



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2023-0061441  
(43) 공개일자 2023년05월08일

- |   |   |
|---|---|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)<br/>A61P 27/02 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)<br/>C12N 15/113 (2010.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>C12N 15/86 (2013.01)<br/>A61K 48/005 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2023-7010791</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2021년09월02일<br/>심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2023년03월29일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/US2021/048917</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2022/051537<br/>국제공개일자 2022년03월10일</p> <p>(30) 우선권주장<br/>63/074,361 2020년09월03일 미국(US)<br/>63/179,700 2021년04월26일 미국(US)</p> | <p>(71) 출원인<br/>유니버시티 오브 매사추세츠<br/>미국 매사추세츠주 02108 보스턴 31 플로어 원 비컨 스트리트</p> <p>(72) 발명자<br/>가오, 광평<br/>미국 01581 매사추세츠 웨스트버러 에드워드 던웨이 4<br/>타이, 필립<br/>미국 01604 매사추세츠 우스터 알바라도 애버뉴 51 아파트먼트 203<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>양영준, 김영</p> |
|---|---|

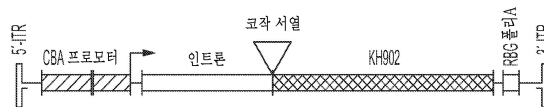
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 KH902 (콘베르셉트)의 전달을 위한 아데노-연관 바이러스 및 그의 용도

(57) 요약

본 개시내용의 측면은 세포 또는 대상체에서 항-혈관 내피 세포 성장 인자 (VEGF) 작용제를 발현하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV2 변이체, AAV2/3 혼성체 변이체, AAV8 변이체 등), 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진 및 하나 이상의 조절 서열을 포함하는 rAAV를 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 조성물은 혈관신생 또는 비정상적 VEGF 활성화/신호전달과 연관된 질환을 갖는 대상체를 치료하는데 유용하다.

대표도 - 도1c



(52) CPC특허분류

*A61P 27/02* (2018.01)

*C07K 14/71* (2013.01)

*C12N 15/113* (2013.01)

*C07K 2319/30* (2013.01)

*C12N 2310/141* (2013.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

(72) 발명자

**폰조, 클라우디오**

미국 02446 매사추세츠 브루클린 플레즌트 스트리트 62 유닛 3

**린, 하이지앙**

미국 02108 매사추세츠 보스턴 31 플로어 원 비컨 스트리트 유니버시티 오브 매사추세츠 내

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV):

(i) AAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV2 캡시드 단백질, AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질, AAV8 캡시드 단백질 또는 그의 변이체인 AAV 캡시드 단백질; 및

(ii) 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산으로서, 여기서 트랜스진은 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 것인 단리된 핵산.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 항-VEGF 작용제가 인간 VEGF 디코이 수용체인 rAAV.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 인간 VEGF 디코이 수용체가 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 4

제2항에 있어서, 인간 VEGF 디코이 수용체가 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 디코이 수용체가 항-혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및/또는 태반 성장 인자 (PlGF)에 결합할 수 있는 것인 rAAV.

#### 청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 항-VEGF 작용제가 인간 VEGF 수용체 융합 단백질인 rAAV.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4에 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 8

제6항에 있어서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 9

제6항에 있어서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 10

제6항에 있어서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4에 융합되고 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 추가로 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함하는 것인 rAAV.

#### 청구항 11

제10항에 있어서, 항-VEGF 작용제가 KH902인 rAAV.

**청구항 12**

제10항 또는 제11항에 있어서, 항-VEGF 작용제가 서열식별번호: 5의 아미노산 서열, 또는 그의 부분과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 13**

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 서열식별번호: 1의 핵산 서열 또는 그의 코돈 최적화된 변이체와 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 14**

제6항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 항-VEGF 작용제가 항-혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및/또는 태반 성장 인자 (PlGF)에 결합할 수 있는 것인 rAAV.

**청구항 15**

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 핵산이 트랜스진에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 16**

제15항에 있어서, 프로모터가 시토메갈로바이러스 (CMV) 초기 인핸서를 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 17**

제16항에 있어서, 프로모터가 키메라 시토메갈로바이러스 (CMV)/닭 β-액틴 (CB) 프로모터를 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 18**

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 하나 이상의 인트론을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 19**

제18항에 있어서, 적어도 하나의 인트론이 프로모터 및 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 핵산 서열 사이에 위치하는 것인 rAAV.

**청구항 20**

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 코작 서열을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 21**

제20항에 있어서, 코작 서열이 인트론 및 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진 사이에 위치하는 것인 rAAV.

**청구항 22**

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 3' 비번역된 영역 (3'UTR)을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 23**

제1항 내지 제22항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 하나 이상의 miRNA 결합 부위를 추가로 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 24**

제23항에 있어서, 하나 이상의 miRNA 결합 부위가 트랜스진의 3'UTR에 위치하는 것인 rAAV.

**청구항 25**

제23항 또는 제24항에 있어서, 적어도 하나의 miRNA 결합 부위가 면역 세포-연관 miRNA 결합 부위인 rAAV.

**청구항 26**

제25항에 있어서, 면역 세포-연관 miRNA가 miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-21, miR-29a/b/c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a, miR-125a/b, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 및 miR-424, miR-221, miR-222, let-7i, miR-148, 및 miR-152로부터 선택되는 것인 rAAV.

**청구항 27**

제1항 내지 제26항 중 어느 한 항에 있어서, ITR이 AAV1 ITR, AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, 및 AAV6 ITR로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈청형의 아데노-연관 바이러스 ITR인 rAAV.

**청구항 28**

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 단리된 핵산이 서열식별번호: 2의 핵산 서열과 적어도 80%, 90%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 29**

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 캡시드 단백질이 v224 캡시드 단백질, v326 캡시드 단백질, v358 캡시드 단백질, v46 캡시드 단백질, v56 캡시드 단백질, v66 캡시드 단백질, v67 캡시드 단백질, v81 캡시드 단백질, v439 캡시드 단백질, v453 캡시드 단백질, v513 캡시드 단백질, v551 캡시드 단백질, v556 캡시드 단백질, v562 캡시드 단백질, 또는 v598 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 30**

제29항에 있어서, 캡시드 단백질이 v224 캡시드 단백질, v326 캡시드 단백질, 또는 v56 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 31**

제1항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, 캡시드 단백질이 안구 조직에 대한 향성을 갖는 것인 rAAV.

**청구항 32**

제35항에 있어서, 안구 조직이 안구 뉴런, 망막, 공막, 맥락막, 망막, 유리체, 황반, 중심와, 시신경 유두, 수정체, 동공, 홍채, 방수, 각막, 결막 섬모체, 또는 시신경을 포함하는 것인 rAAV.

**청구항 33**

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV가 단일-가닥 AAV (ssAAV) 또는 자기-상보적 AAV (scAAV)인 rAAV.

**청구항 34**

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 캡시드 단백질 변이체가 이들이 유래되는 야생형 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 증가시킬 수 있는 것인 rAAV.

**청구항 35**

제34항에 있어서, AAV2 캡시드 단백질 변이체가 야생형 AAV2 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과 증가시킬 수 있는 것인 rAAV.

**청구항 36**

제34항에 있어서, AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질 변이체가 야생형 AAV3b 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과 증가시킬 수 있는 것인 rAAV.

#### 청구항 37

하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스:

(i) rAAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV8 캡시드 단백질, AAV2 캡시드 단백질 및/또는 AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질의 변이체 또는 그의 변이체인 rAAV 캡시드 단백질; 및

(ii) 5'에서 3' 순서로 하기를 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터:

(a) 5' AAV ITR;

(b) CMV 인핸서;

(c) CBA 프로모터;

(d) 닭 베타-액틴 인트론;

(d) 코작 서열;

(e) 항-VEGF 작용제를 코딩하는 트랜스진으로서, 여기서 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 1에서의 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스진;

(f) 토끼 베타-글로빈 폴리A 신호 꼬리; 및

(g) 3' AAV ITR.

#### 청구항 38

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

#### 청구항 39

제38항에 있어서, 숙주 세포가 포유동물 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 또는 곤충 세포인 숙주 세포.

#### 청구항 40

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV를 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 41

제40항에 있어서, 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함하는 제약 조성물.

#### 청구항 42

제40항 또는 제41항에 있어서, 제약 조성물이 유리체내 주사, 정맥내 주사, 종양내 주사, 기질내 주사, 또는 근육내 주사를 위해 제제화되는 것인 제약 조성물.

#### 청구항 43

VEGF 또는 PIGF 활성의 억제를 필요로 하는 대상체에서 VEGF 또는 PIGF 활성을 억제하는 방법으로서,

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV 또는 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 44

항-VEGF 작용제의 전달을 필요로 하는 대상체에서 항-VEGF 작용제를 전달하는 방법으로서,

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV 또는 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

#### 청구항 45

신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환 또는 VEGF 연관 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환 또는 VEGF 연관 질환을 치료하는 방법으로서,

제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV 또는 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 46**

제1항 내지 제37항 및 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, VEGF 활성의 억제를 필요로 하는 대상체에서 VEGF 활성을 억제하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV 또는 제약 조성물.

**청구항 47**

제1항 내지 제37항 및 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 항-VEGF 작용제의 전달을 필요로 하는 대상체에서 항-VEGF 작용제를 전달하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV 또는 제약 조성물.

**청구항 48**

제1항 내지 제37항 및 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항에 있어서, 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF-연관 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF-연관 질환을 치료하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV 또는 제약 조성물.

**청구항 49**

제43항 내지 제48항 중 어느 한 항에 있어서, 항-VEGF 작용제의 전달이 VEGF 활성의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100% 억제를 발생시키는 것인 방법 또는 용도.

**청구항 50**

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 비-인간 포유동물인 방법 또는 용도.

**청구항 51**

제50항에 있어서, 비-인간 포유동물이 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니 피그, 햄스터, 닭, 칠면조, 또는 비-인간 영장류인 방법 또는 용도.

**청구항 52**

제43항 내지 제49항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법 또는 용도.

**청구항 53**

제52항에 있어서, 대상체가 혈관신생 연관 질환 또는 VEGF 연관 질환을 갖는 것으로 진단되거나 의심되는 것인 방법 또는 용도.

**청구항 54**

제53항에 있어서, VEGF 연관 질환이 중양, 암, 망막병증, 습성 연령-관련 황반 변성 (wAMD), 황반 부종, 맥락막 신생혈관화, 또는 각막 신생혈관화인 방법 또는 용도.

**청구항 55**

제43항 내지 제54항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 전신 투여이며, 임의로 여기서 투여가 정맥내 주사인 방법 또는 용도.

**청구항 56**

제43항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 안구 조직에의 직접 투여이며, 임의로 여기서 직접 투여가 유리체내 주사, 안구내 주사, 기질내 주사, 또는 국소 투여인 방법 또는 용도.

**청구항 57**

제43항 내지 제56항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 안구 조직에의 트랜스진의 전달을 발생시키는 것인 방법 또는 용도.

**청구항 58**

제57항에 있어서, 안구 조직이 안구 뉴런, 망막, 공막, 맥락막, 망막, 유리체, 황반, 중심와, 시신경 유두, 수정체, 동공, 홍채, 방수, 각막, 결막 섬모체, 또는 시신경을 포함하는 것인 방법 또는 용도.

**청구항 59**

제43항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 투여 후 적어도 5일, 10일, 15일, 20일, 1개월, 2개월, 또는 그 초과 동안 대상체에서 VEGF의 억제를 발생시키는 것인 방법 또는 용도.

**청구항 60**

각막 신생혈관화 (CoNV)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 CoNV를 치료하는 방법으로서, 제1항 내지 제37항 중 어느 한 항의 rAAV 또는 제40항 내지 제42항 중 어느 한 항의 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법.

**청구항 61**

제60항에 있어서, rAAV가 AAV8 캡시드 단백질을 포함하는 것인 방법.

**청구항 62**

제60항 또는 제61항에 있어서, 투여가 각막 세포에서 항-VEGF 작용제의 전달을 발생시키는 것인 방법.

**청구항 63**

제62항에 있어서, 투여가 각막의 각막세포에서 항-VEGF 작용제의 전달을 발생시키는 것인 방법.

**청구항 64**

제60항 내지 제63항 중 어느 한 항에 있어서, rAAV가 1회 투여되는 것인 방법.

**청구항 65**

제60항 내지 제64항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 3개월, 6개월, 1년 초과, 또는 그 초과 동안 각막 세포에서 항-VEGF 작용제의 발현을 발생시키는 것인 방법.

**청구항 66**

제35항에 있어서, 투여가 투여 후 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년 또는 그 초과 동안 대상체에서 VEGF의 억제를 발생시키는 것인 방법.

**청구항 67**

제60항 내지 제66항 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 기질내 주사인 방법.

**청구항 68**

제60항 내지 제67항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

**청구항 69**

제60항 내지 제68항 중 어느 한 항에 있어서, 각막 신생혈관화가 급성 각막 신생혈관화 또는 만성 각막 신생혈관화인 방법.

**발명의 설명**

**기술분야**

**관련 출원**

- [0001] 관련 출원
- [0002] 본 출원은 발명의 명칭이 "KH902 (콘베르셉트)의 전달을 위한 아데노-연관 바이러스 및 그의 용도"인 2021년 4월 26일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 63/179,700, 및 발명의 명칭이 "KH902 (콘베르셉트)의 전달을 위한 아데노-연관 바이러스 및 그의 용도"인 2020년 9월 3일에 출원된 미국 가출원 일련 번호 63/074,361의 출원일의 35 U.S.C. 119(e) 하의 우선권을 주장하며, 이들의 각각의 전체 내용은 본원에 참조로 포함된다.

**배경기술**

- [0003] KH902는 항-VEGF 치료를 위해 현재 임상 시험 중인 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체 융합 단백질이다. 항-VEGF 요법에 있어서의 현재의 난제는 효능을 지속시키기 위한 반복된 주사 및 항-VEGF 약물의 및 장기-작용 제제에 대한 필요를 포함한다. 따라서, 표적화된 세포 및/또는 조직 내로의 항-VEGF 작용제의 장기 전달을 위한 신규한 방법의 개발에 대한 필요가 있다.

**발명의 내용**

- [0004] 본 개시내용의 측면은 세포 및/또는 조직 (예를 들어, 대상체의 세포)에의 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 전달을 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은, 부분적으로, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진을 발현하도록 조작된 rAAV에 기반한다.
- [0005] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)를 제공한다: (i) AAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV2 캡시드 단백질, AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질, AAV8 캡시드 단백질의 변이체인 AAV 캡시드 단백질; 및 (ii) 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산으로서, 여기서 트랜스진은 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 것인 단리된 핵산.
- [0006] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 인간 VEGF 디코이 수용체이다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 디코이 수용체는 항-혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및/또는 태반 성장 인자 (PlGF)에 결합할 수 있다.
- [0007] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질은 인간 VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4에 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 인간 VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 융합 단백질은 인간 VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4에 융합되고 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 추가로 융합된 인간 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 KH902이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호(SEQ ID NO): 5의 아미노산 서열, 또는 그의 부분과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 90%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 서열식별번호: 1의 핵산 서열 또는 그의 코돈 최적화된 변이체와 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 90%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 항-혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 및/또는 태반 성장 인자 (PlGF)에 결합할 수 있다.
- [0008] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 트랜스진에 작동가능하게 연결된 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 시토메갈로바이러스 (CMV) 초기 인핸서를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 키메라 시토메갈로바이러스 (CMV)/닭 β-액틴 (CB) 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 하나 이상의 인트론을 포함한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 인트론은 프로모터 및 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 핵산 서열 사이에 위치한다.
- [0009] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 코작(Kozak) 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 코작 서열은 인트론 및 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진 사이에 위치한다.
- [0010] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 3' 비번역된 영역 (3'UTR)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 하나 이상의 miRNA 결합 부위를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 miRNA 결합 부위는 트랜스진의

3'UTR에 위치한다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 miRNA 결합 부위는 면역 세포-연관 miRNA 결합 부위이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포-연관 miRNA는 miR-15a, miR-16-1, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a, miR-21, miR-29a/b/c, miR-30b, miR-31, miR-34a, miR-92a-1, miR-106a, miR-125a/b, miR-142-3p, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223 및 miR-424, miR-221, miR-222, let-7i, miR-148, 및 miR-152로부터 선택된다.

- [0011] 일부 실시양태에서, ITR은 AAV1 ITR, AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, 및 AAV6 ITR로 이루어진 군으로부터 선택되는 혈청형의 아데노-연관 바이러스 ITR이다.
- [0012] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 서열식별번호: 2의 핵산 서열과 적어도 80%, 90%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다.
- [0013] 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 v224 캡시드 단백질, v326 캡시드 단백질, v358 캡시드 단백질, v46 캡시드 단백질, v56 캡시드 단백질, v66 캡시드 단백질, v67 캡시드 단백질, v81 캡시드 단백질, v439 캡시드 단백질, v453 캡시드 단백질, v513 캡시드 단백질, v551 캡시드 단백질, v556 캡시드 단백질, v562 캡시드 단백질, 또는 v598 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 v224 캡시드 단백질, v326 캡시드 단백질, 또는 v56 캡시드 단백질의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 안구 조직에 대한 향성을 갖는다. 일부 실시양태에서, 안구 조직은 안구 뉴런, 망막, 공막, 맥락막, 망막, 유리체, 황반, 중심와, 시신경 유두, 수정체, 동공, 홍채, 방수, 각막, 결막 섬모체, 또는 시신경을 포함한다.
- [0014] 일부 실시양태에서, rAAV는 단일-가닥 AAV (ssAAV) 또는 자기-상보적 AAV (scAAV)이다.
- [0015] 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질 변이체는 이들이 유래되는 야생형 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV2 캡시드 단백질 변이체는 야생형 AAV2 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과 증가시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질 변이체는 야생형 AAV3b 캡시드 단백질과 비교하여 rAAV 패키징 효율을 적어도 1배, 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 또는 그 초과 증가시킬 수 있다.
- [0016] 일부 측면에서, 본 개시내용은 하기를 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스를 제공한다: (i) rAAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV8 캡시드 단백질, AAV2 캡시드 단백질 및/또는 AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질의 변이체인 rAAV 캡시드 단백질; 및 (ii) 5'에서 3' 순서로: (a) 5' AAV ITR; (b) CMV 인핸서; (c) CBA 프로모터; (d) 닭 베타-액틴 인트론; (e) 코작 서열; (f) 항-VEGF 작용제를 코딩하는 트랜스진으로서, 여기서 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 1에서의 핵산 서열에 의해 코딩되는 것인 트랜스진; (g) 토끼 베타-글로빈 폴리A 신호 꼬리; 및 (h) 3' AAV ITR을 포함하는 핵산을 포함하는 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터.
- [0017] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 숙주 세포를 제공한다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 또는 곤충 세포이다.
- [0018] 일부 측면에서, 본 개시내용은 본원에 기재된 바와 같은 rAAV를 포함하는 제약 조성물을 제공한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 제약 조성물은 유리체 내 주사, 정맥내 주사, 종양내 주사, 또는 근육내 주사를 위해 제제화된다.
- [0019] 일부 측면에서, 본 개시내용은 VEGF 또는 PlGF 활성의 억제에 필요로 하는 대상체에서 VEGF 또는 PlGF 활성을 억제하는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0020] 일부 측면에서, 본 개시내용은 항-VEGF 작용제의 전달을 필요로 하는 대상체에서 항-VEGF 작용제를 전달하는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.
- [0021] 일부 측면에서, 본 개시내용은 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF 연관 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF 연관 질환을 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다.

다.

- [0022] 일부 측면에서, 본 개시내용은 VEGF 활성의 억제를 필요로 하는 대상체에서 VEGF 활성을 억제하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물로서, 여기서 rAAV는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV 2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체 변이체) 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 것인 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0023] 일부 측면에서, 본 개시내용은 항-VEGF 작용제의 전달을 필요로 하는 대상체에서 항-VEGF 작용제를 전달하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물로서, 여기서 rAAV는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV 2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체 변이체) 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 것인 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0024] 일부 측면에서, 본 개시내용은 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF-연관 질환의 치료를 필요로 하는 대상체에서 신생혈관화 연관 질환, 혈관신생 연관 질환, 또는 VEGF-연관 질환을 치료하는데 있어서의 용도를 위한 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물로서, 여기서 rAAV는 아데노-연관 바이러스 (AAV) 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV 2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체 변이체) 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산을 포함하는 것인 rAAV, 또는 rAAV를 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0025] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제의 전달은 VEGF 활성의 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 90%, 또는 100% 억제를 발생시킨다.
- [0026] 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 일부 실시양태에서, 비-인간 포유동물은 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니 피그, 햄스터, 닭, 칠면조, 또는 비-인간 영장류이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0027] 일부 실시양태에서, 대상체는 혈관신생 연관 질환 또는 VEGF 연관 질환을 갖거나 가질 것으로 의심된다. 일부 실시양태에서, VEGF 연관 질환은 중양, 암, 망막병증, 습성 연령-관련 황반 변성 (wAMD), 황반 부종, 맥락막 신생혈관화, 또는 각막 신생혈관화이다.
- [0028] 일부 실시양태에서, 투여는 전신 투여이며, 임의로 여기서 투여는 정맥내 주사이다. 일부 실시양태에서, 투여는 안구 조직에의 직접 투여이며, 임의로 여기서 직접 투여는 유리체내 주사, 안구내 주사 또는 국소 투여이다.
- [0029] 일부 실시양태에서, 투여는 안구 조직에의 트랜스진의 전달을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 안구 조직은 안구 뉴런, 망막, 공막, 맥락막, 망막, 유리체, 황반, 중심와, 시신경 유두, 수정체, 동공, 홍채, 방수, 각막, 결막 섬모체, 또는 시신경을 포함한다.
- [0030] 일부 실시양태에서, 투여는 투여 후 적어도 5일, 10일, 15일, 20일, 1개월, 2개월, 또는 그 초과 동안 대상체에서 VEGF의 억제를 발생시킨다.
- [0031] 일부 측면에서, 본 개시내용은 각막 신생혈관화 (CNV)의 치료를 필요로 하는 대상체에서 CNV를 치료하는 방법으로서, 본원에 기재된 rAAV 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 AAV8 캡시드 단백질을 포함한다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 각막 신생혈관화 (CNV)의 감소를 필요로 하는 대상체에서 CNV를 감소시키는 (예를 들어, 비치료된 대상체, 또는 투여 전의 대상체에서에 비해 CNV를 감소시키는) 방법으로서, 본원에 기재된 rAAV 또는 제약 조성물의 유효량을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법을 제공한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 AAV8 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0032] 일부 실시양태에서, 투여는 각막 세포에서 항-VEGF 작용제의 전달을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 투여는 각막의 각막세포에서 항-VEGF 작용제의 전달을 발생시킨다.
- [0033] 일부 실시양태에서, rAAV는 1회 투여된다. 일부 실시양태에서, 투여는 3개월, 6개월, 1년 초과, 또는 그 초과 동안 각막 세포에서 항-VEGF 작용제의 발현을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 투여는 투여 후 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 1년 또는 그 초과 동안 대상체에서 VEGF (예를 들어, VEGF 발현 또는 활성)의 억제를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 투여는 기질내 주사이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 각막 신생혈관화는 급성 각막 신생혈관화 또는 만성 각막 신생혈관화이다.

**도면의 간단한 설명**

- [0034] 도 1a-1c는 rAAV-CBA-KH902 벡터 및 서열을 제시한다. 발현된 rAAV 벡터는 분비된 KH902 (콘베르셉트)를 발현하고, CMV 인핸서 및 닭 β-액틴 프로모터 (CBA) 카세트에 의해 유도된다. 코작 서열을 또한 시작 코돈의 5'에

서 디자인하여 번역 개시를 증진시켰다. 플라스미드의 지도 도해 (도 1a) 및 판독 가닥 서열 (도 1b, 서열식별 번호: 3)이 제시된다. 5'-ITR 및 3'-ITR을 포함하고 그에 의해 포괄되는 서열은 AAV 비리온 내로 패키징된다 (도 1c).

도 2는 AAV-KH902-감염된 RPE-컨디셔닝된 배지의 웨스턴 블롯 분석을 제시한다. 상기 각각의 레인으로 표시된 지정된 조건에 대한 15  $\mu$ l의 ARPE-19- (좌측) 또는 hTERT-RPE1- (우측) 컨디셔닝된 배지를 PAGE로 처리하였다. 반-건조 전달 후, 막을 항-VEGFR1 항체 (알앤디 시스템스(R&D Systems) BAF321)로 블롯팅으로 처리하였다. 20 ng의 KH902 약물 (마지막 레인)은 각각의 블롯에 대한 참조물로서 포함되었다.

도 3a-3c는 AAV-KH902 벡터의 시험관내 기능적 입증을 제시한다. KH902; 또는 AAV2-KH902 또는 대조군 GFP 벡터로 감염된 RPE 세포의 컨디셔닝된 배지 (1:10 희석됨)의 존재 하에서, VEGF-자극된 (25 ng/mL) HUVEC의 혈관 신생 또는 증식 능력. 항-VEGF 활성을 각각 관 형성 검정 (도 3a 및 3b)에 의해 또는 CCK-8 활성 (도 3c)에 의해 정량화하였다. \*,  $p < 0.01$ ; \*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*,  $p < 0.0001$ .

도 4는 유리체내 rAAV2-KH902 주사가 정상적인 망막 혈관 발달을 방지함을 제시한다. 신생아 마우스 새끼 (P0-P3)를 rAAV2-KH902로 유리체내 투여에 의해 주사하였다. 마우스를 정상산소 조건 (~21% O<sub>2</sub>)에서 키우고, >P18에서 희생시켰다. 망막을 마운팅하고, PECAM 항체 (내피 세포), 또는 DAPI (DNA) 및 PNA (광수용체)로 염색하고, 신경절 세포 층 (상부 패널) 또는 광수용체 층 (하부 패널)으로부터 영상화하였다.

도 5a-5c는 유리체내 rAAV2-KH902 주사가 미숙아 망막병증에서 망막 부종을 방지함을 제시한다. 신생아 마우스 (P0-P3)를 rAAV2-KH902로 주사하고, 정상산소 조건 (~21% O<sub>2</sub>)에서 대략 4일 동안 키우고, 이어서 산소과잉 조건 (75% O<sub>2</sub>)으로 대략 1주 동안 처리하였다. P12-P18에서, 마우스를 정상산소 조건으로 6일 동안 되돌리고, 희생시켰다. (도 5a) 망막을 마운팅하고, 항-이소렉틴 B4 (혈관 염색) 및 항-PECAM 항체 (내피 세포)로 염색하였다. 각각의 처리 그룹 (n=6)을 분석하고, 부종의 발생 (도 5b) 및 낭종의 수 (도 5c)에 대해 도표화하였다.

도 6a-6b는 산소-유도된 망막병증 마우스 모델에서 rAAV2-KH902의 평가를 제시한다. 도 6a는 rAAV2-EGFP (좌측 칼럼) 및 5:1 비 혼합물로의 rAAV2-KH902:rAAV2-EGFP (우측 칼럼)로 주사되고, 절개 직후 영상화된 눈의 명시야 영상을 제시한다. 동일한 열에서의 눈은 동일한 동물로부터의 것이고, 따라서, rAAV2-Egfp 주사된 눈은 개별적 동물 내의 병리증상 유도의 정도에 대한 대조군으로서 역할을 한다. 도 6b는 대표적인 마우스로부터의 눈의 형광 영상화를 이어서 플랫-마운팅하고, 이소렉틴-B4에 대해 염색하였음을 제시한다. 양성 형질도입의 영역은 EGFP 발현에 의해 표시된다. rAAV2-KH902는 정상적인 혈관 발달 및 동맥류 결절을 감소시키며; 즉, 강한 EGFP 발현은 감소된 망막 혈관구조를 갖는다. 동맥류 결절의 예는 하부 패널 (화살표)에 지시된다.

도 7a-7b는 산소-유도된 망막병증 마우스 모델에서의 rAAV8-KH902의 평가를 제시한다. 도 7a는 rAAV8-EGFP (좌측 칼럼) 및 5:1 비 혼합물로의 rAAV8-KH902:rAAV8-EGFP (우측 칼럼)로 주사되고, 절개 직후 영상화된 눈의 명시야 영상을 제시한다. 동일한 열에서의 눈은 동일한 동물로부터의 것이고, 따라서, rAAV8-Egfp 주사된 눈은 개별적 동물 내의 병리증상 유도의 정도에 대한 대조군으로서 역할을 한다. 도 7b는 대표적인 마우스로부터의 눈의 형광 영상화를 이어서 플랫-마운팅하고, 이소렉틴-B4에 대해 염색하였음을 제시한다. 양성 형질도입의 영역은 EGFP 발현에 의해 표시된다. rAAV8-KH902는 정상적인 혈관 발달을 감소시키지 않으며, 단지 동맥류 결절의 형성에 중간 정도로 영향을 미친다.

도 8은 병리증상을 갖는 rAAV 처리된 눈의 백분율을 제시한다. 도 6a-6b 및 7a-7b에서의 마우스 눈을 부종 또는 구체에 대해 점수화하였다. 실험 그룹: rAAV2, n=10; rAAV8, n=10.

도 9a-9b는 AAV2 및 AAV2/3-혼성체 캡시드 변이체 및 EGFP를 코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV로 주사된 마우스 눈의 검안경검사를 제시한다. CB6-EGFP를 패키징하는 8개의 AAV2 변이체 (v224, v326, v358, v46, v56, v66, v67, 및 v81) 및 7개의 AAV2/3 혼성체 변이체 (v439, v453, v513, v551, v556, v562, 및 v598) 유리체내 투여를 통해 주사하였다. 대표적인 눈을 주사 후 2주 (도 9a) 및 4주 (도 9b)에서 영상화하였다. 3개의 캡시드 v56, v224, v326 (별표에 의해 표시됨)을 선택하여 KH902를 패키징하였다. 평가된 눈의 수 (EGFP-양성 눈의 수 / 모든 눈의 수)는 각각의 현미경사진의 하부 우측 코너에 언급된다.

도 10은 rAAV.v224에 의해 패키징된 벡터화된 KH902로의 레이저 손상-유도된 CNV의 처리를 제시한다. 마우스 눈을 레이저 손상으로 처리하여 맥락막 신생혈관 (CNV) 사건을 유도하였다. 손상 후 5일에, 유리체내 rAAV 주사를 수행하였다. GFP 및 v224-KH902를 코딩하는 대조군 캡시드 후의 잔류 CNV의 종적 분석을 수행하였다. rAAV v224-KH902는 레이저 손상 후 CNV에 대한 수를 손상 후 20일에 80 퍼센트 미만으로 감소시킬 수 있다. 테

이터는 90% 신뢰도에서의 평균±ME를 나타낸다.

도 11은 rAAV v224-KH902가 눈에서의 혈관구조 내로의 면역 세포 침윤과 연관된 눈에서의 병변을 유발하지 않음을 제시한다.

도 12는 조-용해물 PCR을 통한 시험관내 패키징 수율 평가를 제시한다. AAV2 변이체 (상부 패널), AAV2/3 변이체 (중간 패널), 및 AAV8 변이체 (하부 패널)에 대한 상대 패키징 수율을 제시하는 폭포 플롯. 각각의 캡시드에 대한 패키징 수율 값은 그들의 원형적 형태: 각각 AAV2, AAV3b, 및 AAV8에 의해 부여된 수율의 백분율로서 표현된다. 캡시드 변이체 v56은 AAV2에 비해 9.42배 증가를 나타내었고; v224는 AAV2에 비해 8.96배 증가를 나타내었고, v326은 AAV2에 비해 9.79배 증가를 나타내었다. 제시된 캡시드의 총 수는 x-축 상에 제시된다. AAV2/3 혼성체 변이체는 또한 AAV3b에 비해 2 내지 8배 증가를 나타내었다.

도 13a-13f는 rAAV8-eGFP로의 기질내 및 결막하 주사 사이의 각막 형질도입의 비교를 제시한다. 도 13a-13c는 마우스 각막의 기질내 주사를 제시한다. 도 13d-13f는 결막하 주사를 제시한다. 도 13b 및 13e는 eGFP 신호가 rAAV8 (각막당 4  $\mu$ l 중  $1.6 \times 10^{10}$  GC)로의 기질내 주사 후 2주에서의 라이브 동물 영상화에 의해 검출되었음을 제시한다. 점선 원은 마우스 각막의 연부를 나타낸다. 도 13c, 13f는 각각 도 13b 및 13e로부터의 대표적인 횡단면에서의 eGFP 발현의 형광 현미경검사를 제시한다. 화살표는 주사의 부위를 확정한다. GC: 게놈 카피.

도 14a-14c는 rAAV2- 및 rAAV8-매개 KH902 발현 동역학 및 세포 향성을 제시한다. 도 14a는 rAAV2- 및 rAAV8-매개 eGFP 발현이 기질내 주사 후 3개월 (12주)까지, 상이한 시점에서 라이브 영상화 현미경검사에 의해 동일한 강도로 검출되었음을 제시한다. 점선 원은 마우스 각막의 연부를 나타낸다. 도 14b는 rAAV8 및 rAAV2 벡터-처리된 마우스 각막에서의 상대 KH902 mRNA 발현을 제시한다 ( $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ ). 데이터는 평균±SEM 으로서 제시된다, n=3. 도 14c는 rAAV2 및 rAAV8로의 각막 섹션에서의 세포 특이성의 조직학적 분석을 제시한다. (i, ii) rAAV2- 및 rAAV8-매개 eGFP 발현으로의 기질내 주사 후 2주에서의 마우스 각막의 항-비멘틴 염색. 비멘틴 표지된 각막세포로 공동-국재화된 각막 기질에서의 eGFP 신호. (iii, v) 각각 rAAV8 또는 PBS로 기질내로 처리된 각막의 섹션에서의 항-인간 IgG (H+L) 표지화 KH902 단백질. (iv) 항-비멘틴 공동-염색 (적색)으로 공동-염색된 패널 iii에서의 파선-박스 영역의 보다 높은 배율. 배율 a, b 및 d: 400X. 스케일 바, 25  $\mu$ m. 배율 c: 200X. 스케일 바, 500  $\mu$ m. Epi: 상피 층; Endo: 내피 층. 모든 상기 실험에 대한 각각의 rAAV 벡터의 용량은 각막당 4  $\mu$ l PBS 중  $1.6 \times 10^{10}$  GC였다.

도 15a-15d는 중심 각막 두께 (CCT)의 측정 및 rAAV2 및 rAAV8 벡터에 대한 면역 반응을 제시한다. 도 15a는 각막당 4  $\mu$ l 중  $1.6 \times 10^{10}$  GC의 용량으로 PBS, rAAV2-KH902 및 rAAV8-eGFP/KH902의 주사 전, 주사 직후, 및 주사 후 제1주, 제2주 및 제12주에서의 각막의 OCT 영상을 제시한다. 도 15b는 도 15a 영상으로부터 측정된 중심 각막 두께의 정량적 분석을 제시한다. 도 15c는 단핵구/대식세포 (CD11b, F4/80, 적색)에 대한 면역형광 염색으로의 고- ( $1.6 \times 10^{10}$  GC/각막) 및 저-용량 ( $8 \times 10^8$  GC/각막) rAAV2- 또는 rAAV8-eGFP/KH902에 대한 각막 면역 반응의 분석을 제시한다. 배율: 200X. 스케일 바, 50  $\mu$ m. 도 15d는 도 15c 데이터로부터의 지시된 그룹에서의 CD11b+ 세포 및 F4/80+ 세포의 계산된 백분율을 제시한다.  $***, p<0.001$ ;  $****, p<0.0001$ . 데이터는 평균±SEM 으로서 제시된다, n=5.

도 16a-16e는 알칼리 화상-유도된 CoNV 모델에서의 단일 용량으로의 기질내 전달을 통한 rAAV8-KH902에 의한 CoNV의 장기 억제를 제시한다. 도 16a는 제5일 및 제10일, 및 제2주, 제3주, 제4주, 제8주, 및 제12주에서 PBS, rAAV8-eGFP, 콘베르셉트 (10mg/ml, 4  $\mu$ l), 콘베르셉트 (10mg/ml, 4  $\mu$ l)와 조합된 rAAV2-KH902, rAAV8-KH902 및 rAAV8-KH902로 주사된 알칼리-처리된 각막의 대표적인 CoNV 영상을 제시한다. 도 16b-16c는 패널 도 16a 데이터로부터의 각각의 조건에서의 CoNV 면적 정량화의 히스토그램을 제시한다. †: PBS 그룹으로부터의 유의한 차이; \*: rAAV8-eGFP 또는 KH902 그룹으로부터의 유의한 차이; #: rAAV2-KH902 그룹으로부터의 유의한 차이; †, \* 및 #  $p<0.05$ ; ††, \*\* 및 ##,  $p<0.01$ ; †††, \*\*\* 및 ###,  $p<0.001$ ; ††††, \*\*\*\* 및 ####,  $p<0.0001$ . 데이터는 평균±SEM 으로서 제시된다, n = 5-7. 도 16d는 마우스 각막 플랫폼 마운트의 면역형광 분석을 제시한다. 알칼리 화상 후 12주에 수거된 도 16a의 각각의 조건에서의 각막을 이중 염색하였고, CD31<sup>+++</sup>/LYVE-1-에 의해 커버된 영역은 혈관을 지칭하고, CD31<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+++</sup>는 림프관을 지칭한다 (+++는 강한 양성; ++는 중간 양성; 및 +는 경도 양성을 지시함). 배율, 100X. 스케일 바, 50  $\mu$ m. 도 16e는 도 16d 데이터의 각각의 조건에서 각각 CD31<sup>+++</sup> 및 LYVE-1<sup>+++</sup> 염색에 의해 커버된 면적을 측정함으로써 각막 혈관신생 및 림프관신생 분석을 제시한다. \*: PBS 그룹으로부터의 유의한 차이; ∙: rAAV8-eGFP 그룹으로부터의 유의한 차이;

#: KH902 그룹으로부터의 유의한 차이; †: rAAV2-KH902 그룹으로부터의 유의한 차이. ###,  $p < 0.001$ ; ††††, \*\*\*\*, . . . ., ##### 및 †††††,  $p < 0.0001$ . 데이터는 평균±SEM으로서 제시된다,  $n = 4$ . 상기 실험에 대한 각각의 rAAV 벡터의 용량은 각막당 4  $\mu$ l PBS 또는 콘베르셉트 용액 중  $8 \times 10^8$  GC였다.

도 17a-17f는 알칼리 화상-유도된 CoNV 모델에서의 rAAV8-전달된 KH902 하향조절된 D114/Notch 신호전달 및 ERK 활성화를 제시한다. 도 17a는 PBS, rAAV8-eGFP 및 rAAV8-KH902 ( $8 \times 10^8$  GC/각막) 처리된 각막에서의 알칼리 화상 후 2주에서 CD31로 공동-염색된 마우스 각막 플랫 마운트에서의 D114 발현의 면역형광 분석을 제시한다. 배율: 200X. 스케일 바, 100  $\mu$ m. 도 17b, 17c, 17d는 각각의 지시된 처리 그룹에서의 알칼리 화상 후 2주에서의 마우스 각막에서의 D114 및 NICD 발현의 반-정량적 분석으로의 웨스턴 블롯을 제시한다. 도 17e, 17f는 ERK 활성화의 반-정량적 분석으로의 웨스턴 블롯을 제시한다. 결과는 알칼리 화상 후 8일에서의 지시된 처리 그룹에서의 인산화된 ERK (pERK) 대 총 ERK의 비 (pERK/ERK)로서 제시된다. \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ .

도 18a-18c는 알칼리-화상 손상 모델에서의 기존의 CoNV의 rAAV8-KH902 방지된 진행을 제시한다. 도 18a는 마우스 각막을 알칼리 화상 후 제10일 (기준선)에서 PBS, rAAV8-eGFP 및 rAAV8-KH902 (각막당 4  $\mu$ l 중  $8 \times 10^8$  GC)의 기질내 주사로 수행하였음을 제시한다. 4주에 걸쳐 매주 관찰된 CoNV의 대표적인 영상이 제시된다. 도 18b는 도 18a에 제시된 각각의 그룹에서의 매주 CoNV 면적의 정량화 분석을 제시한다. 별표는 관찰의 종료 시점 (제4주) 및 상응하는 기준선 사이의 유의한 차이를 지시한다 (\*\* $p < 0.01$ ). 데이터는 평균±SEM으로서 제시된다,  $n=5$ . 도 18c는 4주 동안 도 18a의 실험 그룹 사이의 정량화된 CoNV 면적에 의한 매주 병렬 비교를 제시한다. (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ). 데이터는 평균±SEM으로서 제시된다,  $n=5$ .

도 19a-19c는 봉합선-유도된 CoNV 모델에서의 기존의 신생혈관화의 rAAV8-KH902 방지된 진행을 제시한다. 도 19a는 5-일 봉합선 정치 (기준선)로 처리된 마우스 각막을 PBS, rAAV8-eGFP 및 rAAV8-KH902 (각막당 4  $\mu$ l 중  $8 \times 10^8$  GC)의 기질내 주사로 처리하였음을 제시한다. CoNV의 매주 대표적인 영상은 4-주 추적적으로 제시된다. 도 19b는 4주 동안 도 19a로부터의 실험 그룹을 비교하는 CoNV 면적의 정량화 분석을 제시한다. (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ). 데이터는 평균±SEM으로서 제시된다,  $n=4-7$ . 도 19c는 도 19a 데이터로부터의 각각의 그룹에서의 매주 CoNV 면적의 정량화 분석을 제시한다. 별표는 종료 시점 (제4주) 및 기준선 사이의 유의한 차이를 지시한다 (\*\*\*\* $p < 0.0001$ ).

도 20a-20c는 rAAV2 벡터-전달된 eGFP로의 기질내 주사 및 결막하 주사의 각막 형질도입을 제시한다. 도 20a는 rAAV2 벡터 ( $1.6 \times 10^{10}$  GC/각막)의 기질내 주사 후 2주에서 형광 현미경검사에 의해 검출된 마우스 각막 섹션에서의 eGFP 발현의 대표적인 영상을 제시한다. 도 20b, 20c는 각각 rAAV2로의 기질내 또는 결막하 주사 후 2주에서의 라이브 동물 영상화에 의해 검출된 eGFP 신호의 대표적인 영상을 제시한다. 점선 원은 영상화 현미경 하에서의 마우스 각막의 연부를 나타낸다.

