혈장 수준을 유전자 전이 1, 2 및 4주 후에 ELISA에 의해 측정하였다. AAV-Rh74는 가장 높은 수준의 FIX 전이유전자 발현을 부여하였다.

도 2는 중량 킬로그램 (kg) 당 3<sup>12</sup> 백터 계놈 전달 후 B형 혈우병 개에서 개의 FIX 혈장 수준을 보여준다. AAV 백터는 복재 정맥을 통해 정맥내 (IV)로 주입되며, FIX 수준을 ELISA에 의해 모니터링하였다. 치료학적 FIX 전이유전자의 발현은 간 특이적 프로모터에 의해 추진된다. AAV8 및 AAV-Rh74 백터는 B형 혈우병 개에서 거의 동일하게 수행되며, 둘 모두 AAV6보다 탁월하다.

도 3은 AAV-Rh74 VP1, VP2, 및 VP3 아미노산 서열 및, VP1에 있어서, 폴리뉴클레오티드 (DNA) 서열 (SEQ ID NO:1-4)을 보여준다.

도 4는 (간-특이적 프로모터의 조정하에) 인간 인자 IX (FIX)를 발현하는 AAV8 및 AAVrh74 백터의 레서스 원숭이, 인간외 영장류로의 투여, 및 동물에서 FIX의 발현을 보여준다. AAVrh74-FIX 백터 (오른쪽 가장자리쪽으로 마지막 2개의 막대)가 투여된 동물은 동일한 용량이 주입된 다른 군의 동물과 비교하여 더 높은 수준으로 FIX 전이유전자를 발현하였다.

도 5는 Rh74 및 AAV8 캡시드화된 AAV 인간 인자 IX 발현 백터와 비교하여, 지시된 AAV (Rh74 변종, 예컨대, RHM4-1 변종)에 의해 캡시드화된 AAV 인간 인자 IX 발현 백터를 투여한 동물에서 혈장 인간 인자 IX 발현 수준을 보여준다.

도 6은 (간-특이적 프로모터의 조정하에) 인간 인자 IX를 발현하는 AAV8 및 AAV-Rh74 변종 RHM4-1 백터의 사이노몰구스 원숭이, 인간외 영장류로의 투여 및 동물에서 FIX의 발현을 보여준다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0039]

## 상세한 설명

[0040]

본 발명은 아데노-관련 바이러스 (AAV) 혈청형 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)이 간의 세포인 간세포에 대해 높은 향성을 가짐을 나타내는 데이터를 적어도 부분적으로 기반으로 한다. 세포로의 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 유전자, 억제 핵산 등) 전이/전달을 위한 백터로서, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)이 사용되어 정맥내 투여 후 간에서 치료학적 수준의 발현을 제공할 수 있다. 게다가, AAV-Rh74 백터 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6) 매개된 유전자 전이/전달은 수개의 기타 혈청형보다 현저하게 더 높은 단백질 발현 수준을 유도하였다 (예를 들어, 도 1, 2, 4, 5 및 6 참조). 특히, AAV-Rh74 백터 및 관련된 AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)은 B형 혈우병 개 및/또는 마우스 및/또는 원숭이에서 간 형질도입에 대한 절대 표준 AAV8에 적어도 필적하며 전형적으로 이보다 탁월한 효율로 간에 전달하기 위한 유전자를 표적으로 한다. 따라서, AAV-Rh74 백터 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)은 이종 폴리뉴클레오티드 예컨대, 바람직한 또는 치료학적 이점을 제공하는 단백질에 대한 코딩 서열 (유전자)은 물론 바람직하지 않은 또는 결함 (예를 들어, 병적) 유전자의 발현을 감소 또는 억제하는 억제성 (예를 들어, 안티-센스) 핵산을 전이/전달하여 다양한 질병을 치료하는데 이용될 수 있다. 예를 들어, 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 계놈은 이종 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 전이/전달하기 위해 AAV-Rh74 백터 또는 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6) 내에 패키징되거나 캡시드화될 수 있다.

[0041]

본원에 제시된 바와 같이, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 혈청형 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)은 생체외, 시험관내 및 생체내에서 세포로의 폴리뉴클레오티드 서열의 전달 수단을 제공한다. 이러한 폴리뉴클레오티드 서열은 폴리뉴클레오티드가 전달되는 세포가 엔코딩된 단백질을 발현하도록 단백질을 엔코딩할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 백터는 요망되는 단백질 또는 웹티드를 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드, 또는 전사되는 경우, 억제 서열 (예를 들어, RNA), 예를 들어, 발현 억제를 위한 유전자를 표적으로 하는 서열을 포함하는 이종 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 따라서, 대상체 (예를 들어, 포유동물)로의 백터 전달 또는 투여는 단백질 및 웹티드를 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드를 대상체에 제공할 뿐만 아니라, 대상체에서 발현 또는 기능의 억제를 위한 유전자를 표적으로 하는 억제 핵산을 제공한다.

[0042]

이와 같이, 본 발명에 따르면, 웹티드 및 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 물론, 직접적으로 또는 전사되는 경우, 발현 또는 기능 억제를 위한 유전자를 표적으로 하는 억제 핵산을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 (캡시드화 또는 패키지) 백터 계놈을 포함하는 AAV-Rh74 백터 및 관련된 AAV 백터 변종 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)이 제공된다.

[0043]

재조합 "백터" 또는 "AAV 백터"는 바이러스 (예를 들어, AAV)로부터 야생형 계놈을 제거하기 위해 분자적 방법을 이용하고 비-천연 핵산 예컨대, 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 치료학적 유전자 발현 카세트)로 대체함으로써 바이러스 예컨대, AAV의 야생형 계놈으로부터 유래된다. 전형적으로, AAV에 있어서, 야생형 AAV 계놈의 한 방향 또는 양방향 역 말단 반복부 (ITR) 서열은 AAV 백터에 보유된다. 재조합 바이러스 백터 (예를 들어, AAV)는 바이러스 (예를 들어, AAV) 계놈과 구별되는데, 바이러스 계놈 모두 또는 일부가 바이러스 (예를 들어, AAV) 계놈 핵산 예컨대, 이종 폴리뉴클레오티드 서열에 있어서 비-천연 서열로 대체되었기 때문이다. 따라서, 비천연 서열 예컨대, 이종 폴리뉴클레오티드의 통합은 바이러스 백터 (예를 들어, AAV)를 "재조합" 백터로서 규정되며, 이는 AAV의 경우 "rAAV 백터"로서 칭해질 수 있다.

[0044]

재조합 백터 (예를 들어, AAV) 서열은 생체외, 시험관내 또는 생체내에서 세포의 후속 감염 (형질전환)을 위한 바이러스 (또한, "입자" 또는 "비리온"으로서 본원에서 언급됨) 내로 패키징될 수 있다. 재조합 백터 서열이 AAV 입자 내로 캡시드화되거나 패키징되는 경우, 입자는 "rAAV"로서 칭해질 수 있다. 이러한 입자 또는 비리온은 전형적으로 백터 계놈을 캡시드화하거나 패키징하는 단백질을 포함할 것이다. 특정 예는 바이러스 엔벨로프 단백질, 및 AAV의 경우, 캡시드 단백질을 포함한다.

[0045]

특정 구체예에서, 재조합 백터 (예를 들어, AAV)는 파르보바이러스 백터이다. 파르보바이러스는 단일-가닥 DNA 계놈을 갖는 작은 바이러스이다. "아데노-관련 바이러스" (AAV)가 파르보바이러스 패밀리에 속한다.

- [0046] AAV를 포함하는 파르보바이러스는 이들이 세포를 관통하고 핵산/유전자 물질을 도입하여 핵산/유전자 물질이 세포 내에서 안정적으로 유지될 수 있기 때문에 유전자 요법 벡터로서 유용한 바이러스이다. 또한, 이들 바이러스는 핵산/유전자 물질을 특이적 부위 예를 들어, 예컨대, 크로모좀 19 상의 특이적 부위로 도입시킬 수 있다. AAV가 인간에서 병원성 질환과 관련되지 않기 때문에, AAV 벡터는 실질적인 AAV 발병기전 또는 질환을 초래하지 않으면서 인간 환자에 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (예를 들어, 치료학적 단백질 및 제제)를 전달할 수 있다.
- [0047] AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1) 혈청형 (예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)은 예를 들어, AAV1-AAV11 또는 Rh10 (예를 들어, 임의의 AAV1-AAV11, 또는 Rh10 혈청형의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열과 구별됨)을 포함하는 기타 AAV 혈청형과 구별될 수 있거나 없다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "혈청형"은 다른 AAV 혈청형으로부터 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV를 나타내기 위해 사용된식별어이다. 혈청학적 구별은 한 AAV와 비교하여 또 다른 AAV에 대한 항체 간의 교차-반응성의 결여를 기반으로 하여 규정된다. 이러한 교차-반응성 차이는 일반적으로 캡시드 단백질 서열/항원 결정인자의 차이로 인한 것이다 (예를 들어, AAV 혈청형의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열 차이로 인함). 캡시드 변종을 포함하는 AAV-Rh74 변종이 Rh74 또는 기타 AAV와 비교하여 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기 만큼 상이하다.
- [0048] 전통적인 정의하에, 혈청형은 관심 바이러스가 활성을 중화시키기 위한 모든 존재하는 특성결정된 혈청형에 대해 특이적인 혈청에 대해 평가되었으며, 관심 바이러스를 중화시키는 항체가 발견되지 않았음을 의미한다. 더욱 자연 발생적인 바이러스 분리물이 발견되고/거나 캡시드 돌연변이체가 발생하기 때문에, 현재 존재하는 혈청형 중 임의의 혈청형과 혈청학적으로 차이가 있을 수 있거나 없다. 따라서, 새로운 바이러스 (예를 들어, AAV)가 혈청학적 차이를 갖지 않는 경우에, 이러한 새로운 바이러스 (예를 들어, AAV)는 상응하는 혈청형의 아집단 또는 변종일 것이다. 그러나 많은 경우에, 중화 활성을 대한 혈청학 테스트는 캡시드 서열 변형된 돌연변이체 바이러스에 대해 수행되어 이들이 전통적인 혈청형 정의에 따라 또 다른 혈청형인지 결정해야 한다. 따라서, 편의를 위해서 그리고 반복을 피하기 위해, 용어 "혈청형"은 광범위하게는, 혈청학적으로 구별되는 바이러스 (예를 들어, AAV)는 물론 주어진 혈청형의 아집단 또는 변종 내에 속할 수 있는 혈청학적으로 구별되지 않은 바이러스 (예를 들어, AAV) 둘 모두를 지칭한다.
- [0049] 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드는 물론 이들의 방법 및 용도는 임의의 바이러스 균주 또는 혈청형을 포함한다. 비제한적 예로서, 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드는 임의의 AAV 계놈 예컨대, 예를 들어, AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -rh74, -rh10 또는 AAV-2i8을 기반으로 할 수 있다. 이러한 벡터는 동일한 균주 또는 혈청형 (또는 아집단 또는 변종)을 기반으로 할 수 있거나 서로 상이할 수 있다. 비제한적 예로서, 하나의 혈청형 계놈을 기반으로 하는 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드는 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상과 동일할 수 있다. 또한, 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 플라스미드는 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상과 구별되는 AAV (예를 들어, AAV2) 혈청형 계놈을 기반으로 할 수 있으며, 이 경우 3개의 캡시드 단백질 중 적어도 하나는 AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, 예를 들어, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)일 수 있다.
- [0050] AAV-Rh74는 AAV-Rh74에 대한 서열 특징과 동일한 유전자/단백질 서열을 갖는다 (예를 들어, 도 3의 VP1, VP2, VP3 참조). 본원에 사용된 바와 같이, "AAV-Rh74 관련된 AAV 벡터" 및 이의 문법적 변형어는 AAV-Rh74를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질 (예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 지칭한다. 따라서, 이러한 AAV-Rh74에 관련된 AAV 벡터는 AAV-Rh74와 하나 이상의 상이한 서열을 가질 수 있으나, AAV-Rh74의 하나 이상의 기능 특징 (예를 들어, 예컨대, 세포/조직 향성)을 갖고/거나 하나 이상의 유전자에 대한 실질적인 서열 동일성을 나타낼 수 있다. 예를 들어, AAV-Rh74 관련된 AAV 변종 RHM4-1은 Rh74 캡시드와 4개 아미노산이 상이한 캡시드를 갖는다. 예시적인 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6) 서열은 본원 예를 들어, 도 3에 제시된 VP1, VP2, 및/또는 VP3을 포함한다. 한 비제한적 예시적 구체예에서, AAV-Rh74에 관련된 AAV 벡터는 도 3에 제시된 하나 이상의 AAV-Rh74 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열과 적어도 80% 또는 그 초과 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 등등)로 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이의 부분서열을 갖는다.
- [0051] 본 발명에 따르면, 방법 및 용도는 기준 AAV-Rh74 유전자 또는 단백질 서열 (예를 들어, 도 3에 제시된 VP1,

VP2, 및/또는 VP3 서열)과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내나, 공지된 AAV 유전자 또는 단백질 예컨대, AAV1-AAV11, AAV-Rh10, 유전자 또는 단백질 등과 구별되며 동일하지 않은 AAV-Rh74 서열 (폴리펩티드 및 뉴클레오티드) 및 이의 부분서열을 포함한다. 일 구체예에서, AAV-Rh74 폴리펩티드 또는 이의 부분서열은 임의의 기준 AAV-Rh74 서열 또는 이의 부분서열 (예를 들어, 도 3에 제시된 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)과 적어도 80% 또는 그 초과로 동일한 예를 들어, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 등등, 즉, 100% 이하로 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 특정 양태에서, AAV-Rh74 관련된 변종은 AAV-Rh74에 제시된 4개 아미노산 치환 중 1, 2, 3 또는 4개를 갖는다 (예를 들어, 캡시드 변종 RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6).

[0052] AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 및 변종, 관련된 하이브리드 및 키메라 서열을 포함하는 재조합 백터 (예를 들어, AAV)는 하나 이상의 기능성 AAV ITR 서열 측면에 인접한 하나 이상의 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (전이유전자)를 포함하도록 당업자에게 공지된 재조합 기법을 이용하여 작제될 수 있다. 이러한 백터는 전체적으로 또는 부분적으로 결실된 야생형 AAV 유전자 중 하나 이상 예를 들어, rep 및/또는 cap 유전자를 가질 수 있으나, AAV 백터 입자로의 재조합 백터의 구조 (rescue), 복제 및 패키징에 필요한 것으로서 적어도 하나의 기능성 측면 인접 ITR 서열을 보유한다. 따라서, AAV 백터 계획은 복제 및 패키징을 위한 시스 (cis)에 필요한 서열 (예를 들어, 기능성 ITR 서열)을 포함한다.

[0053] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 데옥시리보핵산 (DNA) 및 리보핵산 (RNA)을 포함하는 모든 형태의 핵산, 올리고뉴클레오티드를 나타내기 위해 본원에서 상호교환적으로 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 DNA, cDNA 및 안티센스 DNA를 포함하며, 스플라이싱되거나 비스플라이싱된 mRNA, rRNA tRNA 및 억제 RNA 또는 RNAi, 예를 들어, 작거나 짧은 헤어핀 (sh)RNA, 마이크로RNA (miRNA), 작거나 짧은 간섭 (si)RNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 또는 안티센스 RNA)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 천연 발생, 합성, 및 고의로 변화시키거나 변형시킨 폴리뉴클레오티드, 및 유사체 및 유도체를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일, 이중 또는 삼중의 선형 또는 환형일 수 있으며, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의하는데 있어서, 특정 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 5' 내지 3' 방향의 서열을 제공하는 관례에 따라 본원에서 기술될 수 있다.

[0054] "이종" 폴리뉴클레오티드는 세포로의 폴리뉴클레오티드의 백터 매개된 전이/전달을 목적으로 백터 (예를 들어, AAV)에 삽입된 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이종 폴리뉴클레오티드는 전형적으로, 백터 (예를 들어, AAV) 핵산과 구별되며, 즉, 바이러스 (예를 들어, AAV) 핵산과 관련하여 "비-천연"이다. 일단 세포 내로 전이/전달되면, 비리온 내에 함유된 이종 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있다 (예를 들어, 전사되고, 적합하다면, 번역됨). 대안적으로, 비리온 내에 함유된, 세포 내의 전이/전달된 이종 폴리뉴클레오티드는 발현되지 않아도 된다. 용어 "이종"이 본원에서 항상 폴리뉴클레오티드와 관련하여 사용되지 않지만, 심지어 수식어 "이종"의 부재하에서도 폴리뉴클레오티드에 대한 언급은 이러한 누락에도 불구하고 이종 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 의도된다.

[0055] "폴리뉴클레오티드 서열"에 의해 엔코딩된 "폴리펩티드", "단백질" 및 "펩티드"는, 천연 발생 단백질과 같이 천연 전장 서열을 포함하며, 또한, 기능성 부분서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체가 천연 전장 단백질의 기능을 어느 정도 보유하는 한, 이러한 기능성 부분서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체를 포함한다. 본 발명의 방법 및 용도에서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 엔코딩된 이러한 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드는, 결함이 있거나 발현이 처리 동물에서 불충분하거나 결핍된 내인성 단백질일 수 있으나 이와 동일하지 않아도 된다.

[0056] 본 발명의 아데노-관련 바이러스 (AAV) 혈청형 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변종 예컨대, AAV-Rh74 변종 (예를 들어, 캡시드 변종 예컨대, RHM4-1, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)은 폴리뉴클레오티드를 안정하게 또는 일시적으로 세포 또는 이의 자손으로 도입/전달하는데 이용될 수 있다. 용어 "전이유전자"는 본원에서 세포 또는 유기체내로 도입된 그러한 이종 폴리뉴클레오티드를 편리하게 지칭하는데 사용된다. 전이유전자는 임의의 폴리뉴클레오티드 예컨대, 폴리펩티드 또는 단백질을 엔코딩하는 유전자, 억제 폴리뉴클레오티드로 전사되는 폴리뉴클레오티드, 또는 전사되지 않는 (예를 들어, 발현 조절 요소 예컨대, 전사를 추진하는 프로모터가 결핍된) 폴리뉴클레오티드를 포함한다.

[0057] 예를 들어, 전이유전자를 갖는 세포에서, 전이유전자는 세포의 백터 예컨대, AAV "형질전환"에 의해 도입/전이 되었다. 용어 "형질전환" 및 "형질감염"은 분자 예컨대, 폴리뉴클레오티드의 세포 또는 숙주 유기체로의 도입을 지칭한다.

[0058] 전이유전자가 도입된 세포는 "형질전환된 세포" 또는 "형질전환주"로서 언급된다. 따라서, "형질전환된" 또는 "형질감염된" 세포 (예를 들어, 포유동물에서, 예컨대, 세포 또는 조직 또는 기관 세포)는 외인성 분자 예를 들

어, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 (예를 들어, 전이유전자)의 세포 내로의 흔입 후 세포에서의 유전자 변화를 의미한다. 이와 같이, "형질감염된" 또는 "형질전환된" 세포는 예를 들어, 외인성 분자가 도입된 세포 또는 이의 자손이다. 이러한 세포(들)는 증식될 수 있으며, 도입된 단백질은 발현되거나 핵산은 전사된다. 유전자 요법 용도 및 방법에 있어서, 형질전환된 세포는 대상에 존재할 수 있다.

[0059] 도입된 폴리뉴클레오티드는 수령체 세포 또는 유기체의 핵산 내로 통합될 수 있거나 없다. 도입된 폴리뉴클레오티드가 수령체 세포 또는 유기체의 핵산 (계놈 DNA) 내로 통합되는 경우, 이는 그 세포 또는 유기체 내에 안정하게 유지될 수 있으며, 게다가 수령체 세포 또는 유기체의 자손 세포 또는 유기체로 전달되거나 유전될 수 있다. 마지막으로, 도입된 핵산은 단지 일시적으로 수령체 세포 또는 숙주 유기체에 존재할 수 있다.

[0060] 형질전환될 수 있는 세포는 임의의 조직 또는 기관 타입, 임의의 기원 (예를 들어, 중배엽, 외배엽 또는 내배엽)의 세포를 포함한다. 세포의 비제한적 예는 간 (예를 들어, 간세포, 굴 내피 세포), 췌장 (예를 들어, 베타 섬 세포), 폐, 중추 또는 말초 신경계, 예컨대, 뇌 (예를 들어, 신경, 아교 또는 뇌실막 세포) 또는 척추, 신장, 눈 (예를 들어, 망막, 세포 구성요소), 비장, 피부, 가슴샘, 고환, 폐, 횡경막, 심장(heart) (심장(cardiac)), 근육 또는 요근, 또는 장 (예를 들어, 내분비), 지방 조직 (백색, 갈색 또는 베이지색), 근육 (예를 들어, 섬유아세포), 윤활막세포, 연골세포, 파골세포, 상피 세포, 내피 세포, 침샘 세포, 내이 신경 세포 또는 조혈 (예를 들어, 혈액 또는 림프) 세포를 포함한다. 추가적인 예는 줄기 세포, 예컨대, 간 (예를 들어, 간세포, 굴 내피 세포), 췌장 (예를 들어, 베타 섬 세포), 폐, 중추 또는 말초 신경계, 예컨대, 뇌 (예를 들어, 신경, 아교 또는 뇌실막 세포) 또는 척추, 신장, 눈 (망막, 세포 구성요소), 비장, 피부, 가슴샘, 고환, 폐, 횡경막, 심장 (심장), 근육 또는 요근, 또는 장 (예를 들어, 내분비), 지방 조직 (백색, 갈색 또는 베이지색), 근육 (예를 들어, 섬유아세포), 윤활막세포, 연골세포, 파골세포, 상피 세포, 내피 세포, 침샘 세포, 내이 신경 세포 또는 조혈 (예를 들어, 혈액 또는 림프) 세포로 발달되거나 분화되는 만능성 또는 다능성 전구 세포를 포함한다.

[0061] 일 구체예에서, "치료학적 분자"는 대상체 또는 세포 내의 단백질 부재 또는 결함으로 초래된 증상을 완화시키거나 저하시킬 수 있는 웹티드 또는 단백질이다. 대안적으로, 전이유전자에 의해 엔코딩된 "치료학적" 웹티드 또는 단백질은 대상체에 이점을 제공하는 예를 들어, 유전자 결함을 교정하거나, 유전자 (발현 또는 기능) 결핍을 교정하거나 항암 효과가 있는 것이다.

[0062] 본 발명에 따른 유용한 유전자 생성물 (예를 들어, 치료학적 단백질)을 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드의 특정한 비제한적 예로는 하기를 포함하나 이에 제한되지 않는다: CFTR (낭성 섬유종 막횡단 조절 단백질), 기능 획득 혈액 응고 인자를 포함하는 혈액 응고 (coagulation) (응고 (clotting)) 인자 (인자 XIII, 인자 IX, 인자 X, 인자 VIII, 인자 VIIa, 단백질 C 등), 항체, 망막색소상피-특이적 65 kDa 단백질 (RPE65), 에리트로포이에틴, LDL 수용체, 지질단백질 리파제, 오르니틴 트랜스카르바밀라제,  $\beta$ -글로빈,  $\alpha$ -글로빈, 스펙트린,  $\alpha$ -안티트립신, 아데노신 테아미나제 (ADA), 금속 수송체 (ATP7A 또는 ATP7), 설파미다제, 라이소좀 축적 병 관련 효소 (ARSA), 히포잔틴 구아닌 포스포리보실 트랜스퍼라제,  $\beta$ -25 글루코세레브로시다제, 스팽고마이엘리나제, 라이소좀 헥소사미나제, 분지쇄 캐토산 데히드로게나제, 호르몬, 성장 인자 (예를 들어, 인슐린-유사 성장 인자 1 및 2, 혈소판 유래 성장 인자, 표피 성장 인자, 신경 성장 인자, 신경영양 인자 -3 및 -4, 뇌-유래 신경영양 인자, 아교세포 유래 성장 인자, 형질전환 성장 인자  $\alpha$  및  $\beta$ , 등), 사이토킨 (예를 들어,  $\alpha$ -인터페론,  $\beta$ -인터페론, 인터페론- $\gamma$ , 인터류킨-2, 인터류킨-4, 인터류킨 12, 과립구-대식세포 집락자극인자, 림포톡신, 등), 자살 유전자 생성물 (예를 들어, 단순 포진 바이러스 티미딘 키나제, 시토신 테아미나제, 디프테리아 독소, 시토크롬 P450, 테옥시시티딘 키나제, 종양 괴사 인자, 등), 약물 내성 단백질 (예를 들어, 암 치료에 사용된 약물에 대한 내성을 제공하는 단백질), 종양 억제제 단백질 (예를 들어, p53, Rb, Wt-1, NF1, 폰 힙펠-린도우 (VHL), 선종성 결장폴립 (APC)), 면역조절 특성을 갖는 웹티드, 면역허용원성 또는 면역원성 웹티드 또는 단백질 트레지토프(Tregitope) [de Groot et al., 혈액 2008 Oct 15;112(8):3303], 또는 hCDR1 [Sharabi et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Jun 6;103(23):8810-5], 인슐린, 글루코키나제, 구아닐레이트 시클라제 2D (LCA-GUCY2D), Rab 에스코트 단백질 1 (범맥락막위축), LCA 5 (LCA-레베르실린(Lebercillin)), 오르니틴 캐토산 아미노트랜스퍼라제 (우곡상 위축), 레티노쉬신(Retinoschisin) 1 (X-연결된 망막층간분리 (Retinoschisis)), USH1C (아서 증후군 1C), X-연결된 색소성 망막염 GTP아제 (XLRP), MERTK (RP의 AR 형: 색소성 망막염), DFNB1 (코넥신 26 난청), ACHM 2, 3 및 4 (색맹), PKD-1 또는 PKD-2 (다낭 신장병), TPP1, CLN2, 라이소좀 축적 병의 원인이 되는 유전자 결핍 (예를 들어, 설파타제, N-아세틸글루코사민-1-포스페이트 브랜스퍼라제, 카텝신 A, GM2-AP, NPC1, VPC2, 스팽고리피드 활성인자 단백질, 등), 계놈 편집을 위한 하나 이상의 아연 평거 누클레아제, 또는 계놈 편집을 위한 복구 주형으로서 사용된 도너 서열을 포함하거나 엔코딩하

는 유전자.