도 21a-21b는 기질내 주사를 통해 각막에서 rAAV2 벡터에 의해 매개된 KH902 발현의 조직학적 분석을 제시한다. 도 21a는 항-인간 IgG (HHL) 항체에 의해 표시된 KH902 발현의 대표적인 안구 영상을 제시한다. 배율: 200X. 스케일 바, 500  $\mu$ m. 도 21b는 항-비멘틴 공동-염색으로의 도 21a에서의 박스표시된 영역의 보다 높은 배율을 제시하며, 이는 KH902의 발현이 각막 기질 층에 주로 분포되었음을 지시한다. 배율: 400X. 스케일 바, 100  $\mu$ m. rAAV2 벡터의 용량은 각막당 4  $\mu$ l PBS 중  $1.6 \times 10^{10}$  GC였다.

도 22a-22c는 KH902-코딩 rAAV로 주사된 비-인간 영장류 (NHP)의 안저 촬영술 및 형광 혈관촬영술 (FP 및 FFA)과 관련된 대표적인 데이터를 제시한다. 도 22a는 KH902-코딩 rAAV의 주사가 대조군 주사에 비해 등급 IV CNV 병변을 감소시킴을 지시하는 대표적인 데이터를 제시하며; 콘베르셉트는 양성 처리 대조군으로서 사용되었다. 도 22b는 KH902-코딩 rAAV의 주사가 대조군 주사에 비해 플루오레세인 누출 면적을 감소시킴을 지시하는 대표적인 데이터를 제시하며; 콘베르셉트는 양성 처리 대조군으로서 사용되었다. 도 22c는 FFA에 의해 관찰된 바와 같은 투여 후 제29일에 광점의 퇴행을 지시하는 대표적인 데이터를 제시한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035]

본 개시내용의 측면은 세포 또는 대상체에서 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 발현하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다. 본 개시내용은, 부분적으로, 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV2/3 캡시드 단백질, AAV8 캡시드 단백질 등) 및 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 항-VEGF 작용제를 코딩하는 핵산을 포함하는 rAAV 벡터를 포함하는 rAAV에 기반한다. 일부 실시양태에서, 핵산은 프로모터, 예컨대

CMV 프로모터 또는 닭 베타-액틴 (CBA) 프로모터를 포함한다.

- [0036] 일부 측면에서, 본원에 개시된 rAAV는 AAV 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 핵산 서열 항-혈관 내피 성장 인자 (예를 들어, 항-VEGF) 작용제를 포함하는 트랜스진 발현 카세트를 코딩하는 단리된 핵산을 함유하는 AAV 캡시드 (예를 들어, AAV2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체 변이체 캡시드 단백질)를 포함한다. 본 개시내용은, 부분적으로, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, VEGF 수용체 융합 단백질, 예컨대 KH902)를 코딩하는 트랜스진 또는 그의 변이체를 발현하도록 조작된 rAAV에 기반한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 조성물 (예를 들어, rAAV)은 눈과 연관된 질환, 예를 들어 각막 혈관화를 치료하는데 유용하다.
- [0037] *제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)*
- [0038] 일부 측면에서, 본 개시내용은 단리된 아데노-연관 바이러스 (AAV)를 제공한다. AAV에 관하여 본원에 사용된 용어 "단리된"은 인공적으로 생산되거나 수득된 AAV를 지칭한다. 단리된 AAV는 제조합 방법을 사용하여 생산될 수 있다. 이러한 AAV는 본원에서 "제조합 AAV"로 지칭된다. 제조합 AAV (rAAV)는 바람직하게는 조직-특이적 표적화 능력을 갖고, 그에 따라 rAAV의 트랜스진은 하나 이상의 미리 결정된 조직(들) (예를 들어, 안구 조직)에 특이적으로 전달될 것이다. AAV 캡시드는 이들 조직-특이적 표적화 능력 (예를 들어, 조직 향성)을 결정하는데 있어서 중요한 요소이다. 따라서, 표적화되는 조직에 적절한 캡시드를 갖는 rAAV가 선택될 수 있다.
- [0039] 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 하기를 포함하는 제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)에 관한 것이다: (i) AAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체의 것인 AAV 캡시드 단백질, 및 (ii) 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산으로서, 여기서 트랜스진은 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 것인 단리된 핵산. 본 개시내용은, 적어도 부분적으로, 또한 하기를 포함하는 제조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV)에 관한 것이다: (i) AAV 캡시드 단백질로서, 여기서 캡시드 단백질은 AAV8 혈청형의 것인 AAV 캡시드 단백질, 및 (ii) 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 작용제를 코딩하는 트랜스진을 포함하는 단리된 핵산으로서, 여기서 트랜스진은 역위 말단 반복부 (ITR)에 의해 플랭킹된 것인 단리된 핵산.
- [0040] 목적하는 캡시드 단백질을 갖는 제조합 AAV를 수득하는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. (예를 들어, 그의 내용이 그 전문이 본원에 참조로 포함되는 US 2003/0138772 참조). 전형적으로 방법은 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열; 기능적 rep 유전자; AAV 역위 말단 반복부 (ITR) 및 트랜스진으로 구성된 제조합 AAV 벡터; 및 AAV 캡시드 단백질 내로의 제조합 AAV 벡터의 패키징을 허용하는 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양하는 것을 수반한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV의 cap 유전자에 의해 코딩되는 구조적 단백질이다. AAV는 3개의 캡시드 단백질, 즉, 비리온 단백질 1 내지 3 (VP1, VP2 및 VP3으로 명명됨)을 포함하며, 이들 모두는 선택적 스플라이싱을 통해 단일 cap 유전자로부터 전사된다. 일부 실시양태에서, VP1, VP2 및 VP3의 분자량은 각각 약 87 kDa, 약 72 kDa 및 약 62 kDa이다. 일부 실시양태에서, 번역시, 캡시드 단백질은 바이러스 계놈 주위에 구형 60-mer 단백질 쉘을 형성한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질의 기능은 바이러스 계놈을 보호하고, 계놈을 전달하고, 숙주와 상호작용하는 것이다. 일부 측면에서, 캡시드 단백질은 바이러스 계놈을 조직 특이적 방식으로 숙주에 전달한다.
- [0041] 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 안구 조직 또는 근육 조직에 대한 향성을 갖는다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 안구 세포 유형 (예를 들어, 광수용체 세포, 망막 세포 등)을 표적화한다.
- [0042] 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV9.hr, AAVrh8, AAVrh10, AAVrh39, AAVrh43, AAV.PHP, 및 상기 중 임의의 것의 변이체로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 혈청형의 것이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드 단백질은 비-인간 영장류로부터 유래된 혈청형, 예를 들어 AAVrh8 혈청형의 것이다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 AAV 혈청형 6 (예를 들어, AAV6 캡시드 단백질), AAV 혈청형 8 (예를 들어, AAV8 캡시드 단백질), AAV 혈청형 2 (예를 들어, AAV2 캡시드 단백질), AAV 혈청형 5 (예를 들어, AAV5 캡시드 단백질), 또는 AAV 혈청형 9 (예를 들어, AAV9 캡시드 단백질)의 것이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV1이다. 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV2이다. 일부 실시양태에서, 목적하는 조직 향성을 갖는 AAV 캡시드 단백질은 포유동물 (예를 들어, 대상체의 조직)로부터 단리된 AAV 캡시드 단백질로부터 선택될 수 있다. (예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 W02010138263A2 및 W02018071831 참조). 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 AAV8이다.
- [0043] 일부 실시양태에서, AAV 캡시드는 공지된 AAV 캡시드 단백질의 변이체, 또는 동족체이다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질 변이체 및 KH902의 조합은 KH902를 전달하기 위한 이전에 기재된 캡시드보다 rAAV 기반 요법에서

이익 (예를 들어, 보다 양호한 패키징 효율, VEGF의 효과적인 억제, 또는 KH902의 과발현과 연관된 보다 적은 독성)을 제공한다. 캡시드 변이체는 전형적으로 그것이 유래되는 야생형 캡시드 (또는 캡시드들)에 비해 적어도 하나의 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 캡시드 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체) 등)에 비해 약 1 내지 약 100개의 아미노산 (예를 들어, 1-10개의 아미노산, 1-20개의 아미노산, 1-30개의 아미노산, 20-50개의 아미노산, 20-60개의 아미노산, 50-80개의 아미노산, 50-100개의 아미노산, 60-100개의 아미노산 등) 1-치환, 삽입, 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 캡시드 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체) 등)에 비해 100개 초과인 아미노산 (예를 들어, 100-200개의 아미노산, 200-300개의 아미노산, 100-500개의 아미노산, 500-1000개의 아미노산 또는 그 초과) 치환, 삽입, 또는 결실을 포함한다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체) 등)에 비해 약 5 내지 약 50개의 아미노산 (예를 들어, 5-10개의 아미노산, 5-20개의 아미노산, 5-30개의 아미노산, 5-40개의 아미노산, 10-20개의 아미노산, 10-30개의 아미노산, 10-40개의 아미노산, 10-50개의 아미노산, 또는 30-50개의 아미노산) 치환, 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체))에 비해 약 10 내지 약 30개의 아미노산 (예를 들어, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 또는 30개) 치환, 삽입 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 혈청형 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체))에 비해 1, 또는 2, 또는 3, 또는 4, 5, 또는 6, 또는 7, 또는 8, 또는 9, 또는 10, 또는 11, 또는 12, 또는 13, 또는 14, 또는 15, 또는 16, 또는 17, 또는 18, 또는 19, 또는 20개의 아미노산 치환, 삽입, 또는 결실을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, AAV 변이체는 공지된 AAV 캡시드 (예를 들어, AAV 혈청형 2, 또는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체) 등)에 비해 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0044] 일부 실시양태에서, 캡시드 변이체는 키메라 캡시드 변이체일 수 있다. 키메라 캡시드 변이체 서열은 2개 이상의 AAV 캡시드 혈청형 또는 그의 변이체의 부분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 키메라 캡시드는 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과인 상이한 캡시드 단백질 혈청형의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 키메라 캡시드 단백질은 이들이 유래되는 AAV 캡시드 단백질과는 상이한 특성, 예컨대 조직 형성 등을 갖는다. 단편은 임의의 적절한 방법, 예를 들어 재조합 DNA 클로닝에 의해 혼입될 수 있다.

[0045] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 변이체는 AAV2, AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체) 또는 AAV8의 변이체이다. AAV2는 안구 조직 (예를 들어, 광수용체 세포 및 망막 색소 상피 (RPE)), 인간 중추 신경계 (CNS) 조직, 신장 조직, 및 다른 조직)을 효율적으로 형질도입하는 것으로 관찰되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 캡시드는 AAV2 변이체이다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV2 변이체는 유전자 요법을 안구 조직 (예를 들어, 망막)에 전달하는데 유용할 수 있다. AAV3은 암성 인간 간세포를 효율적으로 형질도입하는 것으로 관찰되었다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 변이체는 AAV2/3 (예를 들어, AAV2/3 혼성체)이다.

[0046] 일부 실시양태에서, 캡시드 변이체 (예를 들어, AAV2 변이체, AAV 2/3 변이체, 또는 AAV8 변이체)는 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 W02018071831에 기재된 바와 같은 임의의 캡시드 변이체이다. 일부 실시양태에서, AAV2 변이체는 v224, v326, v358, v46, v56, v66, v67, 또는 v81이다. 일부 실시양태에서, the AAV2 변이체는 v224이다. 일부 실시양태에서, AAV2 변이체는 v326이다. 일부 실시양태에서 AAV2 변이체는 v56이다. 일부 실시양태에서, AAV2/3 혼성체는 v439, v453, v513, v551, v556, v562, 또는 v598이다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 야생형 AAV2/3 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 야생형 AAV8 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 야생형 AAV2의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 11에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPPKPAERHKDDSRGLVLPYKYLGPFNGLDKGEF  
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
LGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDS SSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNS SGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
KEVTQNDGTTTT IANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRT  
NTPSGTTTQSRQLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNNSEYSWTGATKYHLNG  
RDSLVPNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLI FGKQDSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQY  
GSVSTNLQSGNRQAATADVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
HPPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY  
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0047]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 12에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v224 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v224의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 12에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPPKPAERHKDDSRGLVLPYKYLGPFNGLDKGEF  
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLARAVFAQKRVLEP  
LGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPAEPDS SSGTGKSGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
AAPSGLGTNTMASGAPMADNNEGADGVGNS SGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
KEVTQNDGTTTT IANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRT  
NTPSGTTTQSRRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNNSDYSWTGATKYHLNG  
RDSLVPNPGTAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSEKTNVDIERVMITDEEEIRTNPVATEQY  
GSVSTNLQSGNTQAATS DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
HPPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY  
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0049]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 13에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v326 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v326의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 13에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPPKPAERHKDDSRGLVLPYKYLGPFNGLDKGEF  
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
LGLVEEPVKTA PGKKRPVEHSPVEPDS SSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNS SGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQV  
KEVTQNDGTTTT IANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT  
NAPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNNSDYSWTGATKYHLNG  
RDSLVPNPGPAMANHKKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQY  
GSVSTNLQSGNTQAATS DVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
HPPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY  
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0051]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 14에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v56 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v56의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 14에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPPKPAERHQDDSRGLVLPYKYLGPFNGLDKGEF  
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
LGLVEEPVKTA PGKKRPVEHFFPAEPDS SSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNS SGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFS PRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
KEVTQNDGTTTT IANNLSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT  
NAPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTADNNNSDYSWTGATKYHLNG  
RDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSEKTNVDIEKVMITDEEEIRTNPVATEQY  
GSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP IWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
HPPPQILIKNTFPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVIEIWEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY  
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0053]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 15에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v358 아미노산 서열의

아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v358의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 15에 제시된다:

```
MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEP
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLYKNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP
LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVESDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPP
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSRTWALPTYNNHL
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLSFKLFNIQV
KEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT
NAPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNG
RDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQSGKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQY
GSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
HPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
```

[0055]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 16에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v46 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v46의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 16에 제시된다:

```
MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEP
VSEADVAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLYKNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP
LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPP
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSRTWALPTYNNHL
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV
KEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT
NAPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNG
RDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQY
GSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
HPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
```

[0057]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 17에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v66 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v66의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 17에 제시된다:

```
MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEP
VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLYKNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP
LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPDQPLGQPP
AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMGDRVITTSRTWALPTYNNHL
YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV
KEVTQNDGTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS
QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYYLSKT
NAPSGTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNG
RDSLVPNPGPAMASHKDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKTNVDIEKVMITDEEEIRTTNPVATEQY
GSVSTNLQSGNTQAATSDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLQGP I WAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK
HPPQILIKNTVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNY
NKSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL
```

[0059]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 18에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v67 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v67의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 18에 제시된다:

[0060]

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADVAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
 AAPSGLGTNTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT  
 NAPSGTTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKTNVDIEKVMITDEEE IRTTNPVATEQY  
 GSVSTNLQSGNTQAATTDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
 HPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0061]

[0062]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 19에 제시된 바와 같은 AAV2 변이체 v81 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v81의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 19에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPLKPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
 AAPSGLGTNTMAAGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSTWMDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSKT  
 NAPSGTTTTMSRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKTAADNNNSDYSWTGATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKYFPQSGVLI FGKQDSGKTNVDIEKVMITDEEE IRTTNPVATEQY  
 GSVSTNLQSGNTQAATTDVNTQGVLPGMVWQDRDVYLGQPIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
 HPPPQILIKNTPVPANPSTTFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0063]

[0064]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 20에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v439 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v439의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 20에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIQWKKLPGPPPPRPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVDPQPLGQPP  
 AAPTSLGSTTMTATGSGAPMAGNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVI TTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDENRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNRT  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQQRSLKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPMHGTLI FGKQGTNANDADLEHVMITDEEE IRTTNPVATEQY  
 GNVSNNLQNSNTGPTTENVNHQGALPGMVWQDRDVYLGQPIWAKI PHTDGHFHPSPLMGGFGLK  
 HPPPQIMIKNTPVPANPPTNFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFTVDANGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0065]

[0066]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 21에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v453 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v453의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 21에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPRPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPPLGQPP  
 AAPSTLGSSTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWRQLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNR  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVNPAMPASHKDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLEHVMITDEEERTTNPVATEQY  
 GNVSNLQNSNTGPTTENVNHQGALPGMVWQDRDVLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLK  
 HPPQIMIKNTPVPANPPTNFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFTVDANGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0067]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 22에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v513 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v513의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 22에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPRPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPPLGQPP  
 AAPSTLGSSTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWRQLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNR  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNSNFPWTAATKYHLNGR  
 DSLVNPAMPASHKDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLEHVMITDEEERTTNPVATEQY  
 NVSNLQNSNTGPTTENVNHQGALPGMVWQDRDVLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLKH  
 PPPQIMIKNTPVPANPPTNFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 KSVNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0069]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 23에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v551 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v551의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 23에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWVKLKPGRPPRPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGFNGLDKGEP  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFAQKRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDADSVDPQPPLGQPP  
 AAPSTLGSSTMATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRIITSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWRQLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLSAHQGLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLNR  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVNPAMPASHKDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLEHVMITDEEERTTNPVATEQY  
 GNVSNLQNSNTGPTTENVNHQGALPGMVWQDRDVLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLK  
 HPPQIMIKNTPVPANPPTNFSAAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFTVDANGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0071]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 24에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v556 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v556의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 24에 제시된다:

[0072]

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEF  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKRRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPQPLGQPP  
 AAPTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLTKT  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLDNVMITDEEERTTNPVATEQY  
 GTVSNLQNSNTGPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLK  
 HPPPQIMIKNTVPANPPTNFSSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFDVTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0073]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 25에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v562 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v562의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 25에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPKPAERHKDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEF  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKRRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPQPLGQPP  
 AAPTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLTKT  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLDNVMITDEEERTTNPVATEQY  
 GTVSNLQNSNTGPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLK  
 HPPPQIMIKNTVPANPPTNFSSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFDVTNGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0075]

일부 실시양태에서, 캡시드 단백질은 서열식별번호: 26에 제시된 바와 같은 AAV2/3 혼성체 변이체 v598 아미노산 서열의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. v598의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 26에 제시된다:

MAADGYLPDWLEDTLSEGIRQWWKLPKPGPPPRPAERHQDDSRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEF  
 VNEADAAALEHDKAYDRQLDSDGNPYLKYNHADAEFQERLKEDTSFGGNLGRAVFOAKRRVLEP  
 LGLVEEPVKTAPGKKRPVEHSPAEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTDGADSVDPQPLGQPP  
 AAPTSLGSTTMTATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDSQWLGDRVITTTSTRTWALPTYNNHL  
 YKQISSQSGASNDNHYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSPRDWQRLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQV  
 KEVTQNDGTTTTIANNLTSTVQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMVPPQYGYLTLNNGS  
 QAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFTFSYTFEDVPPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLTKT  
 QNSGTLQQRLLFSQAGPTSMSLQAKNWLPGPCYRQRLSKQANDNNNSNFPWTAATKYHLNG  
 RDSLVPNPGPAMASHKDDDEEKFFPMHGTLIFGKQGTNANDADLEHVMITDEEERTTNPVATEQY  
 GNVSNLQNSNTGPTTGTVNHQGALPGMVWQDRDVYLQGPWAKI PHTDGHFHPSPMLGGFGLK  
 HPPPQIMIKNTVPANPPTNFSSAKFASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENSKRWNPEIQYTSNY  
 NKSXNVDFDVTANGVYSEPRPIGTRYLTRNL

[0077]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 rAAV는 단일 가닥 AAV (ssAAV)이다. 본원에 사용된 ssAAV는 별개의 가닥 상의 트랜스진 발현 카세트의 코딩 서열 및 상보적 서열을 갖는 rAAV를 지칭하며, 별개의 바이러스 캡시드에서 패키징된다.

[0078]

rAAV 벡터를 AAV 캡시드에서 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양되는 성분은 트랜스로 숙주 세포에 제공될 수 있다. 대안적으로, 요구되는 성분 (예를 들어, 제조할 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 방법을 사용하여 요구되는 성분 중 하나 이상을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 이러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에서 요구되는 성분(들)을 함유할 것이다. 그러나, 요구되는 성분(들)은 구성적 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 구성적 프로모터의 예는 본원에서, 트랜스진과 함께 사용하는데 적합한 조절 요소의 논의에서 제공된다. 추가의 또 다른 대안에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 구성적 프로모터의 제어 하에서 선택된 성분(들) 및 하나 이상의 유도성 프로모터의 제어 하에서 다른 선택된 성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 293 세포로부터 유래되는 (구성적 프로모터의 제어 하에서 E1 헬퍼 기능을 함유하

[0079]

는), 그러나 유도성 프로모터의 제어 하에서 rep 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 추가의 다른 안정한 숙주 세포는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 생성될 수 있다.

[0080] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV 캡시드 단백질은 참조 AAV 캡시드 단백질보다 더 양호한 패키징 효율을 제공한다. 본원에 사용된 AAV 패키징 효율은 생산된 AAV 비리온의 배치에서 캡시드화된 무손상 계놈을 갖는 AAV 비리온의 백분율을 지칭한다. 패키징 효율은 패키징 효율을 결정하는데 적합한 임의의 공지된 방법에 의해 (예를 들어, 조 용해물 PCR에 의해 또는 문헌 [Zhou et al., *In Vitro Packaging of Adeno-Associated Virus DNA*, *J Virol.* 1998 Apr; 72(4): 3241-3247]에 기재된 바와 같이 세포를 감염시키고 트랜스진 발현을 평가함으로써) 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 보다 양호한 패키징 효율은 참조 캡시드 단백질보다 적어도 10% 초과, 적어도 20% 초과, 적어도 30% 초과, 적어도 40% 초과, 적어도 50% 초과, 적어도 60% 초과, 적어도 70% 초과, 적어도 80% 초과, 적어도 90% 초과, 적어도 100% 초과, 적어도 150% 초과, 적어도 200% 초과, 적어도 250% 초과, 적어도 300% 초과, 적어도 350% 초과, 적어도 400% 초과, 적어도 450% 초과, 적어도 500% 초과 또는 그 초과인 캡시드화된 무손상 계놈을 갖는 AAV 비리온을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 보다 양호한 패키징 효율은 참조 캡시드 단백질보다 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 10 내지 50배 (예를 들어, 10배, 20배, 30배, 40배, 또는 50배), 적어도 50 내지 100배 (예를 들어, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배) 또는 그 초과인 캡시드화된 무손상 계놈을 갖는 AAV 비리온을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 참조 캡시드 단백질은 캡시드 변이체가 그로부터 유래되는 원형적 캡시드 단백질 (예를 들어, AAV2 또는 AAV3b 캡시드 단백질)이다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 캡시드 변이체는 이들이 유래되는 원형적 캡시드와 비교하여 보다 양호한 패키징 효율을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV2 변이체 (예를 들어, v224, v56, 또는 v326)는 AAV2와 비교하여 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 그 초과인 패키징 효율을 갖는다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 AAV2/3 혼성체 캡시드 단백질 (예를 들어, v439, v453, v513, v551, v556, v562, 또는 v598)은 AAV3b와 비교하여 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 50배 또는 그 초과인 패키징 효율을 갖는다.

[0081] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 트랜스진 (예를 들어, KH902)을 코딩하는 코딩 서열을 포함하는 핵산을 함유하는 숙주 세포에 관한 것이다. "숙주 세포"는 관심의 물질을 보유하거나, 보유할 수 있는 임의의 세포를 지칭한다. 대개 숙주 세포는 포유동물 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 광수용체 세포, 망막 색소 상피 세포, 각질세포, 각막 세포, 및/또는 중양 세포이다. 숙주 세포는 AAV 헬퍼 구축물, AAV 벡터, 보조 기능 벡터, 또는 재조합 AAV의 생산과 연관된 다른 운반 DNA의 수용자로서 사용될 수 있다. 상기 용어는 형질감염된 원래 세포의 자손을 포함한다. 따라서, 본원에 사용된 "숙주 세포"는 외인성 DNA 서열로 형질감염된 세포를 지칭할 수 있다. 단일 모 세포의 자손은 자연적, 우연적, 또는 고의적 돌연변이로 인해, 반드시 형태에 있어서 또는 계놈 또는 총 DNA 상보체에 있어서 원래 모체와 완전히 동일하지는 않을 수 있음이 이해된다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 포유동물 세포, 효모 세포, 박테리아 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 또는 진균 세포이다. 일부 실시양태에서, 숙주 세포는 뉴런, 광수용체 세포, 색소화된 망막 상피 세포, 또는 신경교 세포이다.

[0082] 본 개시내용의 rAAV를 생산하는데 요구되는 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전 요소 (벡터)를 사용하여 패키징 숙주 세포에 전달될 수 있다. 선택된 유전 요소는 본원에 기재된 것들을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 개시내용의 임의의 실시양태를 구축하는데 사용되는 방법은 핵산 조작에 있어서의 기술을 갖는 통상의 기술자에게 공지되어 있으며, 유전자 조작, 재조합 조작, 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있으며, 적합한 방법의 선택은 본 개시내용에 대한 제한이 아니다. 예를 들어, 문헌 [K. Fisher et al., *J. Virol.*, 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 번호 5,478,745를 참조한다.

[0083] 일부 실시양태에서, 재조합 AAV는 삼중 형질감염 방법 (미국 특허 번호 6,001,650에 상세하게 기재됨)을 사용하여 생산될 수 있다. 전형적으로, 재조합 AAV는 숙주 세포를 AAV 입자 내로 패키징되는 AAV 벡터 (ITR 요소에 의해 플랭킹된 트랜스진을 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터, 및 보조 기능 벡터로 형질감염시킴으로써 생산된다. AAV 헬퍼 기능 벡터는 생산적 AAV 복제 및 캡시드화를 위해 트랜스로 기능하는 "AAV 헬퍼 기능" 서열 (예를 들어, rep 및 cap)을 코딩한다. 바람직하게는, AAV 헬퍼 기능 벡터는 임의의 검출가능한 야생형 AAV 비리온 (예를 들어, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않으면서 효율적인 AAV 벡터 생산을 지

지한다. 본 개시내용과 함께 사용하는데 적합한 벡터의 비-제한적 예는 미국 특허 번호 6,001,650에 기재된 pHLP19 및 미국 특허 번호 6,156,303에 기재된 pRep6cap6 벡터를 포함하며, 둘 다의 전체는 본원에 참조로 포함된다. 보조 기능 벡터는 AAV가 복제를 위해 의존하는 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포 기능 (예를 들어, "보조 기능")을 위한 뉴클레오티드 서열을 코딩한다. 보조 기능은 제한 없이, AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, cap 발현 산물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여하는 모이어를 포함하는 AAV 복제에 요구되는 기능을 포함한다. 바이러스-기반 보조 기능은 임의의 공지된 헬퍼 바이러스, 예컨대 아데노바이러스, 포진 바이러스 (단순 포진 바이러스 유형-1 이외), 및 백시니아 바이러스로부터 유래될 수 있다.

[0084] 일부 측면에서, 본 개시내용은 형질감염된 숙주 세포를 제공한다. 용어 "형질감염"은 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하기 위해 사용되며, 세포는 외인성 DNA가 세포막 내부에 도입된 경우 "형질감염되었다". 다수의 형질감염 기술은 일반적으로 관련 기술분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌 [Graham et al. (1973) Virology, 52:456], [Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York], [Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier], 및 [Chu et al. (1981) Gene 13:197]을 참조한다. 이러한 기술은 하나 이상의 외인성 핵산, 예컨대 뉴클레오티드 통합 벡터 및 다른 핵산 분자를 적합한 숙주 세포 내로 도입하는데 사용될 수 있다.

[0085] 본원에 사용된 용어 "제조함 세포"는 외인성 DNA 절편, 예컨대 생물학적-활성 폴리펩티드의 전사 또는 생물학적 활성 핵산, 예컨대 RNA의 생산을 초래하는 DNA 절편이 도입된 세포를 지칭한다.

[0086] 본원에 사용된 용어 "벡터"는 적절한 제어 요소와 회합되는 경우 복제가 가능하고, 세포 사이에 유전자 서열을 전달할 수 있는 임의의 유전 요소, 예컨대 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 인공 염색체, 바이러스, 비리온 등을 포함한다. 일부 실시양태에서, 벡터는 바이러스 벡터, 예컨대 rAAV 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 아델로바이러스 벡터 (예를 들어, US20200188456A1에 기재된 바와 같은 아델로바이러스 벡터) 등이다. 따라서, 상기 용어는 클로닝 및 발현 비히클, 뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 유용한 벡터는 전사되는 핵산 절편이 프로모터의 전사 제어 하에 위치하는 벡터인 것으로 고려된다.

[0087] *트랜스진을 코딩하는 단리된 핵산*

[0088] 본 개시내용은 일부 측면에서, 항-혈관 내피 성장 인자 (항-VEGF) 단백질을 코딩하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 원래 혈관 침투성 인자 (VPF)로 공지된 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 혈관의 형성을 자극하는 세포에 의해 생산되는 신호 단백질이다. VEGF는 성장 인자 서브-패밀리, 시스틴-결절 성장 인자의 혈소판-유래 성장 인자 패밀리이다. 이들은 맥관형성 (배아 순환계의 데 노보 형성) 및 혈관신생 (기존의 혈관구조로부터의 혈관의 성장) 둘 다에 관여하는 중요한 신호전달 단백질이다. VEGF의 정상적인 기능은 배아 발생 동안 새로운 혈관, 손상 후 새로운 혈관, 운동 후 근육, 및 차단된 혈관을 우회하는 새로운 혈관 (부수적인 순환)을 생성하는 것이다. 그러나, 비정상적 VEGF 활성화/신호전달은 다양한 질환, 예컨대 혈관 질환에 기여한다.

[0089] 항-혈관 내피 성장 인자 요법, 일명 항-VEGF 요법 또는 항-VEGF 의약은 혈관 내피 성장 인자 활성을 차단하는 의약의 사용이다. 항-VEGF 작용제의 비-제한적 예는 VEGF 수용체 융합 단백질 (예를 들어, KH902), 모노클로날 항체, 예컨대 베바시주맙, 항체 유도체, 예컨대 라니비주맙 (루센티스(Lucentis)), 또는 VEGF에 의해 자극된 티로신 키나제를 억제하는 경구-이용가능한 소분자 (예를 들어, 라파티닙, 수니티닙, 소라페닙, 악시티닙, 및 파조파닙)를 포함한다.

[0090] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단리된 핵산은 항-VEGF 작용제를 코딩하는 트랜스진을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 인간 VEGF 수용체를 표적화한다 (예를 들어, 그에 특이적으로 결합함). VEGF 수용체는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)에 대한 수용체이다. 1, 2 및 3으로 넘버링되는 VEGF 수용체의 3가지 주요 하위유형이 있다. VEGFR-1, VEGFR-2, 및 VEGFR-3은 수용체 티로신 키나제 패밀리에 속한다 (도 1a). VEGFR-1 및 -2는 주로 혈관신생에 관여하는 반면, VEGFR-3은 조혈 및 림프관신생에 관여한다. VEGFR은 7개의 이뮤노글로불린-유사 폴드로 조직화된 대략 750-아미노산-잔기 세포의 도메인을 함유한다. 세포의 도메인에 인접하여 단일 막형단 영역이 있고, 이어서 막인접 도메인, 70-아미노산 키나제 삽입물에 의해 중단된 스플리트 티로신-키나제 도메인, 및 C-말단 꼬리가 이어진다. VEGF 수용체 활성화는 이량체화를 요구한다. 리간드의 결합 특성에 의해 가이드되어, VEGFR은 동종이량체 및 이종이량체 둘 다를 형성한다. VEGFR의 이량체화는 수용체 키나제 활성의 활성화를 수반하여, 자가인산화를 초래한다. 신호 전달은 활성화된 VEGF 수용체가 SH2 도메인-함유 단백질 기질을 인산화하는 경우 전파된다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 많은 생물학적 경로 (예를 들어, 맥관

형성 및 혈관신생)에 관여하는 중요한 신호전달 단백질이다. VEGF 수용체는 7개의 이뮤노글로불린-유사 도메인 (예를 들어, 세포의 도메인 1-7)으로 이루어진 세포의 부분, 단일 막횡단 스페닝 영역 및 스플리트 티로신-키나제 도메인을 함유하는 세포내 부분을 갖는다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 1은 NCBI 수탁 번호 NP\_001153392.1, NCBI 수탁 번호 NP\_001153502.1, NCBI 수탁 번호 NP\_001153503.1, 또는 NCBI 수탁 번호 NP\_002010.2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 2는 NCBI 수탁 번호 NP\_002244.1에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 수용체 3은 NCBI 수탁 번호 NP\_002011.2, NCBI 수탁 번호 NP\_001341918.1, 또는 NCBI 수탁 번호 NP\_891555.2에 제시된 바와 같은 아미노산 서열을 포함한다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 많은 생물학적 경로 (예를 들어, 맥관형성 및 혈관신생)에 관여하는 중요한 신호전달 단백질이다. VEGF 수용체는 7개의 이뮤노글로불린-유사 도메인 (예를 들어, 세포의 도메인 1-7)으로 이루어진 세포의 부분, 단일 막횡단 스페닝 영역 및 스플리트 티로신-키나제 도메인을 함유하는 세포내 부분을 갖는다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 태반-유래 성장 인자 (PIGF)를 표적화한다 (예를 들어, 그에 특이적으로 결합함).

[0091] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 인간 VEGF 디코이 수용체, 또는 그의 부분이다. "디코이 수용체"는 리간드 (예를 들어, VEGF)를 인식하고 그에 결합할 수 있지만, 리간드의 동종체 수용체 복합체를 구조적으로 신호전달하거나 활성화시킬 수 없는 수용체를 지칭한다. VEGF 디코이 수용체는 리간드에 결합하고 그것이 그의 정규 수용체에 결합하지 못하게 하는 억제체로서 작용한다. 일부 실시양태에서, VEGF 디코이 수용체는 VEGF 수용체 1 및/또는 VEGF 수용체 2의 하나 이상의 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 인간 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질은 함께 융합된 VEGF 수용체 1 및/또는 VEGF 수용체 2로부터 선택되는 하나 초과인 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질은 상이한 단백질을 포함하는 제2 부분 (예를 들어, 이뮤노글로불린의 Fc 부분)에 추가로 융합된 VEGF 수용체 2에 융합된 VEGF 수용체 1을 포함하는 제1 부분을 포함한다. VEGF 디코이 수용체 및 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질은 이전에 기재되었으며, 예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 WO2007112675, 및 EP1767546B1을 참조한다.

[0092] 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 VEGF에 결합하는 단백질의 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 포함한다.

[0093] 일부 실시양태에서, 인간 VEGF 디코이 수용체는 인간 VEGF 수용체 융합 단백질이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 1 또는 VEGF 수용체 2로부터 선택되는 세포의 도메인, 및 VEGF 수용체 1 또는 VEGF 수용체 2로부터 선택되는 하나 이상의 제2 세포의 도메인을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2, 및 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2, 및 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3에 융합되고 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 4에 추가로 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2에 융합되고 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3에 추가로 융합된 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 1을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3에 융합되고 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 4에 추가로 융합되고 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 5에 추가로 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3에 융합되고 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 4에 추가로 융합되고 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 5에 추가로 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 디코이 수용체의 융합된 세포의 도메인은 링커에 의해 서로에 연결된다. 일부 실시양태에서, VEGF 디코이 수용체의 융합된 세포의 도메인은 직접적으로 서로에 연결된다.

[0094] 또한, 본원에 기재된 임의의 VEGF 수용체 융합 단백질은 또 다른 단백질에 융합될 수 있다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 이량체화 또는 다량체화 특성을 제공하는 또 다른 단백질에 융합된 VEGF 수용체 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 VEGF 디코이 수용체 또는 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질)인 부분을 포함한다. 융합 단백질에 대한 이량체화 또는 다량체화 특성을 제공하는 단백질의 비-제한적 예는 이뮤노글로불린의 Fc 부분이다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 (예를 들어, 본원에 기재된 임의의 VEGF 디코이 수용체 또는 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질)

인 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질 (예를 들어, 본원에 기재된 VEGF 디코이 수용체 또는 VEGF 디코이 수용체 융합 단백질)은 직접적으로 다른 부분 (예를 들어, Fc 도메인)에 융합된다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질 (예를 들어, VEGF 수용체 디코이)은 링커를 통해 다른 부분에 융합된다.

[0095] 적합한 링커는 관련 기술분야에 공지되어 있다. (예를 들어, 문헌 [Chen et al., Fusion protein linkers: property, design and functionality, Adv Drug Deliv Rev. 2013 Oct;65(10):1357-69] 참조). 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 추가로 융합된다. 일부 실시양태에서, VEGF 수용체 융합 단백질은 KH902이다. KH902, 일명 콘베르셉트 (예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 US20100272719A1)는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF) 수용체 1 및 VEGF 수용체 2 세포의 도메인을 인간 이뮤노글로불린의 Fc 영역과 융합시킴으로써 구축된 디코이 수용체 단백질이다. KH902의 크기는 약 142kD이다. 신생혈관화를 유도할 수 있는 VEGF 및 태반 성장 인자 (PlGF)의 콘베르셉트-매개 차단은 3상 시험을 포함하는 임상 시험에서 습성 연령-관련 황반 변성 (wAMD)을 효과적으로 치료하는 것으로 입증되었으며, 예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Liu et al., AJO, August 17, 2019]을 참조한다.

[0096] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 5에 제시된 바와 같은 아미노산 서열과 적어도 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. KH902에 대한 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 5에 제시된다.

```
MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTL
KKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV
LSPSHGIELSVGKLVNCTARTELVNVDGDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMCKFLST
LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFSGMESLVEATVGERVRIIPAKYL
GYPPEIKWYKNGI PLESNHTIKAGHVLTIMEVSRDTGNVTIVILTNPISKEKQSHVVS LVVYV
PPGPGDKTHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
(SEQ ID NO: 5)
```

[0097]

[0098] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 5의 부분을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 6에 제시된 바와 같은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 7에 제시된 바와 같은 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 8에 제시된 바와 같은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 9에 제시된 바와 같은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제는 서열식별번호: 10에 제시된 바와 같은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4의 아미노산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열을 포함한다.

[0099] VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 6에 제시된다:

```
MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTL
KKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV
(SEQ ID NO: 6)
```

[0100]

[0101] VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 7에 제시된다:

VLSPSHGIELSVGKLVNCTARTELVNVDGIDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS  
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKY  
LGYPPEIKWYKNGIPLSNHTIKAGHVLTIMEVSRDGTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYV  
VPP (SEQ ID NO: 7)

[0102]

[0103] VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 8에 제시된다:

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTL  
KKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVV  
LSPSHGIELSVGKLVNCTARTELVNVDGIDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLST  
LTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKY  
LGYPPEIKWYKNGIPLSNHTIKAGHVLTIMEVSRDGTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYV  
PP (SEQ ID NO: 8)

[0104]

[0105] Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포외 도메인 2의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 9에 제시된다:

MVSYWDTGVLLCALLSCLLLTGSSSGRPFVEMYSEIPEIIHMTGRELVI PCRVTSPNITVTL  
KKFPLDTLIPDGKRIIWSRKGFIISNATYKEIGLLTCEATVNGHLYKTNYLTHRQTNTIIDVG  
PGDKTHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV  
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP  
QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFLYSKL  
TVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 9)

[0106]

[0107] Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 2의 세포외 도메인 3 및 4의 예시적인 아미노산 서열은 서열식별번호: 10에 제시된다:

VLSPSHGIELSVGKLVNCTARTELVNVDGIDFNWEYPPSSKHQHKLVNRDLKTQSGSEMKKFLS  
TLTIDGVTRSDQGLYTCAASSGLMTKKNSTFVRVHEKPFVAFGSGMESLVEATVGERVRIPAKY  
LGYPPEIKWYKNGIPLSNHTIKAGHVLTIMEVSRDGTGNYTVILTNPISKEKQSHVVSLLVYV  
VPPGPGDKTHTCPLCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ  
PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKATPPVLDSDGSFFL  
YSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)

[0108]

[0109] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 서열식별번호: 1에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다. KH902에 대한 예시적인 코딩 서열은 서열식별번호: 1에 제시된다.

ATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGCTCAGCTGTCTGCTTCTCACAG  
GATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGAAATCCCCGAAATATACACAT  
GACTGAAGGAAGGGAGCTCGTCAATCCCTGCGGGTTACGTCACCTAACATCACTGTTACTTTA  
AAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAAGG  
GCTTCATCATATCAAAATGCAACGTACAAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAA  
TGGGCATTTGTATAAGACAAACTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTT  
CTGAGTCCGTCTCATGGAATGAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATGTACAGCAA  
GAACTGAACTAAATGTGGGATGACTTCAACTGGGAATACCCTTCTCGAAGCATCAGCATAA  
GAACTTGTAACCGAGACCTAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAGCACC  
TTAACTATAGATGGTGTAAACCGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGC  
TGATGACCAAGAAGAACAGCACATTTGTGAGGGTCCATGAAAAACCTTTTGTGCTTTTGGGAG  
TGGCATGGAATCTCTGGTGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGTGAGAATCCCTGCGAAGTACCTT  
GGTTACCCACCCCAAGAAATAAAATGGTATAAAAATGGAATACCCTTGAGTCCAATCACACAA  
TTAAAGCGGGGCATGTACTGACGATTATGGAAGTGAGTGAAAGAGACACAGGAAATTACTGT  
CATCCTTACCAATCCCATTTCAAAGGAGAAGCAGACGACCATGTGGTCTCTCTGGTGTGTATGTC  
CCACCGGGCCCGGGGACAAAACCTCACACATGCCACTGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGG  
GACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCCCTGA  
GGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTG  
GACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACC  
GTGGTGGTCCAGCTCCTCAGCTGACCCAGTGGTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCACAA  
GGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCC  
CGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC  
TGACCTGCCTAGTCAAAGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCA  
GCCGGAGAACAACATAAGGCCACGCCCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTAC  
AGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGC  
ATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA (SEQ  
ID NO: 1)

[0110]

- [0111] 본원에 기재된 임의의 항-VEGF 작용제 및 또는 이들의 조합은 본원의 단리된 핵산에 의해 발현될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제1 영역 및 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 코딩하는 제2 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제1 영역 및 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 코딩하는 제2 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제1 영역은 임의의 적합한 위치에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 상류에 위치할 수 있다. 예를 들어, 제1 영역은 제2 영역의 제1 코돈 및 제1 코돈의 상류의 2000개의 뉴클레오티드 사이에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 제1 코돈 및 제1 코돈의 상류의 1000개의 뉴클레오티드 사이에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 제1 코돈 및 제1 코돈의 500개의 뉴클레오티드 사이에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 제1 코돈 및 제1 코돈의 상류의 250개의 뉴클레오티드 사이에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 제1 코돈 및 제1 코돈의 상류의 150개의 뉴클레오티드 사이에 위치할 수 있다. 다른 실시양태에서, 제1 영역은 제2 영역의 하류에 위치할 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 마지막 코돈 및 마지막 코돈의 하류의 위치 2000개의 뉴클레오티드 사이에 있을 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 마지막 코돈 및 마지막 코돈의 하류의 위치 1000개의 뉴클레오티드 사이에 있을 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 마지막 코돈 및 마지막 코돈의 하류의 위치 500개의 뉴클레오티드 사이에 있을 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 마지막 코돈 및 마지막 코돈의 하류의 위치 250개의 뉴클레오티드 사이에 있을 수 있다. 제1 영역은 제2 영역의 마지막 코돈 및 마지막 코돈의 하류의 위치 150개의 뉴클레오티드 사이에 있을 수 있다.
- [0112] 일부 실시양태에서, 핵산은 또한 제3 영역을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제1 영역, VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 코딩하는 제2 영역 및 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제3 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제1 영역, 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 융합된 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4를 코딩하는 제2 영역 및 VEGF 수용체 2의 세포의 도메인 3 및 4에 융합되고 이뮤노글로불린의 Fc 부분에 추가로 융합된 VEGF 수용체 1의 세포의 도메인 2를 코딩하는 제3 영역을 포함한다. 일부 실시양태에서, 제3 영역은 제1 영역의 제1 코돈의 상류에 위치한다. 일부 실시양태에서, 제3 영역은 제1 영역의 마지막 코돈 및 제2 영역의 제1 코돈 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 제3 영역은 제2 영역의 마지막 코돈의 하류에 위치한다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 단리된 핵산의 다양한 영역은 본원에 기재된 항-VEGF 작용제 또는 항-VEGF 작용제의 조합을 발현하기 위한 발현 카세트이다. 일부 실시양태에서, 다중시스트론성 발현 구축물은 본원에 기재된 하나 이상의 항-VEGF 작용제 또는 항-VEGF 작용제의 조합을 코딩하는 2개 이상의 발현 카세트를 포함한다.
- [0114] 일부 실시양태에서, 다중시스트론성 발현 구축물은 상이한 방식으로 위치한 발현 카세트를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 발현 카세트 (예를 들어, 제1 항-VEGF 작용제, 또는 그의 부분을 코딩하는 발현 카세트)가 제2 발현 카세트 (예를 들어, 제2 항-VEGF 작용제, 또는 그의 부분을 코딩하는 발현 카세트)에 인접하여 위치한 다중시스트론성 발현 구축물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 발현 카세트가 인트론을 포함하고, 제2 발현 카세트가 제1 발현 카세트의 인트론 내에 위치한 다중시스트론성 발현 구축물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 제1 발현 카세트의 인트론 내에 위치한 제2 발현 카세트는 프로모터 및 프로모터에 작동적으로 연결된 유전자 산물을 코딩하는 핵산 서열을 포함한다.
- [0115] 상이한 실시양태에서, 발현 카세트가 상이한 방식으로 배향된 다중시스트론성 발현 구축물이 제공된다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 제1 발현 카세트가 제2 발현 카세트와 동일한 배향에 있는 다중시스트론성 발현 구축물이 제공된다. 일부 실시양태에서, 반대 배향에 있는 제1 및 제2 발현 카세트를 포함하는 다중시스트론성 발현 구축물이 제공된다.
- [0116] 발현 카세트와 관련하여 본원에 사용된 용어 "배향"은 주어진 카세트 또는 구조의 방향적 특징을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 발현 카세트는 코딩 핵산 서열의 5'에 프로모터를 보유하고, 코딩 핵산 서열의 전사는 센스가닥의 5' 말단에서 3' 말단으로 진행하여, 이를 방향적 카세트 (예를 들어 5'-프로모터/(인트론)/코딩 서열-3')로 만든다. 사실상 모든 발현 카세트는 이 의미에서 방향적이기 때문에, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 제2 핵산 구조, 예를 들어, 제2 발현 카세트, 바이러스 계통에 관하여, 또는 카세트가 AAV 구축물에 포함되는 경우, AAV ITR에 관하여, 주어진 발현 카세트의 배향을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0117] 예를 들어, 주어진 핵산 구축물이 2개의 발현 카세트를 하기 배열로 포함하는 경우,



미한다. 단리된 핵산은 관련 기술분야에 널리 공지된 재조합 DNA 기술에 의해 용이하게 조작가능한 것이다. 따라서, 5' 및 3' 제한 부위가 공지된 또는 폴리머라제 연쇄 반응 (PCR) 프라이머 서열이 개시된 벡터에 함유된 뉴클레오티드 서열은 단리된 것으로 간주되지만, 그의 천연 숙주에 그의 천연 상태로 존재하는 핵산 서열은 그렇지 않다. 단리된 핵산은 실질적으로 정제될 수 있지만, 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 클로닝 또는 발현 벡터 내에서 단리된 핵산은 그것이 그것이 있는 세포에서 물질의 단지 아주 작은 백분율을 포함할 수 있다는 점에서 순수하지 않다. 그러나, 이러한 핵산은 상기 용어가 본원에 사용된 바와 같이 그것이 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지된 표준 기술에 의해 용이하게 조작가능하기 때문에 단리된다. 단백질 또는 펩티드에 관하여 본원에 사용된 용어 "단리된"은 그의 천연 환경으로부터 단리되었거나 인공적으로 생산된 (예를 들어, 화학적 합성에 의해, 재조합 DNA 기술에 의해 등) 단백질 또는 펩티드를 지칭한다.

[0131] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 단리된 핵산 및 rAAV는 하기 구조적 특색 (예를 들어, 제어 또는 조절 서열) 중 하나 이상을 포함한다: 긴 닭 베타 액틴 (CBA) 프로모터, 연장된 CBA 인트론, 코작 서열, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902) 또는 코돈-최적화된 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902) 변이체-코딩 핵산 서열, 하나 이상의 마이크로RNA 결합 부위, 및 토끼 베타-글로빈 (RBG) 폴리 A 서열. 일부 실시양태에서, 상기 제어 서열 중 하나 이상은 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 핵산 서열에 작동가능하게 연결된다.

[0132] 본원에 사용된 핵산 서열 (예를 들어, 코딩 서열) 및 조절 서열은 이들이 핵산 서열의 발현 또는 전사를 조절 서열의 영향 또는 제어 하에 두는 방식으로 공유 연결되는 경우, "작동가능하게 연결된" 것으로 이야기된다. 핵산 서열이 기능적 단백질로 번역되는 것이 요망되는 경우, 2개의 DNA 서열은 5' 조절 서열에서의 프로모터의 유도가 코딩 서열의 전사를 발생시키고, 2개의 DNA 서열 사이의 연결의 성질이 (1) 격자-이동 돌연변이의 도입을 발생시키거나, (2) 코딩 서열의 전사를 지정하는 프로모터 영역의 능력을 방해하거나, 또는 (3) 상응하는 RNA 전사체가 단백질로 번역되는 능력을 방해하지 않는 경우, 작동가능하게 연결된 것으로 이야기된다. 따라서, 프로모터 영역은 프로모터 영역이 DNA 서열의 전사를 실행할 수 있고, 그에 따라 생성된 전사체가 목적하는 단백질 또는 폴리펩티드로 번역될 수 있을 경우, 핵산 서열에 작동가능하게 연결될 것이다. 유사하게, 2개 이상의 코딩 영역은 이들이 공통적인 프로모터로부터의 그들의 전사가 프레임 내에서 번역된 2개 이상의 단백질의 발현을 발생시키도록 연결되는 경우, 작동가능하게 연결된다.

[0133] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 프로모터에 작동가능하게 연결된 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 핵산 서열을 포함한다. "프로모터"는 유전자의 특이적 전사를 개시하는데 요구되는, 세포의 합성 기구, 또는 도입된 합성 기구에 의해 인식되는 DNA 서열을 지칭한다. 어구 "작동적으로 연결된", "작동적으로 위치된", "제어 하에" 또는 "전사 제어 하에"는 프로모터가 유전자의 RNA 폴리머라제 개시 및 발현을 제어하기 위해 핵산에 관하여 정확한 위치 및 배향에 있음을 의미한다.

[0134] 일반적으로, 프로모터는 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 또는 조직-특이적 프로모터일 수 있다.

[0135] 구성적 프로모터의 예는 제한 없이, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의로 RSV 인헨서를 가짐), 시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의로 CMV 인헨서를 가짐) [예를 들어, 문헌 [Boshart et al., Cell, 41:521-530 (1985)] 참조], 키메라 시토메갈로바이러스 키메라 시토메갈로바이러스 (CMV)/닭 β-액틴 (CB) 프로모터 (CBA 프로모터), SV40 프로모터, 디히드로폴레이트 리덕타제 프로모터, β-액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터, 및 EF1α 프로모터 [인비트로젠(Invitrogen)]를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 RNA pol II 프로모터이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 키메라 시토메갈로바이러스 키메라 시토메갈로바이러스 (CMV)/닭 β-액틴 (CB) 프로모터 (CBA 프로모터)이다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 RNA pol III 프로모터, 예컨대 U6 또는 H1이다.

[0136] 외인적으로 공급된 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌 (MT) 프로모터, 텍사메타손 (Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, T7 폴리머라제 프로모터 시스템 (WO 98/10088); 엑디손 곤충 프로모터 (No et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351 (1996)), 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) 및 Wang et al., Gene Ther., 4:432-441 (1997)) 및 라파마이신-유도성 시스템 (Magari et al., J. Clin. Invest., 100:2865-2872 (1997))을 포함한다. 이 맥락에서 유용할 수 있는 유도성 프로모터의 추가의 다른 유형은 특이적 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성 상, 세포의 특정한 분화 상태에 의해 조절되거나, 단지 복제 세포에 있는 것들이다.

- [0137] 일부 실시양태에서, 조절 서열은 조직-특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에, 조직-특이적 조절 서열은 전사를 유도하는 조직-특이적 전사 인자에 조직 특이적 방식으로 결합한다. 이러한 조직-특이적 조절 서열 (예를 들어, 프로모터, 인핸서 등)은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 예시적인 조직-특이적 조절 서열은 하기 조직 특이적 프로모터를 포함하나 이에 제한되지는 않는다: 레티노쉬신 근위 프로모터, 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 인핸서 (RS/IRBPa), 로돕신 키나제 (RK), 간-특이적 티록신 결합 글로불린 (TBG) 프로모터, 인슐린 프로모터, 글루카곤 프로모터, 소마토스타틴 프로모터, 췌장 폴리펩티드 (PPY) 프로모터, 시냅신-1 (Syn) 프로모터, 크레아틴 키나제 (MCK) 프로모터, 포유동물 테스민 (DES) 프로모터,  $\alpha$ -미오신 중쇄 ( $\alpha$ -MHC) 프로모터, 또는 심장 트로포닌 T (cTnT) 프로모터. 다른 예시적인 프로모터는 통상의 기술자에게 명백할 것인 다른 것들 중에서도, 베타-액틴 프로모터, B형 간염 바이러스 코어 프로모터 (Sandig et al., Gene Ther., 3:1002-9 (1996)); 알파-페토단백질 (AFP) 프로모터 (Arbutnot et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)), 골 오스테오칼신 프로모터 (Stein et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96 (1997)); 골 시알로단백질 프로모터 (Chen et al., J. Bone Miner. Res., 11:654-64 (1996)), CD2 프로모터 (Hansal et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)); 이뮤노글로불린 중쇄 프로모터; T 세포 수용체  $\alpha$ -쇄 프로모터, 뉴런, 예컨대 뉴런-특이적 에놀라제 (NSE) 프로모터 (Andersen et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)), 신경필라멘트 경쇄 유전자 프로모터 (Piccioli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)), 및 뉴런-특이적 vgf 유전자 프로모터 (Piccioli et al., Neuron, 15:373-84 (1995))를 포함한다.
- [0138] 일부 실시양태에서, 조직-특이적 프로모터는 눈-특이적 프로모터이다. 눈-특이적 프로모터의 예는 레티노쉬신 근위 프로모터, 광수용체간 레티노이드-결합 단백질 인핸서 (RS/IRBPa), 로돕신 키나제 (RK), RPE65, 및 인간 원추체 흡수 프로모터를 포함한다.
- [0139] 일부 실시양태에서, 프로모터는 닭 베타-액틴 (CB) 프로모터이다. 닭 베타-액틴 프로모터는 짧은 닭 베타-액틴 프로모터 또는 긴 닭 베타-액틴 프로모터일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터 (예를 들어, 닭 베타-액틴 프로모터)는 인핸서 서열, 예를 들어 시토메갈로바이러스 (CMV) 인핸서 서열을 포함한다. CMV 인핸서 서열은 짧은 CMV 인핸서 서열 또는 긴 CMV 인핸서 서열일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 긴 CMV 인핸서 서열 및 긴 닭 베타-액틴 프로모터를 포함한다. 일부 실시양태에서, 프로모터는 짧은 CMV 인핸서 서열 및 짧은 닭 베타-액틴 프로모터를 포함한다. 그러나, 통상의 기술자는 짧은 CMV 인핸서가 긴 CB 프로모터와 함께 사용될 수 있고, 긴 CMV 인핸서가 짧은 CB 프로모터와 함께 사용될 수 있음 (그 역도 마찬가지임)을 인식하고 있다.
- [0140] 본원에 기재된 단리된 핵산은 또한 하나 이상의 인트론을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 적어도 하나의 인트론은 프로모터/인핸서 서열 및 트랜스진 사이에 위치한다. 일부 실시양태에서, 인트론은 합성 또는 인공 (예를 들어, 이중) 인트론이다. 합성 인트론의 예는 SV-40으로부터 유래된 인트론 서열 (SV-40 T 인트론 서열로 지칭됨) 및 닭 베타-액틴 유전자로부터 유래된 인트론 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 트랜스진은 하나 이상의 (1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) 인공 인트론을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 인공 인트론은 프로모터 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 핵산 서열 사이에 위치한다.
- [0141] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스진은 코작 서열을 포함한다. 코작 서열은 진핵 mRNA에서 발견되고 단백질 번역의 개시에 있어서 역할을 하는 컨센서스 서열 GCC(A/G)CC (서열식별번호: 4)를 포함하는 핵산 모티프이다. 일부 실시양태에서, 코작 서열은 인트론 및 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진 사이에 위치한다.
- [0142] 본 개시내용에 의해 기재된 단리된 핵산은 폴리아데닐화 (폴리 A) 서열을 추가로 포함하는 트랜스진을 코딩할 수 있다. 일부 실시양태에서, 트랜스진은 토끼 베타-글로빈 (RBG) 폴리 A 서열인 폴리 A 서열을 포함한다.
- [0143] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 3'-비번역된 영역 (3'-UTR)을 포함한다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진, 및 하나 이상의 miRNA 결합 부위를 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 임의의 특정한 이론에 구애되기를 원하지는 않지만, 유전자 발현 구축물 내로의 miRNA 결합 부위의 혼입은 상응하는 miRNA가 발현되는 세포 및 조직에서 트랜스진 발현의 조절 (예를 들어, 트랜스진 발현의 억제)을 허용한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 내로의 하나 이상의 miRNA 결합 부위의 혼입은 세포-유형 특이적 방식으로 트랜스진 발현의 탈-표적화를 허용한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 miRNA 결합 부위는 트랜스진의 3' 비번역된 영역 (3'-UTR)에, 예를 들어 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 핵산 서열의 마지막 코돈, 및 폴리 A 서열 사이에 위치한다.
- [0144] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 면역 세포 (예를 들어, 항원 제시 세포 (APC), 예컨대 대식세포, 수상돌기 등)

로부터 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 발현을 탈-표적화하는 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) miRNA 결합 부위를 포함한다. 예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 US 2018/0066279에 기재된 바와 같이, 면역-연관 miRNA에 대한 miRNA 결합 부위의 혼입은 항원 제시 세포로부터 트랜스진 (예를 들어, KH902) 발현을 탈-표적화하고, 따라서 트랜스진의 산물에 대해 대상체에서 생성된 면역 반응 (세포성 및/또는 체액성)을 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0145] 일부 측면에서, 본 개시내용은 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진, 및 하나 이상의 miRNA 결합 부위를 포함하는 단리된 핵산에 관한 것이다. 임의의 특정한 이론에 구애되지 않되지만, 유전자 발현 구축물 내로의 miRNA 결합 부위의 혼입은 상응하는 miRNA가 발현되는 세포 및 조직에서 트랜스진 발현의 조절 (예를 들어, 트랜스진 발현의 억제)을 허용한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진 내로의 하나 이상의 miRNA 결합 부위의 혼입은 세포-유형 특이적 방식으로 트랜스진 발현의 탈-표적화를 허용한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 miRNA 결합 부위는 트랜스진의 3' 비번역된 영역 (3' UTR)에, 예를 들어 하나 이상의 GM3S 단백질 코딩하는 핵산 서열의 마지막 코돈, 및 폴리 A 서열 사이에 위치한다.

[0146] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 간 세포로부터 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 발현을 탈-표적화하는 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) miRNA 결합 부위를 포함한다. 예를 들어, 일부 실시양태에서, 트랜스진은 하나 이상의 miR-122 결합 부위를 포함한다.

[0147] 일부 실시양태에서, 트랜스진은 면역 세포 (예를 들어, 항원 제시 세포 (APC), 예컨대 대식세포, 수상돌기 등)로부터 하나 이상의 GM3S 단백질의 발현을 탈-표적화하는 하나 이상의 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) miRNA 결합 부위를 포함한다. 예를 들어 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 US 2018/0066279에 기재된 바와 같이, 면역-연관 miRNA에 대한 miRNA 결합 부위의 혼입은 항원 제시 세포로부터 트랜스진 발현을 탈-표적화하고, 따라서 트랜스진의 산물에 대해 대상체에서 생성된 면역 반응 (세포성 및/또는 체액성)을 감소시키거나 제거할 수 있다.

[0148] 본원에 사용된 "면역 세포-연관 miRNA"는 면역계의 세포, 예컨대 항원 제시 세포 (APC)에서 우선적으로 발현되는 miRNA이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포-연관 miRNA는 비-면역 세포 (예를 들어, 대조군 세포, 예컨대 HeLa 세포, HEK293 세포, 중간엽 세포 등)에 비해 면역 세포에서 적어도 2배, 3배, 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배 더 높은 수준의 발현을 나타내는 면역 세포에서 발현되는 miRNA이다. 일부 실시양태에서, 면역 세포-연관 miRNA가 발현되는 면역계의 세포 (면역 세포)는 B 세포, T 세포, 킬러 T 세포, 헬퍼 T 세포,  $\gamma$   $\delta$  T 세포, 수지상 세포, 대식세포, 단핵구, 혈관 내피 세포, 또는 다른 면역 세포이다. 일부 실시양태에서, 면역계의 세포는 하기 마커 중 하나 이상을 발현하는 B 세포이다: B220, BLAST-2 (EBVCS), Bu-1, CD19, CD20 (L26), CD22, CD24, CD27, CD57, CD72, CD79a, CD79b, CD86, chB6, D8/17, FMC7, L26, M17, MUM-1, Pax-5 (BSAP), 및 PC47H. 일부 실시양태에서, 면역계의 세포는 하기 마커 중 하나 이상을 발현하는 T 세포이다: ART2, CD1a, CD1d, CD11b (Mac-1), CD134 (OX40), CD150, CD2, CD25 (인터류킨 2 수용체 알파), CD3, CD38, CD4, CD45RO, CD5, CD7, CD72, CD8, CRTAM, FOXP3, FT2, GPCA, HLA-DR, HML-1, HT23A, Leu-22, Ly-2, Ly-m22, MICG, MRC OX 8, MRC OX-22, OX40, PD-1 (프로그램화된 사멸-1), RT6, TCR (T 세포 수용체), Thy-1 (CD90), 및 TSA-2 (흉선 공유된 Ag-2). 일부 실시양태에서, 면역 세포-연관 miRNA는 miR-31, miR-106a, miR-125a/b, miR-146a, miR-150, miR-155, miR-181a, miR-223, miR-221, miR-222, let-7i, miR-148, miR-152, miR-126a, miR-142, miR-15, miR-150, miR-155, miR-16, miR-17, miR-18, miR-181a, miR-19a, miR-19b, miR-20, miR-21a, miR-223, miR-24-3p, miR-29a, miR-29b, miR-29c, miR-302a-3p, miR-30b, miR-33-5p, miR-34a, miR-424, miR-652-3p, miR-652-5p, miR-9-3p, miR-9-5p, miR-92a, 및 miR-99b-5로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 트랜스진은 miR-142에 대한 하나 이상의 결합 부위를 포함한다.

[0149] 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 역위 말단 반복부를 포함한다. 본 개시내용의 단리된 핵산은 재조합 아데노-연관 바이러스 (AAV) 벡터 (rAAV 벡터)일 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 단리된 핵산은 제1 아데노-연관 바이러스 (AAV) 역위 말단 반복부 (ITR), 또는 그의 변이체를 포함하는 영역 (예를 들어, 제1 영역)을 포함한다. 단리된 핵산 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터)은 캡시드 단백질 내로 패키징되고, 대상체에게 투여되고/거나 선택된 표적 세포에 전달될 수 있다. "재조합 AAV (rAAV) 벡터"는 전형적으로 최소로, 트랜스진 및 그의 조절 서열, 및 5' 및 3' AAV 역위 말단 반복부 (ITR)로 구성된다. 트랜스진은 본 개시내용에서 다른 곳에 기재된 바와 같이, 예를 들어, 단백질 (예를 들어, 항-VEGF 작용제, 예컨대 KH902)을 코딩하는 영역 및/또는 발현 제어 서열 (예를 들어, 폴리-A 꼬리)을 포함할 수 있다.

[0150] 일반적으로, ITR 서열은 약 145 bp의 길이이다. 바람직하게는, 실질적으로 ITR을 코딩하는 전체 서열은 분자에

사용되지만, 이들 서열의 일부 정도의 소수의 변형이 허용가능하다. 이들 ITR 서열을 변형시키는 능력은 관련 기술분야의 기술 내이다. (예를 들어, 문헌 [Sambrook et al., "Molecular Cloning. A Laboratory Manual", 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)]; 및 [K. Fisher et al., J Virol., 70:520-532 (1996)]과 같은 텍스트 참조). 본 개시내용에서 채용되는 이러한 분자의 예는 트랜스진을 함유하는 "시스-작용" 플라스미드이며, 여기서 선택된 트랜스진 서열 및 연관된 조절 요소는 5' 및 3' AAV ITR 서열에 의해 플랭킹된다. AAV ITR 서열은 본 확인된 포유동물 AAV 유형을 포함하는 임의의 공지된 AAV로부터 수득될 수 있다. 일부 실시양태에서, 단리된 핵산은 제2 AAV ITR을 포함하는 영역 (예를 들어, 제2 영역, 제3 영역, 제4 영역 등)을 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 트랜스진을 코딩하는 단리된 핵산은 AAV ITR에 의해 플랭킹된다 (예를 들어, 배향 5'-ITR-트랜스진-ITR-3'에서). 일부 실시양태에서, AAV ITR은 AAV1 ITR, AAV2 ITR, AAV3 ITR, AAV4 ITR, AAV5 ITR, 및 AAV6 ITR로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, 제2 ITR은 기능적 말단 분할 부위 (TRS)가 결여된 돌연변이체 ITR이다. 용어 "말단 분할 부위가 결여된"은 ITR의 말단 분할 부위 (TRS)의 기능을 제거하는 돌연변이 (예를 들어, 센스 돌연변이, 예컨대 비-동의 돌연변이, 또는 미스센스 돌연변이)를 포함하는 AAV ITR, 또는 기능적 TRS를 코딩하는 핵산 서열이 결여된 말단절단된 AAV ITR (예를 들어, ΔTRS ITR, 또는 ΔITR)을 지칭할 수 있다. 임의의 특정한 이론에 구애되지 않되, 기능적 TRS가 결여된 ITR을 포함하는 rAAV 벡터는 예를 들어 문헌 [McCarthy (2008) Molecular Therapy 16(10):1648-1656]에 의해 기재된 바와 같이 자기-상보적 rAAV 벡터를 생산한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 벡터는 하나 이상의 AAV ITR을 포함하고, 적어도 하나의 ITR은 공지된 AAV 혈청형 ITR의 ITR 변이체이다. 일부 실시양태에서, AAV ITR 변이체는 합성 AAV ITR (예를 들어, 천연적으로 발생하지 않는 AAV ITR)이다. 일부 실시양태에서, AAV ITR 변이체는 혼성체 ITR이다 (예를 들어, 혼성체 ITR은 2개 이상의 상이한 AAV 혈청형의 ITR로부터 유래된 서열을 포함함).

[0151]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 (예를 들어, rAAV 벡터)은 5'에서 3' 순서로: 5' AAV ITR, CMV 인핸서, CBA 프로모터, 인트론 (예를 들어, 닭 베타 액틴 인트론), 코작 서열, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진, 토끼 베타-글로빈 폴리 A, 및 3' AAV ITR을 포함한다. 단리된 핵산 서열의 예시적인 서열은 서열식별번호: 2에 제시된다. 일부 실시양태에서, rAAV는 서열식별번호: 2 (코작 서열은 밑줄 표시됨; KH902 코딩 서열은 볼드체)에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다:

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC  
 GCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTC  
 CTTGTAGTTAATGATTAACCGCCATGCTACTTATCTACCAGGTAATGGGGATCCTCTAGAAC  
 TATAGCTAGTGCACATTGATTAATGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT  
 CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGC  
 CCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC  
 TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG  
 TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATG  
 CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT  
 TACCATGGTCGAGGTGAGCCCCAGTTCTGCTTCACTCTCCCATCTCCCCCCCTCCCCACCC  
 CCAATTTGTATTTATTTATTTTAAATTTTGTGTCAGCGATGGGGCGGGGGGGGGGGGG  
 GGCGCGGCCAGGCGGGCGGGCGGGGCGAGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGC  
 GGCAGCCAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGC  
 CCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGGAGTCCGTGCGACGCTGCCTTCGCCCGGTGCC  
 CCGCTCCGCGCGGCTCGCGCGCCCGCCCGGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTG  
 AGCGGGCGGGACGGCCCTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTTGT  
 CTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGG  
 CTCGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGGGAGCGCCGCGTGCCTCCGCGCTGCCGGC  
 GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGCGCGGGGCTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGGAGGGGAGCG  
 CGGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGG  
 TGTGTGCGTGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGCGCGTGGTGGGCTGCAACCCCTGCAC  
 CCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGC  
 CGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGGTGGCGGAGGTGGGGGTGCCGGCGGGGCGGGGCGGCC  
 TCGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCCCGAGCGCCGGCGCTGTGAGGC  
 CGCGGAGCCGAGCCATGCTTTTATGGTAAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGT  
 CCAAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCTCTAGCGGGCGGGGG  
 GAAGCGGTGCGCGCGCGGAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTCGCGCGC  
 CGTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGAC  
 GGGGAGGGCGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTGACCGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGT  
 TATGCTTCTTCTTTTCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATGTGCTGTCTCATCAT  
 TTTGGCAAAGTAATCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACGGGGTCTGCTGTGCGCGCTGC  
 TCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTTCGTAGAGATGTACAGTGA  
 AATCCCGAAATATAACACATGACTGAAGGAAGGAGCTCGTCATTCCTGCGGGTTACGTCA  
 CCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCA  
 TAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAAATGCAACGTACAAAAGAAATAGGGCTTCT  
 GACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCAATTTGTATAAGACAACATATCTCACACATCGACAAC  
 AATACAATCAATAGATGTGTTCTGAGTCCGCTCATGGAATGAACTATCTGTGAGAAAAGC  
 TTGCTTAAATTTGACAGCAAGAATGAACTAAATGTGGGATGACTTCACTGGGAATACCC  
 TTC'TCGAAGCATCAGCAATAAGAACTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAG  
 ATGAAGAAATTTTGGAGCCTTAACTATAGATGGTGTAAACCCGAGTGACCAAGGATTTGACA  
 CCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCACATTTGTCAGGGTCCATGAAAA  
 ACC'TTTGTTGCTTTTGGAAAGTGGCATGGAATCTTGGTGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGC  
 AGAATCCCTGCGAAGTACCTTGGTTACCCACCCCGAGAAATAAAATGGTATAAAAAATGGAATAC  
 CCC'TGAGTCCAAATCACACAATTAAGCGGGGATGTACTGACGATATGGAAGTGAGTGAAG  
 AGACACAGGAAATACACTGTATCCTTACCAATCCCATTTCAAAGGAGAAGCAGAGCCATGTG  
 GTCTCTGTGGTGTGTATGTCCACCGGGCCCGGGCGACAAAATCACACATGCCCACTGTGCC

[0152]

CAGCACCTGAACCTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCCCTTCCCCCAAACCCAAAGGACACCT  
 CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAGCCGCGGGAGG  
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTACGCTCCTCACCCTGCACAGGACTGGCTGAA  
 TGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGCTTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATC  
 TCCAAAGCCAAAGGGGACGCCCGAGAACACAGGTGTACACCCCTGCCCCCATCCGGGATGAGC  
 TGACCAAGAACCAGGTCACCTGACCTGCCTAGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCGT  
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCCGAGAACAACTACAAGGCCACGCTCCCGTGTGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCTTACAGCAAGCTCACCCTGGACAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAAAG  
 TCTTCTCATGCTCCGTGATGATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT  
 GTCTCCGGGTAATGAACGCGTGGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGGCGCTCGAGGACGGGGT  
 AACTACGCTGAGGATCCGATCTTTTCCCTTGCCTGCAAAAATATGGGGACATCATGAAGCCCC  
 TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCAATGCAATAGTGTGTTGGAATTT  
 TTTGTGCTCTCACTCGAAGCAATCGTTGATCTGAATTCGACCAACCATAATACCCATTAC  
 CCTGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTAAATCATTAACACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTG  
 GCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTGCGCCGACGCG  
 CGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAG (SEQ ID NO: 2)

[0153]

[0154]

또한, 본원에 기재된 단리된 핵산을 포함하는 벡터는 본 개시내용의 범주 내이다. 일부 실시양태에서, 벡터는 플라스미드이다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터를 포함하는 플라스미드는 하나 이상의 선택 마커를 추가로 포함한다. 선택 마커는 관련 기술분야에 공지되어 있으며, 항생제 저항성 마커를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 카나마이신 저항성 마커 (예를 들어, 네오마이신 포스포트랜스퍼라제 II (nptII) 유전자)를 포함한다. 일부 실시양태에서, 선택 마커는 암피실린 저항성 마커 (예를 들어, 베타-락타마제 유전자)를 포함한다.

[0155]

pAAV-CBA0KH902의 예시적인 전체 벡터 서열은 서열식별번호: 3에 제시된다. 일부 실시양태에서, rAAV 벡터는 서열식별번호: 3에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함한다:

```

CTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTC
GCCCCGGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTTC
CTTGAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACCAGGGTAATGGGGATCCTCTAGAAC
TATAGCTAGTCACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTT
CATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGAC
TTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATG
CCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTAT
TACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCCCACCC
CCAATTTTGTATTTATTTATTTTAAATATTTTGTGTCAGCGATGGGGGCGGGGGGGGGGGGG
GGCGCGCGCCAGCGGGGCGGGGCGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGCG
GGCAGCCAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCCTTTTATGGCGAGGCGGGCGGGCGGGCGG
CCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGCGGGGAGTTCGTGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCC
CCGCTCCGCGCGCGCTCGCGCCGCGCCCGGGCTCTGACTGACCGGTTACTCCACAGGTG
AGCGGGCGGGACGGCCCTTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAAATGACGGCTTGTTC
CTTTTCTGTGGCTGCGTGAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGAGCGG
CTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCGTGGGCTCCGCGCTGCCCGG
GGCTGTGAGCGCTGCGGGCGCGGCGGGGCTTGTGCGCTCCGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCG
CGGCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGGGGAACAAGGCTGCGTGCGGGG
TGTGTGCGTGGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTGGTCCGGCTGCAACCCCCCTGCAC
CCCCCTCCCCAGTTGCTGAGCACGCGCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGGCG
CGGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGGTGGCGGAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCGGCC
TCGGGCCGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGC
GCGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGT
CCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCACCCCCCTCTAGCGGGCGCGGGGC
GAAGCGGTGCGGCGCCGAGGAAGAAATGGGCGGGGAGGGCCTTCGTGCGTGCCTGCGCGCCGC
CGTCCCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGAC
GGGCGAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATGT
TCATGCCTTCTTCTTTTTCTACAGCTCCTGGCAACGTGCTGGTTATGTGCTGTCTCATCAT
TTTGCAAAGAATTCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACCGGGTCTGCTGTGCGCGCTGC
TCAGCTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGACCTTTCGTAGAGATGTACAGTGA
AATCCCCGAAATTATACACATGACTGAAGGAAGGGAGTCTGTCATTCCCTGCCGGGTACGTCA
CCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAAGTTTCCACTTGACACTTTGATCCCTGATGGAAAACGCA
TAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAACGTACAAAGAAATAGGGCTTCT
GACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAACTATCTCACACATCGACAAACC
AATACAATCATAGATGTGGTCTGAGTCCGCTCATGGAATTGAATATCTGTTGGAGAAAAGC
TTGCTTAAATGTACAGCAAGAACGAACTAAATGTGGGATTGACTTCAACTGGGAATACCC
TTCTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAAACCGAGACCTAAAAACCCAGTCTGGGAGTGAG
ATGAAGAAATTTTGGAGACCTTAACTATAGATGGTGTAAACCGAGTGACCAAGGATTGTACA
CCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCACATTTGTGACGGGTCCATGAAAA
ACCTTTTGTGCTTTTGGAGTGGCATGGAATCTCTGGTGAAGCCACGGTGGGGGAGCGTGTG
AGAATCCCTGCGAAGTACCTTGGTTACCCACCCCAAGAAATAAAATGGTATAAAAAATGGAATAC
CCCTGAGTCCAATCACACAATTAAGCGGGGATGACTGACGATTATGGAAGTGAAGTGAAG
AGACACAGGAAATTACACTGTCATCCTTACCAATCCATTTCAAAGGAGAAGCAGAGCCATGTG
GTCTCTCTGTTGTGTATGTCCACCGGGCCCGGGCGACAAAACCTCACACATGCCCACTGTGCG
    
```

[0156]

CAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCCCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCCT  
 CATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAG  
 GTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGGAGG  
 AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAAGCTCCTCACCGTCTGCACCAGGACTGGCTGAA  
 TGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAAACAAAGCCCTCCAGCCCTATCGAGAAAACCATC  
 TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGC  
 TGACCAAGAACCGGTCAAGCTGACCTGCCTAGTCAAAGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGT  
 GGAGTGGGAGAGCAATGGGCGCCGAGAACAACTACAAGGCCACGCTCCCGTGTGGACTCC  
 GACGGCTCCTTCTTCCCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG  
 TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCT  
 GTCTCCGGGTAAATGAACGCGTGGTACCTCTAGAGTGCACCCGGGCGGCCCTCGAGGACGGGGTG  
 AACTACGCTGAGGATCCGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAATATGGGGACATCATGAAGCCCC  
 TTGAGCATCTGACTTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAAATTT  
 TTTGTGTCTCTCACTCGGAAGCAATTCGTTGATCTGAATTTGACCACCCATAATACCCATTAC  
 CCTGGTAGATAAGTAGCATGGCGGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGTAGGAGTTG  
 GCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTGCGCCGACGCC  
 CGGGCTTTGCCGGGCGCTCAGTGGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTAACCT  
 GGCGCTCGTTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGTTACCCAATTAATCGCCTTGCA  
 GCACATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAAC  
 AGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGGCATTAAAGCGCGGGGGTGT  
 GGTGGTTACGCGCAGCGTACCGCTACACTTGCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCTTTTCGCTTTC  
 TTCCCTTCCCTTTTCGCGCAGTTTCGCGCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTT  
 TAGGGTTCCGATTTAGTGTCTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACCTGATTAGGGTGATGGTTC  
 ACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTT  
 AATAGTGGACTCTTGTCCAACTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGTCTATTTCTTTGATT  
 TATAAGGATTTTTTCGCGCATTTTCGCGCTATGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAATTTAA  
 CGCGAATTTTAAACAAAATATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCG  
 GAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCGCTCATGAGACAATAACC  
 CTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATCAACATTTCCGTGTCCGC  
 CTTATTTCCCTTTTTGCGGCATTTTGCCCTTCCCTGTTTTTGGCTCACCCAGAACGCTGGTGAAG  
 TAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGG  
 TAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTG  
 CTATGTGGCGCGTATTTATCCCGTATTGACGCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGATACACT  
 ATTTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTACCAGTACACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGAC  
 AGTAAGAGAATTTAGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAAAGTGCAGGCAACTTACTTCTG  
 ACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACCTC  
 GCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGTGAATGAAGCCATACCAACGACGAGCGTGACACCACGAT  
 CCTGTGATGAATGGCAACACACTTGGCGAACTATTAACGGCGAAGTACTTACTTAGCTTCC  
 CGGCAACAAATTAAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCCTTCTGCGCTCGGCC  
 TTCCGGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCCGTTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCAT  
 TGACGACTGGGGCCAGATGGTAAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAG  
 CCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAAGCATTTGGT  
 AACTGTGACGACCAAGTTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTCATTTTTTAATTTAA  
 AAGGATCTAGGTGAAGATCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCG  
 TTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTGAGATCCTTTTTTTCTGC  
 GCGTAATCTGCTGCTTGCAAAACAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTTGTTTGGCGGATCA  
 AGCGGCGAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTA  
 CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAA  
 ACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAGG (SEQ ID NO: 3)

[0157]

CCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCG  
 CCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGA  
 GCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGGTTTCGCCAC  
 CTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCA  
 GCAACGCGGCTTTTTACGGTTCCCTGGCCCTTTGCTGGCCCTTTGCTCACATGTTCTTTCTG  
 GTTATCCCTGATTTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGC  
 AGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAAGTGAAGGAGGAGGAGCGCCAAATAGCCAAAC  
 CGCCTCTCCCCGCGCTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAA  
 AGCGGGCAGTGAAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTA  
 CACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAA  
 ACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAGG (SEQ ID NO: 3)

[0158]

일부 실시양태에서, rAAV는 서열식별번호: 30에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다:

[0159]

GGTACCTCTAGAGTCGACCCGGGCGCCTCGAGGACGGGGTGAACCTACGCCTGAGGATCCGATC  
TTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGGGGACATCATGAAGCCCCTTGAGCATCTGACTTCTGGCTA  
ATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGC  
AATTCGTTGATCTGAATTTTCGACCACCCATAATACCCATTACCCTGGTAGATAAGTAGCATGGC  
GGTTAATCATTAACTACAAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTC  
GCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGTCCGCCGACGCCGGGCTTTGCCGGGCGGCCTC  
AGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCCTTAATTAACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT  
GACTGGGAAAACCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCCAGCT  
GGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGA  
ATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCGCATTAAAGCGCGCGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACC  
GCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCTCCTTTTCGCTTCTTCCCTTCCCTTCTCGCCACGT  
TCGCCGGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTT  
ACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGTGGTTCACGTAGTGGCCATCGCCCTGA  
TAGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAA  
CTGGAACAACACTCAACCTATCTCGGCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTC  
GGCTATTGGTTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTA  
ACGCTTACAATTTAGGTGGCACTTTTCGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTT  
CTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATAT  
TGAAAAAGGAAGAGTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGG  
AGAGGCTATTTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCGTGTCCG  
GCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAA  
CTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCTTCTTGGCGAGCTGTGC  
TCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCT  
CCTGTCACTCACCTTGTCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTG  
CATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCAC  
GTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGC  
GCCAGCCGAAGTTCGCCAGGCTCAAGGCGAGCATGCCGACGGCGAGGATCTCGTCTGTGACC  
CATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACT  
GTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGA  
AGAGCTTGGCGCGAATGGGCTGACCGCTTCTCGTGTCTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCG  
CAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTCTTCTGACTGTGACCAAGTTTACTCAT

[0160]

ATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTT  
TGATAATCTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTA  
GAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAA  
AAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAA  
GGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGC  
CACCCTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCTACATACTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGG  
CTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCAGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAA  
GGCGCAGCGGTTCGGCTGAACGGGGGTTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTAC  
ACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAATGATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGG  
CGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGG  
AAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGCGGTTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTG  
TGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGCCTTTTTACGGTTCC  
TGGCCTTTTGTGGCTTTTGTCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCGTGGATAA  
CCGTATTACCGCTTTGAGTGAGTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAG  
TCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGA  
TTCATTAATGCAGCTGGCAGCACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAAT  
TAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATG  
TTGTGTGGAATTTGAGCGGATAACAATTCACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCA  
GATTTAATTAAGGCCTTAATTAGGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGCCGCCCGGGCAAAGC  
CCGGGCGTCGGGCGACCTTTGGTCGCCCCGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGGAGT  
GGCCAACTCCATCACTAGGGGTTCCCTGTAGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACC  
AGGGTAATGGGATCCTCTAGAACTATAGCTAGTCGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAG  
TAATCAATTACGGGTCATTAGTTCATAGCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGG  
TAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGT  
TCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACT  
GCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACG  
GTAAATGGCCCGCTGGCATATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTA  
CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTCGAGGTGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTC  
CCCATCTCCCCCCTCCCAACCCCAATTTTGTATTTATTTATTTTTAATTATTTTGTGCAG  
CGATGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGGGGGGGGGGGAGGGGGGGGG  
CGGGGCGAGGGGAGAGGTGCGGCGGCAGCCAATCAGAGCGGCGGCTCCGAAAGTTTCTTTT  
ATGGCGAGGCGGGCGGCGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGGGGGGGGGAGTCGCTG  
CGCGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGCGCGCCCTCGCGCGCCCGCCCCGGCTCTGACT  
GACCGCGTTACTCCACAGGTGAGCGGGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGC

[0161]