[0063]

본 발명에 따른 유용한 유전자 생성물 (예를 들어, 치료학적 단백질)을 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드의 추가의 비제한적 예는 비제한적으로, 낭포성 섬유증 (및 폐의 기타 질환), A형 혈우병, B형 혈우병, 지중해빈혈, 빈혈 및 기타 혈액 질환, AIDS, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축측상 경화증, 간질, 및 기타 신경 질환, 암, 당뇨병, 근육 퇴행위축 (예를 들어, 뒤시엔느, 베커), 고체병, 혈관병, 아데노신 데아미나제 결핍, 글리코겐 축적병 및 기타 대사 결함, 망막 퇴행성 질환 (및 기타 안구 질환), 및 고령 기관 (예를 들어, 뇌, 간, 신장, 심장)의 질환을 포함하는 질병 또는 질환의 치료에 사용될 수 있는 것들을 포함한다.

[0064]

본원에 기재된 비제한적인 유전자 및 단백질을 포함하는 유전자 생성물을 엔코딩하는, 모든 포유동물 및 비-포유동물 형태의 폴리뉴클레오티드가 분명히 포함되며, 이들은 공지되거나 비공지되어 있다. 이와 같이, 본 발명은 비-포유동물, 인간 이외의 포유동물 및 인간으로부터의 유전자 및 단백질을 포함하며, 이러한 유전자 및 단백질은 본원에 기술된 인간 유전자 및 단백질과 실질적으로 유사한 방식으로 작용한다. 비-포유동물 유전자의 비제한적 예로는 박테리아 기원인 Fok 뉴클레아제 도메인이 있다. 포유동물의 비-인간 FIX 서열의 비제한적 예는 문헌 [Yoshitake et al., 1985, *supra*; Kurachi et al., 1995, *supra*; Jallat et al., 1990, *supra*; Kurachi et al., 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79:6461-6464; Jaye et al., 1983, *Nucl. Acids Res.* 11:2325-2335; Anson et al., 1984, *EMBO J.* 3: 1053-1060; Wu et al., 1990, *Gene* 86:275-278; Evans et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 86:10095 (1989), *Blood* 74:207-212; Pendurthi et al., 1992, *Thromb. Res.* 65:177-186; Sakar et al., 1990, *Genomics* 1990, 6:133-143; and, Katayama et al., 1979, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76:4990-4994]에 기술되어 있다.

[0065]

본원에 제시된 바와 같이, 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (전이유전자)는 억제 및 안티센스 핵산 서열을 포함한다. 억제, 안티센스, siRNA (작은 간섭 RNA), miRNA (마이크로 RNA), shRNA (작은 해어핀 RNA), RNAi 및 안티센스 올리고뉴클레오티드는 표적 유전자의 발현을 조절할 수 있다. 이러한 분자는 질환 과정의 중재에 관련된 표적 유전자의 발현을 억제하여 질환의 하나 이상의 증상을 저하, 억제 또는 완화시킬 수 있는 것들을 포함한다.

[0066]

안티센스는 RNA 전사체 또는 DNA (예를 들어, 계놈 DNA)에 결합하는 웨터드 핵산 (PNA), 및 단일, 이중 또는 삼중 가닥 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 예를 들어, 출발 부위로부터 -10번 내지 +10번 위치의, 표적 유전자의 전사 개시 부위로부터의 유래된 올리고뉴클레오티드가 또 다른 특정 예이다. 트리플렉스 형성 안티센스는 이중 가닥 DNA에 결합하여 유전자의 전사를 억제할 수 있다. "RNAi"는 유전자 발현을 억제하기 위한 단일 또는 이중 가닥 RNA 서열로 사용된다 (예를 들어, 문헌 [Kennerdell et al., *Cell* 95:1017 (1998); and Fire et al., *Nature*, 391:806 (1998)] 참조). 따라서, 표적 유전자 코딩 부위로부터의 이중 가닥 RNA 서열이 본 발명의 방법 및 용도에 따라 유전자 발현/전사를 억제하거나 방지하는데 사용될 수 있다. 표적 유전자 서열 (예를 들어, 헌팅턴 또는 HTT)을 엔코딩하는 핵산 예컨대, 포유동물 및 인간 HTT를 엔코딩하는 핵산을 기반으로 하는 안티센스 및 RNAi가 생성될 수 있다. 예를 들어, 단일 또는 이중 가닥 핵산 (예를 들어, RNA)은 HTT 전사체 (예를 들어, mRNA)를 표적으로 할 수 있다.

[0067]

"siRNA"는 서열-특이적 전사-후 유전자 침묵 또는 유전자 낙다운을 위한 RNA 간섭 과정에 관련된 치료학적 분자를 지칭한다. siRNA는 표적화된 유전자의 동족 mRNA의 서열과 상동성을 갖는다. 작은 간섭 RNA (siRNA)는 시험관내에서 합성될 수 있거나 더 긴 dsRNA로부터 리보뉴클레아제 III 절단에 의해 생성될 수 있으며, 서열-특이적 mRNA 분해의 매개체이다. 본 발명의 siRNA 또는 기타 이러한 핵산은 적합하게 보호된 리보뉴클레오시드 포스포르아미다이트 및 통상적인 DNA/RNA 합성기를 이용하여 화학적으로 합성될 수 있다. siRNA는 2개의 별도의 상보적 RNA 분자로서 또는 2개의 상보적 영역을 갖는 단일 RNA 분자로서 합성될 수 있다. 합성 RNA 분자 또는 합성 시약의 시중의 공급업체는 Applied Biosystems (Foster City, CA, USA), ProLigo (Hamburg, Germany), Dharmacaon Research (Lafayette, Colo., USA), Pierce Chemical (part of Perbio Science, Rockford, Ill., USA), Glen Research (Sterling, Va., USA), ChemGenes (Ashland, Mass., USA) 및 Cruachem (Glasgow, UK)를 포함한다. 표적 유전자의 mRNA를 억제하기 위한 특이적 siRNA 작제물은 15-50개 뉴클레오티드 길이일 수 있으며, 더욱 전형적으로, 약 20-30개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 이러한 핵산 분자는 당업자에게 공지된 통상적인 방법을 이용하여 본원에 기재된 바이러스 벡터 내로 용이하게 흔입될 수 있다.

[0068]

본 발명에 따른 억제 핵산 서열로 표적화될 수 있는 병원성 유전자 (예를 들어, RNA 또는 mRNA)의 전사체 또는 유전자 (예를 들어, 계놈 DNA)의 특정한 비제한적 예는 비제한적으로, 폴리뉴클레오티드 반복 질환과 관련된 유전자 예컨대, 헌팅턴 (HTT) 유전자, 치상핵적핵담창구시상하핵 위축증 관련 유전자 (예를 들어, 아트로핀 1,

ATN1); 척수구근 근 위축증에서 X 크로모솜 상의 안드로겐 수용체, 인간 아탁신-1, -2, -3, 및 -7, Ca<sub>v</sub>2.1 P/Q 전압-의존성 칼슘 채널 ((CACNA1A)에 의해 엔코딩됨), TATA-결합 단백질, 아탁신 8 반대 가닥 (또한, ATXN8OS로도 공지됨), 척수소뇌성 실조증에서 세린/트레오닌-단백질 포스파타제 2A 55 kDa 조절 서브유닛 B 베타 아이소형 (타입 1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17), 취약성 X 증후군에서 *FMR1* (취약성 X 정신 지체 1), 취약성 X-관련 진전/운동실조 증후군에서 *FMR1* (취약성 X 정신 지체 1), *FMR1* (취약성 X 정신 지체 2) 또는 취약성 XE 정신 지체에서 AF4/FMR2 패밀리 멤버 2; 근긴장성 이영양증에서 미오토닌-단백질 키나제 (MT-PK); 프리이드라이히 운동실조에서 프라탁신; 근위축성 측삭 경화증에서 슈퍼옥시드 디스무타제 1 (SOD1) 유전자의 돌연변이체; 파킨슨병 및/또는 알츠하이머병의 발병기전과 관련된 유전자; 아포지질단백질 B (APOB) 및 프로단백질 전환효소 섭탕리신/客栈 타입 9 (PCSK9), 하이퍼콜로에스테르올레미아; HIV 감염에서 전사 유전자의 HIV Tat (인간 면역결핍 바이러스 트랜스작용 인자); HIV 감염에서 HIV TAR, HIV TAR (인간 면역결핍 바이러스 트랜스작용 인자 반응) 요소 유전자; HIV 감염에서 C-C 캐모킨 수용체 (CCR5); 라우스 육종 바이러스 (RSV) 감염에서 RSV 뉴클레오캡시드 단백질, C 형 간염 바이러스 감염에서 간-특이적 마이크로RNA (miR-122); p53, 급성 신장 손상 또는 이식기능부전 신장 이식(delayed graft function kidney transplant) 또는 신장 손상 급성 신부전; 진행성 재발 또는 전이성 고형 악성 종양에서 단백질 키나제 N3 (PKN3); LMP2, 또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 9 (PSMB 9)로도 공지된 LMP2, 전이성 흑색종; LMP7 (또한, 프로테아좀 서브유닛 베타-타입 8 (PSMB 8)로도 공지됨), 전이성 흑색종; 고형 종양에서 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 고형 종양에서 키네신 스판들 단백질, 만성 골수성 백혈병에서 아폽토시스 억제인자 B-세포 CLL/림프종 (BCL-2); 고형 종양에서 리보뉴클레오티드 환원효소 M2 (RRM2); 고형 종양에서 푸린; 간 종양에서 폴로-유사 키나제 1 (PLK1), C 형 간염 감염에서 디아실글리세롤 아실트랜스페라제 1 (DGAT1), 가족성 선종성 용종증에서 베타-카테닌; 베타2 아드레날린성 수용체, 녹내장; 당뇨병성 망막부종 (DME) 또는 노인성 황반 변성에서 DNA 손상-유도성 전사 4 단백질로서 또한 공지된 RTP801/Redd1; 노인성 황반 변성 또는 맥락막 혈관신생에서 혈관 내피 성장 인자 수용체 I (VEGFR1), 비동맥형 허혈성 시신경증에서 카스파제 2; 선천성 손발톱 비대증에서 케라틴 6A N17K 돌연변이체 단백질; 인플루엔자 감염에서 인플루엔자 A 바이러스 계놈/유전자 서열; 중증 급성 호흡기 증후군 (SARS) 감염에서 SARS 코로나바이러스 계놈/유전자 서열; 호흡기 세포융합 바이러스 감염에서 호흡기 세포융합 바이러스 계놈/유전자 서열; 에볼라 감염에서 에볼라 필로바이러스 계놈/유전자 서열; B형 및 C형 간염에서 B형 및 C형 간염 바이러스 계놈/유전자 서열; HSV 감염에서 단순 포진 바이러스 (HSV) 계놈/유전자 서열, 콕사키바이러스 B3 감염에서 콕사키바이러스 B3 계놈/유전자 서열; 원발성 근긴장이상에서 토르신 A (TOR1A)와 같은 유전자의 병원성 대립 유전자 침묵 (대립 유전자-특이적 침묵), 이식에 특이적인 pan-클래스 I 및 HLA-대립 유전자; 또는 상염색체성의 우세하게 유전된 색소성 망막염 (adRP)에서 돌연변이체로 돋신 유전자 (RHO)를 포함한다.

[0069] 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및 이의 부분서열은 변형된 및 변종 형태를 포함한다. 본원에 사용된 바와 같이, 용어 "변형" 또는 "변종" 및 이의 문법적 변형은 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이의 부분서열이 기준 서열로부터 벗어남을 의미한다. 따라서, 변형된 서열 및 변종 서열은 기준 서열과 실질적으로 동일하거나, 더 크거나 더 적은 활성 또는 기능을 가질 수 있으나, 적어도 기준 서열의 부분적 활성 또는 기능을 보유한다.

[0070] 따라서, 본 발명은 또한 천연 및 비-천연 발생 변종을 포함한다. 이러한 변종은 AAV-Rh74 변종 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종을 포함한다. 이러한 AAV-Rh74 캡시드 변종의 특정 예는 RHM 15-1, RHM 15-2, RHM 15-3, RHM 15-4, RHM 15-5, RHM 15-6 및 RHM4-1 (예를 들어, 도 5 참조)를 포함한다.

[0071] 이러한 변종은 또한, 기능 획득 및 손실 변종을 포함한다. 예를 들어, 단백질 변종 또는 돌연변이체가 활성을 보유하는 야생형 인간 FIX DNA 서열은 본 발명의 방법 및 용도에서 치료학적으로 유효하거나 비변종 인간 FIX에 필적하거나 심지어 더욱 치료학적으로 활성이다. 특정 예에서, 콜라겐 IV는 FIX를 포획하는 역할을 하며, 이는 포유동물의 근 조직내에 도입되는 경우, FIX의 일부가 근 조직내의 간질 공간내에 보유되기 때문에 혈액 응고의 관여에 이용될 수 없음을 의미한다. 콜라겐 IV로의 감소된 결합 (예를 들어, 기능 손실)을 갖는 단백질을 유도하는 FIX의 서열에서의 돌연변이는 본 발명의 방법 예를 들어, 혈우병 치료에 유용한 돌연변이체이다. 이러한 돌연변이체 인간 FIX 유전자의 예는 성숙 단백질의 시작부터 5번째 아미노산 위치에서 리신 대신 아미노산 알라닌을 갖는 인간 FIX 단백질을 엔코딩한다.

[0072] 비제한적 예의 변형은 기준 서열의 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환 (예를 들어, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100 개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 잔기), 예컨대, 리신 잔기 대신 아르기닌 (예를 들어, RHM4-1, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6의 임의의 것에 제시된 바와 같이 리신의 하나 이상의 아르기닌 치환), 부가 (예를 들어, 삽입 또는 1-3, 3-5, 5-10,

10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100 개 또는 그 초과의 뉴클레오티드 또는 잔기) 및 결실(예를 들어, 부분서열 또는 단편)을 포함한다. 특정 구체예에서, 변형된 또는 변종 서열은 비변형된 서열의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 보유한다. 이러한 변형된 형태 및 변종은 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 기준 서열보다 작거나 동일하거나 더 클 수 있으나, 기준 서열의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 가질 수 있다.

[0073] 변종은 하나 이상의 비-보존적 또는 보존적 아미노산 서열 차이 또는 변형, 또는 이 둘 모두를 가질 수 있다. "보존적 치환"은 생물학적으로, 화학적으로 또는 구조적으로 유사한 잔기에 의한 하나의 아미노산의 대체이다. 생물학적으로 유사함은 치환이 생물학적 활성을 파괴하지 않음을 의미한다. 구조적으로 유사함은 아미노산이 유사한 길이의 측쇄 예컨대, 알라닌, 글리신 및 세린 또는 유사한 크기를 가짐을 의미한다. 화학적 유사성은 잔기가 동일한 전하를 갖거나 둘 모두 친수성 또는 소수성임을 의미한다. 특정 예로는 하나의 소수성 잔기 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또 다른 것으로의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 것으로의 치환 예컨대, 리신 대신 아르기닌(예를 들어, RHM15-1, RHM15-2, RHM15-3/RHM15-5, RHM15-4 및 RHM15-6)으로의 치환, 아스파르트산 대신 글루탐산으로의 치환, 또는 아스파라긴 대신 글루타민으로의 치환, 트레오닌의 세린으로의 치환 등을 포함한다. 보존적 치환의 특정 예로는 소수성 잔기의 치환 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또 다른 것으로의 치환, 극성 잔기의 또 다른 것으로의 치환, 예컨대, 리신 대신 아르기닌으로의 치환, 아스파르트산 대신 글루탐산으로의 치환 또는 아스파라긴의 글루타민으로의 치환 등을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 하기 군내의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. "보존적 치환"은 또한, 비치환된 모 아미노산 대신 치환된 아미노산의 사용을 포함한다.

[0074] 따라서, 본 발명은 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들어, 혈액 응고 기능 등)을 보유하는(예를 들어, 본원에 기술된 단백질을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드의) 유전자 및 단백질 변종을 포함한다. 이러한 단백질 또는 폴리펩티드의 변종은, 재조합 DNA 기법을 사용하여 단백질 또는 폴리펩티드가 변형된 특성 또는 추가의 특성을 갖도록 변형되었거나 변형될 수 있는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함하며, 예를 들어, 변종은 혈장에서 향상된 단백질 안정성 또는 단백질의 향상된 활성을 부여한다. 변종은 기준 서열 예컨대, 천연 발생 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 캡티드와 상이할 수 있다.

[0075] 뉴클레오티드 서열 수준에서, 천연 및 비천연 발생 변종 유전자는 전형적으로, 기준 서열과 적어도 약 50% 동일할 것이며, 더욱 전형적으로, 약 70% 동일할 것이며, 심지어 더욱 전형적으로, 약 80% (90% 또는 그 초과의 동일성) 동일할 것이다. 아미노산 서열 수준에서, 천연 및 비천연 발생 변종 단백질은, 실질적인 비-동일성 부위가 비-보존된 부위에서 허용되지만(예를 들어, 70% 미만의 동일성, 예컨대, 60%, 50% 또는 심지어 40% 미만), 전형적으로 기준 단백질과 적어도 약 70% 동일할 것이며, 더욱 전형적으로, 약 80% 동일할 것이며, 심지어 더욱 전형적으로는 약 90% 또는 그 초과로 동일한 것이다. 또 다른 구체예에서, 서열은 기준 서열과 적어도 60%, 70%, 75% 또는 그 초과의 동일성(예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과의 동일성)을 갖는다. 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 폴리펩티드에서 뉴클레오티드 및 아미노산 변화의 도입 과정은 당업자에게 공지되어 있다(예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2007)] 참조).

[0076] 용어 "동일성" 또는 "상동성" 및 이의 문법적 변형은 2개 또는 그 초과의 언급된 대상이 "정렬된" 서열인 경우 동일함을 의미한다. 따라서, 예를 들어, 2개의 폴리펩티드 서열이 동일한 경우, 이들은 적어도 언급된 부위 또는 부분내에서 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 2개의 폴리뉴클레오티드 서열이 동일한 경우, 이들은 적어도 언급된 부위 또는 부분내에서 동일한 폴리뉴클레오티드 서열을 갖는다. 동일성은 서열의 규정된 영역(부위 또는 도메인)을 망라할 수 있다. 동일성의 "영역" 또는 "부위"는 동일한 2개 또는 그 초과의 언급된 대상의 일부를 나타낸다. 이와 같이, 2개의 단백질 또는 핵산 서열이 하나 이상의 서열 영역 또는 부위에 걸쳐 동일한 경우, 이들은 그 부위 내에서 동일성을 공유한다. "정렬된" 서열은 기준 서열 대비 누락되거나 부가된 염기 또는 아미노산(캡)에 대한 교정(correction)을 종종 갖는 다중 폴리뉴클레오티드 또는 단백질(아미노산) 서열을 나타낸다.

[0077] 동일성은 서열의 전체 서열 길이 또는 일부에 걸쳐 확장될 수 있다. 특정 양태에서, 동일성 퍼센트를 공유하는 서열의 길이는 2, 3, 4, 5 개 또는 그 초과의 연속 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 개 등의 연속 아미노산이다. 추가의 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 20 개 또는 그 초과의 연속 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 개 등의 연속 아미노산이다. 추가의 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 35개 또는 그 초과의 연속 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 35,

36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 개 등의 연속 아미노산이다. 더욱 추가의 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 50개 또는 그 초과의 연속 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 50-55, 55-60, 60-65, 65-70, 70-75, 75-80, 80-85, 85-90, 90-95, 95-100, 100-110 개 등의 연속 폴리뉴클레오티드 또는 아미노산이다.

[0078] 용어 "상동" 또는 "상동성"은 2개 또는 그 초과의 언급된 대상이 해당 부위 또는 부분에 걸쳐 적어도 부분적인 동일성을 공유함을 의미한다. 상동성 또는 동일성의 "영역, 부위 또는 도메인"은 2개 또는 그 초과의 언급된 대상의 일부가 상동성을 공유하거나 동일함을 의미한다. 이와 같이, 2개의 서열이 하나 이상의 서열 부위에 걸쳐 동일한 경우, 이들은 이를 부위에서 동일성을 공유한다. "실질적인 상동성"은 문자가 상동성을 공유하는 기준 문자의 관련된/상응하는 부위 또는 부분, 또는 기준 문자의 하나 이상의 구조 또는 기능 (예를 들어, 생물학적 기능 또는 활성)의 적어도 부분적 구조 또는 기능을 갖거나 갖는 것으로 예측되도록 구조적으로 또는 기능적으로 보존됨을 의미한다.

[0079] 2개 서열 사이의 동일성 (상동성)의 정도는 컴퓨터 프로그램 및 수학적 알고리즘을 이용하여 확인될 수 있다. 서열 동일성 (상동성) 퍼센트를 계산하는 이러한 알고리즘은 일반적으로 비교 부위 또는 영역에 걸친 서열 갭 및 미스매치를 설명한다. 예를 들어, BLAST (예를 들어, BLAST 2.0) 탐색 알고리즘 (예를 들어, 문헌[Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403 (1990)] 참조, 공개적으로 NCBI를 통해 이용가능)은 하기와 같은 예시적인 탐색 변수를 갖는다: 미스매치-2; 갭 개방 5; 갭 연장 2. 폴리펩티드 서열 비교에 있어서, BLASTP 알고리즘은 전형적으로 스코어링 매트릭스 예컨대, PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 또는 BLOSUM 50과 조합되어 사용된다. FASTA (예를 들어, FASTA2 및 FASTA3) 및 SSEARCH 서열 비교 프로그램이 또한, 동일성의 정도를 정량화하기 위해 이용된다 (Pearson et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988); Pearson, *Methods Mol Biol.* 132:185 (2000); and Smith et al., *J. Mol. Biol.* 147:195 (1981)). Delaunay-기반 위상 맵핑을 이용하여 단백질 구조 유사성을 정량화하기 위한 프로그램이 또한 개발되었다 (Bostick et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 304:320 (2003)).

[0080] 폴리뉴클레오티드는 부가 및 삽입 예를 들어, 이종 도메인을 포함한다. 부가 (예를 들어, 이종 도메인)는 조성 물로의 임의의 유형의 문자의 공유적 또는 비공유적 부착일 수 있다. 전형적으로 부가 및 삽입 (예를 들어, 이종 도메인)은 보완적인 또는 별개의 기능 또는 활성을 부여한다.

[0081] 부가 및 삽입은, 서열에 공유적으로 부착된, 기준의 천연 (야생형) 서열에 일반적으로 존재하지 않는 하나 이상의 문자를 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 서열인 키메라 및 융합 서열을 포함한다. 용어 "융합" 또는 "키메라" 및 이의 문법적 변형은 문자와 관련하여 사용되는 경우, 문자의 일부 또는 부분이 이러한 문자와 구별되는 (이종) 상이한 존재를 함유함을 의미하며, 이들은 전형적으로 자연에서는 함께 존재하지 않는다. 즉, 예를 들어, 융합 또는 키메라의 한 부분이 자연에서는 함께 존재하지 않으며 구조적으로 구별되는 부분을 포함하거나 이들로 구성된다.

[0082] 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오티드의 삽입 또는 혼입에 의해 조작될 수 있는 플라스미드, 바이러스 (예를 들어, AAV 벡터), 코스미드 또는 기타 비히클을 지칭한다. 이러한 벡터는 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입/전이시키고, 세포에서 삽입된 폴리뉴클레오티드를 전사 또는 번역시키기 위한 유전자 조작 (즉, "클로닝 벡터")에 사용될 수 있다. 벡터 핵산 서열은 일반적으로 적어도, 세포 내에서의 증식을 위한 복제 오리진 및 선택적으로, 추가적인 요소 예컨대, 이종 폴리뉴클레오티드 서열, 발현 조정 요소 (예를 들어, 프로모터, 인핸서), 선택 마커 (예를 들어, 항생제 내성), 폴리-아데닌 서열을 함유한다.

[0083] 바이러스 벡터 예컨대, 재조합 AAV 벡터의 수식어는 물론, 서열 예컨대, 재조합 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드의 수식어로서 본원에 사용된 바와 같은 용어 "재조합"은, 조성물 (예를 들어, AAV 또는 서열)이 일반적으로 자연에서 발생하지 않는 방식으로 조작 (즉, 유전자 조작)되었음을 의미한다. 재조합체 벡터 예컨대, AAV 벡터의 특정 예는 야생형 바이러스 (예를 들어, AAV) 게놈에 일반적으로 존재하지 않는 폴리뉴클레오티드가 바이러스 게놈 내에 삽입되는 경우일 것이다. 예를 들어, 재조합 폴리뉴클레오티드의 예는, 단백질을 엔코딩하는 이종 폴리뉴클레오티드 (예를 들어, 유전자)가 바이러스 (예를 들어, AAV) 게놈 내에서 유전자가 일반적으로 결합되는 5', 3' 및/또는 인트론 영역의 존재 또는 부재하에 벡터내로 클로닝되는 경우일 것이다. 용어 "재조합"은 본원에서 항상 바이러스 벡터 예컨대, AAV 벡터 및 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 같은 서열과 관련되어 항상 사용되는 것은 아니나, AAV의 재조합 형태, 및 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 포함하는 서열이 임의의 이러한 누락에도 불구하고 명백히 포함된다.

[0084] 재조합 벡터 "게놈" (예를 들어, 바이러스 또는 AAV 벡터 게놈)은 생체외, 시험관내 또는 생체내에서 세포의 후

속 감염 (형질도입 또는 형질전환)을 위해 바이러스 (또한, 본원에서는 "입자" 또는 "비리온"으로서 언급됨) 내로 캡시드화되거나 패키징될 수 있다. 재조합 AAV 벡터 계놈이 AAV 입자 내부로 캡시드화되거나 패키징되는 경우, 입자는 "rAAV"로서 언급될 수 있다. 이러한 입자 또는 비리온은 전형적으로, 벡터 계놈을 캡시드화하거나 패키징하는 단백질을 포함할 것이다. 특정 예는 바이러스 캡시드 및 엔벨로프 단백질 및 AAV의 경우, AAV 캡시드 단백질을 포함한다.

[0085] 재조합 플라스미드에 있어서, 벡터 "계놈"은 궁극적으로 패키징되거나 캡시드화되어 바이러스 입자를 형성하는 재조합 플라스미드 서열의 일부를 지칭한다. 재조합 플라스미드가 재조합 벡터의 자체 또는 제작에 사용되는 경우, 벡터 계놈은 재조합 플라스미드의 벡터 계놈 서열에 상응하지 않는 "플라스미드"의 일부를 포함하지 않는다. 재조합 플라스미드의 이러한 비(non) 벡터 계놈 부분은 '플라스미드 백본'으로서 지칭되며, 이는 중식 및 재조합 바이러스 생성에 필요한 과정인 플라스미드의 클로닝 및 증폭에 중요하나, 그 자체는 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 내로 패키징되거나 캡시드화되지 않는다.

[0086] 따라서, 벡터 "계놈"은 바이러스 (예를 들어, AAV)에 의해 패키징되거나 캡시드화되며, 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하는 벡터 플라스미드의 일부를 지칭한다. 재조합 플라스미드의 비 벡터 계놈 부분은 플라스미드의 클로닝 및 증폭에 중요한 백본을 포함하나, 그 자체는 바이러스 (예를 들어, AAV)에 의해 패키징되거나 캡시드화되지 않는다.

[0087] 바이러스 벡터는 바이러스 계놈을 포함하는 하나 이상의 핵산 요소를 기재로 하거나 이로부터 유래된다. 특정 바이러스 벡터는 파르보바이러스 벡터, 예컨대, 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터를 포함한다.

[0088] 재조합 벡터 서열은 폴리뉴클레오티드의 삽입 또는 혼입에 의해 조작된다. 본원에 기술된 바와 같이, 벡터 플라스미드는 일반적으로, 세포에서의 증식을 위한 복제 오리진 및 하나 이상의 발현 조정 요소를 적어도 함유한다.

[0089] AAV 벡터를 포함하는 벡터 서열은 하나 이상의 "발현 조정 요소"를 포함할 수 있다. 전형적으로, 발현 조정 요소는 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현에 영향을 끼치는 핵산 서열(들)이다. 벡터 내에 존재하는 프로모터 및 인핸서와 같은 본원에 제시된 바와 같은 발현 조정 요소를 포함하는 조정 요소는 적절한 이종 폴리뉴클레오티드 전사 및 적절한 경우 번역을 촉진하기 위해 포함된다 (예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론에 대한 스플라이싱 시그널, mRNA의 인-프레임 번역을 허용하는 유전자의 정확한 해독틀의 유지 및 정지 코돈 등). 이러한 요소는 전형적으로 시스로 작용하나, 또한 트랜스로 작용할 수 있다.

[0090] 발현 조정은 전사, 번역, 스플라이싱, 메시지 안정도 등의 수준에서 일어날 수 있다. 전형적으로, 전사를 조절하는 발현 조정 요소는 전사된 폴리뉴클레오티드의 5' 말단 근처 (즉, "업스트림")에서 나란히 놓인다. 발현 조정 요소는 또한, 전사된 서열의 3' 말단 (즉, "다운스트림") 또는 전사체내 (예를 들어, 인트론내)에 위치할 수 있다. 발현 조정 요소는 전사된 서열로부터 멀리 떨어진 거리 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드로부터 100 내지 500, 500 내지 1000, 2000 내지 5000, 5000 내지 10,000 개 또는 그 초과의 뉴클레오티드)를 두고, 심지어 상당한 거리를 두고 위치할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 폴리뉴클레오티드 길이 제한으로 인해, AAV 벡터에 있어서 이러한 발현 조정 요소는 전형적으로, 폴리뉴클레오티드로부터 1 내지 1000개 뉴클레오티드 내에 위치할 것이다.

[0091] 기능적으로, 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 발현은 발현 요소 (예를 들어, 프로모터)가 폴리뉴클레오티드의 전사 및 적합하다면, 전사체의 번역을 조절하도록 요소에 의해 적어도 부분적으로 조정가능하다. 발현 조정 요소의 특정 예는 프로모터이며, 이는 일반적으로 전사된 서열의 5'에 위치한다. 발현 조정 요소의 또 다른 예는 인핸서이며, 이는 전사된 서열의 5', 3' 또는 전사된 서열내에 위치할 수 있다.

[0092] 본원에 사용된 바와 같은 "프로모터"는 재조합 생성물을 엔코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 근접하게 위치하는 DNA 서열을 지칭할 수 있다. 프로모터는 전형적으로, 근접 서열 예를 들어, 이종 폴리뉴클레오티드에 작동 가능하게 연결된다. 프로모터는 전형적으로, 프로모터가 존재하지 않는 경우 발현된 양과 비교하여 이종 폴리뉴클레오티드로부터 발현된 양을 증가시킨다.

[0093] 본원에 사용된 바와 같은 "인핸서"는 이종 폴리뉴클레오티드에 근접하게 위치하는 서열을 지칭할 수 있다. 인핸서 요소는 프로모터 요소의 업스트림에 전형적으로 위치하며, 또한 작용하며, DNA 서열 (예를 들어, 이종 폴리뉴클레오티드)의 다운스트림 또는 DNA 서열 내에 위치할 수 있다. 따라서, 인핸서 요소는 이종 폴리뉴클레오티드의 100 개 염기 쌍, 200 개 염기 쌍, 또는 300 개 또는 그 초과의 염기 쌍 업스트림 또는 다운스트림에 위치할 수 있다. 인핸서 요소는 전형적으로, 프로모터 요소에 의해 제공된 증가된 발현을 초과하여 이종 폴리뉴

클레오티드의 발현을 증가시킨다.

[0094] "조직-특이적 발현 조정 요소/프로모터"로서 본원에서 언급된 발현 조정 요소 (예를 들어, 프로모터)는 특정 조직 또는 세포 타입에서 활성인 것들을 포함한다. 조직-특이적 발현 조정 요소는 전형적으로 특정 세포 또는 조직(예를 들어, 간, 뇌, 중추신경계, 척수, 눈, 망막, 뼈, 근육, 폐, 췌장, 심장, 신장 세포 등)에서 활성이다. 발현 조정 요소는 전형적으로 이들 세포, 조직 또는 기관에서 활성적인데, 왜냐하면 이들이 특이적 세포, 조직 또는 기관 타입에 독특한 전사 활성 인자 단백질 또는 기타 전사의 조절 인자에 의해 인식되기 때문이다.

[0095] 예를 들어, 골격근에서의 발현이 요망되는 경우, 근육에서 활성인 프로모터가 사용될 수 있다. 이들은 골격  $\alpha$ -액틴, 모이신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제를 엔코딩하는 유전자로부터의 프로모터는 물론, 천연-발생 프로모터보다 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다 (예를 들어, 문헌 [Li, et al., *Nat. Biotech.* 17:241-245 (1999)] 참조). 간에 대해 조직-특이적인 프로모터의 예는 특히, 일부민 [Miyatake, et al. *J. Virol.*, 71:5124-32 (1997)]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터 [Sandig, et al., *Gene Ther.* 3:1002-9 (1996)]; 알파-페토단백질 (AFP) [Arbuthnot, et al., *Hum. Gene Ther.*, 7:1503-14 (1996)], 뼈 (오스테오칼신 [Stein, et al., *Mol. Biol. Rep.*, 24:185-96 (1997)]; 골 시알로단백질 [Chen, et al., *J. Bone Miner. Res.* 11:654-64 (1996)]), 림프구 (CD2 [Hansal, et al., *J. Immunol.*, 161:1063-8 (1998)]; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런 (뉴런-특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터 [Andersen, et al., *Cell. Mol. Neurobiol.*, 13:503-15 (1993)]); 신경미세섬유 경쇄 유전자 [Piccioli, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:5611-5 (1991)]; 뉴론-특이적 vgf 유전자 [Piccioli, et al., *Neuron*, 15:373-84 (1995)]이다.

[0096] 발현 조정 요소는 또한, 많은 다양한 세포 타입에서 폴리뉴클레오티드의 발현을 추진할 수 있는 편제하거나 뒤섞인 프로모터/인핸서를 포함한다. 이러한 요소는 거대세포바이러스 (CMV) 급속 초기 발현 프로모터/인핸서 서열, 라우스 육종바이러스 (RSV) 프로모터/인핸서 서열, 및 다양한 포유동물 세포 타입에서 활성인 기타 바이러스 프로모터/인핸서, 또는 자연적으로는 존재하지 않는 합성 요소 (예를 들어, 문헌 [Boshart et al., *Cell*, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 환원효소 프로모터, 세포질  $\beta$ -액틴 프로모터 및 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0097] 발현 조정 요소는 또한, 조절가능한 방식으로 발현을 부여할 수 있으며, 즉, 시그널 또는 자극은 작동가능하게 연결된 이종 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가 또는 감소시킬 수 있다. 시그널 또는 자극에 반응하여 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 증가시키는 조절가능한 요소는 또한, "유도성 요소" (즉, 시그널에 의해 유도됨)로서 언급된다. 특정 예는 호르몬 (예를 들어, 스테로이드) 유도성 프로모터를 포함하나 이에 제한되지 않는다. 시그널 또는 자극에 반응하여 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현을 감소시키는 조절 가능한 요소는 "억제성 요소"로서 언급된다 (즉, 시그널이 제거되거나 존재하지 않는 경우 발현이 증가되도록, 시그널은 발현을 감소시킴). 전형적으로, 이러한 요소에 의해 부여된 증가 또는 감소의 양은 존재하는 시그널 또는 자극의 양에 비례한다; 시그널 또는 자극의 양이 더 클수록, 발현의 증가 또는 감소가 더 크다. 특정 비제한적 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌 (MT) 프로모터; 스테로이드 호르몬-유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터; T7 폴리머라제 프로모터 시스템 (WO 98/10088); 테트라시클린-억제성 시스템 (Gossen, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551 (1992)); 테트라시클린-유도성 시스템 (Gossen, et al., *Science*, 268:1766-1769 (1995); 또한, 문헌 [Harvey, et al., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2:512-518 (1998)] 참조; RU486-유도성 시스템 (Wang, et al., *Nat. Biotech.* 15:239-243 (1997) and Wang, et al., *Gene Ther.* 4:432-441 (1997)); 및 라파마이신-유도성 시스템 (Magari, et al., *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872 (1997); Rivera, et al., *Nat. Medicine*, 2:1028-1032 (1996))을 포함한다. 이러한 상황에서 유용할 수 있는 기타 조절가능한 조정 요소는 특이적 생리학적 상태 예를 들어, 온도, 급성기 (acute phase)에 의해 조절되는 것들이다.

[0098] 발현 조정 요소는 또한, 이종 폴리뉴클레오티드에 대한 천연 요소(들)를 포함한다. 천연 조정 요소 (예를 들어, 프로모터)는, 이종 폴리뉴클레오티드의 발현이 천연 발현을 모방하는 것이 바람직한 경우 이용될 수 있다. 천연 요소는, 이종 폴리뉴클레오티드의 발현이 일시적으로 또는 발달적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특이적 전사 자극에 대해 반응하여 조절되어야 하는 경우 이용될 수 있다. 기타 천연 발현 조정 요소 예컨대, 인트론, 폴리아데닐화 부위 또는 코자크 컨센서스 서열이 또한 이용될 수 있다.

[0099] 본원에 사용된 바와 같은, 용어 "작동가능한 연결" 또는 "작동가능하게 연결된"은 구성요소들이 이들의 의도된 방식으로 작용하는 것을 허용하도록, 기술된 바와 같은 구성요소의 물리적 또는 기능적 근위를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드와 작동가능하게 연결되는 발현 조정 요소의 예에서, 조정 요소가 핵산의 발현을 조절하도록 관계

가 이루어진다. 더욱 특히, 예를 들어, 작동가능하게 연결된 2개의 DNA 서열은, 2개의 DNA가 DNA 서열중 적어도 하나가 다른 서열에 대해 생리학적 영향을 발휘할 수 있는 관계로 배열(시스 또는 트랜스)됨을 의미한다.

[0100] AAV 벡터를 포함하는 벡터는 여전히 추가의 핵산 요소를 포함할 수 있다. 이들 요소는 비제한적으로, AAV ITR 서열의 하나 이상의 복사체, 프로모터/인핸서 요소, 전사 종결 시그널, 폴리뉴클레오티드 서열 측면에 인접한 5' 또는 3' 비번역된 영역(예를 들어, 폴리아데닐화 서열), 또는 인트론 I 전체 또는 일부를 포함한다. 이러한 요소는 또한, 선택적으로 전사 종결 시그널을 포함한다. 전사 종결 시그널의 특정한 비제한적 예는 SV40 전사 종결 시그널이다.

[0101] 본원에 기술된 바와 같이, AAV 벡터는 일반적으로, 약 4 kb 내지 약 5.2 kb, 또는 약간 더 초과하는 규정된 크기 범위를 갖는 DNA의 삽입물을 전형적으로 수용한다. 따라서, 더 짧은 서열에 있어서, 삽입 단편에서 스터퍼 또는 필러의 포함은 바이러스 입자 내로 AAV 벡터 패키징에 허용가능한 바이러스 계놈 서열의 정상 크기 또는 이에 근접하도록 길이를 조절하기 위한 것이다. 다양한 구체예에서, 필러/스터퍼 핵산 서열은 핵산의 비번역된(비-단백질 엔코딩) 세그먼트이다. AAV 벡터의 특정 구체예에서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 4.7 Kb 미만 길이를 가지며, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은, 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 조합되는 경우(예를 들어, 벡터 내로 삽입되는 경우) 총 길이가 약 3.0~5.5Kb, 또는 약 4.0~5.0Kb, 또는 약 4.3~4.8Kb가 되는 길이를 갖는다.

[0102] 인트론은 또한, 바이러스 입자 내로의 AAV 벡터 패키징을 위한 길이를 달성하기 위해 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 작용할 수 있다. 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 작용하는 인트론 및 인트론 단편(예를 들어, FIX의 인트론 I의 일부)은 또한 발현을 향상시킬 수 있다. 예를 들어, 인트론 요소의 포함은 인트론 요소의 부재하의 발현과 비교하여 발현을 향상시킬 수 있다(Kurachi et al., 1995, 상기 참조).

[0103] 인트론의 사용은 FIX 인트론 I 서열의 포함에 제한되지 않으며, 또한 기타 인트론을 포함하며, 이러한 인트론은 동일한 유전자(예를 들어, 이종 폴리뉴클레오티드가 FIX를 엔코딩하는 경우, 인트론은 FIX 계놈 서열에 존재하는 인트론으로부터 유래됨) 또는 완전하게 상이한 유전자 또는 다른 DNA 서열과 결합될 수 있다. 따라서, 동족(관련된) 유전자(이종 폴리뉴클레오티드 서열이 계놈 서열에 의해 엔코딩된 동일한 단백질의 전부 또는 일부를 엔코딩함) 및 비-동족(비관련된) 유전자(이종 폴리뉴클레오티드 서열이 계놈 서열에 의해 엔코딩된 단백질과 구별되는 단백질을 엔코딩함)로부터의 계놈 서열에서 발견된 인트론과 같은 핵산의 기타 비번역된(비-단백질 엔코딩) 부위는 또한, 본 발명에 따라 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 작용할 수 있다.

[0104] 본원에 사용된 바와 같은 "인트론 I의 부분"은 약 0.1kb 내지 약 1.7kb의 뉴클레오티드 길이를 갖는 인트론 I의 부위를 위미하는 것으로서, 이러한 부위는 인트론 I의 부분의 부재시의 FIX 발현과 비교할 경우 플라스미드 또는 바이러스 벡터 주형에서 FIX의 발현을 전형적으로 약 1.5배 또는 그 초과 만큼 향상시킨다. 더욱 특정한 부분은 1.3kb의 인트론 I의 부분이다.

[0105] 본원에서 사용되는 용어 "올리고뉴클레오티드"는 2개 이상, 전형적으로 3개 초과의 리보- 또는 데옥시리보뉴클레오티드로 구성된 핵산 문자로서 규정된 서열, 프라이머 및 프로브를 지칭한다. 올리고뉴클레오티드의 정확한 크기는 다양한 인자 및 올리고뉴클레오티드의 특정 적용 및 용도에 좌우될 것이나, 전형적으로 올리고뉴클레오티드는 약 5~50개 뉴클레오티드 길이를 갖는다.

[0106] 본원에서 사용되는 용어 "프라이머"는 생물학적 시스템으로부터 유래되거나 제한 효소 분해에 의해 생성되거나 합성에 의해 생성된, 적당한 환경에 놓일 경우, 주형-의존성 핵산 합성의 개시제로서 기능적으로 작용할 수 있는 단일 가닥 또는 이중 가닥의 DNA 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 적절한 핵산 주형, 핵산의 적합한 뉴클레오시드 트리포스페이트 전구체, 폴리머라제 효소, 적합한 보조인자 및 적합한 온도 및 pH와 같은 조건이 제공되는 경우, 프라이머는 폴리머라제의 작용에 의한 뉴클레오티드의 첨가 또는 프라이머 연장 생성물을 산출하는 유사한 활성에 의해 이의 3' 말단에서 연장될 수 있다. 프라이머는 특정 조건 및 적용 요건에 따라 길이가 달라질 수 있다. 예를 들어, 진단적 적용에서, 올리고뉴클레오티드 프라이머는 전형적으로 15~30개 또는 그 초과의 뉴클레오티드의 길이이다. 프라이머는 요망되는 연장 생성물의 합성을 프라이밍하기 위해 요망되는 주형에 충분한 상보성을 지녀야 하고, 즉, 폴리머라제 또는 유사한 효소에 의한 합성의 개시에 사용하기에 적합한 병렬로 프라이머의 3' 하이드록실 모이어티를 제공하는데 충분한 방식으로 요망되는 주형 가닥과 어닐링될 수 있어야 한다. 프라이머 서열이 요망되는 주형의 정확한 상보체를 나타낼 필요는 없다. 예를 들어, 비상보적인 뉴클레오티드 서열은 다른 상보적인 프라이머의 5' 말단에 부착될 수 있다. 대안적으로, 비상보적인 염기는, 프라이머 서열이 요망되는 주형 가닥의 서열과 충분한 상보성을 지녀서 연장 생성물의 합성을 위한 주형-프라이머 복합체를 기능적으로 제공한다면, 올리고뉴클레오티드 프라이머 서열 내에 산재될 수 있다.

- [0107] 중합효소 연쇄 반응(PCR)은 미국특허 4,683,195호, 4,800,195호, 및 4,965,188호에 기재되어 있다.
- [0108] 구 "특이적으로 하이브리드화된다"는 당 분야에서 일반적으로 이용되는 소정의 조건하에서 하이브리드화를 가능케 하는 충분히 상보적인 (때때로, "실질적으로 상보적인"이라고 지칭됨) 서열의 2개의 단일-가닥 핵산 분자들 간의 회합(association)을 지칭한다. 특히, 상기 용어는 2개의 폴리뉴클레오티드 서열의 실질적으로 상보적인 서열과의 하이브리드화를 지칭하고, 다른 단일-가닥 비-상보적 핵산 서열과의 하이브리드화는 실제로 배제된다.
- [0109] "선택 마커 유전자"는 발현되었을 때 형질전환된 세포 상에서 항생제 내성 (예를 들어, 카나마이신)과 같은 선택가능한 표현형을 부여하는 유전자를 지칭한다. "리포터" 유자는 검출가능한 시그널을 제공하는 것이다. 리포터 유자의 비제한적 예는 루시퍼라제 유전자이다.
- [0110] 변형된 형태를 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 다양한 표준 클로닝, 재조합 DNA 기법을 이용하여, 세포 발현을 통해, 또는 시험관내 번역 및 화학 합성 기법을 이용하여 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오티드의 순도는 시퀀싱, 젤 전기영동 등을 통해 측정될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 하이브리드화 또는 컴퓨터-기반 데이타베이스 스크리닝 기법을 이용하여 분리될 수 있다. 이러한 기법은 (1) 상동 뉴클레오티드 서열을 검출하기 위한 프로브와 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리의 하이브리드화; (2) 예를 들어, 발현 라이브러리를 사용하여 공유된 구조적 특징을 갖는 폴리펩티드를 검출하기 위한 항체 스크리닝; (3) 관심 핵산 서열에 어닐링될 수 있는 프라이머를 사용한 게놈 DNA 또는 cDNA에 대한 중합효소 연쇄 반응 (PCR); (4) 관련된 서열에 대한 서열 데이터 베이스의 컴퓨터 탐색; 및 (5) 감수된 핵산 라이브러리의 다양한 스크리닝을 포함하나 이에 제한되지 않는다.
- [0111] 변형된 형태를 포함하는 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드는 또한, 당업자에게 공지된 방법 예를 들어, 자동화된 합성 장치를 사용하여 화학 합성에 의해 생성될 수 있다 (예를 들어, [Applied Biosystems, Foster City, CA] 참조). 웨프티드는 화학 방법을 이용하여 전체적으로 또는 부분적으로 합성될 수 있다 (예를 들어, 문헌 [Caruthers (1980). *Nucleic Acids Res. Symp. Ser.* 215; Horn (1980); and Banga, A.K., *Therapeutic Peptides and Proteins, Formulation, Processing and Delivery Systems* (1995) Technomic Publishing Co., Lancaster, PA] 참조). 웨프티드 합성은 다양한 고체상 기법 (예를 들어, 문헌 [Roberge Science 269:202 (1995); Merrifield, *Methods Enzymol.* 289:3(1997)] 참조)을 사용하여 수행될 수 있으며, 자동화된 합성은 예를 들어, 제조업자의 지시에 따라 ABI 431A 웨프티드 합성기 (Perkin Elmer)를 사용하여 달성될 수 있다.
- [0112] 조성물의 수식어로서 사용되는 경우 용어 "분리된"은 조성물이 수동으로 준비되거나, 생체내 환경에서 자연 발생하는 것으로부터 완전히 또는 적어도 부분적으로 분리됨을 의미한다. 일반적으로, 분리된 조성물에는 이들이 자연에서 일반적으로 관련된 하나 이상의 물질 예를 들어, 하나 이상의 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 세포 막이 실질적으로 존재하지 않는다. 용어 "분리된"은 수동으로 생성된 조합물 예를 들어, 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 서열, 또는 백터 게놈 및 약제 제형을 패키징하거나 캡시드화시키는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 백터 또는 관련된 AAV 백터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 배제하지 않는다. 용어 "분리된"은 또한, 조성물의 대안적인 물리적 형태 예컨대, 하이브리드/키메라, 멀티머/올리고머, 변형물 (예를 들어, 인산화, 당화, 지질화) 또는 유도체 형태, 또는 수동으로 생성된 숙주 세포에서 발현된 형태를 배제하지 않는다.
- [0113] 본 발명의 방법 및 용도는 분열 및 비-분열 세포 둘 모두를 포함하는 광범위한 숙주 세포로 이종 폴리뉴클레오티드 (전이유전자)를 전달(형질도입) 하기 위한 수단을 제공한다. 본 발명의 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 백터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 및 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 방법, 용도 및 약제 제형은 치료 방법으로서 이를 필요로 하는 대상체에 단백질, 웨프티드 또는 핵산을 투여하는 방법에 추가적으로 유용하다. 따라서, 이러한 방식으로, 단백질, 웨프티드 또는 핵산은 대상체에서 생체내에서 생성될 수 있다. 대상체에는 단백질, 웨프티드 또는 핵산이 결핍되어 있기 때문에, 또는 대상체에서 단백질, 웨프티드 또는 핵산의 생성이 치료 방법으로서 또는 다르게 일부 치료학적 효과를 부여할 수 있기 때문에, 대상체는 단백질, 웨프티드 또는 핵산을 필요로 하거나 이로부터 이득을 볼 수 있다. 대안적으로, 예를 들어, 치료학적 효과를 달성하여 예를 들어, 신경퇴행성 질환, 암 또는 죽상동맥경화증의 치료를 위해, 질환 과정에서 관련된 표적 유자의 발현 또는 생성을 억제 또는 감소시키는 것이 바람직할 수 있다.
- [0114] 일반적으로, 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 백터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 방법 및 용도는 생물학적 효과를 갖는 임의의 이종 폴리뉴클레오티드 (전이유전자)를 전달하여 불충분하거나 바람직하지 않은 유전자 발현과 관련된 임의의 질병과 관련된 하나 이상의 증상을 완화시키거나 치료하는데 이용될 수 있다. 재

조합 벡터 (예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 입자, 방법 및 용도는 다양한 질환 상태에 대한 요법을 제공하는데 이용될 수 있다.