TTGGTTTAAATGACGGCTTGTTCCTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGG  
 GCCCTTTGTGCGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGTGCGTGTGTGTGCGTGCGGAGCGCCGC  
 GTGCGGCTCCGCGCTGCCGGCGGCTGTGAGCGCTGCGGGCGGGCGGGGGCTTTGTGCGCTC  
 CGCAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGGGCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGGCTGCGAGG  
 GGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGGGGTGTGGGCGCGTCGGT  
 CGGGCTGAACCCCCCTGCACCCCCCTCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCCGGCTTCGGGTGCG  
 GGGCTCCGTACGGGGCGTGGCGGGGGCTCGCCGTGCCGGCGGGGGGTGGCGGCAGGTGGGGG  
 TGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGGCTCGGGGAGGGGCGGGCGGGCCCCCG  
 GAGCGCCGCGGGCTGTGAGGCGCGGGCAGCCGAGCCATTGCCTTTTATGGTAATCGTGCGAG  
 AGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGCA  
 CCCCCCTAGCGGGCGGGGGCAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGGAGGG  
 CCTTCGTGCGTCCGCGCGCCGCTCCCTTCTCCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGG  
 GACGGCTGCCTTCGGGGGGACGGGGCAGGGCGGGGTTCCGGCTTCTGGCGTGTGACCGGCGGCT  
 CTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTTCTTTTCTTACAGCTCCTGGGCAACGTGCT  
 GGTATTGTGTGTCTCATATTTTGGCAAAGAATTCGCCACCATGGTCAGCTACTGGGACACC  
 GGGTCTCTGTGTGCGCGTGTCTCAGTGTCTGCTTCTCACAGGATCTAGTTCCGGAGGTAGAC  
 CTTTCGTAGAGATGTACAGTGAATCCCCGAAATATAACACATGACTGAAGGAAGGAGCTCGT  
 CATTCCTGCCGGGTACGTACCTAACATCACTGTTACTTTAAAAAGTTTCCACTTGACACT  
 TTGATCCCTGATGAAAACGCATAATCTGGGACAGTAGAAAGGGCTTCATCATATCAAATGCAA  
 CGTACAAAGAAATAGGGCTTCTGACCTGTGAAGCAACAGTCAATGGGCATTTGTATAAGACAAA  
 CTATCTCACACATCGACAAACCAATACAATCATAGATGTGGTCTGAGTCCGTCTCATGGAATT  
 GAACTATCTGTTGGAGAAAAGCTTGTCTTAAATGTACAGCAAGAACTGAACTAAATGTGGGA  
 TTGACTTCAACTGGGAATACCTTCTTTCGAAGCATCAGCATAAGAACTTGTAACCGAGACCT  
 AAAAACCCAGTCTGGGAGTGAGATGAAGAAATTTTGTAGCACCTTAACTATAGATGGTGTAAAC  
 CGGAGTGACCAAGGATTGTACACCTGTGCAGCATCCAGTGGGCTGATGACCAAGAAGAACAGCA  
 CATTTGTGAGGGTCCATGAAAACCTTTTGTGCTTTTGAAGTGGCATGGAATCTCTGGTGG  
 AGCCACGGTGGGGGAGCGTGTGAGAAATCCCTGCGAAGTACCTTGGTTACCCACCCCGAGAAATA  
 AAATGGTATAAAAATGGAATACCCCTTGAGTCCAATCACACAATTAAGCGGGGATGTACTGA  
 CGATTATGGAAGTGTGAGTGAAGAGACACAGGAAATTACTGTCTATCCTTACCAATCCCATTTT  
 AAAGGAGAAGCAGAGCCATGTGGTCTCTCTGGTGTGTATGTCCACCGGGCCCGGGGACAAA  
 ACTCACACATGCCACTGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCC  
 CCCCCAACCCAGGACACCTCATGATCTCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGG  
 CGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT  
 GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCACCG

[0162]

TCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC  
 AGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC  
 CTGCCCCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCTGACCTGCCTAGTCAAAGGCT  
 TCTATCCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCGAGCCGAGAACAACTACAAGG  
 CAGGCTCCCGTGTGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAG  
 AGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT  
 ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGAACGCGT

[0163]

[0164]

일부 실시양태에서, rAAV는 서열식별번호: 31에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다:

CAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTGAAAAAATG  
CTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATAAACAA  
GTTAACAACAACAATTGCATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGTTTTTT  
AAAGCAAGTAAAACCTCTACAAATGTGGTACTCGAGGAAGCAATTCGTTGATCTGAATTCGAC  
CACCCATAATACCATTACCTGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTACAAGGA  
ACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGA  
CCAAAGGTCGCCCACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGCC  
TTAATTAACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCGTCGCTTAC  
CCAACCTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGCCCCGC  
ACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAGCGGCG  
CATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGC  
GCCCCTCCTTTTCGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTTCGCCGGCTTCCCCGTCAAGCT  
CTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCAAAAAAC  
TTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCTTTGAC  
GTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCCAAACGGAACAACACTCAACCCATC  
TCGGTCTATTCTTTGATTTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGCCCTATTGGTTAAAAAATGAGC  
TGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTAGGTGGCACT  
TTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATC  
CGCTCATGAGACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAGGAAGAGTATGATTGA  
ACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGG  
GCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCCGCGTGTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGG  
TTCTTTTTGTCAAGACCGACTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCGCGGCT  
ATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGA  
AGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTCCCGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTG  
CCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCCGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTG  
CCCATTTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTT  
GTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAAGTTCGCCAGGC  
TCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCTGCTTGCCGAA  
TATCATGGTGAAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGAC  
CGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTG  
ACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTTCGACGCGCATCGCCTTCTATCGCCT

[0165]

TCTTGACGAGTTCTTCTGACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAA  
 CTTCAATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAATCC  
 CTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTG  
 AGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTG  
 GTTTGTTCGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGC  
 AGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACTCTGTAGC  
 ACCGCCTACATACTCGCTCTGCTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCCG  
 TGCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCAGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTGAACGG  
 GGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCG  
 TGAGCTATGAGAAAAGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGC  
 AGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTATAGTC  
 CTGTCGGGTTTTCCGCCACTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAG  
 CCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCT  
 CACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAG  
 CTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCACTGAGCGAGGAAGCGGAAGA  
 GCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCGCGCGTTGGCCGATTCAATTAATGCAGCTGGCACGAC  
 AGGTTTCCCGACTGGAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATT  
 AGGCACCCAGGCTTTACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGGAATTGTGAGCGGATA  
 ACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTAATTAG  
 GCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGTTCGGGCGACCTTTGGT  
 CGCCCGCCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGAGGGAGTGGCCAACCTCCATCACTAGGGGTT  
 CCTTGATGTTAATGATTAACCCGCCATGCTACTTATCTACCAGGTAATGGGGATCCGGAGTTC  
 CGCGTTACATAACTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCAACGACCCCGCCATTGA  
 CGTCAATAATGACGTATGTTCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTCCATTGACGTCAATGGGT  
 GGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCC  
 CCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGG  
 ACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTGCGGTTTTG  
 GCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCAT  
 GACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTGTAACAAC  
 CCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCG  
 TTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGACAC  
 CGACTCTACTAGAGGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGGTGAGTACTGGGACACCGGC  
 GTGCTGCTGTGCGCCCTGCTGAGCTGCCTGCTGCTGACCGGCAGCAGCAGCGGGCGCAGACCTT  
 TCGTGGAGATGTAATCCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGGGAGCTCGTGAT

[0166]

CCCCTGCAGAGTGACCAGCCCCAACATCACCGTGACCCTGAAGAAGTTCCCCTGGACACCCTG  
 ATCCCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCAGAAAGGGCTTCATCATCTCCAACGCCACCT  
 ACAAGGAGATCGGCCTGCTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACCAATTA  
 CCTGACCCACAGGCAGACCAATACCATCATCGACGTGGTGTGTCCCCAGCCACGGCATCGAG  
 CTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAACCTGCACCGCCAGGACCGAGCTGAACGTGGGGATCG  
 ATTTTAAC TGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAATAGGGACCTGAA  
 AACCCAGAGCGGAAGCGAGATGAAGAAGTTTCTGAGCACCCCTGACCATCGACGGCGTGACCCGG  
 AGCGACCAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCCCTCCAGCGGCCCTGATGACTAAGAAGAAGCAGCACCT  
 TTGTGCGGGTGCACGAGAAGCCCTTCGTGGCCTTCGGCAGCGGGATGGAGTCTCTGGTGGAGGC  
 TACCGTGGGCGAGAGAGTGAGAATCCCCGCCAAGTACCTGGGCTACCCCCCTCCTGAGATCAAG  
 TGGTATAAGAACGGCATCCCTCTGGAGTCCAACCACACCATCAAGGCAGGCCACGTGCTGACCA  
 TCATGGAAGTGAGCGAGAGGGACACCGGCAACTACACCGTGATCCTGACCAACCCCATCTCCAA  
 GGAGAAGCAGAGCCACGTGGTGGCTGGTGGTGTACGTGCCTCCAGGGCCCTGGCGATAAGACC  
 CACACATGCCCCCTGTGCCCGCCCCGAGCTGCTGGGCGGACCAAGCGTGTCTCTGTCCCAC  
 CCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGATGT  
 GAGCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTTAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACGCC  
 AAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGAGCGTGTGACCGTGC  
 TGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGCCCTGCCCCG  
 CCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGCGAGCCCCAGGTGTACACACTG  
 CCCCCTAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCT  
 ACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCCCGAGAACAACACTACAAGGCCAC  
 CCCCCCTGTGCTGGACTCCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGTCC  
 CGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTTCAGCTGTAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA  
 CCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGGCAAGTGAACGCGT

[0167]

[0168]

일부 실시양태에서, rAAV는 서열식별번호: 32에 제시된 바와 같은 핵산 서열과 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는 단리된 핵산을 포함한다:

AATTCGATATCAAGCTTATCGATAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGG  
TATTCTTAACTATGTTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCAT  
GCTATTGCTTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTT  
ATGAGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGACGCAAC  
CCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCGGCTTTCCCCTC  
CCTATTGCCACGGCGAACTCATCGCCGCTGCCTTGCCCGCTGCTGGACAGGGGCTCGGCTGT  
TGGGCACAGACAATTCCTGGTGTGTGCGGGAAATCATCGTCTTTTCTTGGCTGCTCGCCTG  
TGTGCCACCTGGATTCTGCGCGGACGTCTTCTGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCG  
GACCTTCTTCCCAGCCCTGCTGCCGGCTTGCAGGCTTTCGGCTTTCGGCTTTCGGCTC  
AGACGAGTCGGATCTCCTTTGGGCCGCTCCCCGCATCGATACCGTCGACCCGGGCGGCCGCT  
TCGAGCAGACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGACAAACCACAAC TAGAATGCAGTAAAA  
AAATGCTTTATTTGTGAAATTTGTGATGCTATTGCTTTATTTGTAACCATTATAAGCTGCAATA  
AACAAAGTTAACAAACAATTGCATTTCATTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGAGATGTGGGAGGT  
TTTTTAAAGCAAGTAAACCTCTACAAATGTGGTACTCGAGGAAGCAATTCGTTGATCTGAATT  
TCGACCACCATAATACCCATTACCTGGTAGATAAGTAGCATGGCGGGTTAATCATTAACTAC  
AAGGAACCCCTAGTGATGGAGTTGGCCACTCCCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCG  
GGCGACCAAGGTGCGCCGACGCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCG  
CAGCCTTAATTAACCTAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTGCTGACTGGGAAAACCCCTGGC  
GTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTGCGCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGG  
CCCGCACCGATCGCCCTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGGACGCGCCCTGTAG  
CGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCC  
CTAGCGCCCGCTCCTTTGCTTTCTTCCCTTCTTCTCGCCACGTTGCGCCGCTTTCCCCTGTC  
AAGCTCTAAATCGGGGCTCCCTTTAGGGTTCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAA  
AAAACCTTGATTAGGGTGATGGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTGATAGACGGTTTTTCGCCCT  
TTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGGACTCTTGTTCAAAACCTGGAACAACACTCAACC  
CTATCTCGGTCTATCTTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTCCGGCTATTGGTTAAAAAA  
TGAGCTGATTTAACAAAAATTTAACGCGAATTTAACAAAAATTAACGCTTACAATTTAGGTG  
GCACTTTTCGGGAAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATAT  
GTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGATATG  
ATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTTCGGCTATG  
ACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCG

[0169]

CCCGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAAGACGAGGCAGCG  
CGGTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAG  
CGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCTACCTTGC  
TCCTGCGGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGGCGCTGCATACGCTTGATCCGGCT  
ACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTIONCGGATGGAAGCCG  
GTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTGCG  
CAGGCTCAAGGCGAGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTG  
CCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGG  
CGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATG  
GGCTGACCGCTTCCCTCGTCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTGCGAGCGCATCGCCTTCTAT  
CGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATT  
TAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAA  
AATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCT  
TCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAG  
CGGTGGTTTGTTCGCCGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAG  
AGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACCTCAAGAACTCT  
GTAGCACCGCTACATACTCGCTCTGTAATCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA  
AGTCGTGCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTTCGGGCTG  
AACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTA  
CAGCGTGAGCTATGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCAGAGGAGAAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAA  
GCGGCAGGGTCCGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGAAACGCCCTGGTATCTTTA  
TAGTCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG  
CGGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTT  
TTGCTCACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGA  
GTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCG  
GAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGC  
ACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCAC  
TCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGC  
GGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAGATTTAATTAAGGCCTTA  
ATTAGGCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGCCGGGCAAAGCCCGGGCGTCGGGCGACCT  
TTGGTCGCCCGGCTCAGTGAGCGAGCGAGCGCGCAGAGGGAGTGGCCAACCTCATCACTAG  
GGTTCCTTGTAGTTAATGATTAACCGCCATGCTACTTATCTACCAGGTAATGGGGATCCGG  
AGTTCCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCC  
ATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAA

[0170]

TGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTA  
 CGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAAGTACATGACCTT  
 ATGGGACTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGG  
 TTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACC  
 CCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCTGTAA  
 CAACTCCGCCCCATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGA  
 GCTCGTTTGTAGTGAACCGTCAAGTCCGCTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAA  
 GACACCGACTCTACTAGAGGATCTATTTCCGGTGAATTCGCCACCATGGTGTAGTACTGGGACA  
 CCGGCGTGTGTGTGCGCCCTGTGAGCTGCCTGTGTGACCGGCAGCAGCAGCGCGGCAG  
 ACCTTTCGTGGAGATGTAATCCGAGATCCCCGAGATCATCCACATGACCGAGGGCAGGGAGCTC  
 GTGATCCCCTGCAGAGTACCAGCCCCAACATCACCGTGACCTGAAGAAGTTCCCCTGGACA  
 CCCTGATCCCCGACGGCAAGAGAATCATCTGGGACAGCAGAAAGGGCTTCATCATCTCCAACGC  
 CACCTACAAGGAGATCGGCGTGTGACCTGCGAGGCCACCGTGAACGGCCACCTGTACAAGACC  
 AATTACCTGACCCACAGGCAGACCAATACCATCATCGACGTGGTGTGTCCCCAGCCACGGCA  
 TCGAGCTGAGCGTGGGCGAGAAGCTGGTGTGAACTGCACCGCCAGGACCGAGCTGAACGTGGG  
 GATCGATTTTAACTGGGAGTACCCAGCAGCAAGCACCAGCACAAGAAGCTGGTGAATAGGGAC  
 CTGAAAACCCAGAGCGGAAGCGAGATGAAGAAGTTTCTGAGCACCTGACCATCGACGGCGTGA  
 CCCGGAGCGACAGGGCCTGTACACCTGCGCCGCTCCAGCGGCTGATGACTAAGAAGAACAG  
 CACCTTTGTGCGGGTGCACGAGAAGCCCTTCGTGGCCTTCGGCAGCGGGATGGAGTCTCTGGTG  
 GAGGCTACCGTGGGCGAGAGAGTGAAGAATCCCCGCCAAGTACCTGGGCTACCCCCCTCTGAGA  
 TCAAGTGGTATAAGAACGGCATCCCTCTGGAGTCCAACCACACCATCAAGGCAGGCCACGTGCT  
 GACCATCATGGAAGTGAAGCGAGAGGGACACCGGCAACTACACCGTGATCTGACCAACCCCATC  
 TCCAAGGAGAAGCAGAGCCACGTGGTGTGAGCCTGGTGGTGTACGTGCCTCCAGGGCCTGGCGATA  
 AGACCCACACATGCCCCCTGTGCCCGCCCCGAGCTGTGGGCGGACCAAGCGTGTTCCTGTT  
 CCCACCCAAGCCTAAGGACACCCCTGATGATCAGCCGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTG  
 GATGTGAGCCACGAGGATCCAGAGGTGAAGTTTAACTGGTATGTGGACGGCGTGGAGGTGCACA  
 ACGCCAAGACCAAGCCAGGGAGGAGCAGTACAACAGCACCTACAGAGTGGTGTGAGCGTGTGAC  
 CGTGTGTGACACGAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGAAGGTGAGCAACAAGGCCCTG  
 CCCGCCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCCCGAGCCCCAGGTGTACA  
 CACTGCCCCCTAGCCGCGACGAGCTGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGACCTGCCTGGTGAAGGG  
 CTCTACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCGAGACAACAATAAAG  
 GCCACCCCCCTGTGTGACTCCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACA  
 AGTCCCGCTGGCAGCAGGGCAACGTGTTGAGCTGTAGCGTGTGACAGGCGCCTGCACAACCA  
 CTACACCCAGAAGTCCCTGAGCCTGAGCCCCGCAAGTGAACGCGT

[0171]

[0172]

일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)는 비-바이러스 플랫폼을 통해 대상체에게 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)는 폐쇄-단부 선형 두가닥 DNA (ceDNA)를 통해 대상체에게 전달될 수 있다. 트랜스진 (예를 들어, 항-VEGF 작용제, 예컨대 KH902)의 전달은 이전에 기재되었으며, 예를 들어, 그의 전체 내용이 본원에 참조로 포함되는 WO2017152149를 참조한다. 일부 실시양태에서, 비대칭 말단 서열 (예를 들어, 비대칭 중단된 자기-상보적 서열)을 갖는 핵산은 일부 실시양태에서, 현재 이용가능한 유전자 전달 벡터에 비해 감소된 면역원성을 나타내는 폐쇄-단부 선형 두가닥 DNA 구조 (예를 들어, ceDNA)를 형성한다. 일부 실시양태에서, ceDNA는 천연 조건 하에서 선형 두가닥 DNA로서 거동하며, 변성 조건 하에서 단일-가닥 원형 DNA로 변환된다. 임의의 특정한 이론에 구애되지 않되, ceDNA는 일부 실시양태에서, 대상체로의 트랜스진 (예를 들어, 항-VEGF 작용제, 예컨대 KH902)의 전달에 유용하다.

[0173]

*안구 조직에의 트랜스진의 AAV-매개 전달*

[0174]

본 개시내용의 측면은 캡시드 단백질 및 트랜스진을 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 AAV를 포함하는 조성물로서, 여기서 트랜스진은 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 것인 조성물에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 핵산은 AAV ITR을 추가로 포함한다.

[0175]

단리된 핵산, 벡터, rAAV, 및 본 개시내용의 본원에 기재된 단리된 핵산, 본원에 기재된 벡터, 또는 본원에 기재된 rAAV를 포함하는 조성물은 관련 기술분야에 공지된 임의의 적절한 방법에 따라 조성물 중에서 대상체에게

전달될 수 있다. 예를 들어, 바람직하게는 생리학상 혼화성 담체에 (예를 들어, 조성물에) 현탁된 rAAV는 대상체, 즉, 숙주 동물, 예컨대 인간, 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니 피그, 햄스터, 닭, 칠면조, 또는 비-인간 영장류 (예를 들어, 마카크)에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서 숙주 동물은 인간을 포함하지 않는다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다.

[0176] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 및/또는 rAAV의 투여는 안구 조직에의 트랜스진 (예를 들어, KH902)의 전달을 발생시킨다. 포유동물 대상체에의 rAAV의 전달은 예를 들어, 안구내 주사, 망막하 주사, 국소 투여 (예를 들어, 점안액)에 의한, 또는 안구 조직에의 포유동물 대상체의 눈 내로의 주사 (예를 들어, 유리체내 주사, 또는 기질내 주사)에 의한 것이다. 본원에 사용된 "안구 조직"은 눈으로부터 유래되거나 눈에 함유된 임의의 조직을 지칭한다. 안구 조직의 비-제한적 예는 뉴런, 망막 (예를 들어, 광수용체 세포), 공막, 맥락막, 망막, 유리체, 황반, 중심와, 시신경 유두, 수정체, 동공, 홍채, 방수, 각막 (예를 들어, 각막세포, 각막 내피 세포, 각막 기저 세포, 각막 날개 세포, 및 각막 편평 세포), 결막 섬모체, 및 시신경을 포함한다. 망막은 눈의 후방에 위치하며, 광수용체 세포를 포함한다. 이들 광수용체 세포 (예를 들어, 간상체, 원추체)는 시야에서 색상, 뿐만 아니라 콘트라스트를 파악함으로써 시력을 제공한다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 및/또는 rAAV의 투여는 각막에의 트랜스진 (예를 들어, KH902)의 전달을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 및/또는 rAAV의 투여는 각막의 각막세포에의 트랜스진 (예를 들어, KH902)의 전달을 발생시킨다.

[0177] 대안적으로, 포유동물 대상체에의 rAAV의 전달은 근육내 주사에 의한 또는 포유동물 대상체의 혈류 내로의 투여에 의한 것일 수 있다. 혈류 내로의 투여는 정맥, 동맥, 또는 임의의 다른 혈관 도관 내로의 주사에 의한 것일 수 있다. rAAV의 근육내 투여의 비-제한적 예시적인 방법은 근육내 (IM) 주사 및 혈관내 사지 주입을 포함한다. 일부 실시양태에서, rAAV는 외과 분야에 널리 공지된 기술인 격리 사지 관류에 의해 혈류 내로 투여되며, 상기 방법은 본질적으로 통상의 기술자가 rAAV 비리온의 투여 전에 사지를 전신 순환으로부터 격리하는 것을 가능하게 한다. 미국 특허 번호 6,177,403에 기재된 격리 사지 관류 기술의 변형은 또한 격리된 사지의 혈관구조 내로 비리온을 투여하여 근육 세포 또는 조직 내로의 형질도입을 잠재적으로 증진시킬 수 있도록 통상의 기술자에 의해 채용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 유리체내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 안구내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 망막하 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 정맥내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 근육내 주사에 의해 투여된다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 바와 같은 rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 중앙내 주사에 의해 투여된다.

[0178] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 및/또는 rAAV의 투여는 VEGF (예를 들어, VEGF 활성화)의 억제를 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 바와 같은 단리된 핵산 및/또는 rAAV의 투여는 안구 조직에서 VEGF (예를 들어, VEGF 활성화)의 억제를 발생시킨다. VEGF 억제의 정도는 임의의 적합한 공지된 방법 (예를 들어, HUVEC 혈관신생 검정, 망막 혈관 발달 검정, 망막 부종 검정, 레이저 손상-유도된 맥락막 신생혈관 (CNV), 알칼리-화상 손상 모델, 또는 봉합선 유도된 CoNV 모델 등)에 의해 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제를 받은 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 및/또는 rAAV로 주사된) 대상체에서 VEGF (예를 들어, VEGF 활성화) 활성화는 비주사된 대상체, 또는 항-VEGF 작용제를 받기 전의 동일한 대상체에 비해 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 100% 억제된다. 일부 실시양태에서, 비주사된 대상체, 또는 항-VEGF 작용제를 받기 전의 대상체에서 VEGF (예를 들어, VEGF 활성화)는 항-VEGF 작용제 투여를 받은 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 및/또는 rAAV로 주사된) 대상체에 비해 적어도 2%, 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 적어도 100%, 적어도 1배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 10 내지 50배 (예를 들어, 10배, 20배, 30배, 40배, 또는 50배), 적어도 50 내지 100배 (예를 들어, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배 또는 100배) 또는 그 초과 더 높다. 일부 실시양태

에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 및/또는 rAAV)의 투여는 1일 초과, 2일 초과, 3일 초과, 4일 초과, 5일 초과, 6일 초과, 7일 초과, 1주 초과 (예를 들어, 8일, 9일, 10일, 11일, 12일, 13일, 또는 14일), 2주 초과 (예를 들어, 15일, 16일, 17일, 18일, 19일, 20일, 또는 21일), 3주 초과 (예를 들어, 22일, 23일, 24일, 25일, 26일, 27일, 또는 28일), 4주 초과 (예를 들어, 29일, 30일, 40일, 50일, 60일, 100일 또는 그 초과), 1개월 초과 (예를 들어, 5주, 6주, 7주, 8주, 9주, 10주, 또는 그 초과), 2개월 초과 (예를 들어, 2개월 내지 2.5개월, 2개월 내지 3개월, 2개월 내지 4개월, 2개월 내지 5개월, 2개월 내지 6개월, 2개월 내지 7개월, 2개월 내지 8개월, 2개월 내지 9개월, 2개월 내지 10개월, 2개월 내지 11개월, 2개월 내지 12개월), 3개월 초과 (예를 들어, 3개월 내지 4개월, 3개월 내지 5개월, 3개월 내지 6개월, 3개월 내지 7개월, 3개월 내지 8개월, 3개월 내지 9개월, 3개월 내지 10개월, 3개월 내지 11개월, 3개월 내지 12개월), 4개월 초과 (예를 들어, 4개월 내지 5개월, 4개월 내지 6개월, 4개월 내지 7개월, 4개월 내지 8개월, 4개월 내지 9개월, 4개월 내지 10개월, 4개월 내지 11개월, 4개월 내지 12개월), 5개월 초과 (예를 들어, 5개월 내지 6개월, 5개월 내지 7개월, 5개월 내지 8개월, 5개월 내지 9개월, 5개월 내지 10개월, 5개월 내지 11개월, 5개월 내지 12개월), 6개월 초과 (예를 들어, 6개월 내지 7개월, 6개월 내지 8개월, 6개월 내지 9개월, 6개월 내지 10개월, 6개월 내지 11개월, 6개월 내지 12개월), 7개월 초과 (예를 들어, 7개월 내지 8개월, 7개월 내지 9개월, 7개월 내지 10개월, 7개월 내지 11개월, 7개월 내지 12개월), 8개월 초과 (예를 들어, 8개월 내지 9개월, 8개월 내지 10개월, 8개월 내지 11개월, 8개월 내지 12개월), 9개월 초과 (예를 들어, 9개월 내지 10개월, 9개월 내지 11개월, 9개월 내지 12개월), 10개월 초과 (예를 들어, 10개월 내지 11개월, 11개월 내지 12개월), 11개월 초과 (예를 들어, 11개월 내지 12개월), 12개월 초과 (예를 들어, 12 내지 15개월, 12-18개월, 12-21개월, 12-2개월), 1년 초과 (예를 들어, 1 내지 1.5년), 2년 초과, 3년 초과, 4년 초과, 5년 초과, 10년 초과, 15년 초과, 20년 초과 또는 그 초과 동안 VEGF (예를 들어, VEGF 활성화)의 억제를 발생시킨다.

[0179] 본 개시내용의 조성물은 rAAV를 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 바이러스 (예를 들어, 하나 이상의 상이한 트랜스젠을 갖는 코딩하는 제2 rAAV)와 조합으로 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조성물은 각각 하나 이상의 상이한 트랜스젠을 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개, 또는 그 초과 상이한 rAAV를 포함한다.

[0180] 일부 실시양태에서, 조성물은 제약상 허용되는 담체를 추가로 포함한다. 적합한 담체는 rAAV와 관련된 적응증의 관점에서 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 한 적합한 담체는 다양한 완충 용액 (예를 들어, 포스페이트 완충 염수)로 제제화될 수 있는 염수를 포함한다. 다른 예시적인 담체는 멸균 염수, 락토스, 수크로스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참깨유, 및 물을 포함한다. 담체의 선택은 본 개시내용의 제한이 아니다.

[0181] 임의로, 본 개시내용의 조성물은 rAAV 및 담체(들) 외에도, 다른 통상적인 제약 성분, 예컨대 보존제, 또는 화학 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 소르브산칼륨, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀, 파라클로로페놀, 및 폴록사머 (비-이온성 계면활성제), 예컨대 플루로닉(Pluronic)<sup>®</sup> F-68을 포함한다. 적합한 화학 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.

[0182] rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)은 과도한 유해 효과 없이 목적하는 조직의 세포를 형질감염시키고, 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하는 충분한 양으로 투여된다. 통상적인 및 제약상 허용되는 투여의 경로는 선택된 기관에의 직접 전달 (예를 들어, 눈의 유리체 내 전달), 안구내 주사, 망막하 주사, 경구, 흡입 (비내 및 기관내 전달을 포함함), 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 종양내, 및 다른 비경구 투여의 경로를 포함하나 이에 제한되지는 않는다. 투여의 경로는 목적하는 경우 조합될 수 있다.

[0183] 특정한 "치료 효과"를 달성하는데 요구되는 rAAV 비리온의 용량, 예를 들어, 계통 카피/체중의 킬로그램 당 (GC/kg)의 용량의 단위는 rAAV 비리온 투여의 경로, 치료 효과를 달성하는데 요구되는 유전자 또는 RNA 발현의 수준, 치료되는 특이적 질환 또는 장애, 및 유전자 또는 RNA 산물의 안정성을 포함하나 이에 제한되지는 않는 몇몇 인자에 기반하여 달라질 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 상기 언급된 인자, 뿐만 아니라 관련 기술분야에 널리 공지된 다른 인자에 기반하여 특정한 질환 또는 장애를 갖는 환자를 치료하기 위한 rAAV 비리온 용량 범위를 용이하게 결정할 수 있다.

[0184] rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)의 유효량은 동물을 표적 감염시키고, 목적하는 조직 (예를 들어, 근육 조직, 안구 조직 등)을 표적화하는데 충분한 양이다. 일부 실시양태에서, rAAV의 유효량은 퇴행성 질환의 증상전 단계 동안 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, 대상체는 퇴행성 질환의 하나 이상의 징후 또는 증상을 나타낸 후에 rAAV 또는 조성물이 투여된다. 일부 실시양태

에서, 유효량은 주로 대상체의 종, 연령, 중량, 건강, 및 치료되는 조직과 같은 인자에 의존할 것이며, 따라서 동물 및 조직 사이에 달라질 수 있다. 예를 들어, rAAV의 유효량은 일반적으로 약  $10^6$  내지  $10^{16}$  게놈 카피 (예를 들어,  $1 \times 10^6$  내지  $1 \times 10^{16}$  (경계값 포함))를 함유하는 약 1 ml 내지 약 100 ml의 용액의 범위이다. 일부 실시양태에서, rAAV의 유효량은  $1 \times 10^9$  내지  $1 \times 10^{14}$  게놈 카피의 rAAV의 범위이다. 일부 경우에, 약  $10^{11}$  내지  $10^{12}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $10^{11}$  내지  $10^{13}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $10^{11}$  내지  $10^{14}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $10^{11}$  내지  $10^{15}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $10^{12}$  내지  $10^{14}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $10^{13}$  내지  $10^{14}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 체중의 킬로그램 (kg) 당 약  $1 \times 10^{12}$ , 약  $1.1 \times 10^{12}$ , 약  $1.2 \times 10^{12}$ , 약  $1.3 \times 10^{12}$ , 약  $1.4 \times 10^{12}$ , 약  $1.5 \times 10^{12}$ , 약  $1.6 \times 10^{12}$ , 약  $1.7 \times 10^{12}$ , 약  $1.8 \times 10^{12}$ , 약  $1.9 \times 10^{12}$ , 약  $1 \times 10^{13}$ , 약  $1.1 \times 10^{13}$ , 약  $1.2 \times 10^{13}$ , 약  $1.3 \times 10^{13}$ , 약  $1.4 \times 10^{13}$ , 약  $1.5 \times 10^{13}$ , 약  $1.6 \times 10^{13}$ , 약  $1.7 \times 10^{13}$ , 약  $1.8 \times 10^{13}$ , 약  $1.9 \times 10^{13}$ , 또는 약  $2.0 \times 10^{14}$  벡터 게놈 (vg) 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서, 약  $4 \times 10^{12}$  내지  $2 \times 10^{13}$  rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 일부 실시양태에서 정맥내 투여에 의한 약  $1.5 \times 10^{13}$  vg/kg의 투여량이 적절하다. 특정 실시양태에서,  $10^{12}$  -  $10^{13}$  rAAV 게놈 카피는 조직 (예를 들어, 눈)을 표적화하는데 유효하다. 특정 실시양태에서,  $10^{13}$  -  $10^{14}$  rAAV 게놈 카피는 조직 (예를 들어, 눈)을 표적화하는데 유효하다.

[0185] 일부 실시양태에서, rAAV는 대상체 내로 주사된다. 다른 실시양태에서, rAAV는 국소 투여 (예를 들어, 점안액)에 의해 대상체에게 투여된다. 일부 실시양태에서, rAAV의 유효량은 대상체의 표적 조직 (예를 들어, 눈)에서 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 유효량을 발현하는데 충분한 양이다.

[0186] 일부 실시양태에서, 주사에 의한 rAAV의 유효량의 전달 (예를 들어, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902))를 코딩하는 rAAV를 전달하는 것은 표적 조직에서 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 유효량을 발현하는데 충분하도록 하는 양으로의 전달이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV의 유효량의 전달은 적합한 투여의 경로 (예를 들어, 안구내 주사, i.v. 주사, 복강내 주사 및 근육내 주사)에 의한 대상체에게 눈당 10 µg 내지 10 mg의 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902) 또는 그 사이의 임의의 중간 값을 전달하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV는 대상체에게 눈당 20 µg 내지 5 mg 또는 그 사이의 임의의 중간 값의 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 전달하는데 충분하다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV는 대상체에게 눈당 10 µg, 20 µg, 30 µg, 40 µg, 50 µg, 60 µg, 70 µg, 80 µg, 90 µg, 100 µg, 200 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg, 1 mg, 1.5 mg, 2 mg, 2.5 mg, 3 mg, 3.5 mg, 4 mg, 4.5 mg, 5 mg, 5.5 mg, 6 mg, 6.5 mg, 7 mg, 7.5 mg, 8 mg, 8.5 mg, 9 mg, 9.5 mg, 10 mg 또는 그 초과인 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 전달하는데 충분하다.

[0187] 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV는 1일 1회, 1주 1회, 2주마다 1회, 1개월 1회, 2개월마다 1회, 3개월마다 1회, 6개월마다 1회, 1년 1회, 또는 대상체의 일생에 1회 대상체에게 투여된다.

[0188] 일부 실시양태에서, 국소 투여, 예컨대 점안액에 의한 rAAV의 유효량의 전달 (예를 들어, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902))를 코딩하는 rAAV를 전달하는 것은 표적 조직에서 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 유효량을 발현하는데 충분하도록 하는 양으로의 전달이다. 일부 실시양태에서, 코딩하는 rAAV를 함유하는 점안액은 1주 1회, 1개월 1회, 3개월마다 1회, 6개월마다 1회, 또는 1년 1회 대상체에게 투여된다.

[0189] 일부 실시양태에서, 점안액은 항-VEGF 작용제를 1 mg/ml 내지 20 mg/ml의 농도로 전달하는데 충분한 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV를 포함한다. 일부 실시양태에서, 점안액은 항-VEGF 작용제를 2.5 mg/ml 내지 10 mg/ml의 농도로 전달하는데 충분한 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV를 포함한다. 일부 실시양태에서, 점안액은 항-VEGF 작용제를 1 mg/ml, 2 mg/ml, 2.5 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml, 6 mg/ml, 7 mg/ml, 8 mg/ml, 9 mg/ml, 10 mg/ml, 11 mg/ml, 12 mg/ml, 13 mg/ml, 14 mg/ml, 15 mg/ml, 16 mg/ml, 17 mg/ml, 18 mg/ml, 19 mg/ml, 또는 20 mg/ml의 농도로 전달하는데 충분한 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 rAAV를 포함한다. 일부 실시양태에서, 점안액은 0.01 ml, 0.02 ml, 0.03 ml, 0.04

ml, 0.05 ml, 0.06 ml, 0.07 ml, 0.08 ml, 0.09 ml, 0.1 ml, 0.2 ml, 0.3 ml, 0.4 ml 또는 0.5 ml로 투여된다.

- [0190] rAAV 또는 조성물 (예를 들어, 본원에 기재된 단리된 핵산 또는 rAAV를 함유하는 조성물)의 유효량은 또한 투여의 방식에 의존할 수 있다. 예를 들어, 기질내 투여 또는 피하 주사에 의해 안구 (예를 들어, 각막) 조직을 표적화하는 것은 일부 경우에, 또 다른 방법 (예를 들어, 전신 투여, 국소 투여)에 의해 안구 (예를 들어, 각막) 조직을 표적화하는 것과 상이한 (예를 들어, 더 높은 또는 더 낮은) 용량을 요구할 수 있다. 일부 실시양태에서, 특정 혈청형 (예를 들어, AAV2, AAV5, AAV6, AAV6.2, AAV7, AAV8, AAV9, AAVrh.8, AAVrh.10, AAVrh.39, 및 AAVrh.43)을 갖는 rAAV의 기질내 주사 (IS)는 안구 (예를 들어, 각막, 망막 등) 세포의 효율적인 형질도입을 매개한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 주사는 기질내 주사 (IS)이다. 일부 실시양태에서, 주사는 국소 투여 (예를 들어, 눈의 국소 투여)이다. 일부 경우에, rAAV의 다중 용량이 투여된다.
- [0191] 일부 실시양태에서, rAAV 조성물은 특히 높은 rAAV 농도가 존재하는 경우 (예를 들어,  $\sim 10^{13}$  GC/mL 또는 그 초과), 조성물에서 AAV 입자의 응집을 감소시키도록 제제화된다. rAAV의 응집을 감소시키는 방법은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있으며, 예를 들어, 계면활성제의 첨가, pH 조정, 염 농도 조정 등을 포함한다. (예를 들어, 그의 내용이 본원에 참조로 포함되는 문헌 [Wright FR, et al., Molecular Therapy (2005) 12, 171-178] 참조.)
- [0192] 제약상 허용되는 부형제 및 담체 용액의 제제는 다양한 치료 요법에 본원에 기재된 특정한 조성물을 사용하기 위한 적합한 투여 및 치료 요법의 개발에서와 같이, 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 널리 공지되어 있다.
- [0193] 전형적으로, 이들 제제는 적어도 약 0.1%의 활성 화합물 또는 그 초과를 함유할 수 있지만, 활성 성분(들)의 백분율은 물론 달라질 수 있으며, 편리하게는 총 제제의 중량 또는 부피의 약 1 또는 2% 내지 약 70% 또는 80% 또는 그 초과일 수 있다. 자연적으로, 각각의 치료적으로 유용한 조성물에서 활성 성분의 양은 적합한 투여량이 화합물의 임의의 주어진 단위 용량에서 수득될 방식으로 제조될 수 있다. 용해도, 생체이용률, 생물학적 반감기, 투여의 경로, 산물 저장-수명, 뿐만 아니라 다른 약리학적 고려사항과 같은 인자는 이러한 제약 체제를 제조하는 관련 기술분야의 통상의 기술자에 의해 고려될 것이며, 따라서, 다양한 투여량 및 치료 요법이 바람직할 수 있다.
- [0194] 특정 상황에서 본원에 개시된 적합하게 제제화된 제약 조성물 중 rAAV-기반 치료 구축물을 유리체내로, 안구내로, 망막하로, 기질내로, 피하로, 체장내로, 비내로, 비경구로, 정맥내로, 근육내로, 경막내로, 경구로, 복강내로, 또는 흡입에 의해 전달하는 것이 바람직할 것이다. 일부 실시양태에서, 미국 특허 번호 5,543,158; 5,641,515 및 5,399,363 (각각 구체적으로 그 전문이 본원에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 투여 양상은 rAAV를 전달하는데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 바람직한 투여의 방식은 간문맥 주사에 의한 것이다.
- [0195] 주사가 가능한 용도에 적합한 제약 형태는 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 주사가 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 분말을 포함한다. 분산액은 또한 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물에서 및 오일에서 제조될 수 있다. 저장 및 사용의 통상적인 조건 하에서, 이들 제제는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 많은 경우에, 형태는 멸균이고, 용이하게 시린지화되는 정도까지 유체이다. 이는 제조 및 저장의 조건 하에서 안정해야 하고, 미생물, 예컨대 박테리아 및 진균의 오염 작용에 대해 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 코팅, 예컨대 레시틴의 사용에 의해, 분산액의 경우에 요구되는 입자 크기의 유지에 의해, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물의 작용의 방지는 다양한 항박테리아제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 야기될 수 있다. 많은 경우에, 등장성제, 예를 들어, 당 또는 염화나트륨을 포함시키는 것이 바람직할 것이다. 주사가 가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 모노스테아르산알루미늄 및 젤라틴의 조성물에서의 사용에 의해 야기될 수 있다.
- [0196] 주사가 가능한 수용액의 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 적합하게는 완충될 수 있으며, 필요에 따라, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코스로 등장성이 된다. 이들 특정한 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복강내 투여에 특히 적합하다. 이에 관하여, 채용될 수 있는 멸균 수성 매질은 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있을 것이다. 예를 들어, 하나의 투여량은 1 mL의 등장성 NaCl 용액에 용해되고, 1000 mL의 대량피하주사 유체에 첨가되거나, 제안된 주입의 부위에서 주사될 수 있다 (예를 들어, 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" 15th Edition, pages 1035-1038 and 1570-1580] 참조). 투여량의 일부 변동은 반대

시 숙주의 상태에 따라 일어날 것이다. 투여를 담당하는 사람은 어떠한 경우에도 개별적 숙주에 대한 적절한 용량을 결정할 것이다.