[0115] 결합 유전자가 공지되어 있거나 클로닝된 많은 유전 질환이 존재한다. 일반적으로, 상기 질환 상태는 2개 부류에 속한다: 일반적으로, 열성 방식으로 유전되는 일반적인 효소의 결핍 상태 및 우성 방식으로 유전되는 적어도 때때로 조절 또는 구조 단백질을 포함하는 불균형 상태. 결핍 상태 질환에 있어서, 유전자 전이는 대체 요법을 위해 정상 유전자를 침범된 조직으로 유도하는 것은 물론 안티센스 돌연변이를 이용하여 질환에 대한 동물 모델을 생성시키는데 이용될 수 있다. 불균형 질환 상태에 있어서, 유전자 전이는 모델 시스템에서 질환 상태를 발생시키는데 이용될 수 있으며, 이는 이어서 질환 상태에 대응하고자 하는 노력에 이용될 수 있다. 따라서, 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 방법 및 용도는 유전자 질환의 치료를 허용한다. 본원에 사용된 바와 같이, 질환 상태는 질환을 초래하거나 이를 더욱 심각하게 하는 결핍 또는 불균형을 부분적으로 또는 전체적으로 치료함으로써 치료된다. 돌연변이를 초래하거나 결함을 교정하기 위해 핵산 서열의 부위-특이적 통합을 이용하는 것이 또한 가능하다.

[0116] 예시적인 질환 상태는 비제한적으로, 하기를 포함한다: 낭포성 섬유증 (및 폐의 기타 질환), A형 혈우병, B형 혈우병, 지중해빈혈, 빈혈 및 기타 혈액 응고 질환, AIDS, 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축측상 경화증, 간질, 및 기타 신경 질환, 암, 당뇨병, 근육 퇴행위축 (예를 들어, 뒤티엔느, 베커), 고세병, 허러병, 아데노신 테아미나제 결핍, 글리코겐 축적병 및 기타 대사 결함, 폼페병, 울혈 심부전증, 망막 퇴행성 질환 (맥락막 결여, 래베르선천흑암시 및 기타 안구 질환), 및 고형 기관 (예를 들어, 뇌, 간, 신장, 심장)의 질환, 및 기타 등등.

[0117] 본 발명에 따르면, 본 발명의 재조합 벡터 (예를 들어, AAV), 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자(예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 및 벡터 게놈을 포함하는 본 발명의 바이러스 입자(예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 포함하는 치료 방법 및 용도가 제공된다. 본 발명의 방법 및 용도는 단백질을 엔코딩하는 유전자를 도입함으로써 또는 유전자 발현 또는 기능을 증가시키거나 자극함으로써 예를 들어, 유전자 첨가 또는 치환에 의해 치료될 수 있는 질환에 광범위하게 적용가능하다. 본 발명의 방법 및 용도는 또한, 유전자 발현 또는 기능을 감소시키거나 저하시킴으로써 예를 들어, 유전자 낙아웃 또는 유전자 발현의 감소 (유전자 낙다운)에 의해 치료될 수 있는 질환에 광범위하게 적용가능하다.

[0118] 본 발명에 따르면 치료가능한 질환의 비제한적 특정 예로는 본원에 기술된 질환은 물론, 폐 질환 (예를 들어, 낭성섬유증), 혈액 응고 또는 출혈성 장애 (예를 들어, 억제제의 존재 또는 부재의 A형 혈우병 또는 B형 혈우병), 지중해빈혈, 혈액 장애 (예를 들어, 빈혈), 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병, 근위축측삭경화증 (ALS), 간질, 라이소좀 축적 병, 구리 또는 철 축적 장애 (예를 들어, 월슨병 또는 멘케스병), 라이소좀 산 리파제 결핍, 신경계 장애 또는 신경변성 장애, 암, 타입 1 또는 타입 2 당뇨, 고세병, 허러병, 아데노신 테아미나아제 결핍, 대사 결함 (예를 들어, 글리코겐 축적 병), 망막변성 질환(예컨대, RPE65 결핍 또는 결함, 범맥락막위축, 및 기타 눈 질환) 및 고형 기관 (예를 들어, 뇌, 간, 신장, 심장)의 질환을 포함한다.

[0119] 또한, 본 발명의 재조합 벡터 (예를 들어, AAV), 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 방법 및 용도는 모노클로날 항체 또는 이의 단편을 엔코딩하는 핵산을 전달하여 유익한 생물학적 효과를 제공하여 암, 감염성 질환 및 자가면역 질환 예컨대, 류마티스 관절염과 관련된 증상을 치료하거나 개선하는데 이용될 수 있다.

[0120] 일 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 (a) 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 제공하는 단계로서, 벡터 게놈은 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (및 선택적으로 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열)을 포함하며, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 상기 폴리뉴클레오티드 서열의 전사를 부여하는 발현 조정 요소에 작동가능하게 연결되는 단계; 및 (b) 상기 이종 폴리뉴클레오티드가 포유동물에서 발현되게 하는 양의 바이러스 입자를 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.

[0121] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 벡터 게놈을 포함하는 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 또는 복수의 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡

시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 포유동물 또는 포유동물의 세포에 투여하여 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 포유동물 또는 포유동물의 세포에 전달하거나 전이시킴으로써, 포유동물 또는 포유동물의 세포로 이종 폴리뉴클레오티드 서열을 전달하거나 전이시키는 것을 포함하며, 상기 벡터 계놈은 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (및 선택적으로, 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열)을 포함한다.

[0122] 추가의 구체예에서, 단백질 발현 또는 기능을 필요로 하는 결핍 포유동물을 치료하기 위한 본 발명의 방법 또는 용도는 벡터 계놈을 포함하는 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 또는 복수의 바이러스 (예를 들어, AAV) 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))를 제공하는 단계로서, 벡터 계놈이 이종 폴리뉴클레오티드 서열 (및 선택적으로, 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열)을 포함하는 단계; 및 바이러스 입자 또는 복수의 바이러스 입자를 포유동물에 투여하는 단계로서, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 포유동물에서 발현된 단백질을 엔코딩하거나, 이종 폴리뉴클레오티드 서열은 포유동물에서 내인성 단백질의 발현을 감소시키는 억제 서열 또는 단백질을 엔코딩하는 단계를 포함한다.

[0123] 본원에 기술된 본 발명의 방법 및 용도의 특정 양태에서, 이종 폴리뉴클레오티드의 발현은 포유동물 (예를 들어, 인간)에 치료학적 이점을 제공하는 단백질 또는 억제 핵산을 엔코딩한다. 추가의 특정 양태에서, 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이종 폴리뉴클레오티드 서열과 합친 길이가 약 3.0-5.5Kb, 또는 약 4.0-5.0Kb, 또는 약 4.3-4.8Kb의 총 길이를 갖도록 벡터 서열 내로 포함된다.

[0124] 본 발명의 방법 및 용도는 임의의 치료학적 또는 이로운 효과를 유도하는 치료 방법을 포함한다. 다양한 본 발명의 방법 및 용도에서, 추가로 포함하는 것은 질환에 의해 초래되거나 관련된 하나 이상의 해로운 (예를 들어, 물리적) 증상, 장애, 질병, 질환 또는 합병증의 억제, 감소 또는 저하 예컨대, 감소된 혈액 응고 시간, 보조 응고 인자 단백질의 감소된 투여 용량이다.

[0125] 따라서, 치료의 치료학적 또는 이로운 효과는 특정 대상에 제공된 임의의 객관적인 또는 주관적인 측정가능한 또는 검출가능한 개선 또는 이점이다. 치료학적 또는 이로운 효과는 질환의 모든 또는 임의의 특정한 해로운 증상, 장애, 질병 또는 합병증의 완전한 제거일 수 있으나 그렇지 않아도 된다. 이와 같이, 만족할만한 임상 종점은, 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 해로운 증상, 장애, 질병 또는 합병증에서 점진적 개선 또는 부분적 감소가 이루어지는 경우, 또는 짧거나 긴 기간 (수시간, 수일, 수주, 수개월 등)에 걸쳐 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 하나 이상의 해로운 증상, 장애, 질병 또는 합병증의 악화 또는 진행의 억제, 감소, 저하, 억압, 예방, 제한 또는 제어가 이루어지는 경우 달성된다.

[0126] 조성물 예컨대, 벡터 계놈, 벡터 계놈을 포함하는 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 및 본 발명의 방법 및 용도는 이를 필요로 하는 대상체에 충분량 또는 유효량으로 투여될 수 있다. "유효량" 또는 "충분량"은 단일 또는 다중 용량으로 단독으로 또는 하나 이상의 다른 조성물 (치료학적 제제 예컨대, 약물), 치료제, 프로토콜 또는 치료 요법제와 조합되어 임의의 기간 (장기간 또는 단기간)의 검출가능한 반응, 즉, 임의의 측정가능하거나 검출 가능한 정도로 또는 임의의 기간 (예를 들어, 수분, 수시간, 수일, 수개월, 수년 또는 치료 기간) 동안 대상체에 이로움을 주거나 대상체에 예상되거나 요망되는 결과를 제공하는 양을 나타낸다.

[0127] 치료학적 효과를 달성하기 위한 벡터 계놈 또는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV 예컨대, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 용량 예를 들어, 벡터 계놈 용량/체중 kg (vg/kg) 용량은 하기를 포함하나 이에 제한되지 않은 수개의 인자를 기반으로 변화될 것이다: 투여 경로, 치료학적 효과를 달성하는데 요구되는 이종 폴리뉴클레오티드 발현 수준, 치료되는 특정 질환, 바이러스 벡터에 대한 임의의 숙주 면역 반응, 이종 폴리뉴클레오티드 또는 발현 생성물 (단백질)에 대한 숙주 면역 반응 및 발현된 단백질의 안정도. 당업자는 상기 언급된 인자 및 다른 인자를 기반으로 하여 특정 질환 또는 장애를 갖는 환자를 치료하기 위한 비리온 용량 범위를 용이하게 결정할 수 있다. 일반적으로, 치료학적 효과를 달성하기 위한 용량은 적어도  $1\times 10^8$ , 또는 그 초과, 예를 들어,  $1\times 10^9$ ,  $1\times 10^{10}$ ,  $1\times 10^{11}$ ,  $1\times 10^{12}$ ,  $1\times 10^{13}$  또는  $1\times 10^{14}$ , 또는 그 초과의 대상체의 체중 kg 당 벡터 계놈 (vg/kg) 범위일 것이다.

[0128] 예로서 혈우병을 이용하는 경우, 일반적으로 말해서, 치료학적 효과를 달성하기 위해, 정상 개체에서 발견된 인자 농도의 1% 초과인 혈액 응고 인자 농도가 중증 질환 표현형을 중등증 표현형으로 변화시키는데 필요한 것으로 간주된다. 중증의 표현형은 관절 손상 및 생명을 위협하는 출혈을 특징으로 한다. 중등증 질환 표현형을 경증 표현형으로 전환시키기 위해, 정상치의 5% 초과의 혈액 응고 인자 농도가 요구되는 것으로 간주된다. 이

러한 혈우병 대상체를 치료하는데 있어서, 요망되는 치료학적 효과를 달성하기 위한 전형적인 용량은 대상체의 체중의 kg 당 적어도  $1 \times 10^{10}$  벡터 게놈 (vg) (vg/kg) 또는 약  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{11}$  vg/ 대상체의 체중 kg, 또는 약  $1 \times 10^{11}$  내지  $1 \times 10^{12}$  vg/대상체의 체중 kg, 또는 약  $1 \times 10^{12}$  내지  $1 \times 10^{13}$  vg/대상체의 체중 kg이다.

[0129] 치료를 위한 (예를 들어, 완화시키거나 치료학적 이점 또는 개선을 제공하기 위한) "유효량" 또는 "충분량"의 용량은 전형적으로, 질환의 하나, 다중 또는 모든 해로운 증상, 예후 또는 합병증, 예를 들어, 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 하나 이상의 해로운 증상, 장애, 질병, 병태 또는 합병증에 대한 반응을 측정가능한 정도이나, 질환의 진행 또는 악화의 감소, 저하, 억제, 억압, 제한 또는 제어가 만족스러운 결과를 가져오는 정도로 제공하는데 효과적이다.

[0130] 유효량 또는 충분량은 단일 투여로 제공될 수 있으나 그렇지 않아도 되며, 다중 투여가 요구될 수 있으며, 단독으로 또는 다른 조성물 (예를 들어, 제제), 치료제, 프로토콜 또는 치료학적 요법과 조합되어 투여될 수 있으나 그렇지 않아도 된다. 예를 들어, 양은 대상체의 요구, 치료되는 질환의 타입, 상태 및 중증도 또는 치료의 부작용 (존재하는 경우)에 의해 나타나는 바와 같이 비례적으로 증가될 수 있다. 또한, 제 2의 조성물 (예를 들어, 또 다른 약물 또는 제제), 치료제, 프로토콜 또는 치료 요법 없이 단일 또는 다중 용량으로 제공되는 경우 유효량 또는 충분량이 유효하거나 충분하지 않아도 되는데, 왜냐하면 추가적인 용량, 이러한 용량을 초과하고 넘어서는 양 또는 기간, 또는 추가적인 조성물 (예를 들어, 약물 또는 제제), 치료, 프로토콜, 또는 치료학적 요법이 해당 대상체에 유효하거나 충분한 것으로 간주되도록 포함될 수 있기 때문이다. 유효한 것으로 고려되는 양은 또한, 또 다른 치료, 치료학적 요법 또는 프로토콜 예컨대, 응고 장애 (예를 들어, A형 또는 B형 혈우병)의 치료를 위한 재조합 응고 인자 단백질의 투여의 이용 감소를 유도하는 양을 포함한다.

[0131] 유효량 또는 충분량은 처리된 각각 및 모든 대상체, 또는 해당 군 또는 군집의 대부분의 처리된 대상체에 유효하지 않아도 된다. 유효량 또는 충분량은 군 또는 일반적 군집이 아니라 특정 대상체에 유효하거나 충분함을 의미한다. 이러한 방법에 있어서 전형적인 것으로서, 일부 대상체는 해당 치료 방법 또는 용도 보다 더 큰 반응, 또는 덜한 반응을 나타내거나 반응을 나타내지 않을 것이다. 이와 같이, 적합한 양은 처리되는 상태, 요망되는 치료 효과 및 개별 대상체 (예를 들어, 대상체내의 생체이용율, 성별, 연령 등)에 좌우될 것이다.

[0132] 용어 "완화"는 대상체의 질환 또는 이의 증상, 또는 근본적인 세포 반응에서 검출가능하거나 측정가능한 개선을 의미한다. 검출가능하거나 측정가능한 개선은 질환의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간, 또는 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 합병증의 주관적이거나 객관적인 감소, 저하, 억제, 억압, 제한 또는 제어, 또는 질환의 증상 또는 근본적인 원인 또는 예후의 개선, 또는 질환의 반전을 포함한다.

[0133] 이와 같이, 성공적인 치료 결과는 대상체에서 질환의 하나 이상의 해로운 증상 또는 근본이 되는 원인 또는 예후, 또는 질환의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간의 감소, 저하, 억제, 억압, 제한, 제어 또는 예방의 "치료학적 효과" 또는 "이점"을 유도할 수 있다. 따라서, 질환의 하나 이상의 근본적인 원인 또는 해로운 증상에 영향을 끼치는 치료 방법 및 용도는 이로운 것으로 간주된다. 질환 또는 이의 해로운 증상의 악화의 감소 또는 저하 예컨대, 안정화는 또한 성공적인 치료 결과이다.

[0134] 따라서, 치료학적 이점 또는 개선은 질환, 또는 질환과 관련된 임의의 하나, 대부분 또는 모든 해로운 증상, 합병증, 예후 또는 근본적인 원인을 완전히 제거하지 않아도 된다. 따라서, 만족스러운 종점은, 단기간 또는 장기간 (수시간, 수일, 수주, 수개월 등)에 걸친 대상체의 질환에서의 증가적 개선 또는 질환의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간에서의 부분적 감소, 저하, 억제, 억압, 제한, 제어 또는 예방, 또는 질환의 억제 또는 역전 (예를 들어, 하나 이상의 증상 또는 합병증 안정화)이 이루어지는 경우 달성된다. 방법 또는 용도 예컨대, 질환의 잠재적인 치료학적 이점 또는 개선을 제공하는 치료의 유효성은 다양한 방법에 의해 확인될 수 있다.

[0135] 본 발명의 방법 및 용도는 요망되는 치료학적, 유익한, 가산적, 상승작용적 또는 상보적 활성 또는 효과를 갖는 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료제 또는 기타 치료 요법 또는 프로토콜과 조합될 수 있다. 예시적인 조합 조성물 및 치료제는 제 2의 활성제 예컨대, 생물제제 (단백질), 제제 및 약물을 포함한다. 이러한 생물제제 (단백질), 제제, 약물, 치료 및 요법은 본 발명의 임의의 다른 방법 또는 용도, 예를 들어, 혈액 응고 질환에 대해 대상체를 치료하기 위한 치료학적 방법 전에, 실질적으로 동시에 또는 그 후에 투여되거나 수행될 수 있다.

[0136] 화합물, 제제, 약물, 치료제 또는 기타 치료 요법 또는 프로토콜이 조합 조성물로서 투여될 수 있거나, 별도로 예컨대, 본 발명의 벡터 게놈 또는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))와의 동시 또는 연속적 또는 순차적 (전 또는 후에) 전달 또는 투여에 의해 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법 또는 용도가 본원에 기재되거나 당업자

에게 공지된 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정, 치료제 또는 조성물과 병행되는 조합을 제공한다. 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정, 치료 또는 조성물이 본 발명의 벡터 계놈 또는 바이러스 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))의 대상체로의 투여 전, 실질적으로 동시에 또는 후에 투여되거나 수행될 수 있다. 따라서, 조합 구체예의 특정한 비제한적 예는 상기 또는 기타 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정, 요법 또는 조성물을 포함한다.

[0137] 본 발명의 방법 및 용도는 또한, 특히, 또 다른 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정 또는 요법의 감소된 필요성 또는 사용을 유도하는 방법 및 용도를 포함한다. 예를 들어, 혈액 응고 질환에 있어서, 본 발명의 방법 또는 용도는 대상체에서 결핍되거나 결함이 있는 (비정상 또는 돌연변이) 내인성 응고 인자 보충을 위한 재조합 응고 인자 단백질 투여가 해당 대상체에서 덜한 빈도 또는 감소된 용량으로 이루어지거나 배제되는 경우 치료학적 이점을 갖는다. 이와 같이, 본 발명에 따르면, 또 다른 치료 또는 요법의 필요 또는 사용을 감소시키는 방법 및 용도가 제공된다.

[0138] 본 발명은 가축 의학 적용을 포함하여 동물에 유용하다. 따라서, 적합한 대상체는 포유동물 예컨대, 인간은 물론 인간외 포유동물을 포함한다. 용어 "대상체"는 동물, 전형적으로, 포유동물 예컨대, 인간, 인간외 영장류 (유인원, 긴팔원숭이, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이 (macaque)), 애완 동물 (개 및 고양이), 가축 (가금류 예컨대, 닭 및 오리, 말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험용 동물 (마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그)를 나타낸다. 인간 대상체는 태아, 신생아, 유아, 청소년 및 성인 대상체를 포함한다. 대상체는 동물 질환 모델 예를 들어, 혈액 응고 질환 및 당업자에게 공지된 기타 질환의 마우스 및 기타 동물 모델을 포함한다.

[0139] 본 발명에 제시된 바와 같이 벡터 및 이러한 벡터를 포함하는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))는 단백질의 양이 불충분하거나 기능성 유전자 생성물 (단백질)이 결핍된 대상체에 단백질을 제공하거나, 비정상이거나 부분적으로 기능적이거나 비기능적인 유전자 생성물 (단백질)을 생성하여 질환이 초래될 수 있는 대상체에 억제 혜산 또는 단백질을 제공하는데 이용될 수 있다. 따라서, 치료에 적합한 대상체는 기능성 유전자 생성물 (단백질)이 결핍되거나 이들을 불충분한 양으로 생성하거나 그럴 위험성이 있는 대상체 또는 비정상적이거나, 부분적으로 기능적이거나 비기능적인 유전자 생성물 (단백질)을 생성하여 질환을 초래할 수 있는 대상체를 포함한다. 본 발명에 따르면 치료에 적합한 대상체는 또한, 질환을 초래하는 이상 또는 결손 (돌연변이) 유전자 생성물 (단백질)을 갖거나 이를 생성할 위험성이 있어, 이상 또는 결손 (돌연변이) 유전자 생성물 (단백질)의 양, 발현 또는 기능의 감소가 질환 치료를 유도하거나 하나 이상의 증상을 감소시키거나 질환을 완화시키는 대상체를 포함한다. 따라서, 표적 대상체는 질환 타입, 발병 시점 또는 정도, 진행, 중증도, 빈도 또는 증상 타입 또는 기간에 상관없이 이러한 결함을 갖는 대상체를 포함한다.

[0140] "예방" 및 이의 문법적 변형은 질환 전에 대상체로의 접촉, 투여 또는 생체내 전달되는 방법을 의미한다. 대상체로의 투여 또는 생체내 전달은 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 해로운 증상, 장애, 합병증 등의 발생 전에 수행될 수 있다. 예를 들어, 스크린 (예를 들어, 유전적)이 본 발명의 방법 및 용도를 위한 후보자로서 이러한 대상체를 식별하는데 이용될 수 있으며, 그러나, 대상체는 질환을 나타내지 않을 수 있다. 따라서, 이러한 대상체는 기능성 유전자 생성물 (단백질)에서 불충분한 양 또는 결핍에 대해 양성으로 스크리닝된 대상체, 또는 이상이 있는 부분적으로 기능적이거나 비기능적인 유전자 생성물 (단백질)을 생성하여 질환을 초래할 수 있는 대상체를 포함하며; 심지어 이러한 대상체가 질환의 증상을 나타내지 않더라도 질환을 초래하는 이상 또는 결함 (돌연변이) 유전자 생성물 (단백질)에 대해 양성으로 스크리닝된 대상체를 포함한다.

[0141] 본 발명의 방법 및 용도는 전신, 부위적 또는 국부적으로 또는 임의의 경로 예를 들어, 주입, 융합, 경구 (예를 들어, 섭취 또는 흡입) 또는 국소 (예를 들어, 경피적으로)에 의한 전달 및 투여를 포함한다. 이러한 전달 및 투여는 정맥내, 근내, 복강내, 피내, 피하, 강내, 두개내, 경피 (국소), 비경구 예를 들어, 점막관통 또는 직장을 포함한다. 예시적인 투여 및 전달 경로는 정맥내 (i.v.), 복강내 (i.p.), 동맥내, 근내, 비경구, 피하, 흉막내, 국소, 피부, 피내, 경피, 비경구 예를 들어, 점막통과, 두개내, 척수내, 경구 (소화), 점막, 호흡, 비내, 삼관, 폐내, 폐내 점적, 협측, 설하, 혈관내, 동맥내, 강내, 이온영동, 안구내, 안구, 눈, 선내, 기관내, 림프내를 포함한다.

[0142] 용량은 치료가 예방용 또는 치료용인지의 여부, 치료하고자 하는 질환의 타입, 발병, 진행, 중증도, 빈도, 기간 또는 확률, 요망되는 임상 종점, 이전 또는 동시 치료, 대상체의 일반적 건강 상태, 연령, 성별, 인종 또는 면역학적 수행능 및 당업자에게 의해 자명해질 기타 인자에 따라 변화될 수 있으며 이에 좌우될 수 있다. 용량,

수, 빈도 또는 기간은 임의의 해로운 부작용, 합병증 또는 치료 또는 요법의 다른 위험 인자, 및 대상체의 상태에 의해 나타낸 바대로 비례적으로 증가하거나 감소될 수 있다. 당업자는 치료학적 또는 예방학적 이점을 제공하는데 충분한 양을 제공하는데 요망되는 투여량 및 시점에 영향을 끼칠 수 있는 인자를 인지할 것이다.

[0143] 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법 및 용도는 대상체가 치료에 표적이 되는 질환을 갖는 것으로 확인되거나, 질환의 하나 이상의 증상을 갖거나, 심지어 대상체가 질환의 하나 이상의 증상을 갖지 않더라도 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝되고 양성으로서 확인된 후 1-2, 2-4, 4-12, 12-24 또는 24-72 시간내에 실시될 수 있다. 물론, 본 발명의 방법 및 용도는 대상체가 치료에 표적이되는 질환을 갖는 것으로 확인되거나, 질환의 하나 이상의 증상을 가졌거나, 본원에서 기술된 바와 같이 스크리닝되고 양성으로서 확인된 후 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 또는 그 초과의 수일, 수개월 또는 수년째에 실시될 수 있다.

[0144] 재조합 벡터 (예를 들어, AAV 예컨대, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)), 서열, 플라스미드, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV 예컨대, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 및 기타 조성물, 제제, 약물, 생물제제 (단백질)가 약제 조성물 예를 들어, 약제학적으로 허용되는 담체 또는 부형제내로 혼입될 수 있다. 이러한 약제 조성물은 특히, 생체내 또는 생체외에서 대상체로의 투여 및 전달에 유용하다.

[0145] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "약제학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는"은 하나 이상의 투여 경로, 생체내 전달 또는 접촉에 적합한 생물학적으로 허용가능한 제형, 기체, 액체 또는 고체, 또는 이의 혼합물을 의미한다. "약제학적으로 허용되는" 또는 "생리학적으로 허용되는" 조성물은 생물학적이지 않거나 그렇지 않으면 바람직하지 않은 물질이 아니며, 예를 들어, 물질은 실질적으로 바람직하지 않은 생물학적 효과를 초래하지 않으면서 대상체에 투여될 수 있다. 따라서, 이러한 약제 조성물은 예를 들어, 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 또는 형질전환된 세포를 대상체에 투여하는데 이용될 수 있다.