- [0197]     멸균 주사가 가능한 용액은 활성 rAAV를 요구되는 양으로 적절한 용매에 본원에 열거된 다양한 다른 성분과 함께 혼합하고, 필요에 따라 이어서 멸균 여과함으로써 제조된다. 일반적으로, 분산액은 다양한 멸균된 활성 성분을 염기성 분산 매질 및 상기 열거된 것들로부터의 요구되는 다른 성분을 함유하는 멸균 비히클 내로 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사가 가능한 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우에, 바람직한 제조 방법은 활성 성분 플러스 그의 이전에 멸균-여과된 용액으로부터의 임의의 추가의 목적하는 성분의 분말을 생성하는 진공-건조 및 동결-건조 기술이다.
- [0198]     본원에 개시된 rAAV 조성물은 또한 증성 또는 염 형태로 제제화될 수 있다. 제약상-허용되는 염은 산 부가 염 (단백질의 유리 아미노 기로 형성됨) 및 무기 산, 예컨대, 예를 들어, 염산 또는 인산으로 형성된 것, 또는 아세트산, 옥살산, 타르타르산, 만델산 등과 같은 유기 산으로 형성된 것을 포함한다. 유리 카르복실 기로 형성된 염은 또한 무기 염기, 예컨대, 예를 들어, 나트륨, 칼륨, 암모늄, 칼슘, 또는 수산화제2철, 및 유기 염기, 예컨대 이소프로필아민, 트리메틸아민, 히스티딘, 프로카인 등으로부터 유래될 수 있다. 제제화시, 용액은 투여 제제와 혼화성인 방식으로 및 치료적으로 유효한 바와 같은 양으로 투여될 것이다. 제제는 다양한 투여 형태, 예컨대 주사가 가능한 용액, 약물-방출 캡슐 등으로 용이하게 투여된다.
- [0199]     본원에 사용된 "담체"는 임의의 및 모든 용매, 분산 매질, 비히클, 코팅, 희석제, 항박테리아제 및 항진균제, 등장성제 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등을 포함한다. 제약 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 작용제의 사용은 관련 기술분야에 널리 공지되어 있다. 보충적 활성 성분은 또한 조성물 내로 혼합될 수 있다. 어구 "제약상-허용되는"은 숙주에게 투여되는 경우 알레르기 또는 유사한 뜻밖의 반응을 생성하지 않는 분자 실체 및 조성물을 지칭한다.
- [0200]     전달 비히클, 예컨대 리포솜, 나노캡슐, 미세입자, 미세구, 지질 입자, 베지클 등은 적합한 숙주 세포 내로의 본 개시내용의 조성물의 도입에 사용될 수 있다. 특히, rAAV 벡터 전달된 트랜스진은 지질 입자, 리포솜, 베지클, 나노구, 또는 나노입자 등에 캡슐화되어 전달을 위해 제제화될 수 있다.
- [0201]     이러한 제제는 본원에 개시된 핵산 또는 rAAV 구축물의 제약상 허용되는 제제의 도입에 바람직할 수 있다. 리포솜의 형성 및 사용은 일반적으로 관련 기술분야의 통상의 기술자에게 공지되어 있다. 최근, 개선된 혈청 안정성 및 순환 반감기를 갖는 리포솜이 개발되었다 (미국 특허 번호 5,741,516). 또한, 잠재적 약물 담체로서의 리포솜 및 리포솜 유사 제제의 다양한 방법이 기재되었다 (미국 특허 번호 5,567,434; 5,552,157; 5,565,213; 5,738,868 및 5,795,587).
- [0202]     리포솜은 다른 절차에 의한 형질감염에 대해 통상적으로 저항성인 다수의 세포 유형과 함께 성공적으로 사용되었다. 또한, 리포솜은 바이러스-기반 전달 시스템의 전형적인 DNA 길이 제약으로부터 자유롭다. 리포솜은 유전자, 약물, 방사선치료제, 바이러스, 전사 인자 및 알로스테릭 이펙터를 다양한 배양된 세포주 및 동물 내로 도입하는데 효과적으로 사용되었다. 또한, 리포솜-매개 약물 전달의 유효성을 조사하는 몇몇 성공적인 임상 시험이 완결되었다.
- [0203]     리포솜은 수성 매질에 분산된 인지질로부터 형성되고, 자발적으로 다층판성 동심원성 이중층 베지클 (또한 다층판성 베지클 (MLV))로 용어화됨을 형성한다. MLV는 일반적으로 25 nm 내지 4 μm의 직경을 갖는다. MLV의 초음파처리하는 코어에 수용액을 함유하는 200 내지 500 Å의 범위의 직경을 갖는 작은 단층판성 베지클 (SUV)의 형성을 발생시킨다.
- [0204]     대안적으로, rAAV의 나노캡슐 제제가 사용될 수 있다. 나노캡슐은 일반적으로 안정하고 재현가능한 방식으로 물질을 트랩할 수 있다. 세포내 중합체성 오버로딩으로 인한 부작용을 회피하기 위해, 이러한 초미세 입자 (대략 0.1 μm 크기)는 생체내에서 분해될 수 있는 중합체를 사용하여 디자인되어야 한다. 이들 요건을 충족시키는 생체분해성 폴리알킬-시아노아크릴레이트 나노입자는 사용을 위해 고려된다.
- [0205]     상기 기재된 전달 방법 외에도, 하기 기술은 또한 rAAV 조성물을 숙주에게 전달하는 대안적인 방법으로서 고려된다. 초음파치료 (즉, 초음파)는 순환계 내로의 및 그를 통한 약물 침투의 속도 및 효능을 증진시키기 위한 장치로서 사용되었으며, 미국 특허 번호 5,656,016에 기재되었다. 고려되는 다른 약물 전달 대안은 골내 주사 (미국 특허 번호 5,779,708), 마이크로칩 장치 (미국 특허 번호 5,797,898), 안과 제제 (Bourlais et al., 1998), 경피 매트릭스 (미국 특허 번호 5,770,219 및 5,783,208) 및 피드백-제어된 전달 (미국 특허 번호 5,697,899)이다.

- [0206] 일부 실시양태에서, 본원에 기재된 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)는 ceDNA에 의해 대상체에게 전달된다. 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 ceDNA를 함유하는 임의의 조성물은 또한 본 개시내용의 범주 내이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 ceDNA 및 그의 조성물은 본원에 기재된 임의의 적합한 방법을 사용하여 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시양태에서, 주사에 의한 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 ceDNA의 유효량의 전달은 표적 조직에서 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)의 유효량을 발현하는데 충분하도록 하는 양으로의 전달이다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 ceDNA의 유효량의 전달은 적합한 투여의 경로 (예를 들어, 안구내 주사, i.v. 주사, 복강내 주사 및 근육내 주사)에 의해 대상체에게 눈당 10 µg 내지 10 mg의 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902) 또는 그 사이의 임의의 중간 값을 전달하는데 충분하다. 일부 측면에서, 본 개시내용은 대상체에게 AAV를 투여하기 위한 한 잠재적인 부작용이 염증을 포함하는 AAV에 대한 대상체에서의 면역 반응이라는 인식에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 본원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 rAAV의 투여 전에 면역억제된다.
- [0207] 본원에 사용된 "면역억제된" 또는 "면역억제"는 대상체에서의 면역 반응의 활성화 또는 효능의 감소를 지칭한다. 면역억제는 리톡시맙, 메틸프레드니솔론, 프레드니솔론, 시롤리무스, 이뮤노글로불린 주사, 프레드니손, 솔루-메드롤(Solu-Medrol), 란소프라졸, 트리메토프림/술과메톡사졸, 메토티렉세이트, 및 이들의 임의의 조합을 포함하나 이에 제한되지는 않는 하나 이상의 (예를 들어, 다수의, 예컨대 2, 3, 4, 5개, 또는 그 초과) 작용제를 사용하여 대상체에서 유도될 수 있다. 일부 실시양태에서, 면역억제 요법은 시롤리무스, 프레드니솔론, 란소프라졸, 트리메토프림/술과메톡사졸, 또는 이들의 임의의 조합을 투여하는 것을 포함한다.
- [0208] 일부 실시양태에서, 개시내용에 의해 기재된 방법은 대상체가 rAAV (예를 들어, 본 개시내용에 의해 기재된 바와 같은 rAAV 또는 제약 조성물)가 투여되기 전에 대상체에서 면역억제를 유도하는 (예를 들어, 하나 이상의 면역억제제를 투여하는) 단계를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 대상체는 대상체에의 rAAV의 투여 전에 약 30일 내지 약 0일 (예를 들어, rAAV의 투여까지 30일 사이의 임의의 시간, 경계값 포함)에 면역억제된다 (예를 들어, 면역억제가 대상체에서 유도됨). 일부 실시양태에서, 대상체는 적어도 7일 동안 면역 억제 (예를 들어, 리톡시맙, 시롤리무스, 및/또는 프레드니손)로 사전-처리된다.
- [0209] 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 기재된 방법은 본 개시내용의 rAAV 또는 rAAV를 포함하는 제약 조성물이 투여된 대상체에의 작용제의 공동-투여 또는 사전 투여를 추가로 포함한다. 일부 실시양태에서, 작용제는 미글루스타트(Miglustat), 케프라(Keppra), 프레바시드(Prevacid), 클로나제팜(Clonazepam), 및 이들의 임의의 조합으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV) 및 추가의 작용제는 임의의 순서로 대상체에게 전달될 수 있다. 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV) 및 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜)는 동시에 대상체에게 전달된다. 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV) 및 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜)는 대상체에게 공동-투여된다 (예를 들어, 하나의 조성물에서 또는 상이한 조성물에서). 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV)는 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜) 전에 전달된다. 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV)는 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜) 후에 전달된다. 일부 실시양태에서, rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV) 및 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜)는 상이한 빈도로 대상체에게 전달되며, 예를 들어, 대상체는 rAAV (예를 들어, KH902에 대한 rAAV)를 매월, 2개월마다, 6개월마다, 매년, 2년마다, 3년마다, 5년마다, 또는 그 초과 받지만, 추가의 작용제 (예를 들어, 미글루스타트, 케프라, 프레바시드, 클로나제팜)를 매일, 매주, 격주로, 매월, 1일 2회, 1일 3회, 또는 1주 2회 받는다.
- [0210] 일부 실시양태에서, 대상체의 면역억제는 rAAV 또는 제약 조성물의 투여 동안 및/또는 후에 유지되었다. 일부 실시양태에서, 대상체는 rAAV 또는 제약 조성물의 투여 후 1일 내지 1년 동안 면역억제된다 (예를 들어, 하나 이상의 면역억제제가 투여됨).
- [0211] *VEGF 및/또는 혈관신생과 연관된 질환을 치료하는 방법*
- [0212] 본 개시내용의 측면은 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 코딩하는 트랜스진을 대상체 (예를 들어, 대상체에서의 세포)에게 전달하는 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 인간이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 비-인간 포유동물이다. 비-인간 포유동물의 비-제한적 예는 마우스, 래트, 고양이, 개, 양, 토끼, 말, 소, 염소, 돼지, 기니 피그, 햄스터, 닭, 칠면조, 또는 비-인간 영장류이다.
- [0213] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 VEGF 활성의 억제를 필요로 하는 대상체에서 VEGF 활성을 억제하는 방법에

관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 방법은 VEGF와 연관된 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는데 유용하다. 본원에 사용된 "VEGF-연관 질환"은 비정상적 VEGF 활성화/신호전달과 연관된 질환의 세트를 지칭한다. VEGF는 혈관의 형성을 자극하는 세포에 의해 생산되는 신호 단백질이다. VEGF는 혈관신생을 유도하는 공지된 인자이다. 일부 실시양태에서, 본 개시내용에 의해 기재된 방법은 혈관신생 연관 질환을 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체를 치료하는데 유용하다. 본원에 사용된 혈관신생 연관 질환은 비정상적 혈관신생과 관련된 질환을 지칭한다. 비-제한적 예시적인 혈관신생 연관 질환은 예를 들어, 혈관신생 연관 눈 질환을 포함하는 혈관신생-의존성 암, 고형 종양 (예를 들어, 폐암, 유방암, 신장암, 간암, 췌장암, 두경부암, 결장암, 흑색종), 혈액 유래 종양, 예컨대 백혈병, 전이성 종양, 양성 종양 (예를 들어, 혈관종, 청신경집종, 신경섬유종, 트라코마, 및 화농 육아종), 류마티스 관절염, 건선, 피부홍조, 오시에르-웨버 증후군, 심근 혈관신생, 플라크 신생혈관화, 모세혈관확장증, 혈우병 관절, 또는 혈관섬유종을 포함한다.

[0214] 일부 실시양태에서, 혈관신생-연관 눈 질환은 각막 신생혈관화 (CoNV), 당뇨병성 망막병증, 미숙아 망막병증, 황반 변성, 각막 이식편 거부, 신생혈관 녹내장, 및 수정체후방 섬유증식증, 유행성 각막결막염, 비타민 A 결핍증, 콘택트 렌즈 과도착용, 아토피성 각막염, 상윤부 각막염, 익상편 건성 각막염, 쇼그렌, 여드름 장미증, 소수포증, 매독, 미코박테리아 감염, 지질 변성, 화학적 화상, 박테리아성 궤양, 진균성 궤양, 단순 포진 감염, 대상 포진 감염, 원충 감염, 카포시 육종, 무륜 궤양, 테리엔 변연 변성, 변연 각질용해증, 류마티스 관절염, 전신 루푸스, 다발동맥염, 외상, 베게너 사르코이드증, 공막염, 스티븐 존슨병, 유사천포창 방사상 각막절개, 및 각막 이식편 거부, 겸상 적혈구 빈혈, 사르코이드, 탄성섬유 가황색종, 파제트병, 정맥 폐색, 동맥 폐색, 경동맥 폐쇄성 질환, 만성 포도막염/유리체염, 미코박테리아 감염, 라임병, 전신 홍반 루푸스, 미숙아 망막병증, 일스병, 베체트병, 망막염 또는 맥락막염을 유발하는 감염, 추정 안구 히스토플라스마증, 베스츠병, 근시, 시와, 스타가르트병, 주변 포도막염, 만성 망막 박리, 과다점성 증후군, 독소플라스마증, 외상 또는 레이저후 합병증을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[0215] 본원에 사용된 용어 "치료하는"은 비정상적 VEGF 활성화 또는 혈관신생과 연관된 장애, 질환의 증상, 또는 질환에 대한 소인을 치료하거나, 치유하거나, 경감시키거나, 완화시키거나, 변경시키거나, 교정하거나, 개선시키거나, 개선시키거나, 양향을 미칠 목적으로, 비정상적 VEGF 활성화 또는 혈관신생과 연관된 증상 또는 질환, 또는 비정상적 VEGF 활성화 또는 혈관신생과 연관된 질환에 대한 소인을 갖는 대상체에의 항-VEGF 작용제 (예를 들어, KH902)를 포함하는 조성물의 적용 또는 투여를 지칭한다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제의 투여는 참조 값에 비해 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% VEGF 활성화의 감소를 발생시킨다. VEGF 활성을 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다. 비-제한적 예시적인 참조 값은 항-VEGF 작용제 치료를 받기 전의 동일한 대상체의 VEGF 활성화일 수 있다. 일부 실시양태에서, 항-VEGF 작용제의 투여는 참조 값에 비해 2%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 혈관신생의 감소를 발생시킨다. 혈관신생을 측정하는 방법과 관련 기술분야에 공지되어 있다. 비-제한적 예시적인 참조 값은 항-VEGF 작용제 치료를 받기 전의 동일한 대상체의 혈관신생의 수준일 수 있다.

[0216] 일부 실시양태에서, 본 개시내용은 각막 신생혈관화 (CoNV)의 감소를 필요로 하는 대상체에서 CoNV를 감소시키는 (예를 들어, 비치료된 대상체, 또는 투여 전의 대상체에서에 비해 CoNV를 감소시키는) 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 방법은 비치료된 대상체, 또는 투여 전의 대상체에서에 비해 CoNV를 적어도 5%, 적어도 10%, 적어도 20%, 적어도 30%, 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 99%, 또는 100% 감소시킨다. CoNV를 측정하는 방법은 관련 기술분야에 공지되어 있다 (예를 들어, 시각 간섭 단층촬영 혈관촬영술 (OCTA), 인도시아닌 그린 혈관촬영술 (ICGA) 등). CoNV를 측정하는 임의의 적합한 방법이 본원에 사용될 수 있다.

[0217] 비정상적 VEGF 활성화 또는 혈관신생과 연관된 질환을 경감시키는 것은 질환의 발달 또는 진행을 지연시키거나, 질환 중증도를 감소시키는 것을 포함한다. 질환을 경감시키는 것은 반드시 치료적 결과를 요구하지는 않는다. 본원에 사용된 질환 (예컨대 비정상적 VEGF 활성화 또는 혈관신생과 연관된 질환)의 발달을 "지연시키는"은 질환의 진행을 지체시키고/거나, 저해하고/거나, 감속시키고/거나, 지연시키고/거나, 안정화시키고/거나, 연기하는 것을 의미한다. 이 지연은 질환의 내력 및/또는 치료되는 개체에 따라, 다양한 시간의 길이의 것일 수 있다. 질환의 발달을 "지연시키는" 또는 경감시키는, 또는 질환의 발병을 지연시키는 방법은 방법을 사용하지 않는 것과 비교할 경우, 주어진 기간에서 질환의 하나 이상의 증상을 발달시킬 가능성을 감소시키는 및/또는 주어진 기간에서 증상의 정도를 감소시키는 방법이다. 이러한 비교는 전형적으로 통계적으로 유의한 결과를 제공하는데 충분한 다수의 대상체를 사용한 임상 연구에 기반한다.

[0218] 질환의 "발달" 또는 "진행"은 질환의 초기 징후 및/또는 뒤따르는 진행을 의미한다. 질환의 발달은 검출가능하

고, 관련 기술분야에 널리 공지된 바와 같은 표준 임상 기술을 사용하여 평가될 수 있다. 그러나, 발달은 또한 비검출가능할 수 있는 진행을 지칭한다. 본 개시내용의 목적상, 발달 또는 진행은 증상의 생물학적 과정을 지칭한다. "발달"은 발생, 재발, 및 발병을 포함한다. 본원에 사용된 비정상적 VEGF 활성 또는 혈관신생과 연관된 질환의 "발병" 또는 "발생"은 초기 발병 및/또는 재발을 포함한다.

[0219] 실시예

[0220] 실시예 1: 콘베르셉트 (KH902)를 전달하는 rAAV 벡터 플랫폼

[0221] 유리체내 투여 (또는 다른 경로)를 통해 망막 내로 항-VEGF 치료제인 콘베르셉트 (KH902)를 전달하는 rAAV 벡터 플랫폼이 여기서 기재되었다. 고유한 디자인은 CMV 인핸서/닭 β-액틴 프로모터 조절 카세트에 의해 유도된 KH902 트랜스진을 함유하는 단일-가닥 AAV 벡터 게놈이다 (도 1a-1c). 코작 서열을 KH902 시작 코돈의 상류에서 디자인하여 번역을 증진시켰다 (도 1c). 시스-플라스미드 (도 1a)가 트랜스-플라스미드 공동-형질감염을 통해 또는 안정적인 통합에 의해 AAV Rep 및 Cap 유전자 및 의무적 헬퍼 유전자를 발현한 패키징 세포주 내로 전달된 경우, 역위 말단 반복부 서열 (ITR)을 포함하고 그에 의해 플랭킹된 서열을 AAV 캡시드 비리온 내로 패키징하였다.

[0222] 세포를 생성된 ssAAV-KH902 비리온 발현된 분비된 KH902에 의해 감염시키거나 형질도입하였으며, 이를 표준 웨스턴 블롯 분석에 의해 검출하였다 (도 2). AAV2 캡시드 내로 패키징된 ssAAV-KH902를 갖는 망막 색소 상피 (RPE) 세포주의 형질도입은 중국 햄스터 난소 (CHO) 세포주에서 생산된 콘베르셉트 약물과 유사한 분자량을 갖는 KH902의 단백질 발현을 발생시켰다. 이 데이터는 rAAV-KH902 벡터가 상이한 AAV 캡시드 내로 패키징될 수 있고, 세포 내로 감염되는 경우 KH902를 효과적으로 분비할 수 있음을 지시한다.

[0223] rAAV-KH902로 감염된 RPE 세포로부터의 컨디셔닝된 배지는 콘베르셉트 약물과 동일한 방식으로 인간 체대 정맥 내피 세포 (HUVEC)의 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)-유도된 관형성 (도 3a 및 3b) 및 증식 (CCK-8, 도 3c)의 감소에 의해 지시된 바와 같이 혈관신생을 왕성하게 억제하였다. 이 데이터는 rAAV-KH902로 감염된 세포가 시험관내에서 기능적 항-혈관신생 KH902를 발현하고 분비할 수 있음을 시사한다.

[0224] 신생아 마우스 새끼의 유리체 내로의 rAAV2-CBA-KH902의 주사는 정상적인 망막 혈관 발달을 방지하였다 (도 4). 이 데이터는 AAV-KH902 비리온이 생체내에서 혈관화를 억제하였음을 시사한다. 이 벡터 디자인이 맥락막 신생 혈관화를 억제할 수 있는지 여부를 결정하기 위해, rAAV2-CBA-KH902 벡터를 미숙아 망막병증 (ROP)에 대한 마우스 모델에서 시험하였다 (도 5). rAAV2-CBA-KH902의 유리체내 주사 및 후속의 마우스의 산소과잉 처리는 대조군 비주사된 눈과 비교하여 처리된 마우스의 눈에서 검출가능한 부종을 갖는 눈의 백분율 및 부종의 수의 감소를 초래하였다. 이 데이터는 AAV-KH902가 맥락막 신생혈관화를 예방하고, 가능하게는 반전시키기 위한 잠재적으로 실행가능한 유전자 요법 플랫폼임을 시사한다.

[0225] 실시예 2: AAV2 벡터의 유리체내 주사는 마우스에서 KH902를 전달하여 산소-유도된 망막병증 및 혈관화를 예방하는데 유효하다

[0226] 신생아 마우스를 생후 (PN) 1-3일에 유리체내 주사에 의해 벡터로 처리하였다. 각각의 마우스를 각각 하나의 눈에서 EGFP 트랜스진을 패키징하는 벡터 (rAAV-EGFP)로 및 반대 눈에서 KH902 트랜스진을 패키징하는 벡터 (rAAV-KH902) 및 rAAV-EGFP의 5:1 비 혼합물로 처리하였다. 모든 경우에, 총 용량은 1 μL 부피 중 눈당 1.5E<sup>9</sup> vg였다. 이어서 마우스를 PN 7까지 70% 산소에서 유지하고, PN 11까지 정상산소 조건 (20-21% 산소)에 두었다. 마우스를 PN 18에서 희생시키고, 눈을 수거하고, 가시화하였다 (도 6a-6b 및 도 7a-7b). 이어서 처리된 눈의 병리증상을 육안 검사에 의해 점수화하고, 점수화하였다 (도 8). rAAV-EGFP 단독으로 처리된 눈은 산소과잉 유도의 정도에 대한 지표이며, 병리증상의 가변성에 대한 내부 대조군으로서 역할을 한다. 부종의 부재는 산소과잉이 망막병증을 유도하는데 실패하였음을 의미하지도 않고, rAAV-KH902 처리된 눈에서 부종의 존재는 벡터가 비-효과적이었음을 의미하지도 않음을 유념해야 한다. 혈관 병리증상의 구제는 동맥류 결절의 존재 또는 부재에 의해 결정된다.

[0227] 음성 대조군으로 역할을 하는 rAAV2-Egfp 처리된 눈에서, 혈관 병리증상은 혈관 동맥류 결절의 과다 증식 및 형성의 결과로서 관찰되었다 (도 6b, 하부 패널). rAAV2-KH902로 처리된 눈은 병리증상을 효율적으로 예방하였으며 (도 6a-6b), 또한 혈관 발달을 특정 정도로 감소시켰다 (도 6b, 우측 패널). 대조적으로, rAAV8-KH902는 혈관 병리증상을 예방하는데 있어서 매우 비효율적이다 (도 7a-7b). 이 관찰은 망막 조직에서의 rAAV8-EGFP의 낮은 형질도입과 상관된다 (도 7b, 좌측 패널). 그럼에도 불구하고, 일부 형질도입이 있는 영역에서, rAAV8-

KH902는 병리증상을 부분적으로 예방할 수 있다 (도 7b, 우측 패널 및 도 8).

[0228] 전체적으로, 산소과잉에 의한 망막병증의 유도는 눈이 부종을 발달시키지 않았음에도 불구하고 모든 마우스에서 작동하였다 (도 8). 중요하게는, KH902 트랜스진은 rAAV2로 병리학적 혈관화를 반전시킬 수 있지만, rAAV8로는 불량하다. 그러나, 현재의 결과는 정규 혈관 발달이 그때까지 완결되기 때문에, 성체 동물에서의 치료의 결과를 예측하지 않는다.

[0229] **실시예 3: 망막에의 효율적이고 안전한 유전자 전달을 위한 인간 유래 AAV 캡시드 변이체**

[0230] AAV2 변이체 캡시드 및 AAV2/3 혼성체 캡시드가 트랜스진을 망막 세포에 전달할 수 있는지 여부를 평가하기 위해, AAV2 변이체 및 AAV2/3 혼성체 캡시드를 바코딩화된 EGFP 트랜스진을 운반하는 rAAV 내로 패키징하고, 유리체내로 또는 망막하로 마우스 내로 주사하였다. 망막에서의 GFP의 발현은 망막에서 세포를 형질도입하는데 있어서의 특정 캡시드 단백질의 능력을 반영한다.

[0231] 초기 연구에서, 8개의 AAV2 변이체 (v224, v326, v358, v46, v56, v66, v67, 및 v81) 및 7개의 AAV2/3 혼성체 변이체 (v439, v453, v513, v551, v556, v562, 및 v598)를 시험하였다. 캡시드 변이체 및 바코딩화된 EGFP 트랜스진의 각각을 포함하는 rAAV를 유리체내 투여를 통해 마우스에게 주사하였다 (3마리의 마우스/그룹; 총 45마리의 마우스). 형질도입 효능을 주사 후 2주 (도 9a) 및 4주 (도 9b)에 검안경검사에 의해 관찰하였다. 모든 변이체 중에서, v56, v224, 및 v326은 검안경검사에 의해 평가된 바와 같이 가장 높은 형질도입을 가졌다. 이들 3개의 캡시드를 레이저-유도된 맥락막 신생혈관화 마우스 모델에서의 후속 연구를 위해 KH902를 패키징하는데 사용하였다. 이 연구에서, AAV2 변이체는 마우스에서 AAV2/3-혼성체 변이체보다 더 잘 수행하였음이 관찰되었다.

[0232] rAAV-KH902의 효능을 레이저-손상 처리 모델에서 조사하였다. 레이저 손상은 맥락막 신생혈관 (CNV) 사건을 유도하며, KH902는 레이저 손상 후에 눈에서 CNV를 감소시킬 수 있다. CNV의 수 및 CNV의 크기 둘 다는 눈 내로의 KH902의 효율적인 전달에 대한 지표로서 측정될 수 있다. 현재의 연구에서, 마우스 눈을 rAAV 주사 전 5일에 레이저로 손상시켰다. 마우스를 대조군-GFP 또는 AAVv224-KH902로 주사하였다. 도 10에 제시된 바와 같이, AAVv224-KH902로 처리된 마우스는 대조군-GFP 그룹과 비교하여 레이저 손상 후 20일에 CNV의 수를 80% 미만으로 감소시킬 수 있었다. AAVv56-KH902 및 AAVv326-KH902는 동일한 마우스 모델에서 AAVv224-KH902와 유사한 치료 효능을 나타내었다. 또한, CNV의 표면적이 또한 측정되며, AAV2 변이체 또는 AAV2/3 혼성체 변이체에 의한 KH902의 전달은 CNV의 크기를 감소시킬 수 있을 것으로 예상된다.

[0233] KH902의 과발현은 혈관구조에서의 면역 세포의 축적으로 인해 눈에서 병변을 용량 의존적 방식으로 유발하는 것으로 이전에 관찰되었다. 이러한 병변은 명시야 검안경검사에 의해 눈에서 흰색 줄무늬로서 관찰될 수 있다. v224-KH902가 눈에서 이러한 병변을 유발할 것인지 여부를 시험하기 위해, 마우스를 v224-KH902, 눈에서 병변을 유발하는 것으로 이전에 관찰된 대조군-캡시드-KH902, 대조군 캡시드-KH902의 1:10 희석물, 대조군 캡시드-KH902의 1:20 희석물, 대조군 캡시드-KH902의 1:50 희석물, 또는 대조군 캡시드-KH902의 1:20 희석물로 유리체내로 주사하였다. 도 11에 제시된 바와 같이, 비희석된 대조군 캡시드-KH902는 눈에서 병변을 유발하였으며, 대조군 캡시드-KH902의 희석물은 병변을 감소시켰다. v224-KH902로의 마우스 눈 주사에서는 병변이 관찰되지 않았다.

[0234] 또한, 캡시드 변이체 (예를 들어, AAV2 변이체, AAV2/3 혼성체 변이체 및 AAV8 변이체)는 그들의 각각의 원형적 캡시드 단백질에 비해 더 양호한 패키징 효율을 나타내었다. 도 12에 제시된 바와 같이, 조-용해물 PCR을 통한 시험관내 패키징 수율 평가는 AAV2 변이체 (상부 패널), AAV2/3 변이체 (중간 패널), 및 AAV8 변이체 (하부 패널)에 대한 상대 패키징 수율을 제시하는 폭포 플롯으로서 그래프화되었다. 각각의 캡시드에 대한 패키징 수율 값은 그들의 원형적 형태: 각각 AAV2, AAV3b, 및 AAV8에 의해 제공된 수율의 백분율로서 표현된다. 캡시드 변이체 v56은 AAV2에 비해 9.42배 증가를 나타내었고; v224는 AAV2에 비해 8.96배 증가를 나타내었고, v326은 AAV2에 비해 9.79배 증가를 나타내었다. 나타내어진 캡시드의 총 수는 x-축 상에 제시된다.

[0235] **실시예 4:**

[0236] 정상적인 포유동물 각막은 투명하고, 혈관 및 림프관이 없다. 혈관신생 유발성 및 항-혈관신생 인자의 균형이 파괴된 병리학적 상태에서, 예컨대 염증, 저산소증, 및 운부 장벽 기능이상, 각막 신생혈관화 (CoNV)가 발생할 수 있다. CoNV는 각막 투명성을 감소시키고, 시각 손상을 초래한다. 이는 미국에서 연간 140만 명 초과의 사람들에게 영향을 미친다. CoNV에 대한 현재의 치료는 국소 스테로이드 및 비-스테로이드 항-염증 투여, 레이저 소작술, 미세 바늘 투과열요법, 및 양막 이식을 포함한다. 그러나, 모든 상기 방법은 제한된 효능을

가지며, 관련된 부작용이 있다. 혈관 내피 성장 인자 (VEGF)는 각막 혈관신생에 있어서 중요한 역할을 하지만, 상각 언급된 치료 중 어느 것도 이 핵심적 분자를 특이적으로 표적화하지 않는다. 맥락막 신생혈관화에서 항-VEGF 작용제의 성공적인 적용은 관심의 급등 및 동물 모델 및 임상 시험에서 각막 혈관신생을 관리하는 그들의 능력에 대한 이들 작용제의 시험을 초래하였다. 예를 들어, 몇몇 초기 연구는 많은 동물 모델 및 임상 시험에서 국소, 결막하, 윤부주변, 및 기질내 투여를 통해 CoNV를 억제하는데 있어서의 베바시주맙의 잠재성을 입증하였다. 그 때 이후로, 보다 많은 항-VEGF 의약, 예컨대 라니비주맙 및 아플리베르셉트가 개발되었고, 각막 신생혈관화 임상 요법에 적용되었다. 그러나, 그들의 짧은 반감기 때문에, 이들 VEGF-중화 단백질의 제한된 내구성은 CoNV에 대한 지속가능하고 효율적인 치료를 달성하는데 명백한 장애물이다. 유전자 요법 기술의 현저한 진보는 안구 질환에서 치료 트랜스진의 생체내 전달을 위한 매우 매력적인 비히클인 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV) 벡터 내로 VEGF-중화 단백질을 코딩하는 발현 카세트를 패키징함으로써 항-VEGF 작용제의 내구성을 상승시키는 노력을 고취시켰다. rAAV는 그들의 낮은 면역원성, 유전독성, 및 높은 형질도입 프로파일 때문에 바람직하다. rAAV 벡터의 단일 용량은 왕성하고 지속된 유전자 발현을 매개할 수 있으며, 이는 만성 각막 질환을 갖는 환자에 대한 요법을 달성하고 치료 부담을 완화시키는 목표를 위해 중요하다.

[0237] 이 연구에서, 목표는 손상된 각막에서 혈관신생을 지속적으로 예방하고 억제하는 단일 투여를 갖는 rAAV-매개 외인성 KH902 발현을 사용한 신규한 치료 접근법을 개발하는 것이었다.

[0238] *rAAV2* 및 *rAAV8* 벡터의 기질내 주사는 효율적인 각막 세포 형질도입을 생성한다

[0239] 성공적인 rAAV-매개 유전자 요법을 보장하기 위해, 적용의 경로는 표적 조직 내부에서 치료 유전자의 효율적인 전달 및 발현을 허용해야 한다. 현재, 각막을 표적화하는 치료제는 주로 국소 점적주입, 결막하 주사, 또는 기질내 주사를 통해 투여된다. 표재성 상피의 제거 없이 rAAV 벡터의 국소 점적주입은 상대적으로 낮은 형질도입 효율을 입증하였으며; 따라서, rAAV 벡터의 생체분포를 주로 결막하 및 기질내 주사 경로 후에 비교하였다. 마우스 각막을 기질내 또는 결막하 경로를 통해 동등한 용량 ( $1.6 \times 10^{10}$  게놈 카피 (GC)/각막)으로 닭  $\beta$ -액틴 편재성 프로모터 (*rAAV2-eGFP* 또는 *rAAV8-eGFP*) 하에서 *eGFP* 리포터 트랜스진으로 패키징된 rAAV2 또는 rAAV8로 주사하였다 (도 13a, 13d). 각막에서의 *eGFP* 발현의 수준을 투여 후 2주에 라이브 동물 영상화 시스템 (미크론 (Micron) IV 카메라)에 의한 *eGFP* 신호의 직접 검출을 통해 평가하였다. 흥미롭게도, *eGFP* 신호는 기질내 경로에 의해 처리된 마우스의 각막에서 성공적으로 검출되었지만, 결막하 경로에 의해서는 그렇지 않았다 (도 13b, 13d, 20b, 20c). 각막에서의 *eGFP* 생체분포 패턴을 추가로 확인하기 위해, *eGFP* 형광을 투여 후 2주에 제핵된 안구 섹션에서 분석하였다. 라이브 영상화 데이터와 일치하게, *eGFP*는 벡터의 기질내 주사 후에 전체 각막에서 발현되었다. 대조적으로, 결막하 주사는 윤부, 결막, 및 공막 조직에서 발현을 초래한 반면, 각막에서의 발현은 불량하거나 비-존재하였다 (도 13c, 13f, 20a). 함께, 이들 데이터는 기질내 주사가 각막에서의 광범위한 형질도입을 위해 rAAV2 및 rAAV8 벡터를 투여하기 위한 보다 효과적인 경로임을 입증하였다.

[0240] *rAAV2-* 및 *rAAV8-매개 eGFP* 및 *KH902* 발현의 각막 세포 형성 및 동역학

[0241] 각막 기질내 주사를 통한 rAAV2 및 rAAV8에 의해 매개된 트랜스진 발현의 동역학을 조사하기 위해, rAAV2-*eGFP* 또는 rAAV8-*eGFP*를 각막당  $1.6 \times 10^{10}$  GC의 동등한 용량으로 기질내로 투여하였다. rAAV8에 의해 매개된 *eGFP* 신호는 라이브 동물 영상화에 의해 주사 후 28시간만큼 빨리 용이하게 검출되었다 (도 14a). 그러나, rAAV2-*eGFP*-처리된 각막에서의 *eGFP* 신호는 투여 후 1주까지 관찰되지 않았으며, rAAV8-*eGFP* 처리에 의해 제공된 것들 보다 훨씬 더 약한 신호 강도를 가졌다 (도 14a). 다음으로, rAAV2-*KH902* 또는 rAAV8-*KH902*를 각막당  $1.6 \times 10^{10}$  GC로 야생형 마우스 각막 내로 기질내로 주사하고, 소적 디지털 PCR (ddPCR)에 의해 제1주 및 제2주, 및 제1개월, 제2개월, 및 제3개월에 상대 KH902 mRNA 발현을 평가하였다. *KH902* mRNA의 왕성한 발현이 rAAV8-*KH902* 그룹에서 검출되었으며, 주사 후 1주에 그의 피크에 도달하였다. 반면, rAAV2는 또한 검출가능한 *KH902* 발현을 초래하였지만, 유의하게 더 낮은 수준으로였으며 주사 후 2주에 뒤떨어지는 피크를 가졌다. 피크 수준에 도달한 후, rAAV2 및 rAAV8에 의해 매개된 KH902 mRNA 발현은 점차적으로 감소하였지만, 실험에서 최종 시점인 주사 후 최대 3개월 동안 검출가능하게 남아 있었다 (도 14b). 특히, rAAV8에 의해 매개된 상대 *KH902* mRNA 발현은 모든 시점에서 rAAV2에 의해 달성된 것보다 더 높았다. 이 관찰은 rAAV-*eGFP* 벡터에 의해 제공된 *eGFP* 신호와 일치하였다 (도 14a).

[0242] 마우스 각막에서 rAAV2 및 rAAV8 형질도입의 향성을 조사하기 위해, rAAV2-*eGFP* 또는 rAAV8-*eGFP*로의 기질내 주사로부터의 각막 조직 섹션을 주사 후 2주에 분석하였다 (도 14c). 결과는 *eGFP* 신호가 주로 각막세포 마커인 비멘틴과 공동-국재화됨을 제시하였으며, 이는 rAAV2 및 rAAV8이 주로 각막세포를 형질도입하였음을 지시한다.

상피 세포에서의 산발적 발현이 또한 관찰되었다. 한편, rAAV2-eGFP도 rAAV8-eGFP도 각막 내피 세포를 형질도입하지 않았다 (도 14c-i, ii). 후속적으로, KH902 단백질의 분포를 rAAV2-KH902 또는 rAAV8-KH902 ( $1.6 \times 10^{10}$  GC/각막)로 형질도입된 각막에서 항-인간 IgG (HtL) 항체를 사용하여 탐색하였다. rAAV2 및 rAAV8 형질도입 후의 KH902 단백질은 주로 각막세포에서 및 각막 상피 세포에서 드물게 발견되었으며 (도 14c- iii, iv 및 도 21a-21b), 이는 rAAV2-eGFP 및 rAAV8-eGFP 형질도입 후의 eGFP 발현 패턴과 일치하였다. 그러나, 결과는 KH902 단백질이 각막세포의 세포체에서 분포되었을 뿐만 아니라 전체 각막 기질층 전반에 걸쳐 확산되었음을 명백하게 제시한다. 이는 KH902가 N-말단에 분비 신호 펩티드를 함유하며, 따라서 각막 기질 매트릭스 내로의 각막세포로부터의 KH902 단백질의 분비를 용이하게 한다는 사실에 기인한다.

[0243] 전체적으로, 데이터는 rAAV8이 rAAV2에 의해서보다 기질내 전달 후 각막에서 KH902 발현의 보다 강한 및 보다 이른 발병을 매개하였음을 지지하였으며, 이는 rAAV8-KH902가 각막 신생혈관화의 치료에 있어서 rAAV2-KH902보다 우수하였음을 시사한다. 더욱이, rAAV8에 의해 매개된 KH902의 발현은 최대 3개월 동안 지속되었으며, 전체 각막 기질층을 통해 분산되었다. 이 발견은 VEGF를 중화시키는, 및 결과적으로, CoNV를 약화시키는 rAAV8-KH902의 잠재적인 왕성한 능력을 시사하였다.

[0244] *마우스 각막에서의 rAAV2-KH902 또는 rAAV8-KH902에 대한 면역학적 반응의 특징*

[0245] 중심 각막 두께 (CCT)는 각막 건강 및 생리학적 기능의 지표임을 고려하여, CCT를 PBS, rAAV8-eGFP, rAAV2-KH902, 및 rAAV8-KH902 ( $1.6 \times 10^{10}$  GC/각막)로의 기질내 주사 후 시각 간섭 단층촬영 (OCT) 영상화에 의해 다양한 시점에서 분석하였다. 그룹 중에서, PBS 및 rAAV8-eGFP를 각각 주사 대조군 및 벡터 비히클 대조군으로서 사용하였다. 주사 직후, CCT는 PBS 그룹에서  $22.73 \pm 2.93 \mu\text{m}$ , rAAV8-eGFP 그룹에서  $23.50 \pm 5.37 \mu\text{m}$ , rAAV2-KH902 그룹에서  $22.12 \pm 3.43 \mu\text{m}$ , 및 rAAV8-KH902 그룹에서  $22.75 \pm 3.12 \mu\text{m}$  증가되었고, 이어서 OCT 스캔 하에서 정상적인 형태학적 및 해부학적 구조를 갖는 제12주의 종료 (데이터 수집의 최종 시점)에서 주사 전 수준으로 다시 점차적으로 감소되었음이 밝혀졌다 (도 15a, 15b). 모든 그룹 사이에 CCT의 유의한 차이는 관찰되지 않았다. 모두 함께, 이들 데이터는 rAAV 벡터 및 KH902 트랜스진 산물로의 기질내 주사가 중심 각막 두께를 변경시키지 않고, 각막 생리학적 구조를 파괴하여 3개월 후에 국소 흉터 또는 데스메막 박리를 생성함을 지지하였다. 반면, 면역 반응을 또한 rAAV-KH902의 주사 후 2주에 각막에서 단핵구/대식세포 마커 (CD11b, F4/80)의 수준을 추정함으로써 평가하였다. CD11b+ 또는 F4/80+ 세포의 수준은 고-용량 ( $1.6 \times 10^{10}$  GC/각막) rAAV2-eGFP/KH902 및 rAAV8-eGFP/KH902 투여 후에 유의하게 더 높았던 반면, 그들의 저-용량 ( $8 \times 10^8$  GC/각막) 대응물에서의 CD11b+ 또는 F4/80+ 세포의 백분율은 비교에서 유의하게 더 낮았으며, 이는 PBS 대조군과 유사한 수준이다 (도 15c, 15d). 따라서, rAAV2-KH902 및 rAAV8-KH902 전달을 위한 저 용량 ( $8 \times 10^8$  GC/각막) 주사 스킴을 후속 생체내 CoNV 요법 연구에 사용하였다.