[0146] 이러한 조성물은 약제 투여 또는 생체내 접촉 또는 전달과 양립가능한 용매 (수성 또는 비수성), 용액 (수성 또는 비수성), 에멀젼 (예를 들어, 수중유 또는 유중수), 혼탁액, 시럽, 엘리시르, 분산액 및 혼탁 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 촉진 또는 지연 제제를 포함한다. 수성 및 비수성 용매, 용액 및 혼탁액은 혼탁제 및 중점제를 포함할 수 있다. 이러한 약제학적으로 허용가능한 담체는 정제 (코팅되거나 비코팅됨), 캡슐 (경질 또는 연질), 마이크로비드, 분말, 과립 및 결정을 포함한다. 보조 활성 화합물 (예를 들어, 보존제, 항균제, 항바이러스제 및 항진균제)이 또한, 조성물중에 혼입될 수 있다.

[0147] 약제 조성물이 당업자에게 공지되거나 본원에 기재된 바와 같은 특정 경로의 투여 또는 전달과 양립되도록 제형화될 수 있다. 이와 같이, 약제 조성물은 다양한 경로에 의한 투여에 적합한 담체, 희석제 또는 부형제를 포함한다.

[0148] 비경구 투여에 적합한 조성물은 활성 화합물의 수성 및 비수성 용액, 혼탁액 또는 에멀젼을 포함하며, 이들 제조물은 전형적으로 무균성이며, 의도된 수령체의 혈액과 등장성일 수 있다. 비제한적인 예시적 예로는 물, 염수, 텍스트로스, 프룩토오스, 에탄올, 동물성, 식물성 또는 합성 오일을 포함한다.

[0149] 점막통과 또는 경피 투여 (예를 들어, 국소 접촉)에 있어서, 침투제 (penetrant)가 약제 조성물중에 포함될 수 있다. 침투제는 당해분야에 공지되어 있으며, 예를 들어, 점막통과 투여를 위해 세정제 (detergent), 담즙산염 또는 푸시딘산 유도체를 포함한다. 경피 투여에 있어서, 활성 성분은 당해 기술분야에 일반적으로 공지된 바와 같이 에어로졸, 스프레이, 연고, 고약, 젤 또는 크림으로 제형화될 수 있다. 피부와의 접촉을 위해, 약제 조성물은 전형적으로, 연고, 크림, 로션, 페이스트, 젤, 스프레이, 에어로졸 또는 오일을 포함한다. 사용될 수 있는 담체로는 바셀린, 라놀린, 폴리에틸렌 글리콜, 알코올, 경피 인핸서 및 이들의 조합물을 포함한다.

[0150] 공용매 및 보조제가 제형에 첨가될 수 있다. 공용매의 비제한적 예로는 하이드록실기 또는 기타 극성기 예를 들어, 알코올 예컨대, 이소프로필 알코올; 글리콜 예컨대, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 글리콜 에테르; 글리세롤; 폴리옥시에틸렌 알코올 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르를 함유한다. 애주번트는 예를 들어, 계면활성제 예컨대, 콩 레시틴 및 올레산; 소르비탄 에스테르 예컨대, 소르비탄 트리올리이트; 및 폴리비닐파리돈을 포함한다.

[0151] 벡터 게놈, 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))에 적합한 약제 조성물 및 전달 시스템, 및 본 발명의 방법 및 용도는 당해 기

술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 문헌 [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18<sup>th</sup> ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12<sup>th</sup> ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technicon Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11<sup>th</sup> ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; and Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315] 참조).

[0152] 본원에 사용된 바와 같은 "단위 투여량"은 치료될 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적당한 물리적으로 구분된 단위를 나타낸다; 각 단위는 선택적으로, 약제 담체 (부형제, 희석제, 비히클 또는 충전제)와 함께 소정의 양을 함유하며, 이는 1회 이상의 투여로 투여되는 경우, 요망되는 효과 (예를 들어, 예방 또는 치료 효과)를 유도하도록 계산된다. 단위 투여량 형태는 예를 들어, 앰플 및 바이알내에 존재할 수 있으며, 이는 냉동-건조된 또는 동결건조된 상태의 조성물 또는 액체 조성물을 포함할 수 있다; 예를 들어, 멸균 액체 담체는 생체내 전달 또는 투여 전에 첨가될 수 있다. 개별 단위 투여 형태가 다중-용량 키트 또는 컨테이너내에 포함될 수 있다. 재조합 벡터 (예를 들어, AAV) 서열; 플라스미드, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 및 이의 약제 조성물은 투여량의 투여 용이성 및 균일성을 위해 단일 또는 다수 단위 투여량 형태로 패키징될 수 있다.

[0153] 본 발명은 포장 물질 및 그 안의 하나 이상의 구성요소들을 갖는 키트를 제공한다. 키트는 전형적으로, 구성요소들의 설명 또는 내포된 구성요소들의 시험판내, 생체내 또는 생체외 사용을 위한 설명서를 포함하는 라벨 또는 패키징 삽입물을 포함한다. 키트는 이러한 구성요소들 예를 들어, 벡터 (예를 들어, AAV) 게놈 또는 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 벡터 또는 관련된 AAV 벡터 예컨대, AAV-Rh74 변종 예컨대, 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1)) 및 선택적으로, 제 2 활성제 예컨대, 또 다른 화합물, 제제, 약물 또는 조성물의 수집물을 함유 할 수 있다.

[0154] 키트는 키트의 하나 이상의 구성요소를 하우징하는 물리적 구조물을 나타낸다. 패키징 물질은 멸균된 구성요소들을 함유할 수 있으며, 이러한 목적을 위해 통상적으로 사용되는 재료 (예를 들어, 종이, 골판지, 유리, 플라스틱, 호일, 앰플, 바이알, 튜브 등)로 제조될 수 있다.

[0155] 라벨 또는 삽입물은 내포된 하나 이상의 구성요소의 식별 정보, 용량, 작용 메카니즘을 포함하는 활성 성분 (들)의 임상적 약리학, 약동학 및 약역학을 포함될 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업자, 로트 번호, 제조 위치 및 날짜 즉, 유통 기일을 확인시켜주는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업자 정보, 로트 번호, 제조업자 위치 및 날짜를 확인시켜주는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 키트 성분이 사용될 수 있는 질환에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 방법, 용도, 또는 치료 프로토콜 또는 치료 요법에서 키트 구성요소들 중 하나 이상을 사용하기 위한 임상의 또는 대상체를 위한 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는 본원에 기술된 방법, 용도, 치료 프로토콜 또는 예방 또는 치료 요법 중 임의의 것을 실행하기 위한 설명, 투여량, 빈도 또는 기간을 포함할 수 있다.

[0156] 라벨 또는 삽입물은 예방 또는 치료 이점과 같이 구성요소가 제공할 수 있는 임의의 이점에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 잠재적인 해로운 부작용, 합병증 또는 반응에 대한 정보 예컨대, 특정 조성물을 사용하는데 적합하지 않을 상황에 관한 대상체 또는 임상의에 대한 경고를 포함할 수 있다. 해로운 부작용 또는 합병증이 또한, 대상체가 본 조성물과 양립가능하지 않을 수 있는 하나 이상의 다른 약물 치료를 받거나, 받을 것이거나 현재 받고 있는 경우, 또는 대상체가 조성물과 양립가능하지 않을 또 다른 치료 프로토콜 또는 치료 요법을 받거나, 받을 것이거나 현재 받고 있는 경우에 발생할 수 있으며, 따라서, 설명서는 이러한 부적합에 대한 정보를 포함할 수 있다.

[0157] 라벨 또는 삽입물은 구성요소, 키트 또는 포장 물질 (예를 들어, 박스)에 부착되거나 분리되거나, 키트 구성요소를 함유하는 앰플, 튜브 또는 바이알에 부착된 "인쇄된 물질" 예를 들어, 종이 또는 판지를 포함한다. 라벨 또는 삽입물은 추가적으로 컴퓨터 판독가능한 매체 예컨대, 바-코드 인쇄된 라벨, 디스크, 광학 디스크 예컨대, CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자석 테이프, 또는 전기 저장 매체 예컨대, RAM 및 ROM, 또는 이들의 하이브리드 예컨대, 자석/광 저장 매체, FLASH 매체 또는 메모리 타입 카드를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0158] 다르게 규정되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속한 당해 기술분야의 통상의 기

술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 뜻을 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동일한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수 있으나, 적합한 방법들 및 재료들이 본원에 기술되어 있다.

- [0159] 본원에 인용된 모든 출원, 공개문헌, 특히 및 기타 참조, GenBank 인용 및 ATCC 인용은 그 전체가 참조로 통합된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 기준이 될 것이다.
- [0160] 본원에 기재된 특징들 모두는 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 기재된 각 특징은 동일하거나, 동등하거나 유사한 목적으로 작용하는 대안적인 특징에 의해 대체될 수 있다. 이와 같이, 다르게 명확히 언급되지 않는 한, 기재된 특징들 (예를 들어, 재조합 백터 (예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 백터 게놈 또는 재조합 바이러스 입자 (예를 들어, AAV-Rh74 백터 또는 관련된 AAV 백터 예컨대, AAV-Rh74 캡시드 변종 (예를 들어, RHM4-1))은 동등하거나 유사한 부류의 특징들의 예이다.
- [0161] 본원에 사용된 바와 같이, 단수 형태는 문맥에서 달리 명백하게 나타내지 않는 한 복수의 지시 대상물을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "폴리뉴클레오티드"에 대한 언급은 복수의 이러한 폴리뉴클레오티드를 포함하며, "백터"에 대한 언급은 복수의 이러한 백터들을 포함하며, "바이러스" 또는 "입자"에 대한 언급은 복수의 이러한 비리온들/입자들을 포함한다.
- [0162] 본원에 사용된 바와 같이, 모든 수치 또는 수치 범위는 문맥에서 명백히 달리 명시하지 않는 한 이러한 범위내의 정수 및 범위내의 값 또는 정수의 소수를 포함한다. 따라서, 설명하자면, 적어도 80% 동일성에 대한 언급은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 등등은 물론 81.1%, 81.2%, 81.3%, 81.4%, 81.5%, 등, 82.1%, 82.2%, 82.3%, 82.4%, 82.5%, 등 및 기타 등등을 포함한다.
- [0163] 초과 (넘는) 또는 미만과 같이 쓰인 정수에 대한 언급은 각각 언급된 수보다 큰 또는 작은 임의의 수를 포함한다. 따라서, 예를 들어, 1,000 미만이라는 언급은 999, 998, 997, 등등, 숫자 일 (1)까지 낮은 모든 수를 포함하며; 100 미만은 99, 98, 97 등등, 숫자 일 (1)까지 낮은 모든 수를 포함한다.
- [0164] 본원에 사용된 바와 같이, 모든 수치 또는 범위는 문맥상 다르게 명백히 언급되지 않는 한 이러한 범위내의 값 및 정수의 소수 및 이러한 범위내의 정수의 소수를 포함한다. 따라서, 설명하자면, 수치 범위에 대한 언급 예컨대, 백분율 범위 예컨대, 1-10은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10은 물론, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 등등 및 기타 등등을 포함한다. 따라서, 1-50의 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 등등, 및 50을 포함하는 50 이하는 물론, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 등, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 등등, 및 기타 등등을 포함한다.
- [0165] 일련 범위에 대한 언급은 일련내의 다양한 범위의 경계 값과 조합되는 범위를 포함한다. 따라서, 설명하자면, 11-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000, 또는 8,000-9,000의 일련의 범위에 대한 언급은 10-50, 50-100, 100-1,000, 1,000-3,000, 2,000-4,000, 등등의 범위를 포함한다.
- [0166] 본 발명은 일반적으로, 많은 구체예 및 양태를 기술하기 위해 긍정의 언어를 사용하여 본원에서 기술하였다. 또한, 본 발명은 특히, 특정 내용 예컨대, 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜 또는 절차가 전체적으로 또는 부분적으로 배재된 구체예를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 구체예 또는 양태에서, 재료 및/또는 방법 단계가 배제된다. 따라서, 본 발명은 본 발명이 무엇을 포함하지 않는지에 대해 본원에서 일반적으로 표현되지 않았지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명에 명확하게 배제되지 않은 양태들은 본원에 기재된 것이다.
- [0167] 본 발명의 많은 구체예가 기술되어 있다. 그렇지만, 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 당업자는 다양한 용도 및 조건에 맞춰 본 발명을 다양하게 변화 및 변경시킬 수 있다. 따라서, 하기 실시예는 설명을 위한 것이며, 청구된 본 발명의 범위를 제한하고자 하는 것은 아니다.
- [0168] 실시예
- [0169] 실시예 1
- [0170] 본 실시예는 다양한 재료 및 방법의 설명을 포함한다.
- [0171] **마우스:** 수컷 C57BL/6J (WT) 마우스 8-10주령, 실험군 당 n=5. 개는 FIX 유전자에서 미스센스 돌연변이를 수반하는 노스 캐롤리나 채플 힐 유니버시티 (University of North Carolina Chapel Hill) 콜로니로부터의 HB 개이

다 (Evans et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10095 (1989)).

[0172] **AAV 벡터 작제물:** ApoE-hAAT 간 특이적 프로모터의 조정하에 인간 FIX를 발현하는 작제물을 사용하여 마우스에서 생체내 연구를 수행하였다. 개에서의 연구는 거의 동일한 프로모터 및 개 FIX 전이유전자를 사용하였다.

[0173] **유전자 전이 방법론:** 모든 벡터를 정맥내로 전달하였다. 마우스에서는 꼬리 정맥을 통하였다 (마우스 당 200 마이크로리터의 용적을 투여하였으며, 벡터는 PBS로 희석하였다). 개에서 벡터는 복재 정맥을 통해 전달하였다.

[0174] **FIX 발현 측정:** ELISA를 사용하여 FIX 수준을 측정하였다. 마우스에서, 인간 FIX ELISA 항체 쌍 (캡처 및 이차)은 Affinity Biologicals로부터 얻었다. 개에서, 항체 쌍 또한 Affinity Biologicals로부터 얻었으며, 문헌 [Haurigot et al. (Mol Ther 18:1318 (2010))]에 기술된 바와 같이 사용하였다.

[0175] **통계학적 분석:** 통계학적 분석은 언페어드 2 테일드 t 평가 (unpaired, two tailed t test)를 이용하여 수행하였다. <0.05 p 값은 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

[0176] **AAV 항체 측정:** 문헌 [Manno et al., (Nat Med 12:342 (2006)) and Mingozi et al. (Nat Med 13:419 (2007))]에 기술된 시험관내 중화 검정을 항체 측정에 이용하였다. 간단하게는, CMV 프로모터(ssAAV-LacZ)의 조정하에 β-갈اكتоз다제를 발현하는 단일 가닥 벡터, 또는 닫 β-액틴 프로모터 (CBA)의 조정하에 레닐라 리포터 유전자를 발현하는 자기-상보성 벡터인 AAV-Rh74-CBA-Renilla인 2개의 AAV 벡터 작제물을 측정에 사용하였다. 시험관내에서 AAV 벡터의 형질도입의 효율성을 증가시키기 위해, 2V6.11 세포 (ATCC)를 사용하였으며, 이는 유도성 프로모터의 조정하에 아데노바이러스 유전자 E4를 발현하였다. 세포를  $1.25 \times 10^4$  세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 시딩하고, 포나스테론 A (Invitrogen)의 1:1000 희석물을 배지에 첨가하여 E4 발현을 유도하였다. 검정 당일에, 열-불활성화된 평가 혈청의 연속 1/2-log 희석물을 바이러스를 함유하는 배지와 혼합하였다. ssAAV-LacZ 벡터에 있어서, 검정에 사용된 바이러스 농도는 AAV2에 있어서  $\sim 1 \times 10^{10}$  vg/ml, 및 AAV5, 6, 또는 8에 있어서  $\sim 5.5 \times 10^{10}$  vg/ml이었다. scAAV-Luc 벡터에 있어서, 검정에서의 바이러스 농도는 ~50 내지 150 배 더 낮았다. 리포터 전이유전자의 잔여 활성을 비색 검정 (ssAAV-LacZ) 또는 루미노미터 (scAAV-Luc)를 사용하여 측정하였다.

[0177] 항-AAV 캡시드, 총 IgG 또는 Ig 서브클래스는 포획 검정을 이용하여 측정하였다; ELISA 플레이트를  $5 \times 10^{10}$  캡시드 입자/AAV 빈 캡시드 ml로 코팅하였다. 플레이트를 2시간 동안 실온에서 PBS 중의 0.05% Tween 20, 2% BSA로 차단하고, 샘플의 연속 희석물을 웰 상에 로딩하고, 밤새 4°C에서 인큐베이션하였다. 바이오틴-컨쥬게이팅 된 항-인간 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM 항체 (Sigma)를 검출 항체로서 사용하였다; 스트렙타비딘-HRP는 기질 검출을 위해 첨가되었다. Ig 농도는 인간의 정제된 IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, 또는 IgM (Sigma)의 연속 희석물로 제작한 표준 곡선에 대하여 결정되었다.

[0178] **AAV 생성:** 벡터 생성 과정은 문헌 [Ayuso et al. (Gene Ther 17:503 (2010))]에 상세히 기술되어 있다.

#### 실시예 2

[0180] 본 실시예는 인간 FIX 유전자 전이 동물 (마우스) 연구 및 유전자 전이 후 FIX 발현의 설명을 포함한다.

[0181] C57BL/6 마우스 (군 당 n=5)에 간-특이적 프로모터의 조정하의 인자 IX (FIX) 유전자를 함유하는 AAV 벡터 (마우스 당  $2.5^{10}$  벡터 개눔)를 꼬리 정맥을 통해 주입하였다. 마우스에서 인간 FIX 전이유전자 생성물 (단백질) 혈장 수준을 유전자 전이 1, 2 및 4 주 후에 ELISA에 의해 측정하고, 도 1에 묘사하였다. AAV-Rh74는 동물에서 가장 높은 수준의 전이유전자 발현을 보여주었다.

#### 실시예 3

[0183] 본 실시예는 혈우병 개에서 치료학적 수준의 FIX의 효과적인 AAV-Rh74 매개된 전달을 입증하는 동물 연구 및 데이터의 설명을 포함한다.

[0184] 간단하게는, B형 혈우병 개에 중량 kg 당  $3 \times 10^{12}$  벡터 개눔을 복재 정맥을 통해 정맥내 (IV) 주입하였다. 치료학적 FIX 전이유전자의 발현은 간 특이적 프로모터에 의해 추진된다. 벡터 및 FIX 수준은 ELISA에 의해 모니터링하였다. 개 FIX 혈장 수준은 도 2에 도시되어 있다. AAV-Rh74 및 AAV8은 B형 혈우병 개에서 대략 동일하게 수행하나, 이 둘 모두는 AAV6보다 탁월하였다.

실시예 4

[0185] 본 실시예는 인간에서 항-AAV 중화 항체 (NAb)의 존재를 보여주는 연구의 설명을 포함한다.

[0186] 표 1의 데이터는 시험관내 검정을 이용한 인간에서 측정된 항-AAV 중화 항체 (NAb)를 보여준다. 1:1 또는 그 미만의 NAb 역가를 갖는 대상체는 항-AAV 항체에 대해 순수 또는 저-역가로서 규정되며, 그러한 AAV 혈청형에 있어서 유전자 전이에 적격이다 (회색으로 표시함). 1:1 내지 1:3의 역가를 갖는 환자는 빈 캡시드가 디코이 (decoy)로서 사용되는 한 AAV-허용성인 것으로 간주된다. 1:3보다 높은 역가를 갖는 샘플은 전신 주입 후 AAV 형질도입에 대해 비-허용성인 것으로 간주되며, 밝은 회색으로 나타내었다. AAV-Rh74는 AAV-2 및 AAV-8과 비교하여 가장 낮은 유병률의 항-AAV Nab를 나타내었다.

표 1

	<b>AAV2</b>	<b>AAV8</b>	<b>RHM4-1</b>	<b>RHM15-5</b>
Genlmm 005	<1:3.16	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 015	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 040	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 058	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
Genlmm 070	1:10-1:31.6	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 080	1:10-1:31.6	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 082	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 083	준주	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 087	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 095	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
Genlmm 099	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 102	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 105	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 100	<1:1	<1:1	<1:1	ND
Genlmm 124	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 125	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1	1:1-1:3.16
Genlmm 130	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 131	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 133	<1:1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 150	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 151	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 154	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 155	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 143	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 145	1:1-1:3.1	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 140	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 141	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 011	ND	<1:1	<1:1	<1:1
Genlmm 049	<1:1	<1:1	<1:1	1:1-1:3.1
Genlmm 146	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	<1:1	ND
Genlmm 147	1:1-1:3.1	1:1-1:3.1	<1:1	ND
Genlmm 007	1:100-1:316	1:3.16-1:10	ND	ND
Genlmm 084	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	<1:1	<1:1
Genlmm 127	1:100-1:316	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	1:3.16-1:10
Genlmm 137	1:100-1:316	1:3.1-1:10	1:3.1-1:10	1:1-1:3.16
Genlmm 153	ND	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
Genlmm 001	1:100-1:316	1:10-1:31.6	ND	ND
Genlmm 006	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
Genlmm 110	1:316-1:1000	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	>1:31.6
Genlmm 128	1:1000-1:3160	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	>1:31.6
Genlmm 129	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	1:3.16-1:10
Genlmm 148	ND	1:10-1:31.6	1:100-1:316	>1:31.6
Genlmm 157	ND	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6
Genlmm 158	ND	1:10-1:31.6	1:3.1-1:10	ND

[0189]

GenImm 028	1:3.1-1:10	1:10-1:31.6	<1:1	1:1-1:3.16
GenImm 016	1:10-1:31.6	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	ND
GenImm 075	1:316-1:1000	1:31.6-1:100	1:10-1:31.6	1:10-1:31.6
GenImm 126	>1:3160	1:31.6-1:100	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 139	ND	1:31.6-1:100	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 149	ND	1:31.6-1:100	1:31.6-1:100	ND
GenImm 068	1:3160	1:316-1:1000	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 088	>1:3160	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 138	ND	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 004	1:316-1:1000	1:100-1:316	ND	ND
GenImm 035	>1:3160	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 074	1:3160	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 142	ND	1:100-1:316	1:1000-1:3160	>1:31.6
GenImm 152	ND	1:100-1:316	1:31.6-1:100	>1:31.6
GenImm 156	ND	1:100-1:316	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 072	1:3.1-1:10	1:100-1:316	<1:1	<1:1
GenImm 144	>1:3160	1:316-1:1000	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 060	>1:3160	1:1000-1:3160	1:100-1:316	>1:31.6
GenImm 069	>1:3160	>1:3160	1:1000-1:3160	>1:31.6
GenImm 017	>1:3160	>3160	1:316-1:1000	>1:31.6
GenImm 002	<1:2	ND	ND	ND
GenImm 003	<1:2	ND	<1:1	<1:1

	AAV2	AAV8	RHM4-1	RHM15-5
<b>&lt;1:1</b>	13	29	35	27
<b>총</b>	66	66	66	66
<b>&lt;1:1 %</b>	19.7	43.9	53.0	40.9

[0190]

실시예 5

[0192]

본 실시예는 AAV-Rh74를 포함하는 다양한 AAV 혈청형의 생산량을 보여주는 데이터의 설명을 포함한다.

[0193]

표 2의 데이터는 다양한 AAV 혈청형의 생산 수율을 보여준다. 롤러 베틀에서의 바이러스 배치 크기, 총 벡터 생산 수율, 및 보틀 당 수율을 기록하였다. 모든 혈청형은 동일한 밸런 카세트내에 패키징하였다. AAV-Rh74는 평가된 다른 혈청형 즉, AAV-8, AAV-dj, 및 AAV-2에 필적하거나 이보다 높은 수율을 갖는다.

[0194]

표 2

혈청형	배치 크기 (롤러 보틀의 수)	총 벡터 수율 (벡터 개놈)	롤러 모들당 수율 (벡터 개놈)
AAV-Rh74	80	1.21E+15	1.51E+13
AAV-Rh74	10	1.23E+14	1.23E+13
AAV-8	30	2.54E+14	8.47E+12
AAV-dj	20	1.79E+14	8.95E+12
AAV-2	30	1.38E+14	4.60E+12

[0195]

실시예 6

[0197]

본 실시예는 레서스 원숭이에 투여된 간-특이적 프로모터 조정하에 인간 인자 IX (FIX)를 발현하는 AA VRh74 벡터가 동일한 양으로 투여된 AAV8 벡터보다 더 높은 수준으로 동물에서 FIX의 생산량을 유도함을 보여주는 데이터의 설명을 포함한다.

[0198]

간단하게는, 동물에  $2 \times 10^{12}$  벡터 개놈 (vg)/체중 kg의 용량으로 AAV8 또는 AA VRh74를 투여하였다. 벡터를 염수 중에 또는 벡터와 빈 AAV 캡시드 (EC로 표시함)의 혼합물 중에 포뮬레이팅하였다.

[0199]

도 4는 레서스 원숭이 혈장에서 특이적으로 인간 FIX를 검출하는 ELISA에 의해 측정된 인간 FIX의 평균 (2 내지

8 주) 및 표준 오차 또는 평균의 막대그래프이다. AAVrh74-FIX 벡터가 투여된 동물은 오른쪽 가장자리 쪽으로 마지막 2개의 막대에 나타내었다. 데이터는 AAVrh74 벡터 (오른쪽 가장자리 쪽으로 마지막 2개 막대)가 투여된 동물이 동일한 용량 (검정 및 회색 막대)으로 주입된 동물의 다른 군과 비교하여 더 높은 수준으로 FIX 전이유전자를 발현하였음을 보여준다. 평균 수준은 언페어드 2-테일드 스튜던트 t 평가를 이용하여 비교하였다.