[0246] *기질내 투여를 통한 rAAV8-KH902로의 처리는 알칼리-화상 손상 모델에서 CoNV를 효과적으로 억제한다*

[0247] 기질내 전달에 의한 rAAV2-KH902 및 rAAV8-KH902가 각막 신생혈관화를 치료적으로 억제할 것인지 여부를 시험하기 위해, 알칼리 화상을 마우스 각막 상에 적용하여 CoNV 모델을 생성하고, 후속적으로 마우스를 PBS, rAAV8-eGFP, rAAV2-KH902, 또는 rAAV8-KH902로 알칼리 화상 후 제1일에  $8 \times 10^8$  GC/각막의 용량으로 주사하였다. CoNV 진행을 각막 손상 후 제5일, 제10일, 뿐만 아니라 2, 3, 4, 8, 및 12주에서 추적하였다 (도 16a). 알칼리 손상 후 제5일에, 운부 혈관 층으로부터의 CoNV의 스프라우팅 및 스플리팅이 모든 그룹에서 가시적이 되기 시작하였으며, CoNV 면적에 있어서 그룹 사이에 통계적 차이는 없었다. 흥미롭게도, CoNV의 길이 및 면적은 rAAV8-KH902 처리 그룹에서 명백하게 증가되지 않았으며, 제5일에서 제12주 (실험 종점)까지 상대적으로 정지하여 남아 있었다. 반대로, rAAV2-KH902는 화상 후 대략 4주에 운부로부터 중심 각막으로의 CoNV의 추가의 성장을 억제하는데 실패하였으며, rAAV8-eGFP 및 PBS 대조군 그룹에서도 그러하였다 (도 16a, 16b). rAAV8-KH902 및 콘베르셉트 약물의 치료 효능을 비교하기 위해, CoNV의 영역을 단일-용량 콘베르셉트 (10mg/ml) 및 rAAV8-KH902 처리 그룹 둘 다에서 정량적으로 분석하였다. 결과는 제5일 및 제10일에 CoNV 성장의 초기 단계에서 유의한 차이가 없었음을 제시하였다. 그러나, 단일-용량 콘베르셉트 약물-처리된 그룹에서, CoNV는 처리 후 2주부터 급증하였고, 4주에 추가로 진행되어 중심 각막을 침습하였으며, 12주에 PBS 대조군 그룹과 유사한 크기를 갖는 극심한 CoNV로 종료하였다. rAAV8-KH902-형질도입된 그룹에서의 CoNV 영역 크기는 주사 후 2주에서 12주까지 콘베르셉트 약물-처리된 그룹에서의 그것에 비해 유의하게 더 작았으며, 이는 rAAV8-KH902가 연장된 항-VEGF 효능을 나타내었음을 지지한다. 또한, 콘베르셉트와 조합으로 rAAV8-KH902는 관찰 기간 전반에 걸쳐 rAAV8-KH902 단독에 비해 CoNV 영역을 추가로 억제하지 않았으며 (도 16a, 16c), 이는 이 용량에서, rAAV8에 의해 전달된

*KH902*의 발현이 항-혈관신생 효과를 달성하는데 시기적절한 방식으로 VEGF를 중화시키는데 적당하였음을 지시한다. 추가의 콘베르셉트 약물 보충은 rAAV8-*KH902*의 치료 효과를 추가로 강화시키는데 도움을 주지 않았다. 입증을 위해, 각막 전체 마운트 상의 혈관을 개요하기 위한 항-CD31 (일명 혈소관-내피 세포 부착 분자 1, PECAM-1)을 사용한 면역염색 데이터는 CoNV 크기가 12주에서의 전체 혈관 병리증상의 결과와 상관되었음을 제시하였다 (도 16d, 좌측 패널).

[0248] 림프관신생은 또한 CoNV의 병리학적 과정에 연루되었다. 각막 윤부로부터의 새로운 림프관의 형성은 혈관신생 동안의 혈관 성장과 유사한 것으로 믿어지며, 주로 VEGFR-2 및 VEGFR-3에의 VEGF-C 및 VEGF-D의 결합에 의해 유도된다. VEGF-A는 또한 림프관신생에 기여하는 것으로 제시되었으며, 콘베르셉트는 모든 VEGF-A 이소형을 차단한다는 점을 고려하여, 림프관신생에 대한 rAAV8-*KH902*의 효과를 또한 평가하였다. 각막 내로 침습한 병리학적 림프관이 직접적으로 가시적이지 않기 때문에, 마우스 각막을 각각의 그룹에서 제12주에 수집하였다. 각막 전체 마운트를 범-내피 마커로서 CD31 및 특이적 림프관 마커로서 LYVE-1 (림프관 내피 수용체 1)로 이중-염색하였다. CD31<sup>+++</sup>/LYVE-1<sup>-</sup> 혈관 및 CD31<sup>+</sup>/LYVE-1<sup>+++</sup> 림프관에 의해 커버된 면적을 각막 전체 마운트에서 측정하였다. 12-주 추적에서 모든 실험 그룹에서, 단독으로 및 콘베르셉트 약물과 조합으로 rAAV8-*KH902*로 처리는 림프관신생의 크기를 감소시키지 않았으며, PBS 대조군 및 다양한 처리 그룹 사이에 유의한 차이는 관찰되지 않았다 (도 16d, 16e).

[0249] *D114/Notch* 신호전달 및 *ERK* 활성화는 rAAV8-*KH902*에 의해 하향조절된다

[0250] 혈관신생의 스프라우팅은 스프라우팅 과정을 지정하는 내피 "정단" 세포에 의해 초래되는 반면, 내피 "줄기" 세포는 신생혈관 스프라우트를 신장시킨다. 이 과정 동안, VEGF 및 Notch 신호전달 경로는 혈관 내피에서의 정단 및 줄기 세포의 선택에 연루된다. 특수화된 내피 정단 세포는 VEGF-A 구배를 향한 혈관 스프라우트의 생성을 초래한다. *D114* 및 Notch 신호전달의 리포터는 활성화적으로 스프라우팅하는 혈관의 내피 세포 중에서 모자이크 패턴으로 분포된다. VEGF 자극 하에서, 정지 내피 세포는 정단 세포 사상위축을 형성하도록 유도되고, 정단 세포에서 *D114* 발현의 수준을 상향조절한다. 다시, *D114* 리간드는 줄기 세포에서 Notch 신호전달을 활성화시켜, 세포막으로부터의 활성 Notch 세포간 도메인 (NICD)의 방출을 초래하여, 결과적으로 적당하게 이격된 브랜칭 및 스프라우팅을 가능하게 한다. 그러나, 이전의 연구는 CoNV에 있어서의 *D114/Notch* 신호전달의 역할을 다루지 않았다. 따라서, *D114/Notch* 신호전달 발현을 알칼리 화상 후 2주에 면역염색 및 웨스턴 블롯 분석에 의해 활발하게 성장하는 혈관을 갖는 마우스 각막에서 평가하였다. PBS 및 rAAV8-*eGFP* 대조군 그룹에서, *D114*는 각막 신생혈관 스프라우팅에서 폭넓게 발현되었으며, 이는 각막 혈관신생의 과정에서 *D114*의 관여를 시사한다. 대조적으로, rAAV8-*KH902* 처리된 그룹에서, *D114*는 드물게 검출되었으며, 정단 세포 사상위축은 완전히 움츠러졌다 (도 17a). 이들 결과는 VEGF-A 자극이 rAAV8-*KH902*에 의해 차단되고, 따라서 정단 세포 이동 및 CoNV 진행을 방지하였음을 입증하였다. 상기 발견은 대조군 그룹에 비해 rAAV8-*KH902* 처리된 그룹에서 *D114* 및 NICD 발현의 유의한 하향조절을 제시한 웨스턴 블롯 결과에 의해 확인되었다 (도 17b, 17c, 17d).

[0251] VEGFR에의 VEGF 결합은 인산화된 VEGFR2를 발생시켜, 혈관신생과 관련된 하류 신호전달 경로를 개시하며, 상피 세포 (EC)에서 몇몇 세포 반응을 생성한다. 이들 경로 중에서, VEGF-유도된 ERK1/2 신호전달은 광범위하게 연구되었으며, 미세혈관 내피 분화 및 증식을 조절하는 것으로 제시된다. 따라서, 마우스 각막을 알칼리 화상 후 8일에 수집하여 각각의 조건에서 ERK 활성화의 수준을 평가하였다. 인산화된 ERK (pERK) 대 총 ERK의 비 (pERK/ERK)는 웨스턴 블롯 분석에 의해 PBS 그룹 및 rAAV8-*eGFP* 처리된 그룹에 비해 rAAV8-*KH902* 처리된 그룹에서 유의하게 감소되었으며 (도 17e, 17f), 이는 rAAV8-*KH902*에 의해 VEGF를 차단하는 것이 알칼리 화상-유도된 CoNV 마우스에서 ERK 활성화의 억제를 발생시켰음을 시사한다.

[0252] rAAV8-*KH902*는 알칼리-화상 및 봉합선 유도된 CoNV 모델 둘 다에서 기존의 신생혈관화의 진행을 예방한다

[0253] 화학적 화상은 급성 안구 손상이며, 다양한 중증도 및 문제의 병변을 갖는 복잡한 상태이다. 초기 단계에서 즉각적인 또는 집중적인 관리를 얻는데 실패한 사례에 대해, CoNV는 활성 단계 동안 급속하게 진행되는 경향이 있다. 따라서 rAAV8-*KH902*가 알칼리 화상에 의해 촉발된 활성화적으로 확장하는 CoNV를 억제하거나 심지어 퇴행시킬 수 있는지를 탐구하는 것은 크게 흥미롭다. 마우스 각막을 알칼리 화상 후 10일에 PBS, rAAV8-*eGFP*, 또는 rAAV8-*KH902* ( $8 \times 10^8$  GC/각막)로 기질내로 주사하였으며, 이 시점에서, CoNV는 활성 단계에 있는 다양한 정도로 각막 내로 이미 침습하였으며, 계속적으로 성장하였다 (도 18a). CoNV가 알칼리 화상에 의해 유도되었으면, 자기-제어 연구 방법을 통해 임의의 실험 그룹에서 현저한 퇴행이 발견되지 않았다 (도 18a, 18b). 그러나, rAAV8-*KH902* 처리 그룹에서, 기존의 CoNV는 4-주 추적 동안 사전-처리 단계에서 유의하게 억제되고 유지되었다

(도 18a, 18c).

- [0254] 상이한 손상 모델에서 CoNV를 억제하는데 있어서 rAAV8-KH902의 효과를 확인하기 위해, 이를 기질내 봉합선을 마우스 각막 상의 결절로 정치함으로써 봉합선-유도된 CoNV 마우스 모델을 사용하여 추가로 탐구하였다. 5일의 봉합선 자극 후, CoNV는 활성적으로 성장하고 있었으며, 각막 내로 침습하였다. 이 때, 마우스를 PBS, rAAV8-eGFP, 또는 rAAV8-KH902로 각막당  $8 \times 10^8$  GC의 용량으로 기질내로 주사하였다. CoNV 진행의 수준을 추적하고, 주사 전후에 정량화하였다. PBS 및 rAAV8-eGFP 대조군에 비해, CoNV의 진행은 rAAV8-KH902 처리로 유의하게 억제되었으며, 억제 효과는 최종 시점까지 지속되었다 (도 19a, 19b). 그림에도 불구하고, rAAV8-KH902 처리 후에 확립된 각막 혈관의 퇴행은 관찰되지 않았다 (도 19a, 19c). 따라서, 상기 데이터는 rAAV8-KH902가 활성 단계에서 존재하는 CoNV에 대한 치료 효과를 지속하였음을 확인시켜 주었다.
- [0255] 각막 신생혈관화는 시각 기능에 심각하게 영향을 미치며, 다수의 병인론, 예컨대 콘택트 렌즈 착용, 건조한 눈, 외상, 화학적 화상, 운부 줄기 세포 결핍증, 안구 표면 염증 및 박테리아, 진균 및 바이러스로의 각막 감염의 병리학적 결과일 수 있다. 현재의 요법은 효능 및 안전성 문제에 의해 제한된다. 콘베르젠티의 기질내 주사는 각막 신생혈관화를 억제할 수 있지만, 이는 반복된 투여를 요구하며, 주사-연관 부작용을 생성한다. 약물 투여의 빈도를 감소시키기 위해, 각막에서 KH902 발현을 매개하는 rAAV 벡터의 사용을 탐구하였다. rAAV8-KH902는 각막에서 KH902의 왕성하고 지속된 발현을 생성하였고, 주목할 만한 부작용 없이 1-회 저-용량 기질내 주사로 CoNV를 성공적으로 억제하였으며, rAAV8-KH902 단독으로의 치료는 CoNV의 발병에서 혈관신생을 시기적절한 방식으로 억제하는데 충분하였음이 입증되었다.
- [0256] CoNV의 항-혈관신생 치료의 장은, 상이한 사례가 별개의 병리학적 병인론을 갖기 때문에, 결정하기 곤란하다. 혈관신생의 패턴 및 적절한 치료 과정은 선행하는 자극의 유형 및 기저의 병리증상의 특징에 강하게 의존한다. 예를 들어, 단순 포진 바이러스 (HSV)-유도된 각막염에서, CoNV는 제1일만큼 빨리 명백할 수 있으며, 각막 HSV-1 감염 후 최대 3주까지 계속될 수 있다. 질환이 진행함에 따라, 감염, 염증, 및 CoNV는 양성-피드백 루프에서 서로를 촉발시켜, 연장된 과정을 초래할 것이다. 다른 사례에서, 중증 화학적 손상을 갖는 환자는 6주 초과 동안 지속하여, 유의한 운부 줄기 세포 결핍증 및 신생혈관화를 갖는 합병증을 발달시킬 수 있는 만성 상으로 들어갈 수 있다. 또한, 데이터는 rAAV8-KH902 전달의 단일 용량이 적어도 3-개월 치료 창을 제공한 반면, 직접 콘베르젠티 적용은 단지 10-14일 동안 지속할 수 있음을 제시하였다. 따라서, rAAV8-KH902는 치료 창을 유의하게 연장시키는 항-VEGF 효과를 계속적으로 제공한다. 이는 만성 각막 질환을 갖는 환자에서 항-VEGF 약물의 반복된 투여에 대한 필요를 감소시키는데 있어서 유의한 차이를 만든다.
- [0257] 혈관신생은 기존의 혈관으로부터의 새로운 혈관의 형성이다. 이는 내피 세포 (EC) 증식 및 침습에 의존할 뿐만 아니라, 혈관 안정화 및 성숙을 위해 후속 혈관주위세포 커버리지를 요구한다. 혈관주위세포의 부재 하에서, 새롭게 형성된 EC는 불안정하고, VEGF 자극 없이 퇴행하는 경향이 있으며, 이는 미성숙한 혈관이 생존 및 성장을 위해 VEGF에 의존함을 시사한다. 항-VEGF 단독요법에 대한 연구는 성숙한 혈관이 이들 혈관이 VEGF에 덜 의존한다는 사실로 인해 효과적으로 퇴행하도록 유도되지 않았음을 제시하였다 (49). 마찬가지로, 연구에서 CoNV의 성공적인 억제 및 실패하는 퇴행은 또한 VEGF가 새롭게 형성된 혈관을 지속시키고 촉진시키는데 중요하지만, 성숙한 혈관을 유지하는데 요구되지는 않음을 입증하였다. 따라서, CoNV에 대한 보다 조기의 rAAV8-KH902 치료는 보다 양호한 결과를 달성할 것이다.
- [0258] 투여의 경로는 안구 질환에 대한 유전자 요법을 개발하는데 있어서 고려할 중요한 인자이다. 각막 조직에서의 rAAV 유전자 형질도입에 대해 다양한 투여의 경로가 탐구되고 있다. 국소 적용은 가장 용이한 투여의 경로이지만, 이들이 상대적으로 낮은 형질도입 효율을 가지며, 벡터가 눈물을 통해 확산될 경우 비-표적 조직의 형질도입에 의해 유발되는 잠재적인 유해 효과가 있을 수 있기 때문에 rAAV 벡터에 대해 이상적이지는 않다. 각막의 생체분포를 rAAV2-eGFP 및 rAAV8-eGFP의 결막하 및 기질내 주사 사이에 비교하였다. 증거는 rAAV2 또는 rAAV8 벡터의 기질내 전달이 결막하 주사에 비해 각막에서 보다 효율적이고 광범위한 형질도입을 생성하였음을 밝혀내었다. 또한, rAAV2 및 rAAV8의 기질내 주사는 상피 세포에서의 산재로, 주로 각막세포에 대한 유사한 각막 세포 향성을 가졌지만, 내피 세포에서는 그렇지 않았다. rAAV8-매개 유전자 발현은 rAAV2에 비해 보다 조기의 발병으로 및 보다 높은 효율로 발생하였다. 이는 rAAV8-KH902가 CoNV를 성공적으로 억제하였지만, rAAV2-KH902는 실패한 이유를 설명한다.
- [0259] 각막 상처-치유 캐스케이드는 혈관신생, 상피형성, 및 각막 흉터 및 불투명성에 기여하는 다양한 유형의 콜라겐의 비정상적 침착으로 구성된다. 건강한 각막 내로의 rAAV-KH902 또는 rAAV-eGFP의 기질내 주사는 흉터형성 또는 불투명성을 유도하지 않았다. 이는 알칼리 화상에 의해 유발된 각막 손상이 상처 치유의 과정 동안의 흉터

형성 및 보다 낮은 투명성에 대한 이유임을 지시하였다.

[0260] 요약하면, 각막 기질 내로의 단일 저-용량 rAAV8-KH902 주사는 연장된 기간 동안 CoNV의 효율적인 억제를 초과하였다. 이 연구는 CoNV에 대한 rAAV-기반, 항-VEGF 유전자 요법의 잠재적인 장기-작용 및 상대적 안전성을 입증한다.

[0261] **방법**

[0262] **백터 생산**

[0263] 백터를 담  $\beta$ -액틴/시토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터의 제어 하에서 *eGFP* 또는 *KH902*를 코딩하는 트랜스진 카세트로 패키징하였다. *KH902*를 코딩하는 백터를 토끼 글로빈 폴리 A로 디자인하였다. 백터를 기재된 바와 같은 삼중 형질감염을 사용하여 생산하였다. 백터를 CsCl 구배 초원심분리에 의해 정제하고, ddPCR 및 나트륨 도데실 술페이트 (SDS)-폴리아크릴아미드 겔의 은 염색 둘 다에 의해 적정하였다.

[0264] **동물**

[0265] C57BL/6J 마우스를 잭슨 래보러토리즈(Jackson Laboratories) (미국 메인주 바 하버)로부터 획득하고, 유니버시티 오브 매사추세츠 메디칼 스쿨(University of Massachusetts Medical School)의 동물 시설에서 12시간 명/12시간 암 사이클을 갖는 표준화된 조건에서 사육하고 유지하였다. 모든 실험은 기관 동물 관리 및 사용 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committees)에 의해 승인되었으며, 안과학 및 시각 연구에 있어서의 동물의 사용에 관한 ARVO의 진술에 따랐다.

[0266] **알칼리 화상-유도된 CoNV**

[0267] 알칼리 화상-유도된 CoNV에 대한 마우스 모델을 일부 변형을 갖고 이전에 기재된 바와 같이 수행하였다 (25). 마우스를 케타민 (5mg/mL) 및 크실라진 (2mg/ml) 조합물 (10mL/kg 체중)의 복강내 주사를 통해 마취시키고, 국소 마취제 프로파라카인 (0.5%)을 각막 표면에 적용하였다. 원형 필터-페이퍼 디스크 (2- mm 직경)를 1 M NaOH에 20초 동안 사전-침지시키고, 이어서 중심 각막 상에 대략 40초 동안 정치하고, 이어서 15 mL 멸균 염수 용액으로 1분 동안 부드럽게 세척하였다.

[0268] **봉합선-유도된 CoNV**

[0269] 이전에 기재된 봉합선 기술로부터의 변형을 수행하여 CoNV를 유도하였다 (55). 간략하게, 마우스의 우측 눈은 국소 마취 (0.5% 프로파라카인)에 의해 보충된 전신 마취 [복강내 케타민 (5mg/mL) 및 크실라진 (2mg/mL) 조합물 (10mL/kg 체중)] 하에서 각막 봉합선 정치를 받았다. 단일 10-0 나일론 봉합선을 윤부로부터 1mm 떨어진 눈의 측두 각막에서의 결절로 기질내로 정치하였다. 절차의 일관성 및 재현가능성을 보장하기 위해, 전체 과정을 각각의 동물에 대해 해부 현미경 하에서 동일한 연구자에 의해 수행하였다.

[0270] **기질내 또는 결막하 주사에 의한 rAAV 백터 전달**

[0271] 기질내 주사를 이전에 공개된 방법을 사용하여 수행하였다 (7). 간략하게, 대략 1.0 mm의 크기의 절개를 먼저 측두 윤부 및 각막의 중심 사이의 등거리의 각막 상피에서 30-게이지 바늘의 팁으로 만들었다. 이어서 4  $\mu$ L의 PBS 중  $1.6 \times 10^{10}$  또는  $8 \times 10^8$  GC의 rAAV 백터를 34-게이지 바늘을 갖는 5- $\mu$ L 해밀턴(Hamilton) 시린지 (해밀턴(Hamilton), 미국 네바다주 레노; 30° 베벨 각)를 사용함으로써 각막 기질 내로 절개를 통해 주사하였다. 결막하 주사를 또한 5- $\mu$ L 해밀턴 시린지를 사용함으로써 수행하였다. 총  $1.6 \times 10^{10}$  GC의 rAAV 백터를 각각의 부위당 1  $\mu$ L ( $0.4 \times 10^{10}$  GC) 주사로, 각각 상부, 하부, 비내, 및 측두 결막하 내로 주사하였다. 항생제 연고를 주사 후에 적용하였다.

[0272] **생체내 형광 영상화**

[0273] 각각의 그룹에서의 동물을 rAAV 투여 후 총 12주 동안 매주 관찰하였다. 마우스 눈에서의 eGFP 발현을 마이크론 IV 카메라 (피닉스 리서치 랩스(Phoenix Research Labs), 미국 캘리포니아주 플레젠튼)에 의해 포획하였다.

[0274] **각막 시각 간섭 단층촬영**

[0275] 마우스 각막 시각 간섭 단층촬영 (OCT)을 마이크론 IV OCT 영상화 시스템 (피닉스 리서치 랩스, 미국 캘리포니아주 플레젠튼)을 사용하여 수행하였다. 마우스를 상기 언급된 바와 같이 복강내 주사를 통해 마취시켰다. 마우스 각막을 카메라의 렌즈를 향해 정치하고, 전체 전안방을 영상화하였다. 이어서 각막 중심 두께 (CCT)를 포획

된 영상에서 이미지제이(ImageJ) 소프트웨어 (imagej.nih.gov/ij/에서 온라인에서 이용가능함)에 의해 측정하였다. CCT를 주사 전, 주사 직후, 및 주사 후 1-, 2- 및 12-주에 측정하였다.

[0276] *각막 NV의 전면 컬러 영상화 및 정량화 분석*

[0277] 절차를 전에 언급된 바와 같이 전신 마취 및 국소 점안액 하에서 수행하였다. 마우스 눈을 안과 외과 현미경 (와일드 히어브루그(WILD HEERBRUGG)) 아래에 놓고, 상이한 각도로부터의 각막을 현미경에 부착된 디지털 카메라에 의해 영상화하였다. CoNV를 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 설정 시점에서 분석하였다. CoNV의 면적을 하기 식을 사용함으로써 계산하였다: 면적 (mm<sup>2</sup>) = CN/12 x 3.1416 x [R<sup>2</sup> - (R - VL)<sup>2</sup>], 여기서 CN은 NV의 시계-시간이고; R은 각막의 반경이고; VL은 윤부 혈관구조로부터 연장되는 최장 혈관 길이이다 (56). 살아 있는 마우스에서의 각각의 각막의 컬러 영상을 8개의 상이한 각도에서 수행하고, 각막 NV의 면적을 그에 따라 각각의 각도에서 4회 계산하였다.

[0278] *전체 각막 플랫 마운트의 면역조직화학*

[0279] 안구를 제핵하고, 바늘로 작은 구멍을 윤부에 만든 후 실온에서 1시간 동안 4% PFA로 고정시켰다. 이어서 절제된 안구를 이전의 보고에 대해 변형을 갖고 전체-마운트 염색을 위해 제조하였다 (31). 간략하게, 각막 및 공막을 윤부를 따라 절개에 의해 분리하고, 이어서 수정체 및 홍채를 제거하였다. 각막에서 4개의 반경 커팅을 만들어 전체-마운트 편평화를 허용하였다. 이어서 조직을 PBS 중 0.3% 트리톤(Triton) X-100에 의해 세척하고, 차단 완충제 (0.3% 트리톤 X-100/ 5% 정상 소 혈청 알부민 (BSA, 셀 시그널링 테크놀로지(Cell Signaling Technology))/1X PBS로 1시간 동안 차단하였다. 각막을 4°C에서 밤새 래트 항-CD31 (PECAM-1, 1:400, sc-18916, 산타 크루즈(Santa Cruz), 산타 크루즈), 토끼 항-마우스 LYVE-1 (1:200, 11-034, 안지오바이오 컴퍼니(AngioBio Co)), 또는 염소 항-마우스 D114 (1:40, AF1389, 알앤디 시스템스)로 염색하였다. 이어서 1차 항체를 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 또는 594 (써모 피셔 사이언티픽(Thermo Fisher Scientific), 싱가포르)와 접합된 염소 항-토끼, 항- 래트, 또는 당나귀 항-염소 2차 항체로 검출하였다. PBS 중 0.3% 트리톤 X-100으로의 최종 세척 후, 각막 조직을 내피 측이 아래로 가게 마운팅하고, 16- 비트 흑백 카메라를 갖는 레이카(Leica) DM6 현미경에 의해 영상화하였다. 영상 프로세싱을 어도비(Adobe) 포토샵(Photoshop) CC 2019로 수행하여 선명도를 개선시켰다. 혈관 및 림프관의 마커에 의해 커버된 영역을 검출하고, 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 측정하였다. 전체 각막을 샘플 편향을 최소화하기 위해 처리 상태에 맹검인 2명의 독립적 관찰자에 의해 분석하였다.

[0280] *각막 동결색선의 조직학 및 면역조직화학*

[0281] 신선하게 절제된 안구를 색셔닝을 위한 제조에서 O.C.T. (피셔 사이언티픽, 미국 펜실베이니아주 피츠버그)에 직접적으로 포매하였다. 14 μm-두께 동결색선을 동결된 블록 (레이카 CM3050 S, 레이카 바이오시스템스 인크.(Leica Biosystems Inc.), 미국 일리노이주 버팔로 그로브)으로부터 만들었다. 실온에서 15분 동안 4% PFA로의 색선의 고정 후, 조직 색선을 PBS 중 0.3% 트리톤 X-100에 의해 세정하고, 차단 완충제 (1X PBS / 1% BSA / 0.3% 트리톤™ X-100)으로 1시간 동안 차단하였다. 슬라이드를 1차 항체로 4°C에서 밤새 염색하였다. 사용된 1차 항체는 모두 0.3% 트리톤 X-100 및 5% BSA를 갖는 PBS에 희석된 알렉사 플루오르(Alexa Fluor) 488 (1:400, #144222, 잭슨 면역노리서치 래보러토리즈 인크.(Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc.))로 접합된 래트 항-F4/80 (1:400, NB600-404, 노부스(Novus)), 래트 항-마우스 CD11b (1:50, #550282, 비디 파밍겐(BD Pharmingen)), 토끼 항-비멘틴 (1:100, #5741, 셀 시그널링 테크놀로지), 및 당나귀 항-인간 IgG (H+L)였다. 사용된 반대염색된 DAPI (# 9542, 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich))를 갖는 2차 항체는 염소 항-래트 IgG-알렉사 플루오르 594 및 염소 항-토끼 IgG-알렉사 플루오르 594였다. 형광 영상을 레이카 DM6 현미경에 의해 획득하였다. 영상 분석을 어도비 포토샵 소프트웨어로 수행하였다. CD11b+ 또는 F4/80+ 세포를 검출하고, 이미지제이 소프트웨어를 사용함으로써 카운팅하였다.

[0282] *KH902 mRNA 발현 분석*

[0283] rAAV2-KH902 또는 rAAV8-KH902로 처리된 또는 비처리된 정상 마우스 각막 (4개의 각막/그룹)으로부터의 RNA를 처리 후 제1주 및 제2주 및 제1개월, 제2개월, 및 제3개월에 RN이지 플러스(RNeasy Plus) 마이크로 키트를 사용하여 단리하고, 콰티텍트(QuantiTect) 역전사 키트 (둘 다 퀴아젠(Qiagen), 독일 힐텐으로부터)를 사용하여 cDNA로 역전사하였다. 다중화 ddPCR을 KH902 및 참조 전사체, 글루쿠로니다제 베타 (GUSB) (#4448489; 써모피셔)를 표적화하는 프로브를 갖는 QX200 ddPCR 시스템 (바이오-래드 래보러토리즈(Bio-Rad Laboratories), 미국 캘리포니아주 허큘레스)을 사용하여 수행하였다. KH902에 대한 프라이머 및 프로브 세트를 디자인하고, 인테그

레이티드 디엔에이 테크놀로지스(Integrated DNA Technologies) (미국 아이오와주 코칼빌) (정방향: 5'-GGACATACACAACCCAGAGAGAC-3' (서열식별번호: 27) 및 역방향: 5'-GTGAGTGAAAGAGACACAGGAA-3 (서열식별번호: 28), 프로브: 5'-/56-FAM/CCCATTTC/A/ZEN/AAGGAGAAGCAGAGCCA/3IAbkfq/-3' (서열식별번호: 29))에 의해 합성하였다. KH902 mRNA 카피 수를 GUSB 카피에 대해 정규화하였다. ddPCR 결과는 KH902 값 대 GUSB 값의 비로서 제시된다.

[0284] 웨스턴 블롯

[0285] 각각의 그룹에서의 풀링된 각막으로부터의 총 단백질을 퀴아젠 티슈라이시스(TissueLysis) II를 사용한 균질화 후, 신선한 프로테아제 및 포스파타제 억제제 (써모 피셔 사이언티픽, 미국 매사추세츠주 월썸)를 갖는 RIPA 용해 완충제에서 얼음 상에서 추출하였다. 총 20 µg/레인 단백질 추출물을 4%-12% 비스-트리스 프리캐스트 겔 (Bis-Tris Precast Gel) (QP3510, SMOBIO) 상으로 로딩하고, 폴리비닐리덴 디플루오라이드 (PVDF) 막 (밀리포어(Millipore)) 상으로 옮겼다. 비특이적 결합을 트윈(Tween)-20을 갖는 트리스(Tris) 완충 염수 (TBST) 중 5% BSA로 차단하였다. 막을 토끼 항-절단된 Notch1 (#4147, 셀 시그널링 테크놀로지), 염소 항-마우스 D114 (AF1389, 알앤디 시스템스), 토끼 항-pERK1/2(#4370, 셀 시그널링 테크놀로지) 및 항-ERK1/2(#9102, 셀 시그널링 테크놀로지) 항체와 함께 4°C에서 밤새 인큐베이션하였다. 막을 막 가혹한 스트리핑 후 토끼 항-ERK와 함께 인큐베이션하였다. TBST로 세척한 후, 막을 서양고추냉이 퍼옥시다제-접합된 염소 항-토끼 IgG (1:10,000, G-21234; 인비트로젠), 또는 토끼 항-염소 IgG (1:1000; HAF017, 알앤디 시스템스)와 함께 1시간 반 동안 인큐베이션하였다. 단백질 검출을 오딧세이(Odyssey) 시스템과 조합으로 증진 화학발광 (ECL) 웨스턴 블롯팅 기질 (카탈로그 번호 W1001; 프로메가(Promega), 미국 위스콘신주 매디슨)을 사용하여 수행하였다. 특이적 밴드의 강도를 이미지제이 소프트웨어를 사용하여 정량화하였다.

[0286] 통계

[0287] 결과는 평균±SEM으로서 표현된다. 각각의 데이터 점은 3회의 반복실험 값의 평균을 나타낸다. 분석을 다수의 변수에 대해 1-원 또는 2-원 ANOVA를 사용하여 수행하고, 터키(Tukey) 다중-비교 검정을 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism) 7.0 (그래프패드 소프트웨어(GraphPad Software), 미국 캘리포니아주 라호이아)을 사용하여 그룹간 차이에 대해 사용하였다.  $p < 0.05$ 를 유의한 것으로 간주하였다.

[0288] 실시예 5: 플라스미드 분석

[0289] KH902 트랜스진을 함유하는 2개의 플라스미드를 생산하였다. 플라스미드 1은 5'AAV ITR, CBA 프로모터, 인트론, 코작 서열, KH902를 코딩하는 트랜스진, 토끼 글로블린 폴리A, 및 3'AAV ITR을 포함하는 rAAV 벡터를 포함한다. rAAV 벡터 서열은 플라스미드 1의 5'-ITR에서 3'-ITR로 작동되고, 서열식별번호: 3에 제시된다. 플라스미드 1의 전체 플라스미드 서열은 서열식별번호: 30에 제시된다.

[0290] 플라스미드 2는 5'AAV ITR, CMV 프로모터, 인트론, 코작 서열, KH902를 코딩하는 트랜스진, SV40 폴리A, 및 3'AAV ITR을 포함하는 rAAV 벡터를 포함한다. KH902 트랜스진의 서열은 코돈 최적화되었다. 플라스미드 2의 전체 플라스미드 서열은 서열식별번호: 31에 제시된다.

[0291] 플라스미드의 각각에는 ITR1 및 ITR2 (예를 들어, 각각 rAAV 벡터의 5' 및 3' ITR)로 명명된 2개의 ITR 서열이 있다. 2개의 플라스미드에는 다수의 SmaI 부위가 있다; ITR1에 2개 및 ITR2에 2개. SmaI로의 플라스미드 소화 후의 이론적인 DNA 밴드의 수 및 크기를 계산하였다. 플라스미드가 무손상인 경우, SmaI 소화의 위치는 DNA 서열에 따라 결정될 수 있고, DNA 밴드의 수 및 크기는 SmaI에 의해 완전히 소화된 후에 계산될 수 있다. 이는 무손상 플라스미드의 밴드 프로파일이다. 플라스미드의 ITR1이 소화된 경우 (ITR1에서 SmaI 부위의 결실과 등가임), SmaI로 완전히 소화된 후에 결실된 플라스미드의 DNA 밴드의 수 및 크기를 계산하였다. 이는 ITR1-결실된 플라스미드의 밴드 프로파일이다. 동일한 방법을 사용하여 SmaI로 완전히 소화된 후에 ITR2-결실된 플라스미드, 및 ITR1+ITR2-결실된 플라스미드의 밴드 프로파일을 계산하였다. 플라스미드 1 및 플라스미드 2의 샘플을 SmaI을 사용하여 완전히 소화시키고, 아가로스 겔 전기영동을 수행하였다. ITR 결실의 경우에, 샘플은 무손상 플라스미드 및 결실된 플라스미드의 혼합물일 것으로 예상된다. 전기영동 DNA 밴드에 따라, ITR 결실의 가능한 유형 및 정도가 추정될 수 있다.

[0292] 플라스미드 1이 무손상인 경우, 겔 전기영동 스펙트럼은 407 bp, 307 bp, 343 bp, 2868 bp, 및 2817 bp 부근의 밴드를 나타낼 것이다. 플라스미드 1의 ITR1이 결실된 경우, 밴드는 3171 bp 부근에서 나타날 것이다. ITR2가 소실되는 경우, 밴드는 5696 bp 부근에서 나타날 것이고, ITR1 및 ITR2 둘 다 소실되는 경우, 밴드는 6050 bp 부근에서 나타날 것이다. 실험 결과는 플라스미드 1 소화의 겔 전기영동 스펙트럼이 이론적인 완전한 플라스미

드 스펙트럼과 일치하였고, 3171, 5696, 또는 6050 bp 주위의 밴드가 없었음을 제시하였으며, 이는 플라스미드 1이 ITR 결실을 갖지 않았음을 지시한다.

[0293] 플라스미드 2가 무손상인 경우, 겔 전기영동 완전한 스펙트럼은 2817 bp 및 2834 bp 부근의 밴드를 나타낼 것이다. ITR1 및/또는 ITR2가 소실되는 경우, 밴드는 5673 bp 부근에서 나타날 것이다. 플라스미드 2 소화의 겔 전기영동 결과는 >5000bp의 소수의 밴드가 있었던 반면, 정상적인 플라스미드 소화 지도는 5000bp 초과 밴드를 나타내지 않았음을 제시하였으며, 이는 플라스미드 2가 ITR1 및/또는 ITR2 결실을 포함함을 지시한다.

[0294] **실시예 6: 청색증 토끼에서의 단일 유리체내 주사 후의 단백질 발현**

[0295] 이 실시예는 단일 유리체내 주사 후에 청색증 토끼의 눈 조직에서 상이한 rAAV 벡터에 의해 발현된 KH902 단백질의 분포를 기재한다. AAV7m8 캡시드 단백질에 의해 캡시드화된 CMV 인핸서 및 닭β-액틴 프로모터 조절 카세트에 의해 유도된 KH902 트랜스진을 함유하는 rAAV 7m8-CBA-KH902 (예를 들어, 실시예 5에 기재된 바와 같은 플라스미드 1)를 사용하였다. AAV7m8 캡시드 단백질에 의해 캡시드화된 CMV 프로모터, 인트론, 코작 서열, KH902를 코딩하는 코돈 최적화된 트랜스진, WPRE, SV40 폴리A, 및 3'AAV ITR을 포함하는 단리된 핵산을 함유하는 rAAV 7m8-CMV-KH902를 비교를 위해 사용하였다. rAAV7m8-CMV-902를 생산하는데 사용된 플라스미드는 서열식별 번호: 32에 제시된다.

[0296] 청색증 토끼의 좌측 및 우측 눈에서의 rAAV 7m8-CBA-KH902 또는 rAAV 7m8-CMV-KH902의 유리체내 주사 ( $2E^{11}$  vg/50 μl) 후, 동물을 특정된 시간 (제2주 및 제4주)에서 희생시켰다. 이어서, 안구 및 시신경을 제거하고, 안구를 절개하고, 망막-맥락막 및 유리체를 분리하고, 콘베르셉트 단백질 (예를 들어 KH902 단백질)의 발현을 균질화 후에 측정하였다.

[0297] 데이터는 rAAV 7m8-CBA-KH902가 rAAV 7m8-CMV-KH902와 비교할 경우 망막 맥락막 총 및 유리체에서 보다 높고 보다 안정한 발현을 가졌음을 지시한다 (표 1).

[0298] 표 1

백터	샘플링 시간	망막-맥락막 (ng/g)				유리체 (ng/g)			
		암컷-좌측	암컷-우측	수컷-좌측	수컷-우측	암컷-좌측	암컷-우측	수컷-좌측	수컷-우측
rAAV 7m8-CBA-KH902	제2주	1125	1432	1346	207	311	331	291	462
	제4주	1312	1763	1226	208	675	777	193	341
rAAV 7m8-CMV-KH902	제2주	0	225	3226	2900	9	14	12	5
	제4주	86	120	49	19	1	1	3	2

[0299] **실시예 7: 시노물구스 원숭이에서의 망막하 전달에 의한 방수의 발현**

[0301] CMV 인핸서, 닭β-액틴 프로모터 조절 카세트에 의해 유도된 KH902 트랜스진을 함유하는 rAAV8-CBA-KH902 (예를 들어, 실시예 5에 기재된 바와 같은 플라스미드 1)를 이 연구에 사용하였다.

[0302] rAAV8-CBA-KH902를 상부 혈관 아치 바로 밑의 측두 측 상에서  $1E^{12}$  vg/100 μL/눈의 용량으로 시노물구스 원숭이의 눈 내로 망막하로 주사하였다. 전안방의 방수를 투여 후 제3일, 제7일, 제21일 및 제28일에 약 50 μL/눈으로 샘플링하였다. 방수에서의 표적 단백질의 농도를 ELISA에 의해 검출하였으며, 결과는 표 2에 제시된다. 방수에서의 콘베르셉트 단백질 (예를 들어, KH902 단백질)의 농도는 주사 후 28일 내에 점차적으로 증가하였음이 관찰되었다.

[0303] 표 2

시간	방수 (ng/ml)	
	좌측 눈	우측 눈
제3일	검출되지 않음	0.6
제7일	14.5	30.5
제21일	78.6	141.4
제28일	116	162.6

[0304] **실시예 8: 망막하 전달에 의한 레수스 원숭이에서의 벡터의 효능**

[0306] 비인간 영장류 (NHP)는 인간의 그것과 유사한 황반 구조를 갖는다. 레이저 광응고에 의해 유도된 NHP 맥락막 신생혈관화 모델은 nAMD에 대한 한 모델이다 (Wang Q, et al. British Journal of Ophthalmology, 2015, 99(1):119-24.). 실시예 7에 기재된 rAAV8-CBA-KH902를 이 연구에 사용하였다. 건강한 눈을 갖는 레수스 원숭이를 선택하여 동공 확장 및 마취 후에 작업 테이블 상에 반듯하게 눕게 하였다. 눈 주위의 피부를 포비돈 아이오딘으로 소독하고, 결막낭을 포비돈 아이오딘 점막 소독제로 세척하였다. WPI 미세주사 바늘 (36G)을 사용하여 기공을 통해 유리체강 내로 침투시키고, 검영기를 각막 상에 정치하였다. 주사를 후방극의 상부 혈관 아치 부근에서 100  $\mu$ L/눈의 부피로 수행하였다. 투여한 날을 제1일로서 기록하였다. 투여량 및 그룹화는 하기 표 3에 제시된다.

[0307] 표 3

그룹 번호	그룹 명칭	동물의 수	눈의 수	용량 $\mu$ g/눈	부피 $\mu$ L	투여 방식
1	고용량	3	6	2E12	100	망막하 주사
2	중간 용량	3	6	1E12	100	망막하 주사
3	저용량	3	6	5E11	100	망막하 주사
4	음성 대조군	3	6	완충제	100	망막하 주사
5	양성 대조군	2	4	0.5mg	50 $\mu$ L	유리체내 주사

[0308]

[0309] 제15일에, 레수스 원숭이를 확장 및 마취시키고, 카르보머 점안액을 안구 표면에 적용하고, 안저 레이저 렌즈를 사용하였다. 안저가 명백하게 보여진 후, 황반 중심와로부터 약 1.5~2 PD 떨어진 위치를 선택하여 혈관을 회피하여 광응고를 수행하였다. 레이저 파라미터는 하기와 같이 설정된다: 파장 532nm, 전력 450-550MW, 스폿 직경 50  $\mu$ m, 노출 시간 100ms. 양성 대조군 그룹에서, 50  $\mu$ L 콘베르셋트 안과 주사 (0.5mg/눈)를 레이저 광응고 직후 유리체내로 주사하였다.

[0310] 검출 및 검사 인덱스를 위해, 증진 심층 영상화 시각 간섭 단층촬영 (EDI-OCT)을 사용하여 그룹 1-4에서의 동물의 눈을 투여 전에, 투여 직후에, 제15일에 (모델링 전후), 제29일에, 제43일에, 및 제57일에 조사하였다. OCT를 사용하여 그룹 5에서의 동물의 눈을 투여 전에, 제15일에 (모델링 후에), 제29일에, 제43일에, 및 제57일에 조사하였다. 레이저 검사 전 영역은 후방 극, 투여 영역, 및 모든 레이저 광응고 스폿을 커버해야 한다.

[0311] 형광 누출에 의해 유발된 등급 4 병변에 상응하는 OCT 영상에서의 과-반사성 물질 (SHRM)의 두께를 기기에 의해 제공된 소프트웨어를 사용하여 측정하고, 각각의 눈에 대한 평균 SHRM 두께를 계산하였다.

[0312] 안저 촬영술 및 형광 혈관촬영술 (FP 및 FFA)을 사용하여 그룹 1-4에서의 동물의 눈을 투여 전, 투여 직후 (FP 단독), 제15일 (FP 단독, 모델링 전후), 제29일, 제43일, 및 제57일에 조사하였다. FA 및 FFA를 사용하여 그룹 5에서의 동물의 눈을 제15일 (FP 단독, 모델링 후), 제29일, 제43일, 및 제57일에 조사하였다. 안저 플루오레세인 혈관촬영술 전에, 동물을 플루오레세인 나트륨 주사 (10 mg/kg, 100 mg/mL)로 정맥내로 주사하였다.

[0313] 안저 플루오레세인 혈관촬영술의 초기 및 후기 영상을 비교하고, 맥락막 신생혈관화 및 누출을 동물의 안저에서의 형광 누출의 존재에 따라 결정하였다. 형광 누출의 정도를 등급화하고, 등급 4 병변의 수 및 비율을 계산하였다. 등급화 기준은 하기에 제시된다:

[0314] 등급 1: 병변에서 높은 형광이 나타나지 않음;

[0315] 등급 2: 높은 형광을 갖지만 형광 누출을 갖지 않는 병변;

[0316] 등급 3: 약간의 형광 누출을 갖는 높은 형광 병변, 누출은 병변 연부를 초과하지 않음;

[0317] 등급 4: 약간의 형광 누출을 갖는 높은 형광 병변, 누출은 스폿 연부를 초과함.

[0318] 등급 4 병변의 누출 면적이 측정되어야 한다 (주: 광응과 스폿이 약물 투여 후의 검사 시점 중 하나에서 등급 4 병변으로서 등급화되는 경우, 이 병변의 형광 누출 면적은 모든 검사 시점에서 측정되어야 한다. 형광 누출이 없는 경우, 측정은 요구되지 않는다).

[0319] 투여 후 제29일 (즉, 모델링 후 14일)에 등급 4 병변의 비 및 등급 4 병변의 누출 면적을 각각 도 22a 및 도 22b에 제시하였다. 고, 중간 및 저 용량 그룹에서 등급 4 병변의 비 및 등급 4 병변의 누출 면적은 음성 그룹에 비해 유의하게 감소한 것을 볼 수 있었다.

- [0320] 또한, 투여 후 제29일에 광점의 퇴행은 또한 도 22c에서 FFA로부터 관찰될 수 있다. 이 도면은 각각의 실험 그룹의 대표적인 FFA 도해이다. 도 22c로부터 볼 수 있는 바와 같이, 고, 중간 및 저 용량 약물 그룹의 등급 4 병변은 음성 그룹에 비해 유의하게 진정되었다.
- [0321] 증가물
- [0322] 본 발명의 몇몇 실시양태를 본원에 기재하고 예시하였지만, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 기능을 수행하고/거나 결과 및/또는 본원에 기재된 이점 중 하나 이상을 얻기 위해 다양한 다른 수단 및/또는 구조를 용이하게 상정할 수 있고, 이러한 변동 및/또는 변형의 각각은 본 발명의 범주 내인 것으로 간주된다. 보다 일반적으로, 관련 기술분야의 통상의 기술자는 본원에 기재된 모든 파라미터, 치수, 물질, 및 배열이 예시적인 것으로 의미되며, 실제 파라미터, 치수, 물질, 및/또는 배열은 본 발명의 교시내용이 사용되는 구체적인 적용 또는 적용들에 의존할 것임을 용이하게 인정할 것이다. 관련 기술분야의 통상의 기술자는 통상적인 실험 이하를 사용하여 본원에 기재된 본 발명의 구체적인 실시양태에 대한 많은 증가물을 인식하거나 확인할 수 있을 것이다. 따라서, 상기 실시양태는 단지 예로서 제시되며, 첨부된 청구범위 및 그에 대한 증가물의 범주 내에서, 본 발명은 구체적으로 기재되고 청구된 것과 다르게 실시될 수 있음이 이해되어야 한다. 본 발명은 본원에 기재된 각각의 개별적 특색, 시스템, 물품, 물질, 및/또는 방법에 관한 것이다. 또한, 2개 이상의 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질, 및/또는 방법의 임의의 조합은, 이러한 특색, 시스템, 물품, 물질, 및/또는 방법이 상호 불일치하지 않는 경우, 본 발명의 범주 내에 포함된다.
- [0323] 명세서에서 및 청구범위에서 본원에 사용된 단수 형태는, 명백하게 반대로 지시되지 않는 한, "적어도 하나"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다.
- [0324] 명세서에서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "및/또는"은 그렇게 함께 결합된 요소, 즉, 일부 경우에 결합하여 존재하고 다른 경우에 분리되어 존재하는 요소 중 "어느 하나 또는 둘 다"를 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 명백하게 반대로 지시되지 않는 한, 구체적으로 확인된 요소와 관련된 비관련되든, "및/또는" 조합에 의해 구체적으로 확인된 요소 이외에 다른 요소가 임의로 존재할 수 있다. 따라서, 비-제한적 예로서, 개방-단부 언어, 예컨대 "포함하는"과 함께 사용되는 경우, "A 및/또는 B"에 대한 언급은 한 실시양태에서, B 없는 A (B 이외의 요소를 임의로 포함함); 또 다른 실시양태에서, A 없는 B (A 이외의 요소를 임의로 포함함); 추가의 또 다른 실시양태에서, A 및 B 둘 다 (다른 요소를 임의로 포함함) 등을 지칭할 수 있다.
- [0325] 명세서에서 및 청구범위에서 본원에 사용된 "또는"은 상기 정의된 바와 같은 "및/또는"과 동일한 의미를 갖는 것으로 이해되어야 한다. 예를 들어, 목록에서 항목을 분리하는 경우, "또는" 또는 "및/또는"은 포괄적인 것으로, 즉, 요소의 수 또는 목록 중 적어도 하나 (그러나 또한 하나 초과를 포함함), 및, 임의로, 추가의 비열거된 항목의 포함으로 해석될 것이다. 단지 명백하게 반대로 지시된 용어, 예컨대 "단지 하나" 또는 "정확하게 하나", 또는, 청구범위에서 사용되는 경우, "이루어진"은 요소의 수 또는 목록의 정확하게 하나의 요소의 포함을 지칭할 것이다. 일반적으로, 본원에 사용된 용어 "또는"은 배타성의 용어, 예컨대 "어느 하나", "하나", "단지 하나", 또는 "정확하게 하나"에 의해 진행되는 경우, 단지 배타적인 대안 (즉, "하나 또는 다른 것, 그러나 둘 다는 아님")을 지시하는 것으로 해석될 것이다. 청구범위에서 사용되는 경우, "본질적으로 이루어진"은 특허법의 분야에 사용되는 바와 같은 그의 통상적인 의미를 가질 것이다.
- [0326] 하나 이상의 요소의 목록에 관하여 명세서에서 및 청구범위에서 본원에 사용된 어구 "적어도 하나"는 요소의 목록에서 요소 중 임의의 하나 이상으로부터 선택되는 적어도 하나의 용소를 의미하는 것으로 이해되어야 하지만, 반드시 요소의 목록 내에 구체적으로 열거된 각각의 및 모든 요소 중 적어도 하나를 포함하지는 않으며, 요소의 목록에서 요소의 임의의 조합을 배제하지 않는다. 이 정의는 또한 구체적으로 확인된 요소와 관련된 비관련되든, 어구 "적어도 하나"가 지칭하는 요소의 목록 내에 구체적으로 확인된 요소 이외의 요소가 임의로 존재할 수 있음을 허용한다. 따라서, 비-제한적 예로서, "A 및 B 중 적어도 하나" (또는, 증가적으로, "A 또는 B 중 적어도 하나", 또는, 증가적으로 "A 및/또는 B 중 적어도 하나")는 한 실시양태에서, B가 존재하지 않는 하나 초과 A를 임의로 포함하는 적어도 하나 (및 B 이외의 요소를 임의로 포함함); 또 다른 실시양태에서, A가 존재하지 않는 하나 초과 B를 임의로 포함하는 적어도 하나 (및 A 이외의 요소를 임의로 포함함); 추가의 또 다른 실시양태에서, 하나 초과 A를 임의로 포함하는 적어도 하나, 및 하나 초과 B를 임의로 포함하는 적어도 하나 (및 다른 요소를 임의로 포함함) 등을 지칭할 수 있다.
- [0327] 청구범위에서, 뿐만 아니라 상기 명세서에서, 모든 전이적 어구, 예컨대 "포함하는", "포괄하는", "보유하는", "갖는", "함유하는", "수반하는", "수용하는" 등은 개방-단부인 것으로, 즉, 포함하나 이에 제한되지는 않음을 의미하는 것으로 이해되어야 한다. 단지 전이적 어구 "이루어진" 및 "본질적으로 이루어진"은 미국 특허청 특

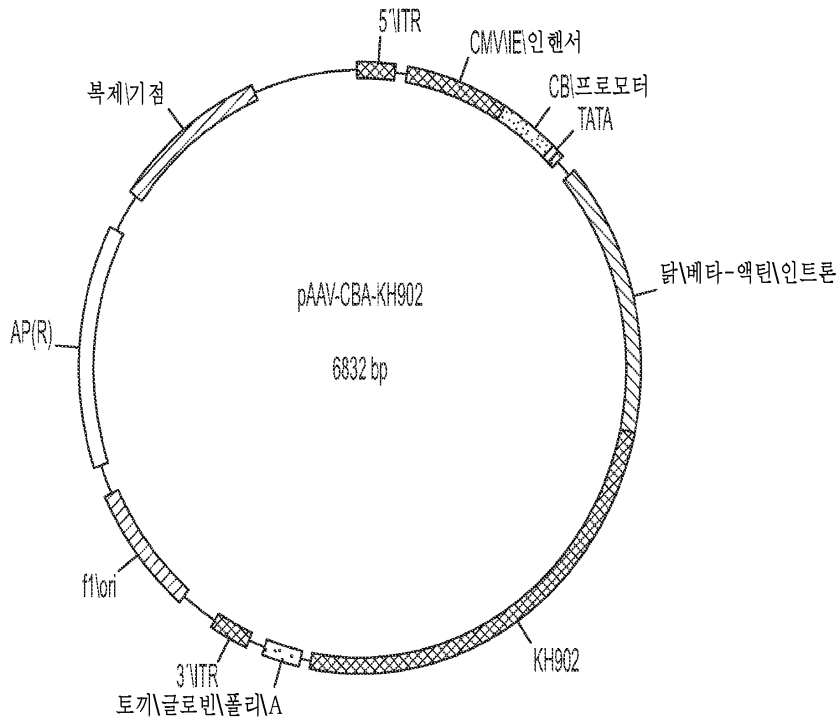
허 심사 절차 지침서, 섹션 2111.03에 제시된 바와 같이, 각각 폐쇄 또는 반-폐쇄 전이적 어구일 것이다.

[0328]

청구항 요소를 수식하기 위해 청구항에서 서수 용어, 예컨대 "제1", "제2", "제3" 등의 사용은 그것만으로 임의의 우선순위, 우선성, 또는 또 다른 것에 비한 하나의 청구항 요소의 순서 또는 방법의 작용이 수행되는 시간적 순서를 내포하지 않지만, 단지 청구항 요소를 구별하기 위해, 특정 명칭을 갖는 하나의 청구항 요소를 (서수 용어의 사용을 제외하고는) 동일한 명칭을 갖는 또 다른 요소로부터 구별하는 표지로서 사용된다.

**도면**

**도면1a**



도면 1ba

```

1 CTGCGCGCTC GCTCGCTCAC TGAG3CCGCC CGGGCAAAGC CCGGGCGTCG GCGGACCTTT
61 GGTGGCCCGG CCTCAGTGAG CGAGCGAGCG CGCAGAGAGG GAGTGGCCAA CTCATCACT
121 AGGGGTTCCT TCTAGTAAAT GATTAACCCG CCATGCTACT TATCTACCAG GGTAAATGGG
181 ATCCTCTAGA ACTATAGCTA CTCGACATTG ATTATTGACT AGTTATTAAT AGTAATCAAT
241 TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GGAGTTCGCG GTTACATAAC TTACGGTAAA
301 TGGCCCGCCT GCCTGACCGC CCAACGACCC CGGCCCATPG ACCTCAATAA TGACGTATGT
361 TCCCATAGTA AGCCCAATAG GGACTTTCCTA TTGACGTCAA TGGGTGGAGT ATTTACGGTA
421 AACTGCCCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTA TCATATGCCA AGTAACGCCC CTATTGAOCT
481 CAATGACGGT AAATGGCCCG CCTGGCATTG TCCCGAGTAC ATGACCTTAT GGCACTTTCC
541 TACTTGGCAG TACATCTACG TATTAGTCAT CGCTATTACC ATGGTCGAGG TGAGCCCCAC
601 GTTCTGTGTC ACTCTCCCCA TCTCCCCCCC CTCGCCACCC CCAATTTTGT ATTTATTTAT
661 TTTTAAATTA TTTGTGTCAG CGATGGGGCC GGGGGGGGGG GGGGGGGCGC CGCCAGGCGG
721 GCGGGGGCGG GCGGAGGGGC GGGGCGGGCC GAGGCGGAGA GGTGCGGCGG CAGCCAATCA
781 GAGCGGGCGG CTCGAAAGT TTCTTTTAT GCGGAGGCGG CCGCGGGCGC GGCCTATAAA
841 AAAGCGAAGC GCGGGGCGGG CGGGGAGTCC CTGCGACGCT GCCTTCGCCC CGTGC000CG
901 TCGGCGCGCG CCTCGCCCGC CCGGCCCGGG CTCTGACTGA CCGCGTACT CCCACAGGTG
961 AGCGGGCGGG ACGGCCCTTC TCCTCCGGCC TGTAAATAGC GCTTGTTTTA ATGACGGCTT
1021 GTTTCTTTTC TCTGGCTGGG TGAAGCCTT GAGGGCTCC GGGAGGGCCC TTTGTGCGGG
1081 GCGAGCGGCT CCGGGGCTGC CTGCGTGTGT GTGTGCGTGG GGAGCGCGCC GTGCGGCTCC
1141 GCGCTGCCCG GCGGCTCTGA CGGCTGCGGG CCGGGCGCGG GCCTTTGTGC GCTCCGCACT
1201 GTGCGCGAGG GCAGCGCGCC CGGGGCGGGT GCCCGCGGT GCGGGGGGGG CTGCGAGGGG
1261 AACAAAGCCT GCGTCCCGGG TCTGTGCGTG GGGGGGTGAG CAGGGGGTGT GGGCGGCTCG
1321 GTGCGGCTGC AACCCCCCTT GCACCCCCCT CCCCAGTTG CTGAGCACGG CCGGGCTCG
1381 GGTGCGGGCC TCCGTACGGG CGGTGGCGCG GGGCTCGCGG TCGCGGGCGG GGGGTGGCGG
1441 CAGCTGGGGG TCCGGGCGGG GCGCGGGCGC CTCGGGGCGG GGGAGGGCTC GGGGAGGGG
1501 CGCGCGCGCC CCGGGAGCGC CGCGGGCTGT CGAGCGCGGG CGAGCGCGAG CCATTGCCCTT
1561 TTATGGTAAT CGTGCAGAGG GCGCGAGGGA CTTCCTTTGT CCCAATCTG TCGGAGCGG
1621 AAATCTGGGA GCGCGCGCGG CACCCCTCTT AGCGGGCGCG GGGCGAAGCG GTCGGGCGCC
1681 GGCAGGAAGG AAATGGCGGG GAGGGCCTT CGTGGCTGCG CGCGCGCGG TCCCTTCTC
1741 CCTCTCCAGC CTCGGGCGTG TCCCGGGGG GACGCTGCC TTCGGGGGGG ACGGGGCGG
1801 GCGGGGTTCG GCTCTGCGG IGTGACCGGC GGTCTAGAG CCTCTGCTAA CCATGTTTCT
1861 GCCTTCTTCT TTTTCCYACA GCTCCTGGGC AACGTGCTGG TTATTGTGCT GTCTCATCAT
1921 TTTGGCAAAG AATTCGCCAC CATGCTCAGC TACTGGGACA CCGGGGTCTT GCTGTGCGCG
1981 CTGCTCAGCT GTCTGCTTCT CACAGGATCT AGTTCCGGAG GTAGACCTTT CGTAGAGATG
2041 TACAGTGAAG TCCCGGAAAT TATACACATG ACTGAAGGAA GCGAGCTCGT CATTCCCTGC
2101 CGGGTTACGT CACCTAACAT CACTGTTACT TTAATAAAGT TTCCACTTGA CACTTTGATC
2161 CCTGATGAA AACGATAAT CTGGGACAGT AGAAAGGCT TCATCATATC AAATGCAACG
2221 TACAAAGAAA TAGGCTTCT GACCTGTGAA GCAACAGTCA ATGGGCATTT GTATAAGACA
2281 AACTATCTCA CACTCCACA AACCAATACA ATCATAGATG TGGTCTGAG TCCGTCTCAT
2341 GGAATTGAAC TATCTGTGG AGAAAAGCTT GTCTTAAATT GTACAGCAAG AACTGAACTA

```

(SEQ ID NO:3)

도면 1bb

2401 AATGTGGGA TTGACTTCAA CTGGGAATAC CCTTCTTOGA AGCATCAGCA TAAGAAACTT  
 2461 GTAACCCGAG ACCTAAAAAC CCAGTCTGGG AGTGAGATGA AGAAATTTTT GAGCACCTTA  
 2521 ACTATAGATG GTGTAAACCG CAGTGACCAA GGATTGTACA CCTGTCCAGC ATCCAGTGGG  
 2581 CTGATGACCA AGAAGAACAG CACATTTGTC AGGTCCCATG AAAAACCTTT TGTTCCTTTT  
 2641 GGAAGTGGCA TGGAACTCTT GGTGGAAGCC ACGGTGGGGG AGCGTGTCCG AATCCCTGCG  
 2701 AAGTACCTTG GTTACCCACC CCCAGAAATA AAATGGTATA AAAATGGAAT ACCCCTTGAG  
 2761 TCCAATCACA CAATTAAGC GGGGCATGTA CTGACGATTA TGGAAAGTAG TGAAGAGAGC  
 2821 ACAGAAAATT ACACCTGTCAH CCTTACCAAT CCCATTTCAA AGGAGAAGCA GAGCCATGTG  
 2881 GTCTCTCTGG TTGTGATGT CCCACGGGGC CCGGCGGACA AAATCACCAC ATGCCACTG  
 2941 TGCCAGCAC CTGAACTCCT GGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC AAAACCCAG  
 3001 GACACCTCA TGAFTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG TGGTGGTGA CGTGAGCCAC  
 3061 GAAGACCCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC GTGGACGGCG TCGAGGTGCA TAATGCCAAG  
 3121 ACAAAGCCCG GCGAGGAGCA CTACAACAGC ACGTACCCGT TGGTCAAGCT COTCACCGTC  
 3181 CTCACCCAGG ACTGGGTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC  
 3241 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCGAAGGGC AGCCCCGAGA ACCACAGGTG  
 3301 TACACCTGCG CCCCATCCCG GGATGAGCTG ACCAAGAACC AGGTCAAGCT CACTGACCTA  
 3361 GTCAAGGGCT TCTATCCCG CCACATCGCC GTGGAGTGGG AGAGCAATGG CCAGCCGCG  
 3421 AACCACTACA AGGCCACGCG TCCCGTGGTG GACTCCGAGG GCTCCTTCTT CCTCTACAGC  
 3481 AAGCTCACCG TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCGGIGATG  
 3541 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCG AGAGGCTCT CCTGTCTCC GGTAAATGA  
 3601 AGCGCTGGTA CCTCTAGAGT CGACCCGGGG GCGCTCGAGG ACGGGGTGAA TACGCTCA  
 3661 GGATCCGATC TTTTCCCTC TGCCAAAAT TATGGGGACA TCATGAAGCC CCTTGACCAT  
 3721 CTGACTTCTG GCTAAIAAAG GAAATTTAT TTCAATGCAA TAGTGTGTTG GAATTTTTG  
 3781 TGTCTCTCAC TCGGAACCAA TTGTTGATC TGAATTTGCA CCACCCATAA TACCCATTAC  
 3841 CTTGTTAGAT AAGTAGCATG CCGGCTTAAT CATTAACTAC AAGGAACCCC TAGTGATGGA  
 3901 GTTGGCCACT CCTCTCTGCG CCGCTCGCTC GCTCACTGAG GCGGGGCGAC CAAAGGTCCG  
 3961 CCGAGCCCGG GCCTTCCCGG GGGCGGCTC AGTAGCGGAG CGAGCGGCA GCCTTAATTA  
 4021 ACCTAATFCA CTGGCCGTCG TTTTACAACG TCGTGACTGG GAAAACCCCTG GCGTTACCCA  
 4081 ACTTAATCGC CTTGCACGAG ATCCCCCTTT CCGCAGCTGG CTAATAGCG AAGAGGCCCG  
 4141 CACCGATCGC CCTTCCCAAC AGTTGGCGAG CCTGAATGGC GAATGGCAGG CGCCCTGTAG  
 4201 CGCCGCNTTA AGCCCGCGCG GTGTGTTGGT TACGCGCAGC GTGACCGCTA CACTTGCCAG  
 4261 CGCCCTAGGG CCGCTCTCTT TCGCTTCTT CCTTCCCTTT CTGCGCCAGT TCGCCGGCTT  
 4321 TCCCCGTCAA GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC CGATTTAGTG CTTTACGGCA  
 4381 CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA TGGTTCAGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA  
 4441 GACGGTTTTT CCGCCITTTG OGTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTGTITCCA  
 4501 AACTGGAACA ACACCTAACC CTATCTCGGT CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGCC  
 4561 GATTTCCGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTTACAA AAATTTAAG CGAATTTTAA  
 4621 CAAAATATTA ACGCTTACAA TTTAGGTGGC ACTTTTCGGG GAAATGTCCG CGGAACCCCT  
 4681 ATTTGTTTTT TTTTCTAAAT ACATTCAAAT ATGTATCCGC TCATGAGACA ATAACCCCTG  
 4741 TAAATGTTTC AATAAIATG AAAAAAGGAG AGTATGAGTA TTCAACATTT CCGTGTCCG

(SEQ ID NO:3)

계속

도면1b

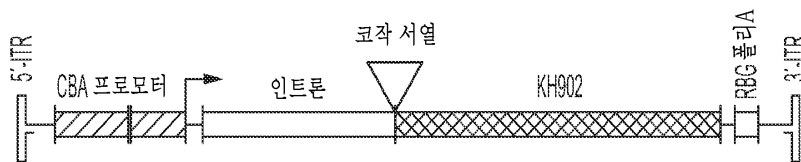
```

4801 CTTATTCOCT TTTTTCGGC ATTTTGCCTT CCTGTTTTTG CTCACCCAGA AACGCTGGTG
4861 AAAGTAAAAG ATGCTGAAGA TCAGTTGGGT GCACCGAGTGG GTTACATCGA ACTGGATCTC
4921 AACAGCGGTA AGATCCCTGA GAGTTTTCCG CCGGAAGAAC GTTTTCCAAT GATGAGCACT
4981 TTTAAAGTTC TCCTATCTGG CCGGTATTA TCCCGTATTG ACGCCGGGCA AGAGCAACTC
5041 GGTCCCGCA TACACTATTC TCAGAATGAC TTGGTTGAGT ACTCACCCAGT CACAGAAAAG
5101 CATCTTACGG ATGGCATGAC AGTAAGAGAA TTATGCAGTG CTGCCATAAC CATGAGTGAT
5161 AACACTCGGG CCAACTTACT TCTGACAACG ATCGGAGGAC CGAAGGAGCT AACCGCTTTT
5221 TTGCACAACA TEGGGGATCA TGTAACTCGC CTTGATCGTT GGGAACCGGA GCTGAATGAA
5281 GCCATACCAA ACGACGAGCG TGACACCACG ATGCCCTGTAG CAATGGCAAC AACGTTGCGC
5341 AAACATAATA CTGGCCAAC TACTACTCTA GCTTCCCGGC AACAAATAAT AACTGGATG
5401 GAGGCGGATA AAGTTCAGG ACCACTTCTG CGCTCGGCC TTCCGGCTGG CTGGTTTATT
5461 GCTGATAAAT CTGGAGCCGG TGAGCGTGGG TCTCGCGGTA TCATTGCAGC ACTGGGGCCA
5521 GATGGTAAGC CTTCCCTAT CTTAGTATC TACACGACGG GGAGTCAGGC AACTATGGAT
5581 GAACGAATA GACAGATCCG TGAGATAGGT GCCTCACTGA TTAAGCATTC GTAACGTCA
5641 GACCAAGTTT ACTCATATA ACTTTAGATT GATTTAAAAC TTCAFTTTTA ATTTAAAAGG
5701 ATCTAGGTGA ACATCCCTTT TGATAATCTC ATGACCAAAA TCCCTTAACG TGAGTTTTCG
5761 TTCCACTGAG CTTACAGACC CGTAGAAAAG ATCAAAGGAT CTTCTTGAGA TCCTTTTTTT
5821 CTCCCGGTAA TCTGCTGCTT CAAAACAAA AAACCACCGC TACCACGGGT GGTTCGTTTG
5881 CCGGATCAAG AGCTACCAAC TCTTTTTCCG AAGGTAAC TGCTCAGCAG AGCCGAGATA
5941 CCAAATACTG TTCTTCTAGT GTAGCCGTAG TTAGGCCACC ACTTCAAGAA CTCTGTAGCA
6001 CCGCCTACAT ACCTCCCTCT GCTAATCCTG TTACCAGTGG CTGCTGCCAG TGGCGATAAG
6061 TCGTGTCTTA CCGGGTTGGA CTCAAGACGA TAGTTACCGG ATAAGGCGCA GCGGTCCGGC
6121 TGAACGGGGG GTTCGTCCAC ACAGCCACG TTGGAGCGAA CGACCTACAC CGAACTGAGA
6181 TACCTACAGC GTGAGTATG AGAAAGCGCC ACGCTTCCCG AAGGGAGAAA GCGGACAGG
6241 TATCCGGTAA GCGGCAGGT CCGAACAGGA GAGCGCACGA GGGAGCTTCC AGGGGAAAAC
6301 GCCTGGHATC TTTATAGTCC TGTCCGGTTT CGCCACCTCT GACTTGAGCG TCGATTTTTG
6361 TGATGCTCGT CAGGGGGGGG GAGCCTATGG AAAAAAGCCA GCAACCGCGC CTTTTTACGG
6421 TTCTTGGCCT TTTGCTGGCC TTTTGCTCAC ATGTTCTTTC CTGCGTTATC CCTGTATTCT
6481 GTGGATAACC GTATTACCGC CTTTGAGTGA GCTGATACCG CTGCGCCGAC CCGAACGACC
6541 GAGCGCAGCG AGTCAGTGA CGAGGAAGCG GAAGACGCGC CAATACGCAA ACCGCCTCTC
6601 CCGCGCGGTT GCCCGATTCA TTAATGCAGC TGGCACGACA GGTTCCCGA CTGGAAAGCG
6661 GGCAGTGAGC GCAACGCAAT TAATGTGAGT TAGCTCACTC ATTAGGCACC CAGGCTTTA
6721 CACTTTATGC TTCCGCCTCG TATGTTGTGT GGAATTGTGA GCGGATAACA ATTTACACACA
6781 GGAAACAGCT ATGACCATGA TTACGCCAGA TTAATTAAG GCCTTAATTA GG
    
```

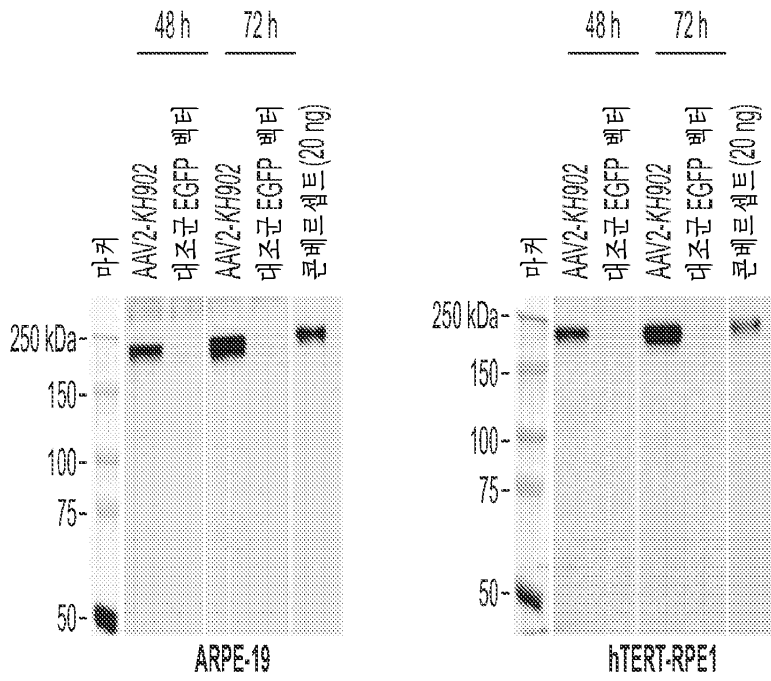
(SEQ ID NO:3)