[0200] AAV-RHM4-1-FIX가 투여된 동물 중 하나는 인간 인자 IX 전이유전자 생성물에 대한 억제제를 발달시켰으며, 이는 인간 FIX 벡터로 처리된 원숭이 중 대략 20%에서 발생하는 충분히 입증된 현상이다. 2차 RHM4-1-처리된 동물은 AAV8-처리된 원숭이와 비교하여 대략 2-배 높게 FIX 수준을 발현하였다.

#### 실시예 7

[0202] 본 실시예는 수개의 Rh74 캡시드 변종의 설명을 포함한다.

[0203] 간단하게는, 다양한 치환이 Rh74 캡시드 서열에 도입되어 Rh74 캡시드 변종을 생성하였다. 다양한 Rh74 캡시드 변종, 및 각 위치에서 치환된 아미노산은 하기와 같다:

[0204] 표 3:

변종	VP1 캡시드에서 아미노산 치환 및 표시된 위치
RHM4_1	G195A-L199V- S201P-G202N
RHM15_1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R
RHM15_2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

[0205]

[0206] RHM4-1 변종은 Rh74 VP1 캡시드의 각각 아미노산 위치 195, 199, 201 및 202 번에서 알라닌, 류신, 프롤린 및 아스파라긴 치환을 갖는다. 밑줄치고 굵게 나타낸 치환된 잔기 **a**, **v**, **p** 및 **n**을 갖는 RHM4-1 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:5):

```

1 maadgylpdwlednlsegirewwd1kpgapkpkanqqkqdngrglvglykylgpfnlgld
61 kgepvnaadaaalehdkaydqqlqagdpnpylrynhadaefqer1qedtsfggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvktapgkkrpvevspqrspdsstgigkqgqpkakrlnfgqtgd
181 esvpdpqpgeppaapsgvpntmaaggapmadnnegadvgsssgnwhcdstwlqdrv
241 ittstrtwalptynhhlykqisngtsggstndntfygystpwgyfdfnrfhchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfknfniqvkevtqnegtktianltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hqgcclppfpadvfmipqygytltnngsqav grssfcleyfpsqmlrtgnnfefsynfed
421 vpfhssyahsqslrdlmnpolidqylylsrtqstggtagtqql1fsqagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqrsvstttsqnnnsnfawtgatkyhlngrds1vnpgvamathkddeerffps
541 gvlmgfkqgagdkndvdyssvmltseeikittpvateqygvvadnlqqqnaapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdvylqgpiwakiphdtgnfhpsplmggfglkhpppqililiknptvpadp
661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpeiqytsnyykstnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltrnl

```

[0207]

[0208] 밑줄치고 굵게 나타낸 치환된 잔기 **a**, **v**, **p** 및 **n**을 엔코딩하는 코드를 갖는 RHM4-1 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:11):

```

1 atggctgccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgc
61 gagttgggtggacctgaaacctggagccccgaaacccaaagccaaccagcaaaagcaggac
121 aacggccgggtcttgtgcttcctggctacaagtacctcgacccttaacggactcgac
181 aagggggagccgtcaacgcggcggacgcagcgcggctcgagcacgacaaggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctcggtataaatcagccgacgcccagtt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtctttggggcaacctcgccgcgcagttttccag
361 gccaaaaagcggttctcgaaacctctggcctggttgaatcgccggtaagacggctct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcacccagcgctctccagactcctctacgggcatc
481 ggcaagaaaaggccagcagccgcaaaaaagagactcaatttgggcagactggcactca
541 gagtcagtccccgaccctcaaccaatcgagaaccaccagaccccccttgggtggga
601 cctaataacaatgctgcaggcggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggccgac
661 ggagtggtagttccctcagaaattgcattgcattccacatggctggcgacagagtc
721 atcaccaccagcacccgcacctggccctgcccacctaacaaccacctctacaagcaa

```

[0209]

```

781 atctccaacgggacctcgggaggaaggcaccaacaacacacttccgtacagcacc
841 ccctggggatttgactcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactgggattccggccaaaggcgtcaactcaagcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcacaagaccatcgccaataaccttacc
1021 agcacgattcaggtcttacggactcggaataccagctccgtacgtgctcggtcgac
1081 caccagggctgcctgcctccgttccggcggacgtcttcatgattcctcagtagcgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtggggcgtcgtccttactgcctggagttac
1201 ttccttcaatgctgagaacgggcaacaacttgaattcagtcactaacttcgaggac
1261 gtgccttccacagcagctacgcgcacagccagagcctggaccggctgtgaaccctctc
1321 atcgaccagtacttgtactacctgtccggactcaaagcacggcgtactgcaggaact
1381 cagcagttgttatcccgttccgttccggccctaacaacatgtcggtcaggccaagaactgg
1441 ctaccggccctgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
1501 agcaactttgcgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
1561 aatctggcgttgccatgcttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
1621 ggagtcttaatgtttggaaaacaggagactggaaaagacaacacgtggactatagcagcgtg
1681 atgctaaccagcggagaaataaagaccacaacccagtgccacagaacacgtacggc
1741 gtggggccgataacctgcacagcaaaacgcgcgttccattgttagggccgtcaatagt
1801 caaggagccttacccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
1861 tggggccgataacctgcacagcaaaacgcgcgttccattgttagggccgttccgttccgttccgtt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatcttccatcgttccgttccgttccgttccgttccgtt
1981 ccgaccacccatcaatcagccaaacgtggcttccatcagcgcgttccgttccgttccgttccgtt
2041 gtcagcgtggagatcagtggtggagctgcagaaggagaacacagcaacacgtggaaaccctcag
2101 attcgttccatcactactacaaatcttccatcgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcacccgttccatcgttccgttccgttccgttccgtt

```

[0210]

RHM15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 1-5 및 15-6 변종은 또한, Rh74 VP1 캡시드의 각각 아미노산 위치 195, 199, 201 및 202번에서 알라닌, 류신, 프롤린 및 아스파라긴 치환을 갖는다. 또한, 이들 변종은 다양한 위치에서 리신의 다중 아르기닌 치환을 갖는다.

[0212]

RHM15-1 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:6):

```

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkanqqrqdnggrglvlpgrylgpfnlgld
61 kgepvnaadaaalehdraydqqlqagdnpylrynhadaefqerlqedtsfggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvepsqrspsdsstgigkkqqparkrlnffgqtqds
181 esvpdpqpigepapaapsvgvpntmaagggapmadnnegadvgvsssgnwhcdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynhlyrqiisngtsggtndntyfgytspwgfydfnrhchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfniqvkevtqnegtrtianltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvmippqgytltnngsqavgrsssfycleypfqpsqmlrtgnnfefsynfed
421 vpfhssyahsqslrdlmnpnplidqylylsrtqstggtagtqqlfsqagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvstt1sqnnnsnfawtgatkyhlngrdsvlvpvgavamathrddeerffpss
541 gvlmfgrqqagrdnvdyssvmltseeeirttnpvateqygvvadnlqqqn aapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdvylqgpwiakiphdtgnfhpsplmggfglkhpppqilikntpvpadp
661 pttfnqaklasfitqystgqsvievelqkenskrwnpeiqytsnykstnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltrnl

```

[0213]

RHM15-1 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:12):

```

1 atggctccgatggttatcttccagattggctcgaggacaacctctctgagggcattcgc
61 gagttggggacctgaaacctggagcccgaaacccaaagccaaaccggcaggac
121 aacggccgggtctggcttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgtt
181 aagggggagccgttccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgttccgttccgtt
241 cagcagcttccaaagccgttccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgttccgtt
301 caggagcgttccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgttccgttccgtt
361 gccaaaaaaggcggttccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgttccgtt
421 ggaaagaagagaccgttagagccatcaccggcgttccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgtt
481 ggcacaaaaaggccagcgcggccatcgccggacgcgcggccctcgagcacacggccgttccgtt
541 gagtcagtccccgaccctcaaccaatcggagaaccaccaggcagccccctctgggtggaa

```

[0215]

601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgctccaatggcagacaataacgaaggcgccgac  
 661 ggagtgggtagttcctcaggaaattggcattgcattccacatggctggcgacagagtc  
 721 atcaccaccagcacccgcacctggccctgcccacctacaacaaccacacttgcgtacaggcaa  
 781 atctccaacgggacactcgggaggaagcacaacgacaacacacttgcgtacaggcacc  
 841 ccctgggggtatTTgacttcaacagattccactgccactttcaccacgtgactggcag  
 901 cgactcatcaacaacaactgggattccggcccaagaggctcaactcaagcttcaac  
 961 atccaagtcaaggaggtaacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taacottacc  
 1021 agcacgattcaggcttacggactcggataccagctcc cgtacgtgt cggctcggcg  
 1081 caccaggctgcctgcgttccggcggacgttca tgattcctca gtacgggtac  
 1141 ctgactctgaacaatggcagtgaggctgtggccggctgt cttctactg cctggagtag  
 1201 tttccctctcaaatgtgagaacgggacaacttgaat tcagctacaat ttccgaggac  
 1261 gtgccttccacagcagctacgcgcacagccagcctgg accggctgtat gaaccctctc  
 1321 atcgaccagttactgttactacctgtccggactcaagca cggccgggtac tgcaggaact  
 1381 cagcagttgttatTTctcaggccggcctaacaatgt cggctcaggc caagaacttgg  
 1441 ctaccgggtccctgctacccgcagcaacgcgttccacga cactgtcgca gaacaacaac  
 1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg  
 1561 aatcttgcgttgcattggtaccacaggacgacgaag agcgatttt tccatccagc  
 1621 ggagtcttaatgtttggagacaggagctggaaagagaca acgtggacta tagcagctg  
 1681 atgctaaccagcggagaaataaggaccaccaacccag tggccacaga acagtagcgc  
 1741 gtggcggccgataacctgcaacagcaaaaacggcgtcccta ttgttagggc cgtcaatagt  
 1801 caaggagccttacctggcatggcggcagaacccgggacg 1861 tggggcaagattctcatacggacggcaacttcatccct cggcgtgtat gggaggctt  
 1921 ggactgaagcatccgcctctcagatctgattaaaaaca cactgttcc cgcggatcct  
 1981 ccgaccaccttcaatcagggcaagctggcttcatca cgcagtagac taccggccag  
 2041 gtcagcgtggagatcgagttggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccagag  
 2101 attcagtacacttcaactactacaatctacaaatgtgg actttgctgt caataactgag  
 2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcaccgtaa tctgtaa

[0216]

RHM15-2 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:7):

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkanqqrqd ngrglvlpgy rylgpfnfld  
 61 kgepvnaadaaalehdriaydqqlqagdnpylrynhaeef qerlqedtsf ggnlgravfq  
 121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvspqrspdsstgi gkrqqqpark rlnfgqtgd  
 181 esvpdpqpigepapaapsgvgpntmaagggapmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgrv  
 241 ittstrtwalptynnhlyrqiisngtsgstndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq  
 301 rlinnnwgfrpkrlnfklfnipykevtqnegtrtiannlt stiqvftdse yqlpyvlgsa  
 361 hqgclppfpadvfmipqygytltnngsqavgrssfcley fpgsqmlrtgn nfefsynfed  
 421 vpfhssyahsqslldrlnmplidqylyylsrtqstggtagt qqllfsgqap nnmsaqaknw  
 481 lpgpcyrrqrvstlsqnnnsnfawtgatkyhlngrdsvl npgvamathr ddeerffps  
 541 gvlmfgkqgagrdrndvdyssvmltseeirttvpateqyg vvadnlqqqn aapivgavns  
 601 qgalpgmvwqnrdvylqgpiwakiphgtdgnfhpsplmgf glkhpppqil ikntpvpadp  
 661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqkenskrwnpe iqytsnyyks tnvdfavnte  
 721 gtyseprpigtryltrnl

[0218]

RHM15-2 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:13):

1 atggctgccatggttatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc  
 61 gagttggggacctgaaacctggagccccgaaaccggaa ccaaccagca aaggcaggac  
 121 aacggccgggtctggcttcgttgcacaggtacctcg gacccttcaa cgactcgac  
 181 aagggggagccgtcaacgcggcggacgcagcggccctcg agcacgacag ggctacgac  
 241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcgtata atcacgcga cggcggat  
 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtctttggggcaacc tcggcgcgc agtcttccag  
 361 gccaaaaagggttctcgAACCTctggccctggtagt cgccggtag gacggctc  
 421 gggaaagaagagaccggtagagccatccccagcgcttc cagactcctc tacggcattc  
 481 ggcaagagaggccagcggccgcaagaaagagactcaatt ttgggcagac tggcactca  
 541 gagtcagtccccgaccctcaaccaatcgggagaaccacccag cagccccctc tgggtggga  
 601 cctaatacaatggctgcaggcggtggcgcttcaatggcag acaataacga aggccgcac  
 661 ggagtgggtagttcctcaggaaattggcattgcgttca catggctgg cgacagagtc  
 721 atcaccaccagcacccgcacctggccctgcccacctaca acaaccacct ctacaggcaa  
 781 atctccaacgggacactcgggaggaagcacaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc  
 841 ccctgggggtatTTgacttcaacagattccactgcccact tttcaccacg tgactggcag

[0220]

```

901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtcttacggactcggaataccagctcc cgtacgtgct cggctggcg
1081 caccaggctgcctgcctcggtccggcggacgtctca tgattctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtggccggctgt ccttctactg cctggagtag
1201 tttccctctcaaatactgctgagaacggcaacaacttgaat tcagctacaa ctccgaggac
1261 gtgccttccacagcagtaacgcgcacagccagggctgg accggctgat gaaccctctc
1321 atcgaccagtacttgtactacccgtccggactaaagca cgggggtac tgcaggaact
1381 cagcagttgtctatccctcaggccggctaaacatgt cggctcaggc caagaactgg
1441 ctaccggccctgtctaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac
1501 agcaactttgeetggacgggtgccacaaactatctga atggcagaga ctcttgtg
1561 aatccctggcggtccatggctacccacaggacgacgaag agcgatttt tccatccagc
1621 ggagtcataatgtttggaaacacaggagctggagagaca acgtggacta tagcagcgtg
1681 atgctaaccagcggagaaataaggaccaccaacccag tggccacaga acagtaacggc
1741 gtggggccgataaacctgcaacacgaaaacgcggctcta ttgttagggc cgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggatggcagaaccgggacg tgtacctgca gggcccattc
1861 tggccaagattccctatacggacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggctt
1921 ggactgaagcatccgcctcctcagatctgattaaaaaca cacctgttcc cgccgatcct
1981 ccgaccacccatcaatcaggcaagctggcttcatca cgcagtagac taccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgagttggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaacccagag
2101 attcagttacacttccaaactactacaaatctacaatgtgg actttgtgt caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggtaa tcacccgtaa tctgtaa

```

[0221]

RHM15-3/RHM15-5 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:8):

```

1 maadgylpdwlednlsegir ewwdlkpgapkpkanqqrqd ngrglvlpky rylgpfnlgld
61 kgepvnaadaaaalehdryadqqlqagdnpylrynhaaef qerlqedtsf ggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvrtapgkkrpvepsqrspdsstgi gkrgqqpakk rlnfgqtgd
181 esvpdpqpigepaapsvgpntmaagggapmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgrv
241 ittstrtwalptynnhlyrqiisngtsggstndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfniqvkewtnegtrtiannlt stiqvftdse yqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygytlnnngsqavgrssfcley f
421 vpfhssyyahsqslrlmnplidqylyylsrtqstggtagt qqlifsqagp nnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatkyhlnrdslv npgvamathr ddeerffpss
541 gvlmfgrrqgagrndvdyssvmltseeirttnpvateqyg vvadnlqqqn aapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdrvylqgpiwakiphdtgnfhpsplmgf glkhpppqil ikntrpvadp
661 pttfnqaklasfitqystgqvsveiewelqenkrsrnpe iqytsnyyks tnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltrnl

```

[0223]

RHM15-3/RHM15-5 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:14):

```

1 atggctgccatggtatcttccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
61 gagtggtgggacctgaaacctggagcccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
121 aacggccgggtctggctctggctacaggtaacctcg gacccttcaa cggactcgac
181 aagggggagccgtcaacgcggcggacgcagcggccctcg agcacgacag ggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctcggtata atcacgcga ccccgagtt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgctttttggggcaacc tcggcgcgc agtcttccag
361 gccaaaaagggtctcgAACCTCTGGGCGTGGTGAAT cgcgggttag gacggctcct
421 ggaaagaagagaccggtagagccatcccccagcgcctc cagactcctc tacgggcattc
481 ggcaagagagggcagcggccggaaaaagagactcaatt ttgggcagac tggcactca
541 gagtcagtcccccggccctcaaccaatcggagaaccaccag cagccccctc tgggtggga
601 cctaatacaatggctgcaggcgggtggcgtccatggcag acaataacga aggccgcac
661 ggagtggtagttccctcaggaaattggcattgcgattcca catggctgg cgacagagtc
721 atcaccaccagcacccgcacctggccctgcccacctaca acaaccacct ctacaggca
781 atctccaacgggacctcgggaggaagcaccaacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc
841 ccctggggattttgacttcaacagattccactgcccact tttcaccacg tgactggcag
901 cgactcatcaacaacaactggggattccggcccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac

```

[0225]

```

961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtcttacggactcggaaataccagctcc cgtacgtgct cggctcgccg
1081 caccaggctgcctcgccgtccggacgtctca tgattcctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtggccggctgt ccttctactg cctggagtac
1201 tttcctctcaaatactgtgagaacggcaacaacttgaat tcagctacaa cttcgaggac
1261 gtgccttccacagcagcagctacgcacagccagacgctgg accggctgat gaacccttc
1321 atcgaccagtagttactgtactacgtccggactcaaagca cgggctgat tgcaggaact
1381 cagcagttgctatcccggccataacaacatgt cggctcaggc caagaactgg
1441 ctaccggccctgtctaccggcagcaacgcgtctccgca cactgtcgcga gaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagttatctgtatcga atggcagaga ctctctggtg
1561 aatectggcgttgcctggatggccatggccacaggacgacgaa acgattttt tccatccagc
1621 ggagtcttaatgtttggagacaggagctggagagaca acgtggacta tagcagcgtg
1681 atgctaaccagcggagaagaaaataaggaccaccaacccag tggccacaga acagtagggc
1741 gtggggccgataacctcaacagcaaaaacgcgtcccta ttgttagggc cgtaatagt
1801 caaggagccttacctggatggcgtgtggcagaacccggacg tgcgttacactgca gggccccatc
1861 tggccaagatccctacacggacggcaactttcatccct cgccgctgat gggaggctt
1921 ggactgaagcatccgcctctcagatctgattaaaaca cacctgtcc cgccgatct
1981 ccgaccacccatcaatcaggcaagctggcttcatca cgcaatcag taccggccag
2041 gtcagcgtggagatcgcggactgtcagaaggagaaca gcaaacgcgtg gaaccagag
2101 attcagtagtacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgcgtg caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcaccggttacc tcacccgtaa tctgtaa

```

[0226]

RHM15-4 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:9):

```

1 maadgylpdwlednlsegirewdlkgpgap kpkankqrqd nrgglvlpwy rylgpfnql
61 kgepvnaadaaaalehdryadqlqagdnpv lrynhadaef qerlqedtsf ggnlgravfq
121 akkrvlleplglvespvrtapgkkrpvevsp qrspdsstgi gkrgqqpakk rlnfgqtgds
181 esvpdpqpigepappaapsgvgpntmaaggga pmadnnegad gvgsssgnwh cdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynhlyrqiisngtsggst ndntyfgyst pwgyfdfnrf hchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfnivkevtqne grtrianlt stiqvftdse yqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmipqygytltnngsqav grssfyctley fpxsqmlrtgn nfefsynfed
421 vpfhssyahsqslrilmnplidqylyylsr tqstggtagt qqlifsqagp nnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrsvstlsqnnsnfawtgatk yhlngrdsv npgvamathr ddeerffps
541 gvlmfgkqgagrndvdyssvmltseeirt tnpvateqyg vvadnlqqgn aapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdrvylqgpiwakiphdtgn fhpsplmggf glkhpppqil iknntpvpadp
661 pttfnqarlasfitqystgqvsveiewelq kenskrwnpe iqytsnyks tnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltrnl

```

[0228]

RHM15-4 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:15):

```

1 atggctccgatggtatctccagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc
61 gagttggggacctgaaacctggagccggaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac
121 aacggccgggtctggtgctcctggctacaggtacctcg gacccttcaa cggactcgcac
181 aagggggagccgtcaacgcggcggacgcagccgcctcg agcacagacag ggcctacgac
241 cagcagctccaagcgggtgacaatccgtacctgcggctata atcacccga cgccgatgtt
301 caggagcgtctgcaagaagatacgtctttggggcaacc tcgggcgcgc agtcttccag
361 gccaaaaagcgggtctcgAACCTCTgggctggtaat cgccggtagt gacggctcct
421 gggaaagaagagacggtagagccatccccagcgtctc cagactcctc tacggcattc
481 ggcaagagaggccagcagccgcaaaaaagagactcaatt ttgggcagac tggcactca
541 gagtcagtccccgaccctcaaccaatcgagaaccaccag cagccccctc tgggtggga
601 cctaatacatggctgcaggcggtggcgtccaaatggcag acaataacga aggccggcgc
661 ggagtggtagttctcaggaaattggcattgcattcca catggctgg cgacagagtc
721 atcaccaccaggcacccgcacccgtggccctggccacctaca acaaccacccatcataaggca
781 atctccaacgggacccgcggaggaaggcacaacgacaaca cctacttgcg ctacaggacc
841 ccctggggatatttgcactcaacagattccactgccact tttcaccacg tgactggcag
901 cgactcatcaacacaactgggattccggccaaagaggc tcaacttcaa gctcttcaac
961 atccaagtcaaggaggtcacgcagaatgaaggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc
1021 agcacgattcaggtcttacggactcggaaataccagctcc cgtacgtgct cggctcgccg
1081 caccaggctgcctcgccgtccggacgtctca tgattcctca gtacgggtac
1141 ctgactctgaacaatggcagtcaggctgtggccggctgt ccttctactg cctggagtac

```

[0230]

1201 tttccttctcaaatgctgagaacggcaacaacttgaat tcagctaca cttcgaggac  
 1261 gtgccctccacagcagctacgcgcacagccagagcctgg accggctgat gaaccctctc  
 1321 atcgaccagtacttgtactacctgtccggactcaaagca cgggcgtac tgcaaggaact  
 1381 cagcagttgtathttctcaggccggcctaacaacatgt cggctcaggc caagaactgg  
 1441 ctaccggccctgttaccggcagcaacgcgtctccacga cactgtcgca gaacaacaac  
 1501 agcaactttgcctggacgggtgccaccaagtatcatctga atggcagaga ctctctggtg  
 1561 aatcctggcgttgcctggcatggctacccacaggagcacaag akgatttt tccatccagc  
 1621 ggagtttaatgtttggaaacagggagctggaaagagaca acgtggacta tagcagcgtg  
 1681 atgtaaccaggcagggaaaataaggaccacaacccag tggccacaga acgtacggc  
 1741 gtggggccgataaacctggcatggcggacggacgaaaacccag ttgttagggc cgtcaatagt  
 1801 caaggagccttaacctggcatggcggacggacg gggccccatc  
 1861 tggggcaagatttctcatacgacggcaacttcatccct cgccgctgat gggaggctt  
 1921 ggactgaagcatccgcctctcagatctgattaaaaaca cacctgttcc cgccgatcct  
 1981 ccgaccaccttaatcagggcaggctggcttcatca cgcaactacg tacccggccag  
 2041 gtcagcgtggagatcgagttggagctgcagaaggagaaca gcaaacgcgt gaaccaggag  
 2101 attcagttacacttccaactactacaaatctacaaatgtgg actttgtgt caataactgag  
 2161 ggtacttattccgagcctcgccccattggcacccgttacc tcacccgtaa tctgtaa

[0231]

[0232]

RHM15-6 변종 VP1 캡시드 아미노산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:10):

1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkanqqrqdngrglvlp gy rylgpfnl d  
 61 kgepvnaadaaaalehdrydqqlqagdnpylrynhadaefqerlqedtsf ggnlgravfq  
 121 akkrvleplglivespvrtapgkkrpvepspqrspdsstgigkkqqpkk rlnfgqtgd s  
 181 esvpdpqpipgeppaapsvgvpntmaagggapmadnnegadgvsssgnwh cdstwlgdrv  
 241 ittstrtwalptynnhlyrqisngtsggstndnfygystpwgyfdfnr hchfsprdwq  
 301 rlinnnwgfrpkrlnfklfnicqvkevtqnegtrtianltstiqvftdse yqlpyvlgsa  
 361 hqgclppfpadvmipqgyyltlnnngsqavgrssfcleyfpsqmrltgn nfefsynfed  
 421 vpfhssyahsqslrdlmnp lidqylylsrtqstggtagtqqlf fsqagp nnmsaqaknw  
 481 lpgpcyrqqrvstt lsqnnnsnfawtgatkyhlngrdsvlvpvgvamathr ddeerffpss  
 541 gvlmfgrqgagrdnvdyssvmltsee eirttnpvateqygvvadnlqqqn aapivgavns  
 601 qgalpgmvwqnrdvylqgp iwaki ht dgnfhpsplmggf gfkhpqqil ikn t pvpadp  
 661 pttfnqarlasfitqystqqsveiewelqkenskrwnpeiqytsnyyks tnvd favnte  
 721 gtyseprpigtryl trnl

[0233]

[0234]

RHM15-6 변종 VP1 캡시드 핵산 서열은 하기와 같다 (SEQ ID NO:16):

1 atggctccgatggtatcttcagattggctcgaggaca acctctctga gggcattcgc  
 61 gagtggtgggac gctggaaacctggagcccgaaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac  
 121 aacggccgggtctggctggcttgc t a c a g g t a c c t g g a c c t t c a a c g g a c  
 181 aaggggagccgtcaacgcggcggacgc a c g c g g c c t c g a g c a c g a c a g g c  
 241 cagcagctcaagcgggtgacaatccgtacctgcgg t a t a c a c g c c g a c  
 301 caggagcgtctgcaagaagatacgtctttggggcaacc tcggg cgc a g t t c c a g  
 361 gccaaaaagcgggtctcg a c c t c t g g g c t g g t g a a t c g c g g t t a g  
 421 g g a a a g a g a g a c c g g t a g a g c c a t c a c c c a g c g t t c  
 481 g g c a a g a a g g c c a g c a g c c g c a a a a a g a g a c t c a a t t  
 541 g a g t c a g t c c c c a c c t c a a c c a t t c g g a a c c a c c a g  
 601 c c t a a c a a t t g g c t g a c c t c a a c c a t t g g c t t c a a c  
 661 g g a g t g g t a g t t c c t c a g g a a t t g g c t t c a a c  
 721 a t c a c c a c c a c c c g a c c t c g g g a g g a a g c a c  
 781 a t c t c a a c c g g a c c t c g g g a g g a a g c a c  
 841 c c t c g g g g t a t t t g a c t t c a a c a g a t t c a c t  
 901 c g a c t c a t c a a c a a c t g g g a t t c c g g c c a a g  
 961 a t c c a a g t c a a g g a g g t c a c g c a g a a t g a a g g  
 1021 a g c a c g a t t c a g g t c t t a c g g a c t c g g a a t  
 1081 c a c c a g g g c t g c t c g c t c g t c c c c g g a c g t  
 1141 c t g a c t c t g a a c a a t t g g c a g t c a g g t  
 1201 t t c c t t c t c a a t g c t g a g a a c c g g c a  
 1261 g t g c c t t c c a c a g c a g c t a c g c g c a c  
 1321 a t c g a c c a g t a c t t g t a c t a c t  
 1381 c a g c a g t t g t a t t t c t c a g g c g g g c t a a

[0235]

```

1441 ctaccggccctgtaccggcagcaacgcgttccacga cactgtcgca gaacaacaac
1501 agcaactttgcctggacgggtgccacaaggatcatctga atggcagaga ctctctggtg
1561 aatcctggcggtgcatggctaccccacagggacacgaaag
1621 ggagtcataatgtttggagacagggagctggaaagagaca acgtggacta tagcagcgt
1681 atgctaaccagcggagaaataaggaccacaacccag tggccacaga acagtacggc
1741 gtggtgccgataacctgcaacacagcaaaaacgcgcctta ttgttagggc cgtcaatagt
1801 caaggagccttacctggatggcagaacccggacg tgtaatgc gggccccatc
1861 tggccaagattccctatacggacggcaacttcatccct cgccgctgat gggaggctt
1921 ggactgaagcatccgcctctcagatcctgattaaaaca cacctgtcc cgccgatct
1981 ccgaccacccatcaggccaggctggctttcatca cgcgtacag tacccggcag
2041 gtcagcgtggagatcgagtgggagctgcagaaggagaaca gcaaacgctg gaaccoagag
2101 attcagtacacttccaaactactacaatctacaaatgtgg actttgcgt caatactgag
2161 ggtacttattccgagcctcgccccatggcacccgttacc tcacccgtaa tctgtaa

```

[0236]

실시예 8

[0238]

본 실시예는 Rh74 및 AAV8과 비교하여 Rh74 캡시드 변종을 사용한 인간 인자 IX 발현 연구의 설명을 포함한다.

[0239]

간단하게는, Rh74 캡시드 변종을 사용하여 AAV 인간 인자 IX 발현 벡터를 폐기징하였으며, AAV 입자는 마우스를 감염시키는데 사용하고, 인자 IX의 발현 수준을 동물(혈장)에서 측정하였다. 캡시드 변종은 표시한 위치에서 하기 아미노산 치환을 갖는다:

[0240]

표 4

RHM4_1	G195A-L199V-S201P-G202N
RHM15_1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R
RHM15_2	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

[0241]

[0242]

도 5는 2주 후 처리된 동물에서 혈장 인간 인자 IX 발현 수준을 보여준다. 도시된 바와 같이, RHM4-1 변종 캡시드에 의해 캡시드화된 AAV 인간 인자 IX 발현 벡터는 가장 높은 수준의 발현을 제공하였으며, Rh74 캡시드화된 AAV 인간 인자 IX 발현 벡터, 및 AAV8 캡시드화된 AAV 인간 인자 IX 발현 벡터에 의해 생성된 발현보다 실질적으로 더 높았다.

[0243]

실시예 9

[0244]

본 실시예는, 시아노몰구스 원숭이에 투여된 간-특이적 프로모터의 조정하에 인간 인자 IX (FIX)를 발현하는 AAVarh74 변종 RHM4-1 벡터가 동물에서 FIX의 생산량을 동일한 양으로 투여된 AAV8 벡터보다 높은 수준으로 유도함을 보여주는 데이터의 설명을 포함한다.

[0245]

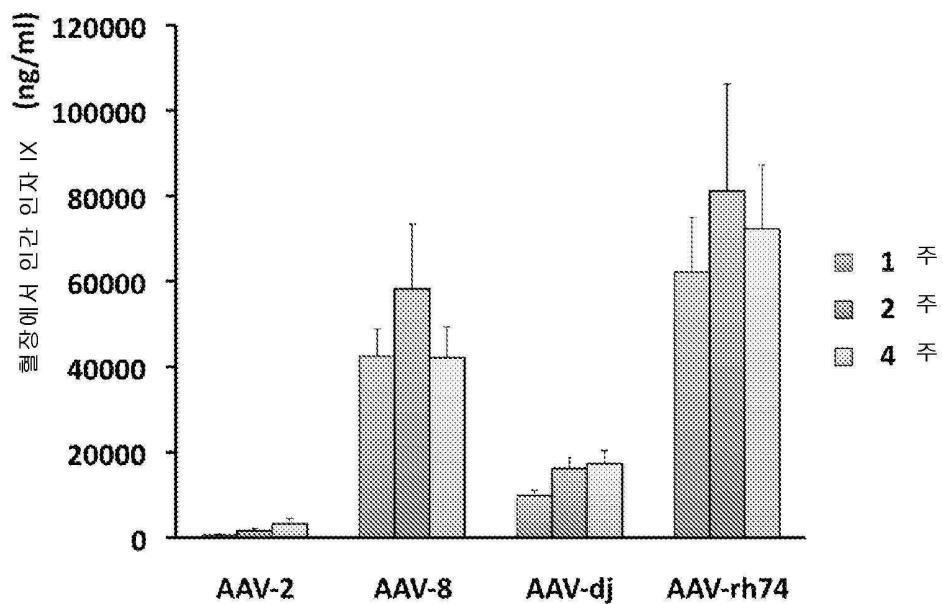
시아노몰구스 원숭이는 중화 AAV 항체에 대해 사전스크리닝하였으며; <1:1의 전처리 역가를 갖는 동물이 성공적인 형질도입을 보장하는 것으로 선택되었다. 이어서, 원숭이에  $3 \times 10^{12}$  vg/kg 용량으로 인간 IX 전이유전자를 발현하는 AAV8 또는 AAV-Rh74 변종 RHM4-1 벡터를 주입하였다. 인간외 영장류에서 인간 FIX 전이유전자 생성물(단백질) 혈장 수준은 연구 기간에 걸쳐 주마다 ELISA에 의해 측정하고, 도 6에 묘사하였다.

[0246]

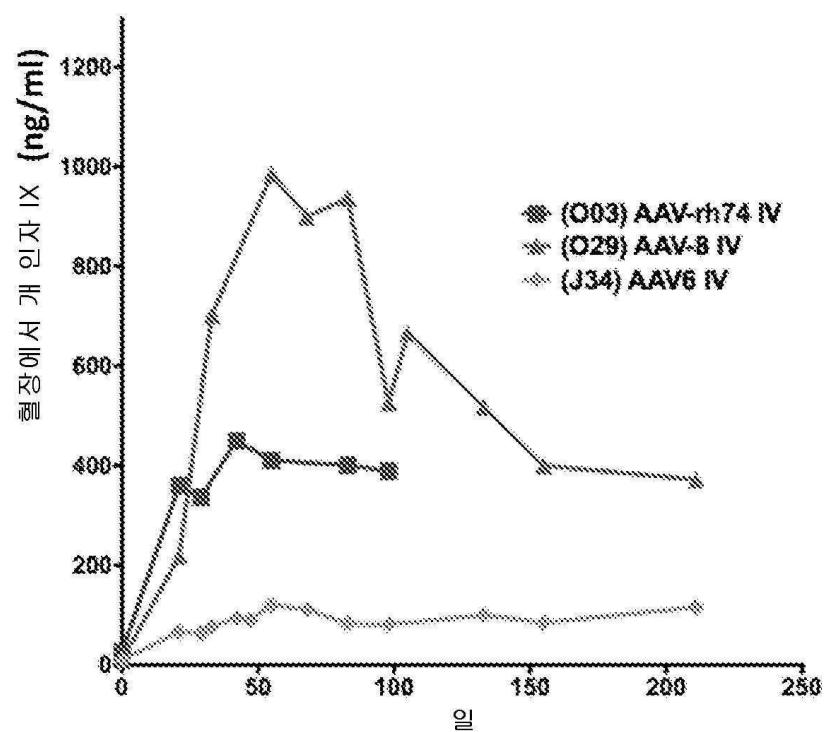
AAV-RHM4-1-FIX가 투여된 동물중 하나는 인간 인자 IX 전이유전자 생성물에 대한 억제제를 발달시켰으며, 이는 인간과 원숭이 단백질 간의 적은 아미노산 차이로 인해 인간 FIX 벡터로 처리된 원숭이 중 대략 20%에서 발생하는 충분히 입증된 현상이다. RHM4-1로 처리된 한 동물에서 발현의 손실은 인간 전이유전자에 대한 항체 반응의 발달로 인한 것이었다. 2차 RHM4-1-처리된 동물은 AAV8-처리된 원숭이와 비교하여 약 2-배 높은 수준으로 FIX를 발현하였다.

## 도면

## 도면1



## 도면2



**도면3a****(SEQ ID NO :1-5)**

Rh74 VP1 Amino Acid (SEQ ID NO:1):

MAADGYLPDWEDNLSEGIREWWDLKGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFGNLDKG  
 EPVNAADAAALEHDKAYDQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRV  
 LEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQQPAKKRNLNGQTGDSESVPDPQP  
 PEGAGPSGLSGSTMAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHDSTWLGRVITTSTWALPTYN  
 NHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNFNRFHCFSPRDWQRLINNNWGFRPKRLNFK  
 LFNIQVKEVTQNNEGTKTIANNLSTIQLVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMPQYGYLTL  
 NNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPHSSYAHQSLSLDRLMNPLIDQYLYLS  
 RTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYH  
 LNGRDSDLVNPVGAMATHKDEERFFPSSGVLMGKQGAGKDNDYSSVMLTSEEIKTTNPVAT  
 EQYGVVADNLQQQNAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGG  
 FGLKHPPPQJLIKNTPVADPPTTFNQAKLASFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTS  
 NYKSTNVDAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL.

Rh74 VP1 DNA (SEQ ID NO:2):

ATGGCTGCCGATGGTTATCTTCAGATTGGCTCGAGGACAACCTCTTGAGGGCATTGCGAGTG  
 GTGGGACCTGAAACCTGGAGCCCCGAAACCCAAAGCCAACAGCAAAGCAGGACAACGGCCGG  
 GGTCTGGTGCCTCTGGCTACAAGTACCTCGGACCCCTCAACGGACTCGACAAGGGGGAGCCGT  
 CAACCGCGCGGACGCAGCGGCCCTCGAGCACGACAAGGCCTACGACCAGCAGCTCCAAGCGGGTG  
 ACAATCCGTACCTGCGGTATAATCACGCCGACGCCGAGTTCAGGAGCGTCTGCAAGAAGATAC  
 GTCTTTGGGGCAACCTCGGGCGCCAGTCTCCAGGCCAAAAGCGGGTTCTCGAACCTCTGG  
 GCCTGGTTGAATGCCGTTAACGCGCTCCTGAAAGAACGACCGTAGAGCCATCACCCCA  
 GCGCTCTCCAGACTCCTACCGGCATCGGAAGAACGCGCAGGCCGCAAAAAGAGACTCA  
 ATTTTGGGAGACTGGCAGTCAGAGTCAGTCCCCGACCCCAACCAATCGGAGAACCCACAGCA  
 GGCCCTCTGGTCTGGATCTGGTACAATGGCTGCAGCGGTGGCGCTCCAATGGCAGACAATAA  
 CGAAGGCGCCGACGGAGTGGTAGTTCTCAGGAAATTGCATTGCGATTCCACATGGCTGGC  
 GACAGAGTCATCACCAACAGCACCCGACCTGGGCGCCACCTACAACAAACCAACCTCTACAA  
 GCAAATCTCCAACGGACCTCGGGAGGAAGCACCAACGACAACACCTACTTCGGCTACAGCACCC  
 CCTGGGGTATTTGACTTCAACAGATTCACTGCCACTTTCAACCACGTGACTGGCAGCGACTC  
 ATCAACAACAACGGGATTCCGGCCAAGAGGCTCAACTCAAGCTCTAACATCCAAGTCAA  
 GGAGGTCACCGACAATGAAGGCACCAAGACCATCGCCAATAACCTTACCGACCGATTAGGTC  
 TTTACGGACTCGGAATACCAGCTCCCGTACGTGCTCGGCTCGGCACAGGGCTGCCTGCCTCC  
 GTTCCCAGGCGACGTCTCATGATTCTCAGTACGGTACCTGACTCTGAACAATGGCAGTCAGG  
 CTGTGGCCGGTCTACTGCCGAGTACTTCCCTCTAAATGCTGAGAACGGCAAC  
 AACCTTGAAATTCACTGAGTCACCAACTTCGAGGACGTGCCCTCCACAGCAGCTACGCGCACAGCAGAG  
 CCTGGACCGGCTGATGAACCCCTCTCATGACCAGTACTTGACTACCTGTCGGACTCAAAGCA  
 CGGGCGGTACTGCAGGAACCTCAGCAGTTCTCAGGCCGGGCTAACACATGTCGCT  
 CAGGCCAACGAAACTGGTACCCGGTCCCTGCTACCGCAGCAACCGCTCCACGACACTGTCGCA  
 GAACAACAACAGCAACTTGCCTGGACGGGTGCCACCAAGTATCATCTGAATGGCAGAGACTCT  
 CTGGTGAATCTGGCTTGCCATGGTACCCACAAGGACGACGAAGAGCGATTTCATCCAG  
 CGGAGTCTTAATGTTGGAAACAGGGAGCTGAAAAGACAACGTGACTATAGCAGCGTGATG  
 CTAACCAGCGAGGAAGAAATAAGACCAACCCAGTGGCCACAGAACAGTACGGCGTGG  
 CCGATAACCTGCAACAGCAAACGCCCTCTATTGTAGGGGCCGTCAATAGTCAAGGAGCCTTA  
 CCTGGCATGGTGTGGCAGAACCGGGACGTGTACCTGCAGGGTCCCATCTGGCCAAGATTCCCTCA  
 TACGGACGGCAACTTTCATCCCTGCCGCTGATGGAGGCTTGGACTGAAGCATCCGCTCCTC  
 AGATCCTGATTAACACACCTGTCGGGAGTCTCCGACCACCTCAATCAGGCCAAGCTG  
 GCTTCTTCATCACGCAGTACAGTACCGGCCAGGTGAGCTGAGTGGAGCTGAGA  
 AGGAGAACAGCAAACGCTGGAACCCAGAGATTCACTACACTACAAATCTACAAA

### 도면3b

TGTGGACTTGCTGTCAATACTGAGGGTACTTATTCCGAGCCTGCCCGATTGGCACCCGTTACC  
TCACCCGTAATCTGTAA

Rh 74 VP2 Amino Acid (SEQ ID NO:3) :

TAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKQQPAKKRLNFQQTGDSESVPDPQPIDGEPPAGPSGLGSGTMAAGGGAPMAD  
NNEGADGVGSSSGNWHDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGSTDNTYFGYSTPWGYDFNRFH  
CHFSPRDWQRLINNNWGFTRPKRLNFKLNFNIQVKEVTQNEGKTIAANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPF  
PADVFMIPQYGYLTLNNNSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFESYNFEDVPFHSSYAHQSLSRDLMNPLIDQYL  
YYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLNVNP  
GVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNDYSSVMLTSEEIKTTPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVN  
SQGALPGMVWQNRDVYLQGP\_IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQY  
STGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

Rh 74 VP3 Amino Acid (SEQ ID NO:4) :

MAAGGGAPMADNNNEGADGVGSSSGNWHDSTWLGDRVITTSTRTWALPTYNHLYKQISNGTSGGSTDNTYFGYST  
PWGYFDNFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFTRPKRLNFKLNFNIQVKEVTQNEGKTIAANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVL  
GSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNNSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNEFESYNFEDVPFHSSYAHQSLS  
RLMNPLIDQYLYLTSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKY  
HLNGRDSLNVNPGVAMATHKDDEERFFPSSGVLMFGKQGAGKDNDYSSVMLTSEEIKTTPVATEQYGVVADNLQQ  
QNAAPIVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGP\_IWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFN  
QAKLASFITQYSTGQSVIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

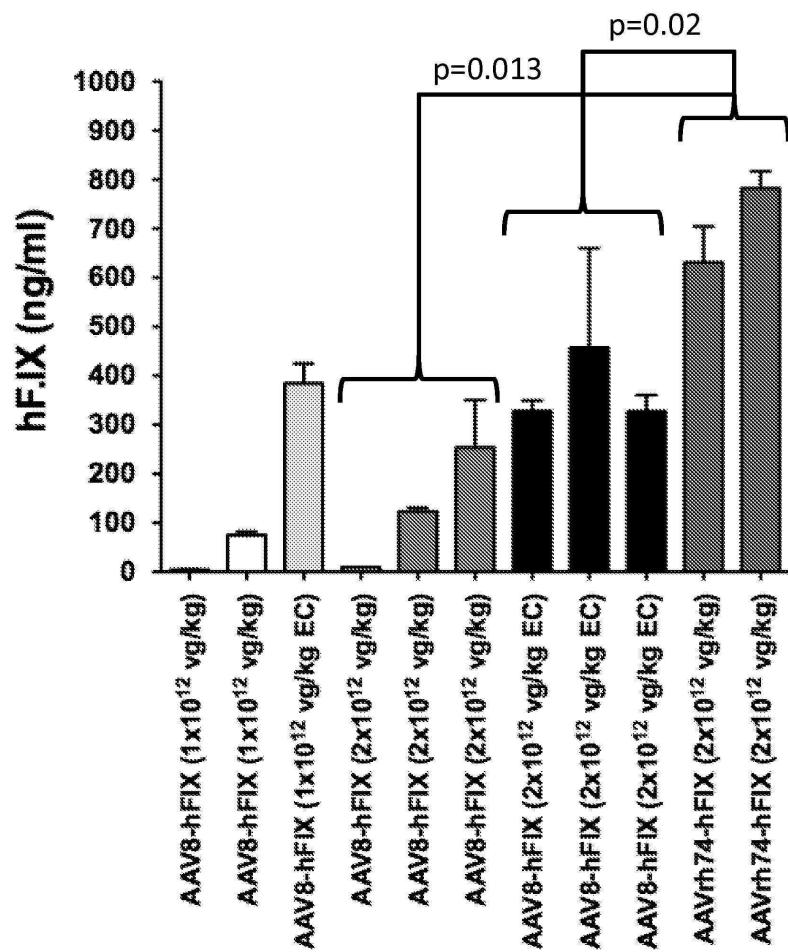
RHM4-1 VP1 Amino Acid (SEQ ID NO:5)

```

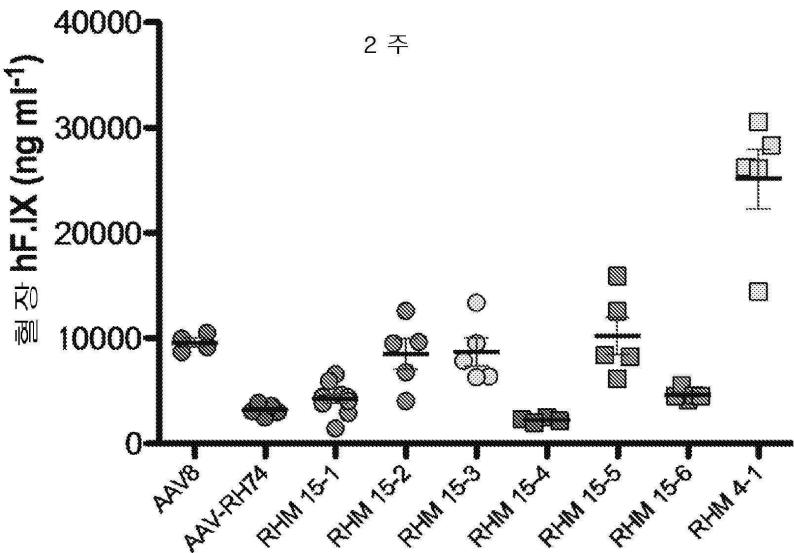
1 maadgylpdwlednlsegirewwdlkpgapkpkkanqqkqdnggrglvlpqykylgpfngld
61 kgepvnaadaaaalehdkadqqlqagdnpyplyrhadaefqerlqedtsfsggnlgravfq
121 akkrvleplglvespvktapgkkrpvepspqrspdsstgigkkqqaakkrlnfgqtgds
181 esvpdpqpigeppaapsgvgntmaagggapmadnnegadgvgsssgnwhdstwlgdrv
241 ittstrtwalptynhlykqisngtsggstndntyfgystpwgyfdnfhrchfsprdwq
301 rlinnnwgfrpkrlnfklfniqvkevtqnegktiaannltstiqvftdseyqlpyvlgsa
361 hqgclppfpadvfmpipqygytltnnnsqav grssfcleyfpsqmlrtgnnfefsynfed
421 vpfhssyahsqslrdlmnplidqylyylsrtqstggtagtqqlfsgagpnnmsaqaknw
481 lpgpcyrqqrvtstlsqnnnsnfawtgatkyhlngrdslnvnpvgavamathkddeerffpss
541 gvlmgfkgqgagkdndyssvmltseeiikttnpvateqygvvadnlqqqnaapivgavns
601 qgalpgmvwqnrdvylqgpwiwakihtdgnfhpsplmggfglkhpppqilikntpvpadp
661 pttfnqaklasfitqy়stgqsvieewelqkenskrwnpeiqytsnyykstnvdfavnte
721 gtyseprpigtryltrnl

```

## 도면4

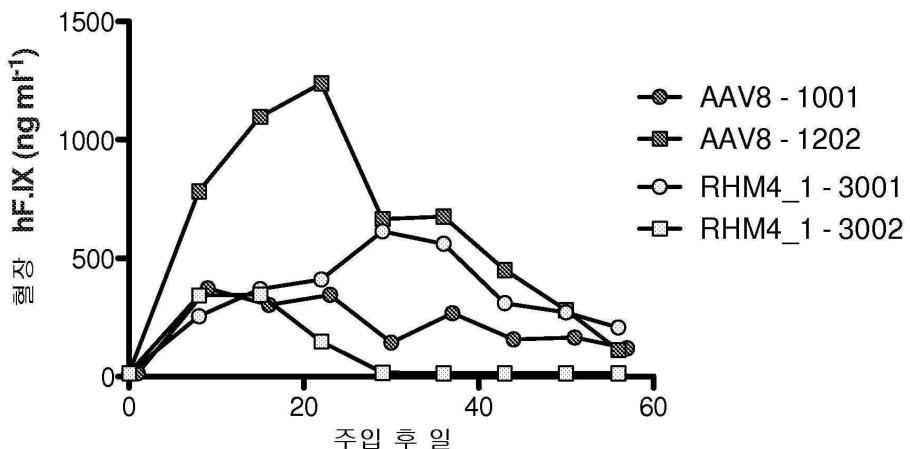


## 도면5



RHM4_1	G195A-L199V- S201P-G202N
RHM15_2	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R
RHM15_3	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547)R
RHM15_4	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R
RHM15_5	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R
RHM15_6	G195A-L199V- S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R

## 도면6



## 서 열 목록

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; The Children's Hospital of Philadelphia

YAZICIOGLU, MUSTAFA

HIGH, KATHERINE

ANGUELA, XAVIER

<120> Variant AAV and Compositions, Methods and Uses for Gene Transfer  
to Cells, Organs and Tissues

<130> 074659-0433285

<150> 61/857161

<151> 2013-07-22

<150> 61/985365

<151> 2014-04-28

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus

<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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380

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

385                    390                    395                    400

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

405                    410                    415

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

420                    425                    430

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

435                    440                    445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450                    455                    460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465                    470                    475                    480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485                    490                    495

Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500                    505                    510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515                    520                    525

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

530                    535                    540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545                    550                    555                    560

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

565                    570                    575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580                    585                    590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595                    600                    605

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

610                    615                    620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Asn Leu

<210> 2

<211> 2217

<212> DNA

<213> Adeno-associated virus

<400> 2

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
---	----

gagtggtggg acctgaaacc tggagccccc aaacccaaag ccaaccagca aaaggcaggac	120
--	-----

aacggccggg gtctggtgct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cgactcgac	180
--	-----

aagggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
--	-----

cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggata atcacccgaa cgccgagttt	300
--	-----

caggagcgta tgcagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcggggcgac agtcttccag	360
---	-----

gccaaaaaagc gggtctcgaa acctctggc ctgggtaat cgccggtaa gacggctct	420
--	-----

ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgcttc cagactcctc tacggcatc	480
---	-----

ggcaagaaag gccaggagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcgactca	540
---	-----

gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag caggccctc tggctggga	600
---	-----

tctggtacaa tggctgcagg cggggcgct ccaatggcag acaataacga aggcggcgcac	660
---	-----

ggagtggtta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc  
 atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa  
 atctccaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc  
 ccctggggat atittgactt caacagattt cactgcaactt ttccaccacg tgactggcag  
 cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac  
 atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatgccaa taaccttacc 720  
 1020

agcacgattc aggtcttac ggactcgaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcgcc  
 caccaggct gcctgcctcc gttcccgcg gacgtcttca tgattcctca gtacgggtac  
 ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccgctgt cttctactt cctgggtac  
 tttccttctc aaatgcttag aacggcaac aacttgaat ttagtacaa cttcgaggac  
 gtgccttcc acaggcagcta cgcgcacagc cagagcctgg accggctgtat gaacccttc  
 atcgaccagt acttgtacta cctgtcccg actcaaagca cggcggtac tgcaggaact  
 cagcgttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg 1080  
 1140  
 1200  
 1260  
 1320  
 1380  
 1440

ctacccggtc cctgttaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac  
 agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg  
 aatcctggcg ttgccccatggc taccacaaag gacgacgaag agcgatttt tccatccagc  
 ggagtcttaa tttttggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgtg  
 atgctaacca gcgaggaaga aataaagacc accaaccacg tggccacaga acagtagggc  
 gtggggcccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgttagggc cgtcaatagt  
 caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggttccatc 1500  
 1560  
 1620  
 1680  
 1740  
 1800  
 1860

tgggccaaga ttctctatac ggacggcaac ttcatccct cgccgctgtat gggaggctt  
 ggactgaagc atccgcctcc ttagatcctg attaaaaaca cacatgttcc cgcggatcct  
 ccgaccaccc tcaatcaggc caagctggct tctttcatca cgcgtacag taccggccag  
 gtcagcgtgg agatcgatgt ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccaggag  
 attcagtaca ctccaaacta ctacaaatct acaaattgtgg actttgtgt caataactgag  
 ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgattacc tcacccgtaa tctgtaa 1920  
 1980  
 2040  
 2100  
 2160  
 2217

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 601

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-associated virus

&lt;400&gt; 3

Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser

1 5 10 15

Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys

20 25 30

Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp

35 40 45

Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser

50 55 60

Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu

65 70 75 80

Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser

85 90 95

Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala

100 105 110

Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr

115 120 125

Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro

130 135 140

Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg

145 150 155 160

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

165 170 175

Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn

180 185 190

Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val

195 200 205

Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His

210 215 220

Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln

225 230 235 240

Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser

245	250	255
-----	-----	-----

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

260	265	270
-----	-----	-----

Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr

305	310	315
-----	-----	-----

320

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

325	330	335
-----	-----	-----

Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln

340	345	350
-----	-----	-----

Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp

355	360	365
-----	-----	-----

Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn

370	375	380
-----	-----	-----

Pro Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe

385	390	395
-----	-----	-----

400

Pro Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp

405	410	415
-----	-----	-----

Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys

420	425	430
-----	-----	-----

Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn

435	440	445
-----	-----	-----

Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln

450	455	460
-----	-----	-----

Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln

465	470	475
-----	-----	-----

480

Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro

485	490	495
-----	-----	-----

Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile

500 505 510

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

515 520 525

Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val

530 535 540

Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp

545 550 555 560

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val

565 570 575

Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile

580 585 590

Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

595 600

<210> 4

<211> 535

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus

<400> 4

Met Ala Ala Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala

1 5 10 15

Asp Gly Val Gly Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp

20 25 30

Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro

35 40 45

Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly

50 55 60

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

65 70 75 80

Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp

85 90 95

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

100 105 110

Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly

115 120 125

Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr

130 135 140

Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly

145 150 155 160

Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly

165 170 175

Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe

180 185 190

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

195 200 205

Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr

210 215 220

Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln

225 230 235 240

Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly

245 250 255

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

260 265 270

Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val

275 280 285

Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly

290 295 300

Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly

305 310 315 320

Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser

325 330 335

Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asn Val

340	345	350
-----	-----	-----

Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr

355	360	365
-----	-----	-----

Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln

370	375	380
-----	-----	-----

Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro

405	410	415
-----	-----	-----

Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro

420	425	430
-----	-----	-----

Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile

435	440	445
-----	-----	-----

Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala

450	455	460
-----	-----	-----

Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val

465	470	475	480
-----	-----	-----	-----

Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro

485	490	495
-----	-----	-----

Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe

500	505	510
-----	-----	-----

Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr

515	520	525
-----	-----	-----

Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

530	535
-----	-----

<210> 5

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated virus

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

Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp  
 260 265 270  
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn  
 275 280 285  
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn  
 290 295 300  
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn  
 305 310 315 320  
  
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala  
 325 330 335  
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln  
 340 345 350  
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe  
 355 360 365  
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn  
 370 375 380  
  
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr  
 385 390 395 400  
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr  
 405 410 415  
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser  
 420 425 430  
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu  
 435 440 445  
  
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu  
 450 455 460  
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp  
 465 470 475 480  
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser  
 485 490 495  
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500	505	510
-----	-----	-----

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515	520	525
-----	-----	-----

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

530	535	540
-----	-----	-----

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545	550	555	560
-----	-----	-----	-----

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

565	570	575
-----	-----	-----

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580	585	590
-----	-----	-----

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595	600	605
-----	-----	-----

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

610	615	620
-----	-----	-----

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

625	630	635	640
-----	-----	-----	-----

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

645	650	655
-----	-----	-----

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

660	665	670
-----	-----	-----

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

675	680	685
-----	-----	-----

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

690	695	700
-----	-----	-----

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

705	710	715	720
-----	-----	-----	-----

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

725	730	735
-----	-----	-----

Asn Leu

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-associated virus

&lt;400&gt; 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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

195 200 205

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

210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		
420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		

450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700

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

<210> 7  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> Adeno-associated virus  
 <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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20                    25                    30  
 Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35                    40                    45

Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50                    55                    60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65                    70                    75                    80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala  
 85                    90                    95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100                    105                    110

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val

225	230	235
-----	-----	-----

240

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

245	250	255
-----	-----	-----

Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315
-----	-----	-----

320

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340	345	350
-----	-----	-----

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

355	360	365
-----	-----	-----

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

370	375	380
-----	-----	-----

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

385	390	395
-----	-----	-----

400

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

405	410	415
-----	-----	-----

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485 490 495

Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580 585 590

Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735
Asn Leu		

&lt;210&gt; 8

&lt;211&gt; 738

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Adeno-associated virus

&lt;400&gt; 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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro			
20	25	30	
Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro			
35	40	45	
Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro			
50	55	60	
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp			

65	70	75	80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala			
85	90	95	
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly			
100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro			
115	120	125	

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

130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
Gly Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		
290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		

370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		
420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540
Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val		
545	550	555
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr		
565	570	575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Asn Ala Ala		
580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val

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

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

<210> 9  
 <211> 738  
 <212> PRT  
 <213> Adeno-associated virus  
 <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 Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro  
 20 25 30

Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45  
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
 50 55 60  
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala

85	90	95
----	----	----

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

115	120	125
-----	-----	-----

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

130	135	140
-----	-----	-----

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

145	150	155	160
-----	-----	-----	-----

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

165	170	175
-----	-----	-----

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

180	185	190
-----	-----	-----

Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

195	200	205
-----	-----	-----

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

210	215	220
-----	-----	-----

Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val

225	230	235	240
-----	-----	-----	-----

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

245	250	255
-----	-----	-----

Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

260	265	270
-----	-----	-----

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

275	280	285
-----	-----	-----

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

290	295	300
-----	-----	-----

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

305	310	315	320
-----	-----	-----	-----

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

325	330	335
-----	-----	-----

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu

450 455 460

Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp

465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser

485 490 495

Gln Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510

Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525

His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met

530 535 540

Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val

545 550 555 560

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

565 570 575

Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580	585	590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val		
595	600	605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile		
610	615	620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe		
625	630	635
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val		
645	650	655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe		
660	665	670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu		
675	680	685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr		
690	695	700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu		
705	710	715
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg		
725	730	735
Asn Leu		
<210> 10		
<211> 738		
<212> PRT		
<213> Adeno-associated virus		
<400> 10		
Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser		
1	5	10
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro		
20	25	30
Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro		
35	40	45

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

50	55	60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp		
65	70	75
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala		
85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly		
100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
160		
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
240		
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn		
275	280	285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn		

290	295	300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn		
305	310	315
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala		
325	330	335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln		
340	345	350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe		
355	360	365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn		
370	375	380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr		
385	390	395
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr		
405	410	415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser		
420	425	430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu		
435	440	445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu		
450	455	460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp		
465	470	475
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser		
485	490	495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His		
500	505	510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr		
515	520	525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met		
530	535	540

Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val  
 545 550 555 560  
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr  
 565 570 575  
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala  
 580 585 590  
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val  
 595 600 605  
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile  
 610 615 620  
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe  
 625 630 635 640  
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val  
 645 650 655  
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe  
 660 665 670  
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu  
 675 680 685  
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr  
 690 695 700  
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu  
 705 710 715 720  
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg  
 725 730 735  
 Asn Leu

<210> 11  
 <211> 2214  
 <212> DNA  
 <213> Adeno-associated virus  
 <400> 11

atggctgccg atggttatct tccagattgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaagcaggac	120
aacggccggg gtctgggtct tcctggctac aagtacctcg gacccttcaa cgactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggccgacgca gcggccctcg agcacgacaa ggcctacgac	240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccg cggcggat	300
caggagcgta tgcagaaga aacgtttt gggggcaacc tcggggcgcg agtcttccag	360
ccaaaaaagg ggttctcgaa acctctggc ctgggtaat cgccggtaa gacggctcct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcatc	480
ggcaagaaag gccagcagcc cgaaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tggtgtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggccgcac	660
ggagtggta gttccctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaagcaa	780
atctccaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaaaggc tcaacttcaa gctttcaac	960
atccaagtca aggaggcac gcagaatgaa ggcaccaaga ccatcgccaa taaccitacc	1020
agcacgattc aggtcttac ggactcgaa taccagctcc cgtacgtgt cggctggcg	1080
caccagggt gcctgcctcc gttccggcg gacgtttca tgattcctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaaggctgtg ggccggcgct cttctactg cctggagtac	1200
tttccctctc aatgctgag aacggcaac aactttgaat tcagctacaa cttcgaggac	1260
gtgccttcc acagcagcta cgccacagc cagacccctgg accggctgtat gaaccctctc	1320
atcgaccagt acttgtacta cctgtcccg actcaaagca cggccggta tgcaggaact	1380
cagcagtgc tattttctca ggccggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500
agcaactttg cttggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctgg	1560
aatccctggcg ttgccatggc taccacaaag gacgacgaag agcgatttt tccatccagc	1620
ggaggtttaa ttgttggaa acagggagct ggaaaagaca acgtggacta tagcagcgt	1680
atgctaaccg gcgaggaaga aataaagacc accaaccag tggccacaga acagtacggc	1740

gtggtgccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgttagggc cgtcaatagt	1800
caaggagcc tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggtcccata	1860
tggccaaga ttccctatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgat gggaggctt	1920
gactgaagc atccgcctcc tcagatcccg attaaaaaca cacctttcc cgccgatcc	1980
ccgaccacct tcaatcaggc caagctggc tcttcatac cgccgtacag taccggccag	2040
gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaacccagag	2100
attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag	2160
ggtaattt ccgagcctcg cccattggc acccgtaacc tcacccgtaa tctg	2214
<210> 12	
<211> 2217	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated virus	
<400> 12	
atggctgccg atggtatct tccagatgg ctcgaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagttgtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac	120
aacggccggg gtctgggtct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cgactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac	240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggata atcacggca cgccgagtt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tcggcgccgc agtcttccag	360
gccaaggaaagc gggttctcga acctctggc ctgggtaat cgccggtag gacggctct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcata	480
ggcaagaaag gccagcagcc cgcaagaaag agactcaatt ttggcagac tggcactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgt ccaatggcag acaataacga aggccggac	660
ggagtggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa	780
atctccaacg ggacctcggg aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac	960
atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taacattacc	1020
agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgt cggctcgccg	1080

caccagggct gcctgcctcc gttccggcgc gacgtttca tgattcctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggtcgt ccttctactg cctggagtagac	1200
ttcccttctc aaatgctgag aacgggcaac aactttgaat ttagtacaa cttcgaggac	1260
gtgcccttcc acagcagcta cgccacagc cagagcctgg accggctgat gaacccttc	1320
atcgaccagt acttgtacta cctgtcccgg actcaaagca cggcggtac tgcaggaact	1380
cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500
agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctgggt	1560
aatcctggcg ttgccatggc taccacagg gacgacgaag agcgatffff tccatccagc	1620
ggagtcttaa tggggag acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg	1680
atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccagg tggccacaga acagtacggc	1740
gtggtgcccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccta ttgttagggc cgtcaatagt	1800
caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggtcccatc	1860
tggccaaga ttcctcatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgat gggaggctt	1920
ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgtcc cgcgatcct	1980
ccgaccacct tcaatcaggc caagctggct tcttcatca cgcaatcag taccggccag	2040
gtcagcgtgg agatcgagtgg gagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccaggag	2100
attcagttaca cttccaacta ctacaaatct acaaattgtgg actttgtgtt caatactgag	2160
ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccggtacc tcacccgtaa tctgtaa	2217
<210> 13	
<211> 2217	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated virus	
<400> 13	
atggctgccc atggttatct tccagattgg ctggaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagttgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac	120
aacggccggg gtctgggtgt tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cggactcgac	180
aaggggggagc ccgtcaacgc ggcggacgcg cggccctcg agcacgacag ggcctacgac	240
cacggcgtcc aacgggttgc caatccgtac ctgggtata atcagccga cgccgagtt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtttttt gggggcaacc tcggggcgcg agtcttccag	360
gccaaaaagc gggttctcgaa acctctggcctt ctgggtgaat cgccgggttag gacggctcct	420

gaaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcatc	480
ggcaagagag gccagcagcc cgcaagaaag agactcaatt ttggcagac tggcgactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tggtgtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggccgcac	660
ggagtggta gtccctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacataca acaaccacct ctacaggcaa	780
atctccaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagattt cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca aacaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gcttcaac	960
atccaagtca aggaggcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc	1020
agcacgattc aggtctttac ggactcgaa taccagctcc cgtacgtgct cggctcgccg	1080
caccaggct gcctgcctcc gttcccgccg gacgtttca tgattcctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggtcgt cttctactg cttggagttac	1200
tttccttctc aaatgcttag aacggcaac aacttgaat tcaagttacaa cttcgaggac	1260
gtgccttcc acagcagcta cgccacagc cagagectgg accggctgat gaacccttc	1320
atcgaccagt acttgtacta cctgtcccgg actcaaaagca cggcggtac tgcaggaact	1380
cagcagtgc tattttctca ggccggccct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500
agcaactttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg	1560
aatcctggcg ttgcatggc taccacagg gacgacgaag agcgatttt tccatccagc	1620
ggagtcttaa tttttggaa acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg	1680
atgctaacca gcgaggaaga aataaggacc accaaccacg tggccacacg acagttacggc	1740
gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccctt ttttagggc cgtcaatagt	1800
caaggagcc tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggtccatc	1860
tggccaaga ttccctatac ggacggcaac tttcatccct cggcgctgat gggaggctt	1920
ggactgaagc atccgcctcc ttagatcctg attaaaaaca cacctgtcc cgccgatcct	1980
ccgaccacat tcaatcaggc caagctggct tctttcatca cgcagttacag taccggccag	2040
gtcagcgtgg agatcgatgt ggagctgcag aaggagaaca gcaaagctg gaaccacag	2100
attcagtaca ctccaaacta ctacaaatct acaaattgtgg actttgtgt caataactgag	2160

ggtacttatt ccgagcctcg ccccattggc acccgtaacc tcacccgtaa tctgtaa 2217

<210> 14

<211> 2217

<212> DNA

<213> Adeno-associated virus

<400> 14

atggctgccg atggttatct tccagatgg ctgcaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggtggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac	120
aacggccggg gtcgggtgct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cggaactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac	240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggtata atcacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggggcgcgc agtcttccag	360

gccaaaaagc gggttctcgaa acctctggc ctgggtgaat cgccggtag gacggctct	420
ggaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcatc	480
ggcaagagag gccagcagcc cgcaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtgtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cggtgtgcgt ccaatggcag acaataacga aggccgcac	660
ggagtggta gttcctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctig cccacactaca acaaccacct ctacaggcaa	780

atctccaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca acaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac	960
atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc	1020
agcacgattc aggtctttac ggactcgaa taccagctcc cgtacgtgct cggctggcg	1080
caccagggt gcctgcctcc gttccggcg gacgtttca tgattcctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggtcgt cttctactg cctggagtac	1200

tttccttctc aaatgctgag aacggcaac aacttgaat ttagctacaa cttcgaggac	1260
gtgccttcc acagcagcta cgccgcacagc cagagectgg accggctgtat gaaccctctc	1320
atcgaccagt acttgtacta cctgtcccg actcaaagca cggccggta tcgaggaact	1380
cagcagttgc tatttctca ggccggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500

agcaacttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg	1560
aatcctggcg ttgccatggc tacccacagg gacgacgaag agcgatttt tccatccagc	1620
ggagtcttaa ttttggag acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagcgt	1680
atgctaaccg gcgaggaaga aataaggacc accaaccagg tggccacaga acagtacggc	1740
gtggtggccg ataacctgca acagcaaaac gccgctcta ttgttagggc cgtcaatagt	1800
caaggagcc tacctggcat ggtgtggcag aaccgggacg tgtacctgca gggtcccatt	1860
tggccaaga ttccctatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgat gggaggctt	1920
ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgcgatcct	1980
ccgaccacct tcaatcaggg caagctggc tcttcatca cgcaatcag taccggccag	2040
gtcagcgtgg agatcgagtgg gagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaacccagag	2100
attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaattgtgg actttgctgt caatactgag	2160
gttacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgtaacc tcacccgtaa tctgtaa	2217
<210> 15	
<211> 2217	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated virus	
<400> 15	
atggctgccc atggtatct tccagattgg ctggaggaca acctctctga gggcattcgc	60
gagtgggggg acctgaaacc tggagccccg aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac	120
aacggccggg gtctgggtct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cgactcgac	180
aagggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcccggctcg agcacgacag ggcctacgac	240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgggtata atcacggca cggcggat	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtcttt gggggcaacc tggggcgcc agtcttccag	360
gccaaaaagc gggttctcgaa acctctggc ctgggttaat cggcggat gacggctct	420
ggaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcatc	480
ggcaagagag gccagcagcc cgaaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcactca	540
gagtcagtc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tgggtggga	600
cctaatacaa tggctgcagg cgggtggcgt ccaatggcag acaataacga aggccggac	660
ggagtggta gttctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagagtc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacatca acaaccacct ctacaggca	780
atctccaaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840

ccctgggggt atttgactt caacagattc cactgccact tttcaccacg tgactggcag  
 cgactcatca aacaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac  
 atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taacctacc 900  
 960  
 1020

agcacgattc aggtcttac ggactcgaa taccagctcc cgtagtgct cggctcgccg 1080  
 caccaggct gcctgcctcc gttccggcg gacgcttca tgattcctca gtacgggtac 1140  
 ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggctgt cttctactg cctggagtag 1200  
 tttccttc aatgctgag aacgggcaac aacttgaat tcaactacaa cttcgaggac 1260  
 gtgccttcc acagcagcta cgccacagc cagagctgg accggctgtat gaacccttc 1320  
 atcgaccagt acttgtacta cctgtcccgg actcaaagca cggcggtac tgcaggaact 1380  
 cagcagttgc tattttctca ggccggcct aacaacatgt cggtcaggc caagaactgg 1440

ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac 1500  
 agcaacttg cctggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg 1560  
 aatccctggcg ttgccccatggc tacccacagg gacgacgaag aegatttt tccatccagc 1620  
 ggagtcttaa tggggaa acagggagct ggaagagaca acgtggacta tagcagctg 1680  
 atgctaaccg gcgaggaaga aataaggacc accaaccacg tggccacaga acagtacggc 1740  
 gtggtgcccg ataaccctgca acagcaaaac gccgtccctt ttgttagggc cgtcaatagt 1800  
 caaggagcct tacctggcat ggtgtggcag aaccggacg tgtacctgca gggtcccatc 1860

tgggccaaga ttccctatac ggacggcaac tttcatccct cgccgctgtat gggaggctt 1920  
 ggactgaagc atccgcctcc tcagatcctg attaaaaaca cacctgttcc cgccgatcct 1980  
 ccgaccacct tcaatcagggc caggctggct tctttcatca cgcaatcag taccggccag 2040  
 gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaacccagag 2100  
 attcagtaca ctcccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160  
 ggtacttatt ccgagcctcg cccattggc acccgttacc tcacccgtaa tctgtaa 2217

&lt;210&gt; 16

&lt;211&gt; 2217

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Adeno-associated virus

&lt;400&gt; 16

atggctgccc atggtttatct tccagattgg ctggaggaca acctctctga gggcattcgc 60  
 gagttggggg acctgaaacc tggagccccc aaacccaaag ccaaccagca aaggcaggac 120  
 aacggccggg gtctgggtct tcctggctac aggtacctcg gacccttcaa cgactcgac 180

aagggggagc ccgtcaacgc ggccggacgca gcggccctcg agcacgacag ggcctacgac	240
cagcagctcc aagcgggtga caatccgtac ctgcggata atcacgccga cgccgagttt	300
caggagcgtc tgcaagaaga tacgtctttt gggggcaacc tcggggcgcg agtcttccag	360
gccaaaaagc gggttctcgaa acctctggc ctggtaat cgccggttag gacggctct	420
gaaaagaaga gaccggtaga gccatcaccc cagcgtctc cagactcctc tacggcatc	480
ggcaagaaag gccagcagcc cgaaaaaaag agactcaatt ttgggcagac tggcactca	540
gagtcagtcc ccgaccctca accaatcgga gaaccaccag cagccccctc tggtgtggaa	600
cctaatacaa tggctgcagg cggtggcgct ccaatggcag acaataacga aggccgcac	660
ggagtggta gtccctcagg aaattggcat tgcgattcca catggctgg cgacagatc	720
atcaccacca gcacccgcac ctggccctg cccacctaca acaaccacct ctacaggcaa	780
atctccaacg ggacctcgaa aggaagcacc aacgacaaca cctacttcgg ctacagcacc	840
ccctgggggt atttgactt caacagatc cactgccact tttcaccacg tgactggcag	900
cgactcatca aacaacaactg gggattccgg cccaagaggc tcaacttcaa gctttcaac	960
atccaagtca aggaggtcac gcagaatgaa ggcaccagga ccatcgccaa taaccttacc	1020
agcacgattc aggtctttac ggactcggaa taccagctcc cgtacgtgt cggctggcg	1080
caccagggt gcctgcctcc gttccggcg gacgtttca tgattctca gtacgggtac	1140
ctgactctga acaatggcag tcaggctgtg ggccggcgt cttctactg cctggagttac	1200
tttcttctc aaatgctgaa aacggcaac aactttgaat tcaacttacaa cttcgaggac	1260
gtgcccttcc acagcagcta cgccgcacagc cagagcctgg accggctgtat gaaccctctc	1320
atcgaccagt acttgtacta cctgtcccg actcaaagca cggccggatc tgcaggaact	1380
cagcagttgc tattttctca ggccgggcct aacaacatgt cggctcaggc caagaactgg	1440
ctacccggtc cctgctaccg gcagcaacgc gtctccacga cactgtcgca gaacaacaac	1500
agcaactttg cttggacggg tgccaccaag tatcatctga atggcagaga ctctctggtg	1560
aatcctggcg ttgccccatggc taccacagg gacgacgaaag agcgatttt tccatccagc	1620
ggagttttaa tttttgggatc acagggatc ggaagagaca acgtggacta tagcagcgtg	1680
atgctaaccg gcgaggaaga aataaggacc accaaccacg tggccacaga acagtaacggc	1740
gtggtgcccg ataacctgca acagcaaaac gccgctccat ttgttagggc cgtcaatagt	1800
caaggaggct tacctggcat ggtgtggcag aaccggacg tgcgttccat cggccgtat	1860
tggcccaaga ttccatccatc ggacggcaac tttcatccct cggccgtat gggaggcttt	1920
ggactgaagc atccgcctcc tcagatccgt attaaaaaca cacctgtcc cgcggatcct	1980
ccgaccacct tcaatcaggc caggctggct tctttcatca cgcagtacag taccggccag	2040

gtcagcgtgg agatcgagtg ggagctgcag aaggagaaca gcaaacgctg gaaccaggag 2100

attcagtaca ctccaacta ctacaaatct acaaatgtgg actttgctgt caatactgag 2160

ggtacttatt ccgagcctcg ccccattggc acccgtaacc tcacccgtaa tctgtaa 2217