계속

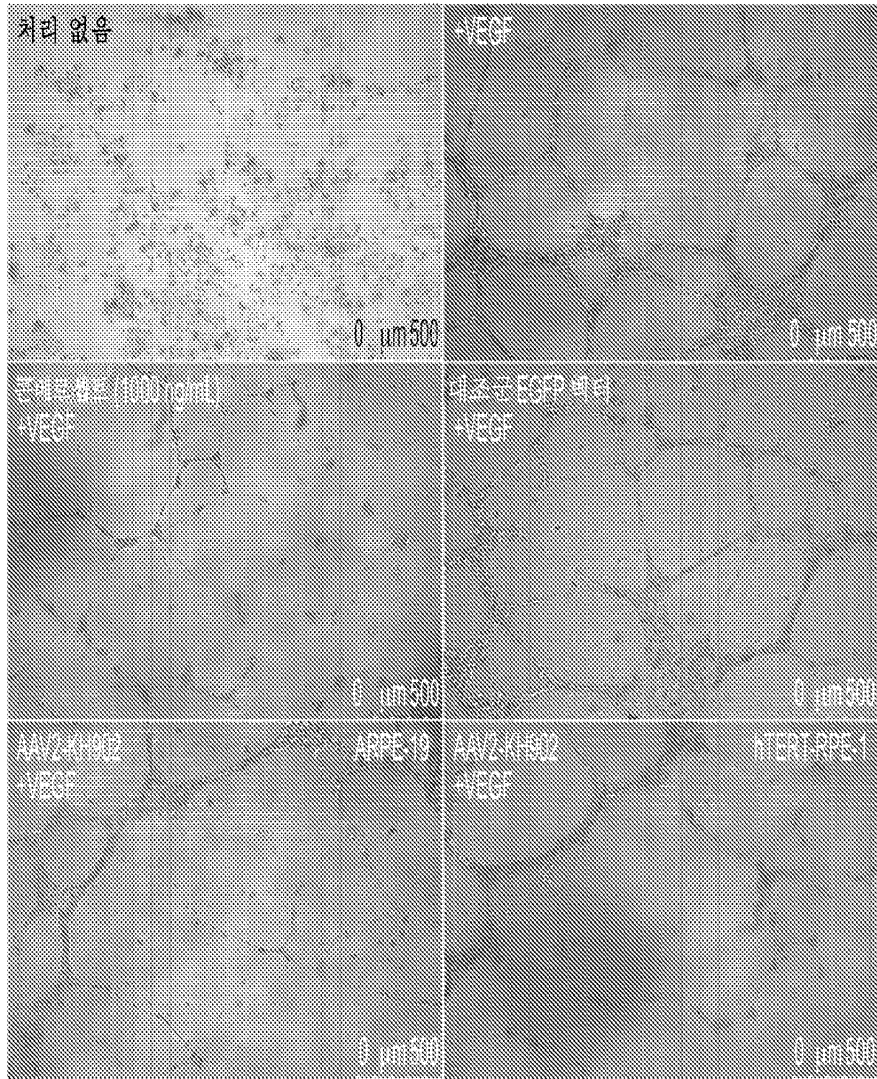
도면1c



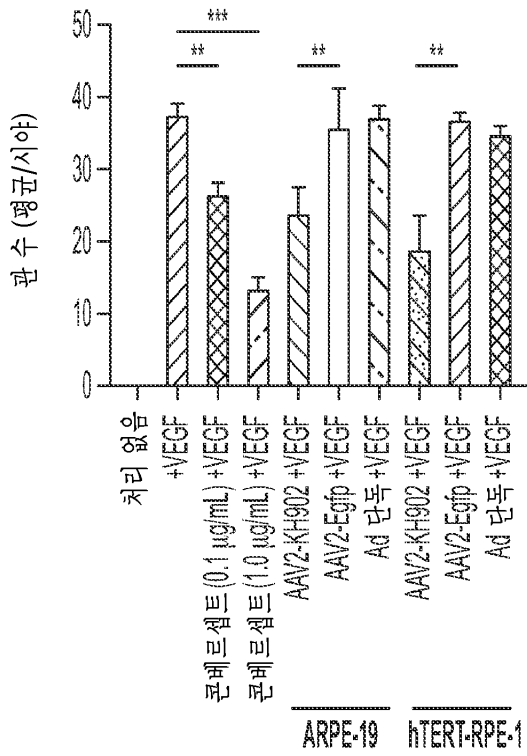
도면2



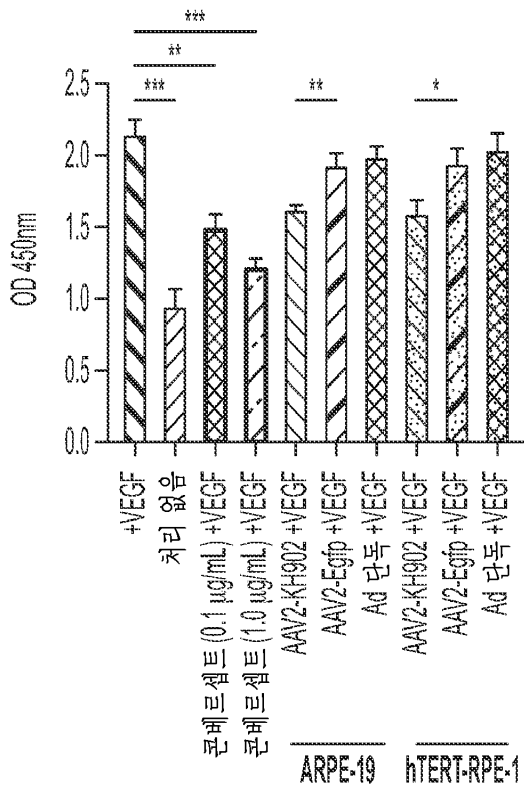
도면3a



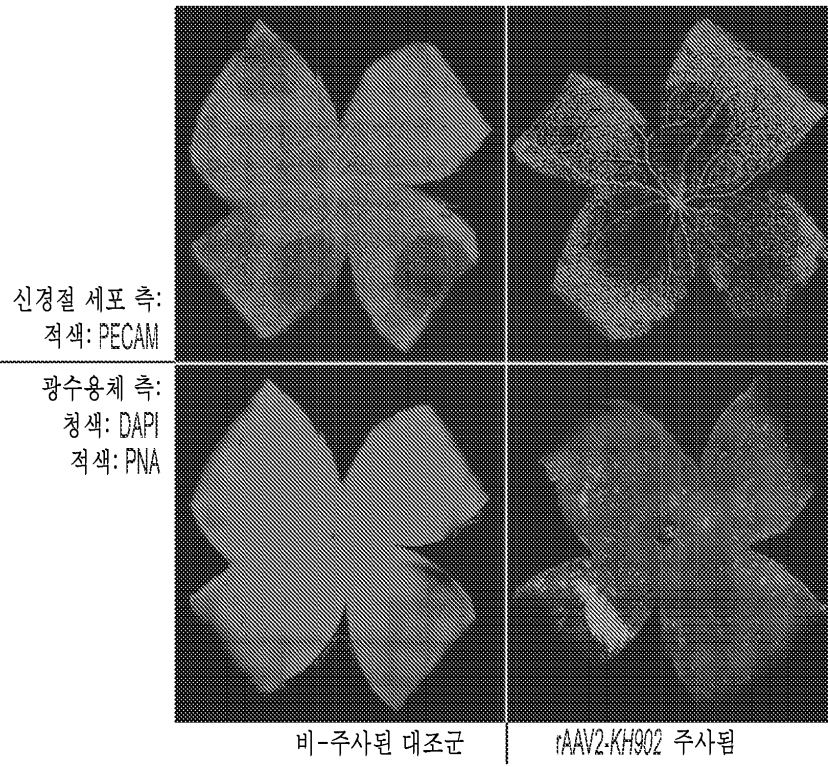
도면3b



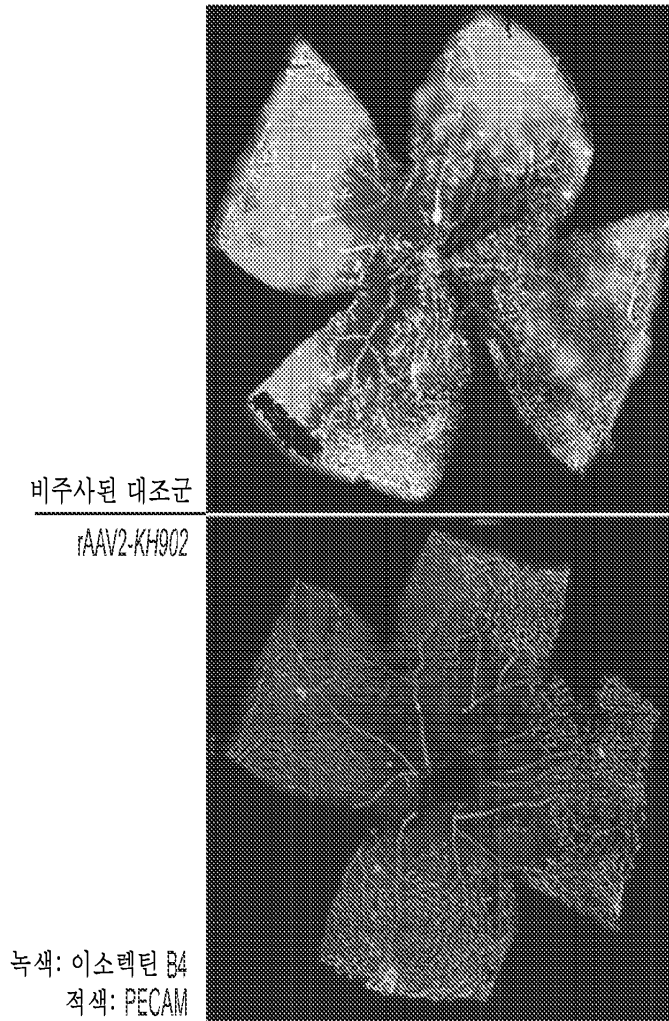
도면3c



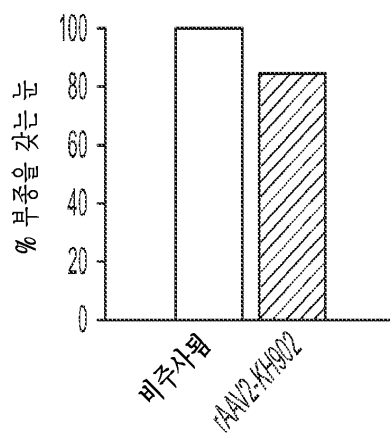
도면4



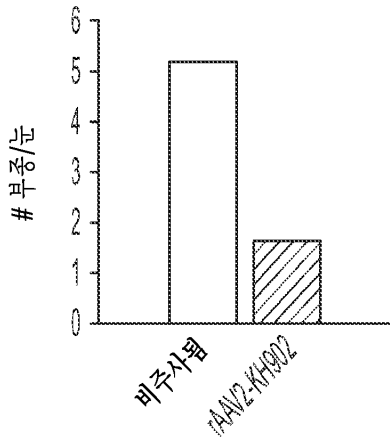
도면5a



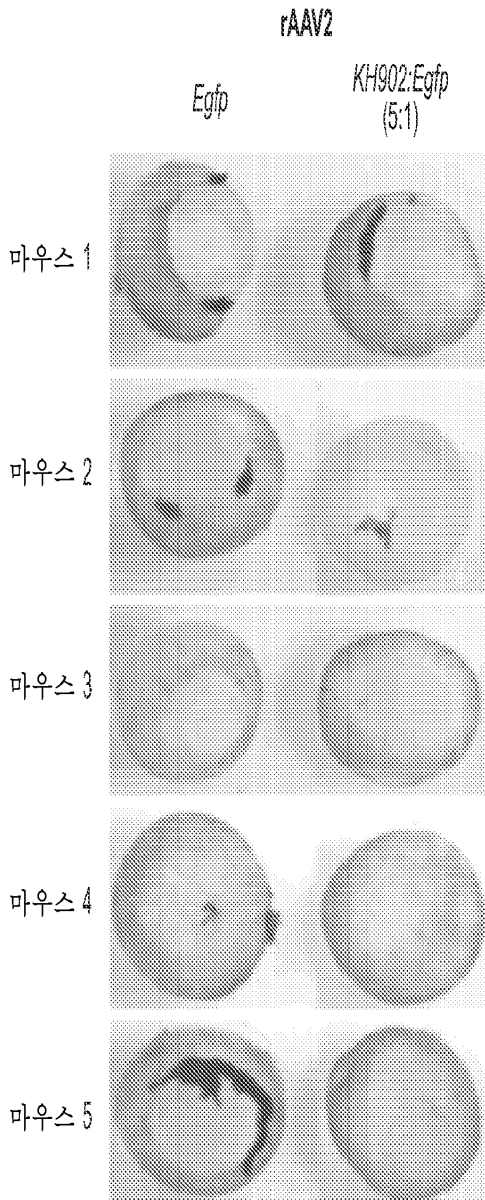
도면5b



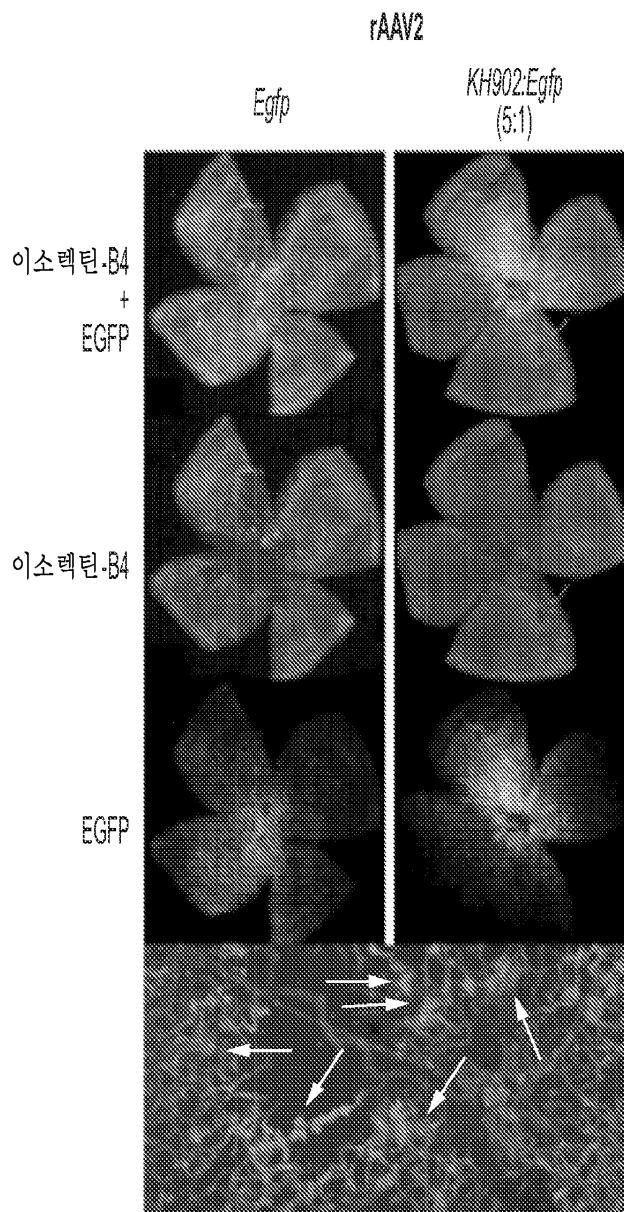
도면5c



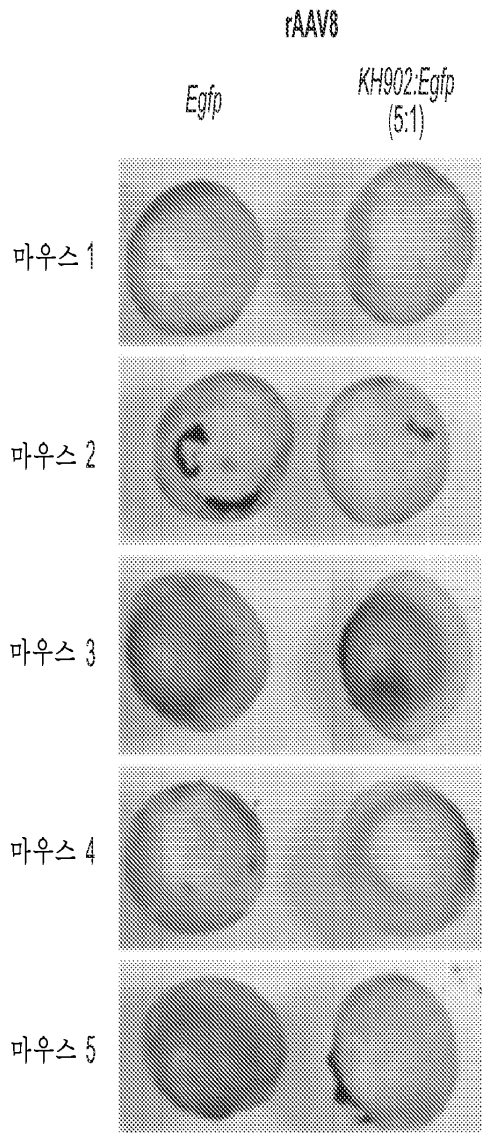
도면6a



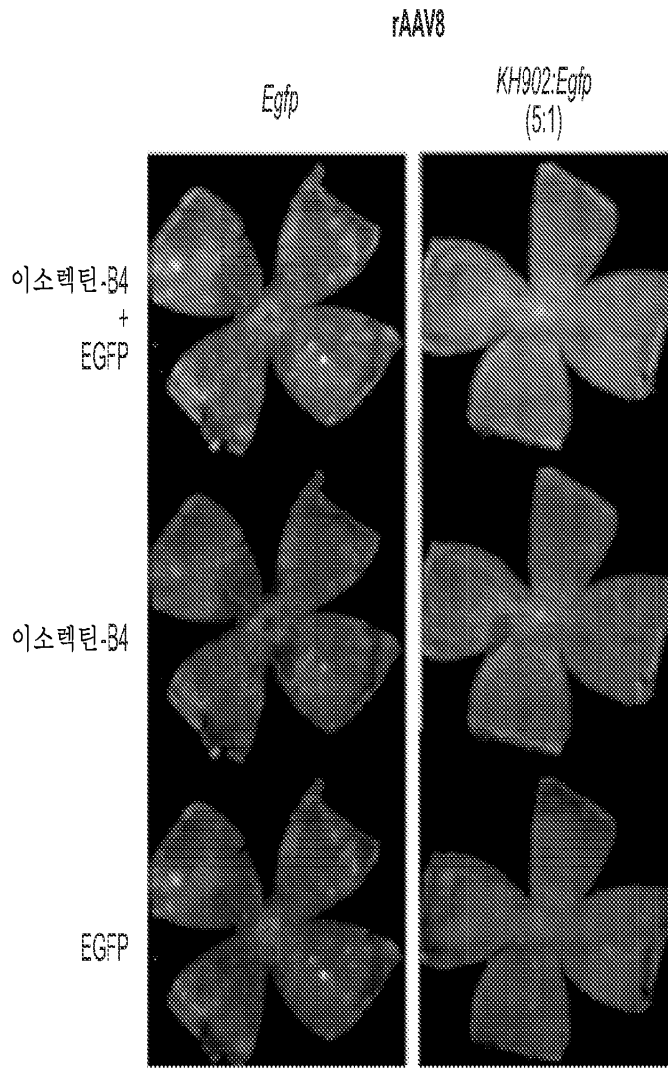
도면6b



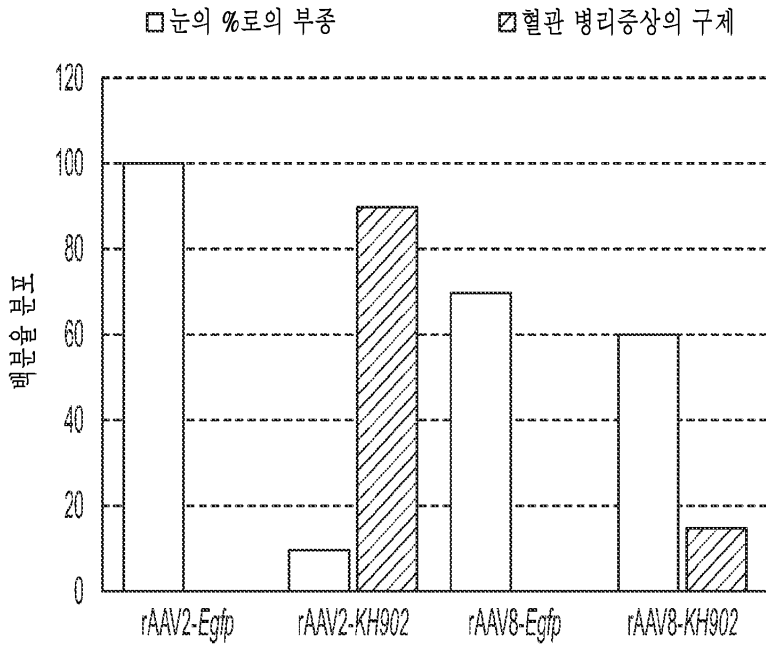
도면7a



도면7b

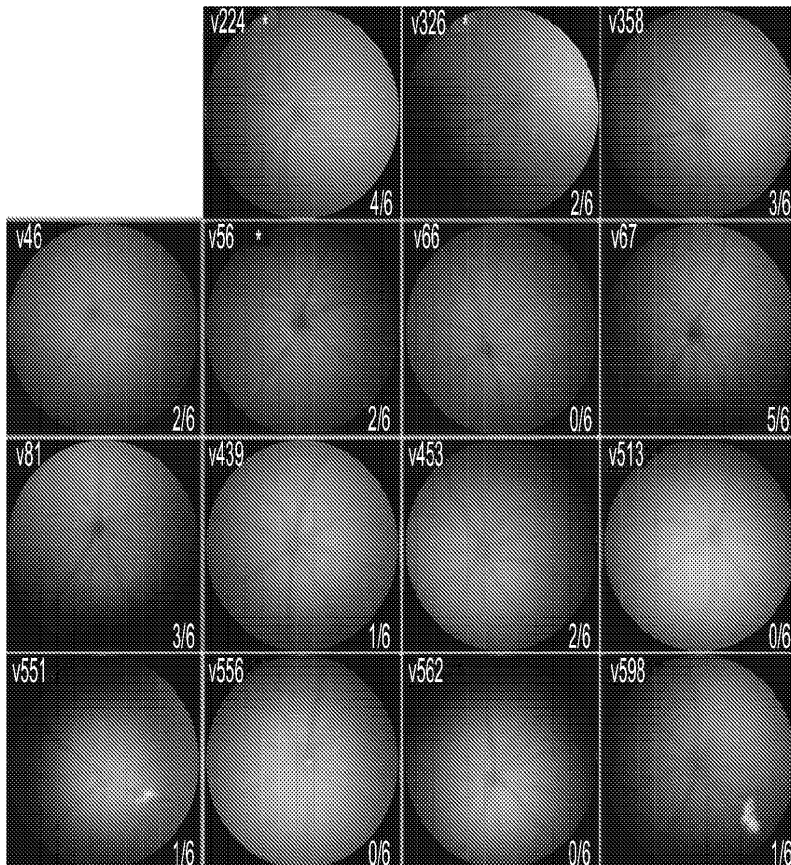


도면8



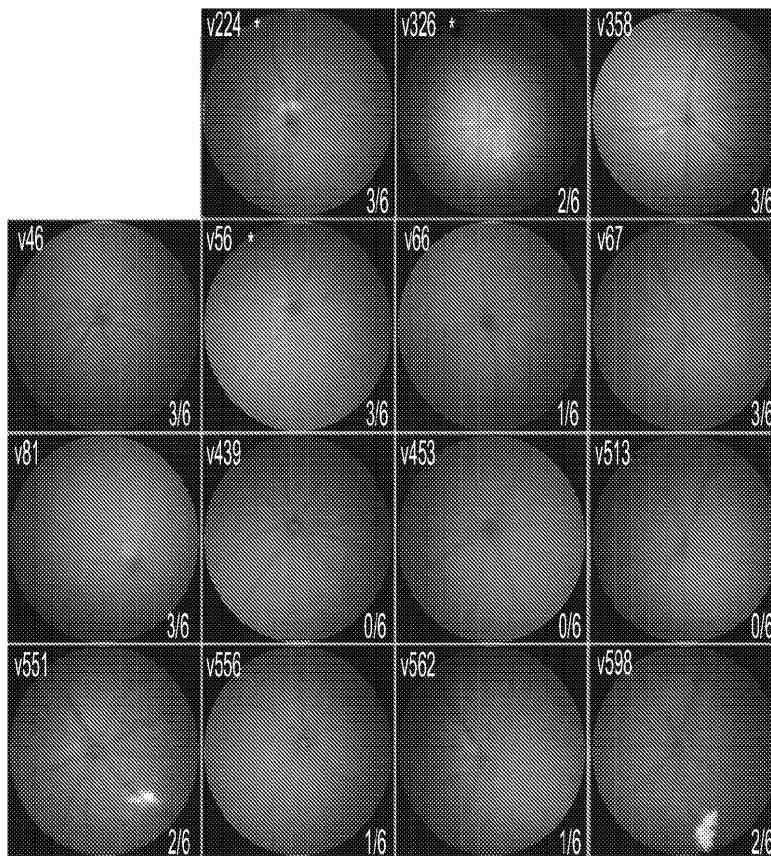
도면9a

2주

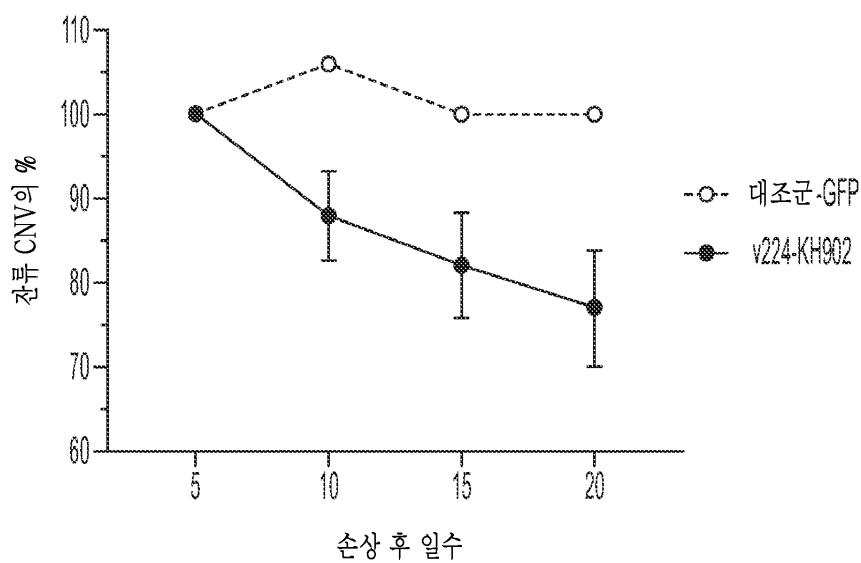


도면9b

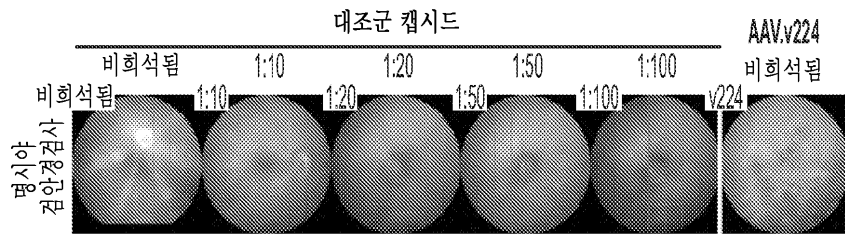
4주



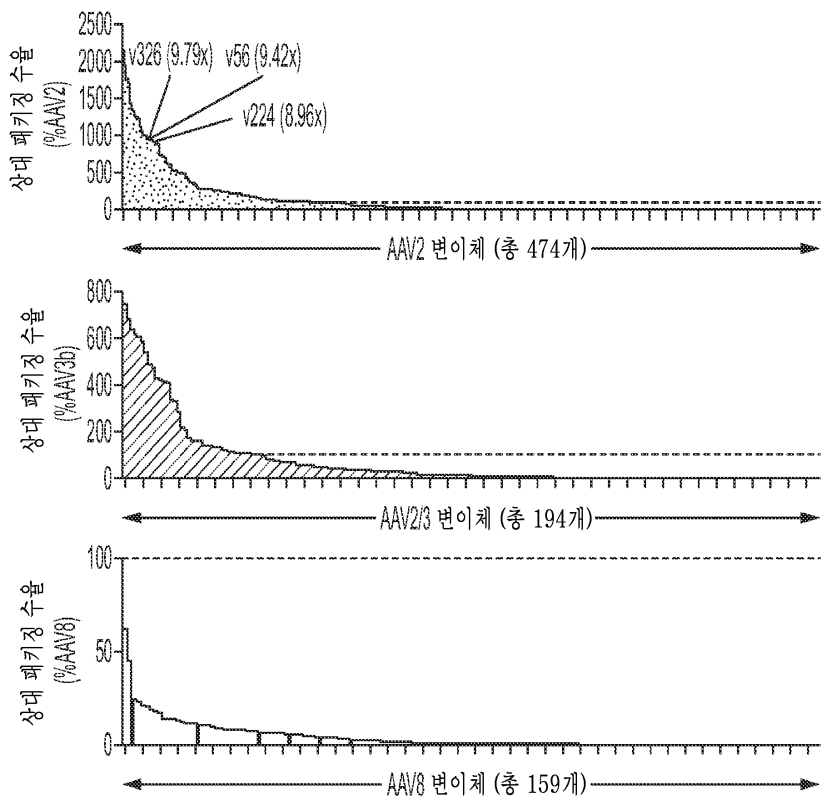
도면10



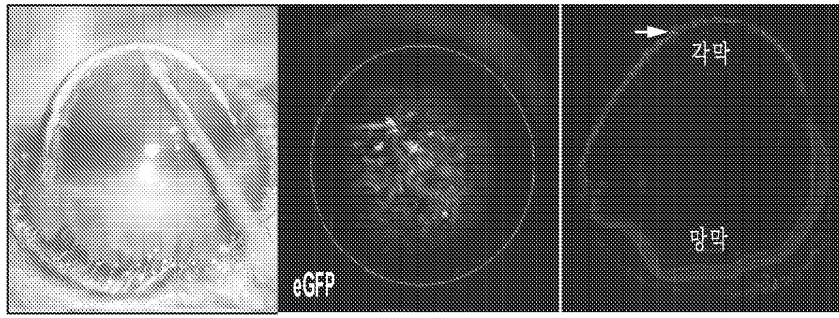
도면11



도면12



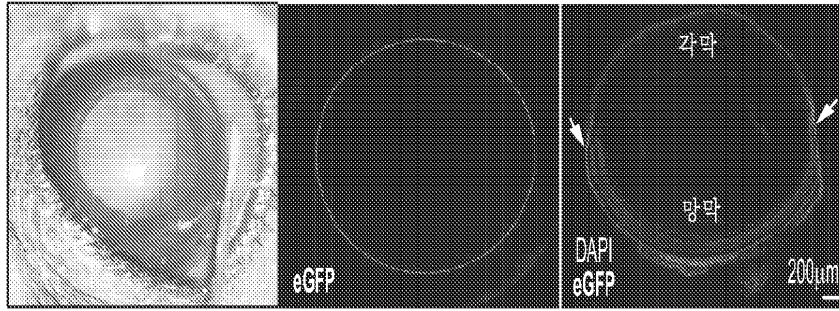
도면13



13a

13b

13c

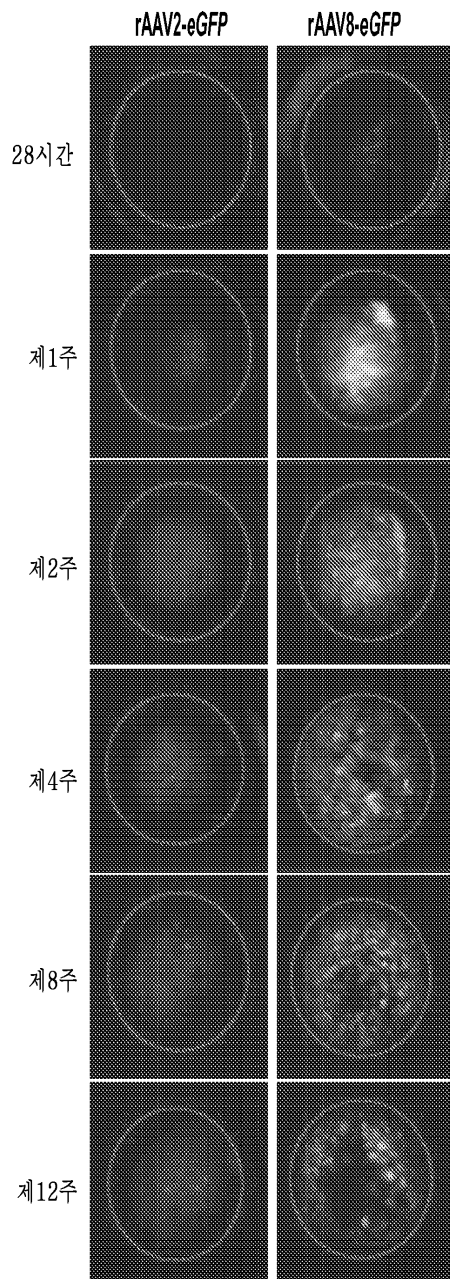


13d

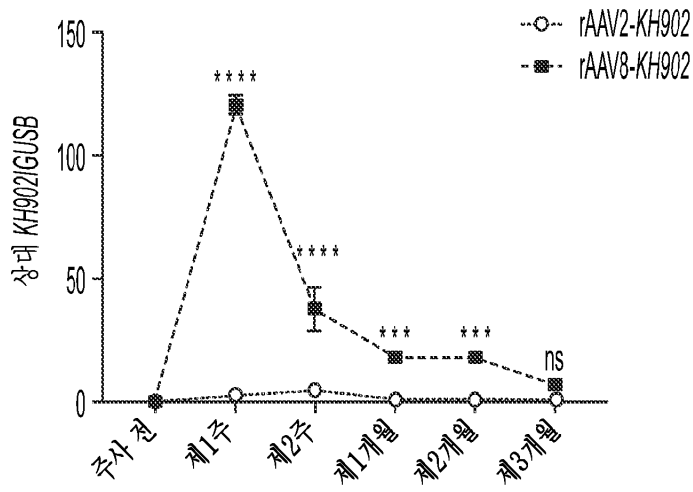
13e

13f

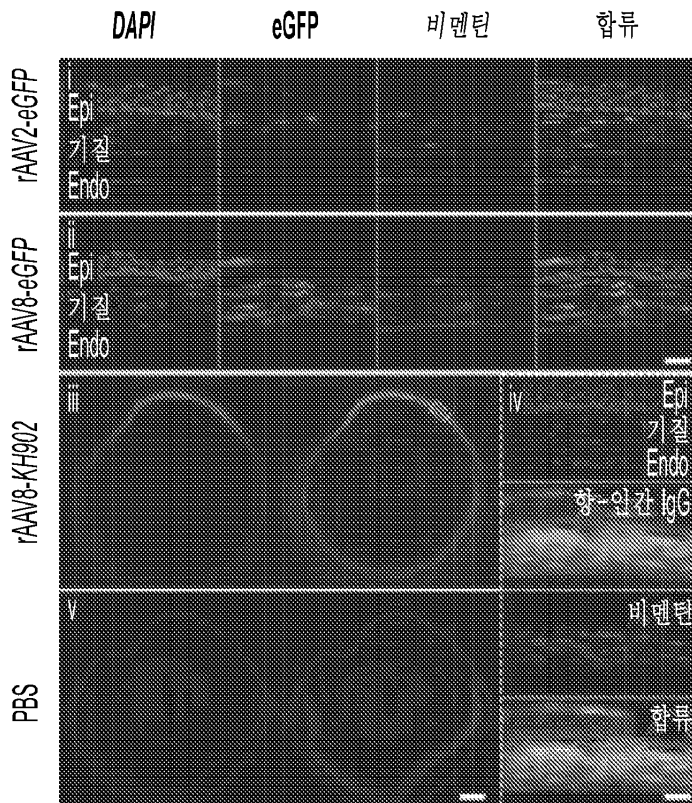
도면14a



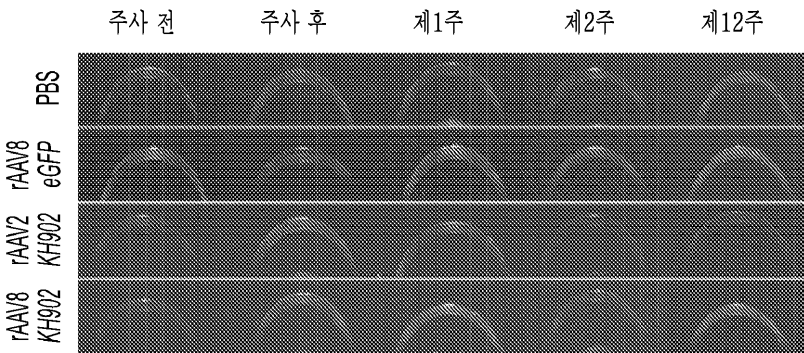
도면14b



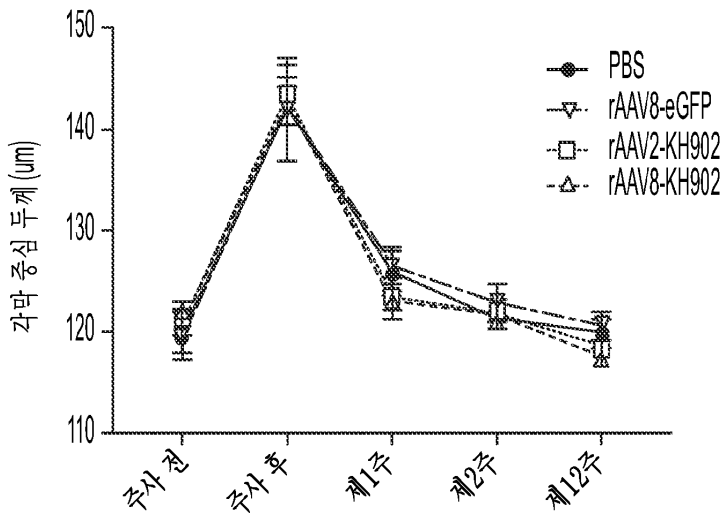
도면14c



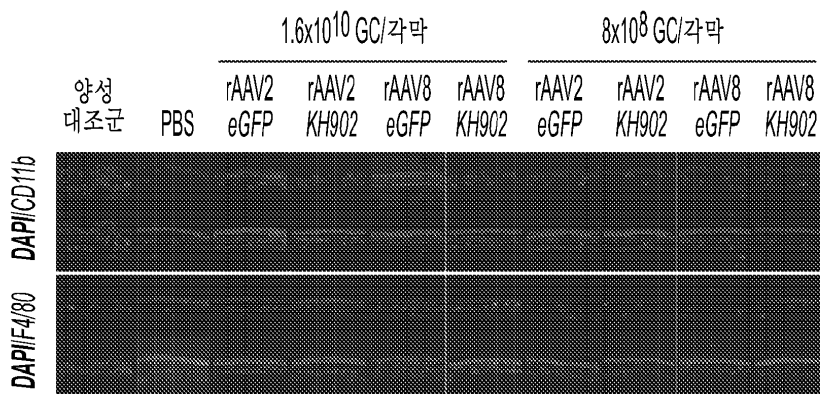
도면15a



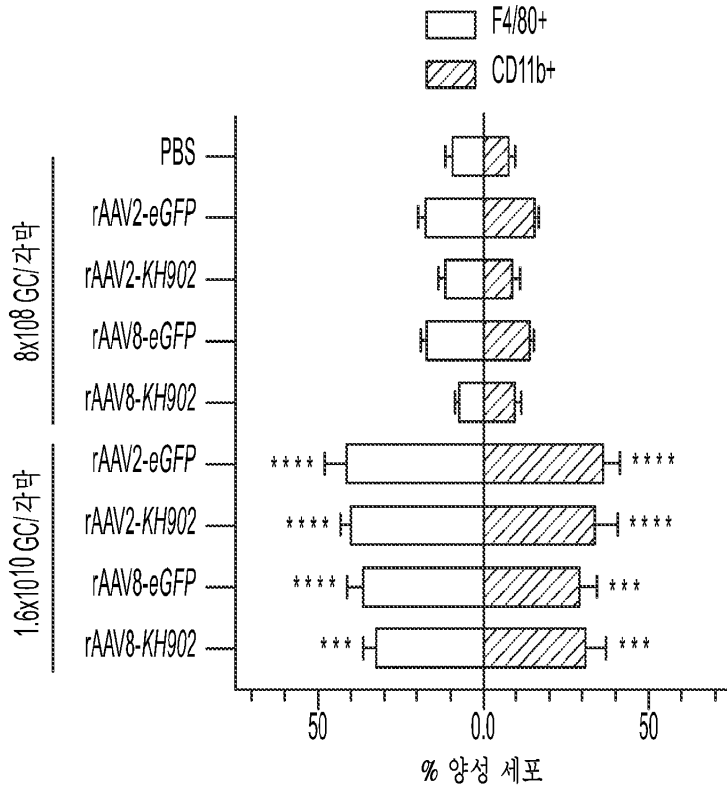
도면15b



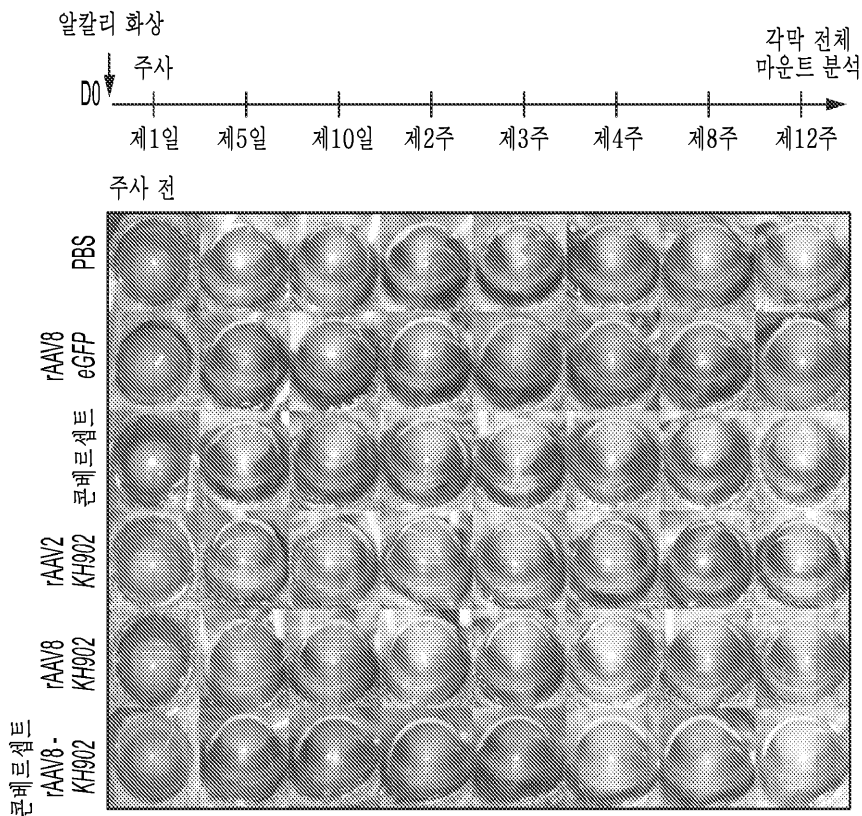
도면15c



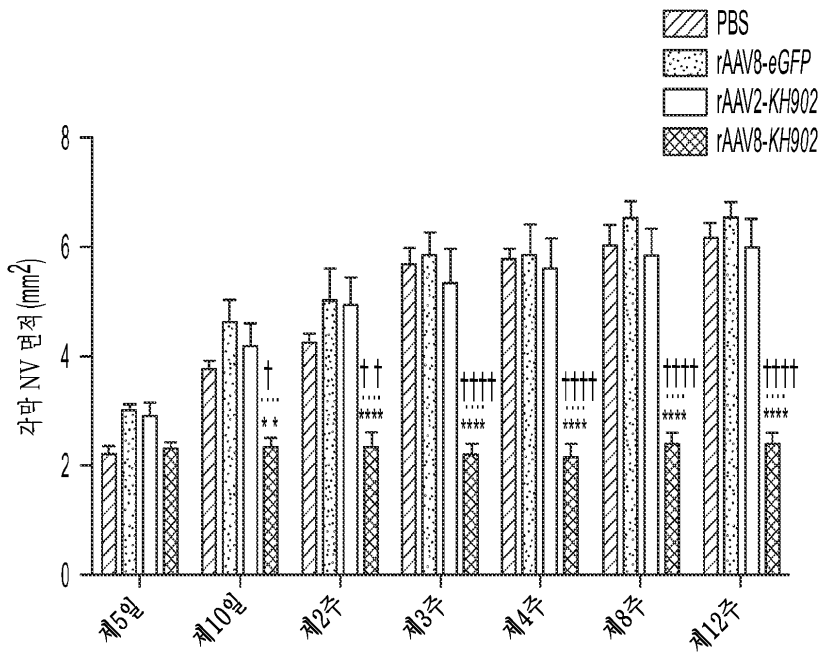
도면15d



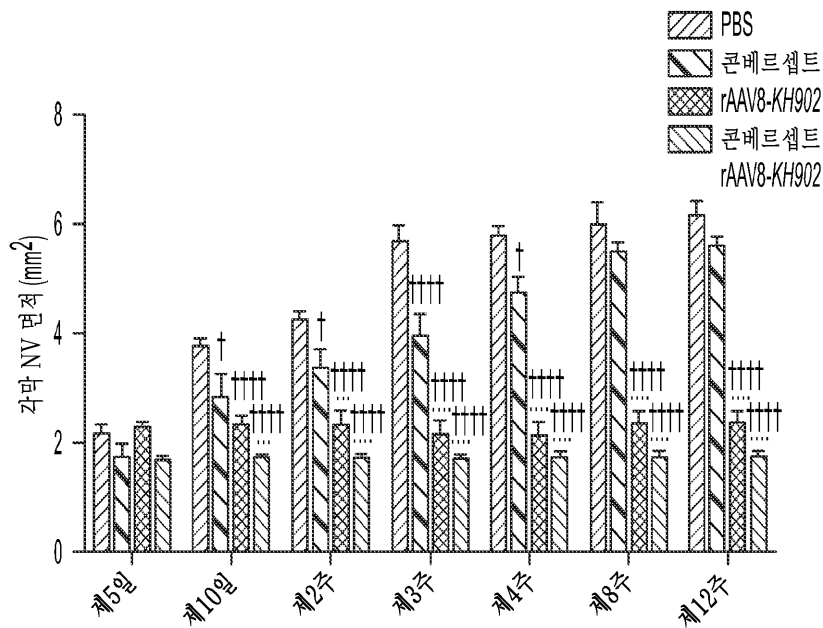
도면16a



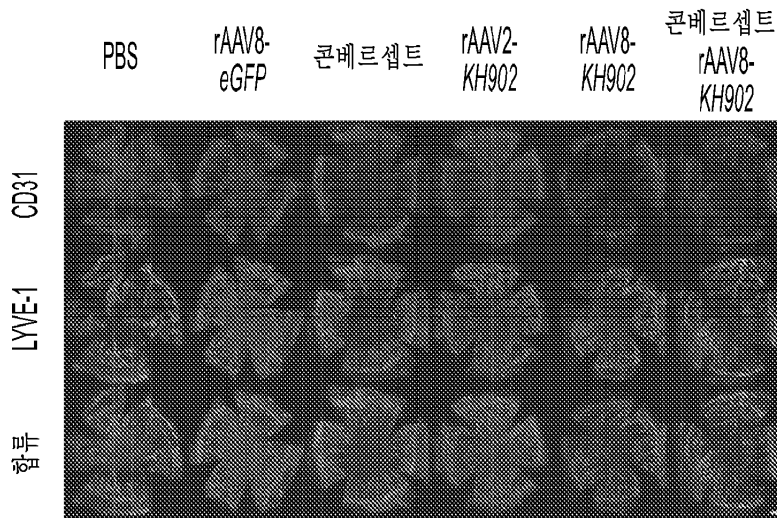
도면16b



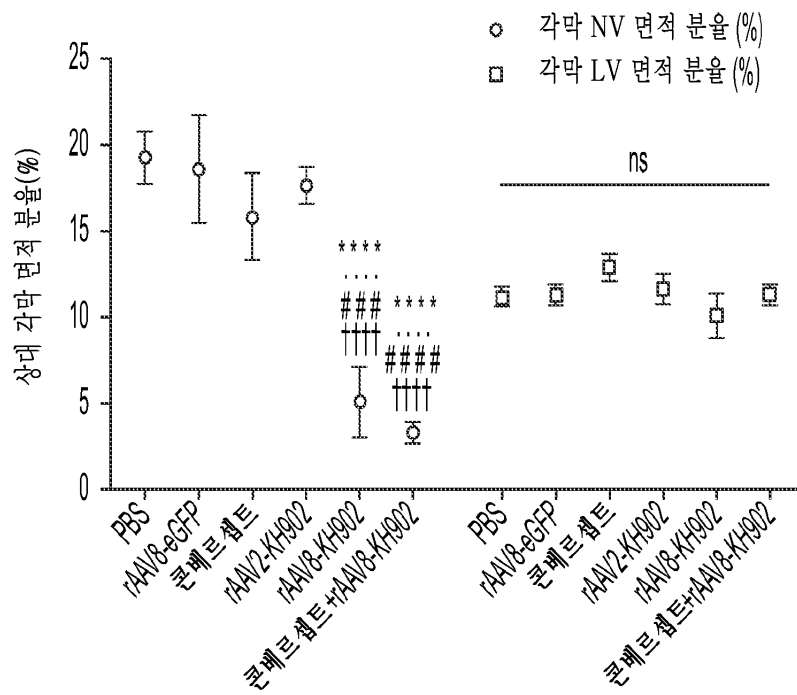
도면16c



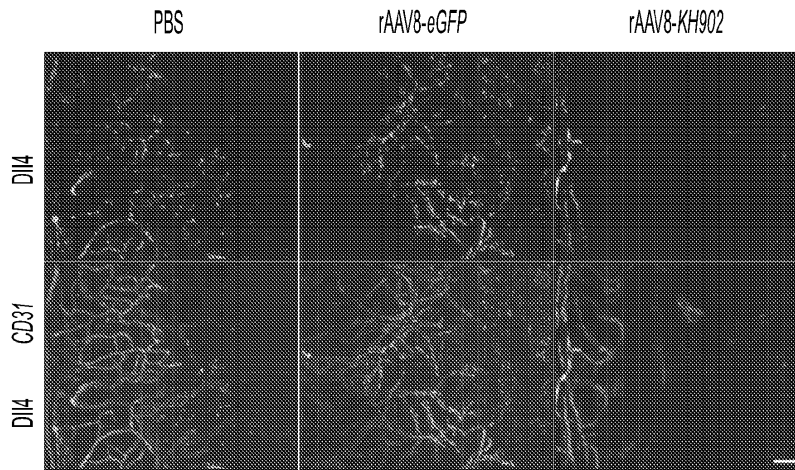
도면16d



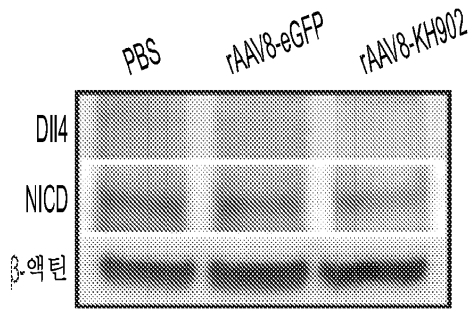
도면16e



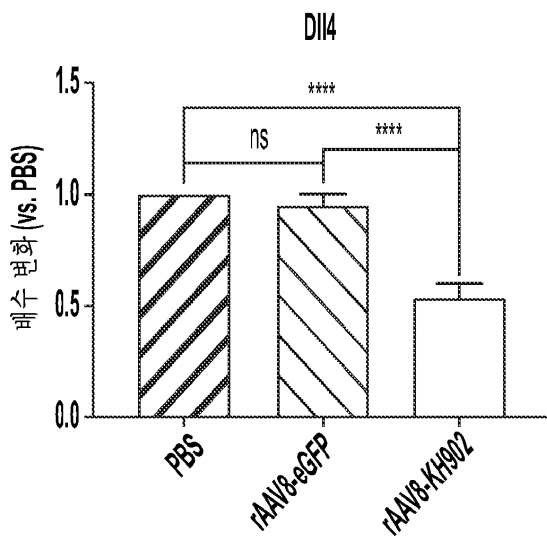
도면17a



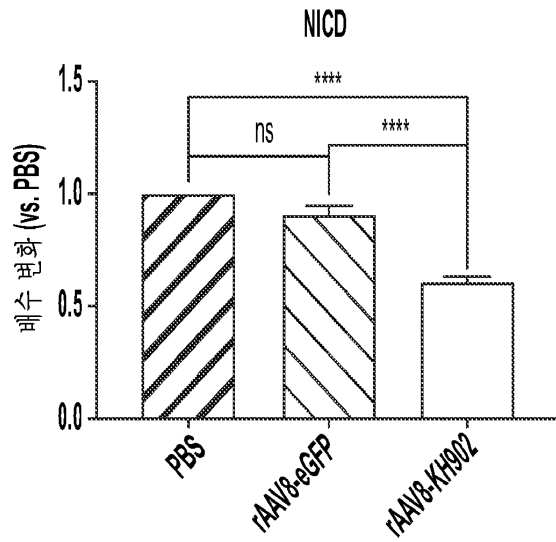
도면17b



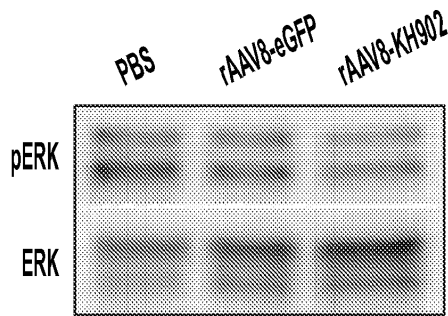
도면17c



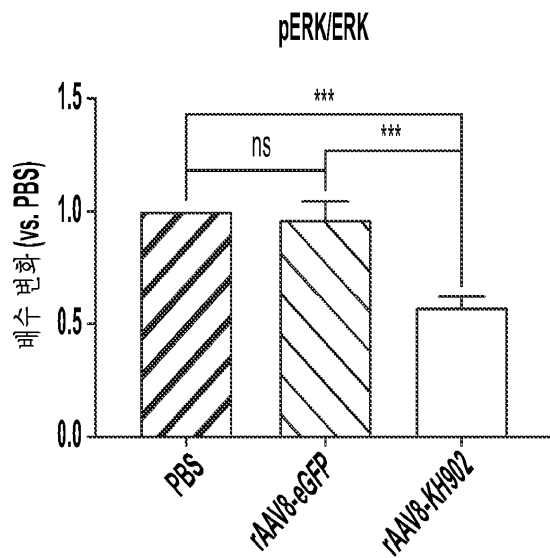
도면17d



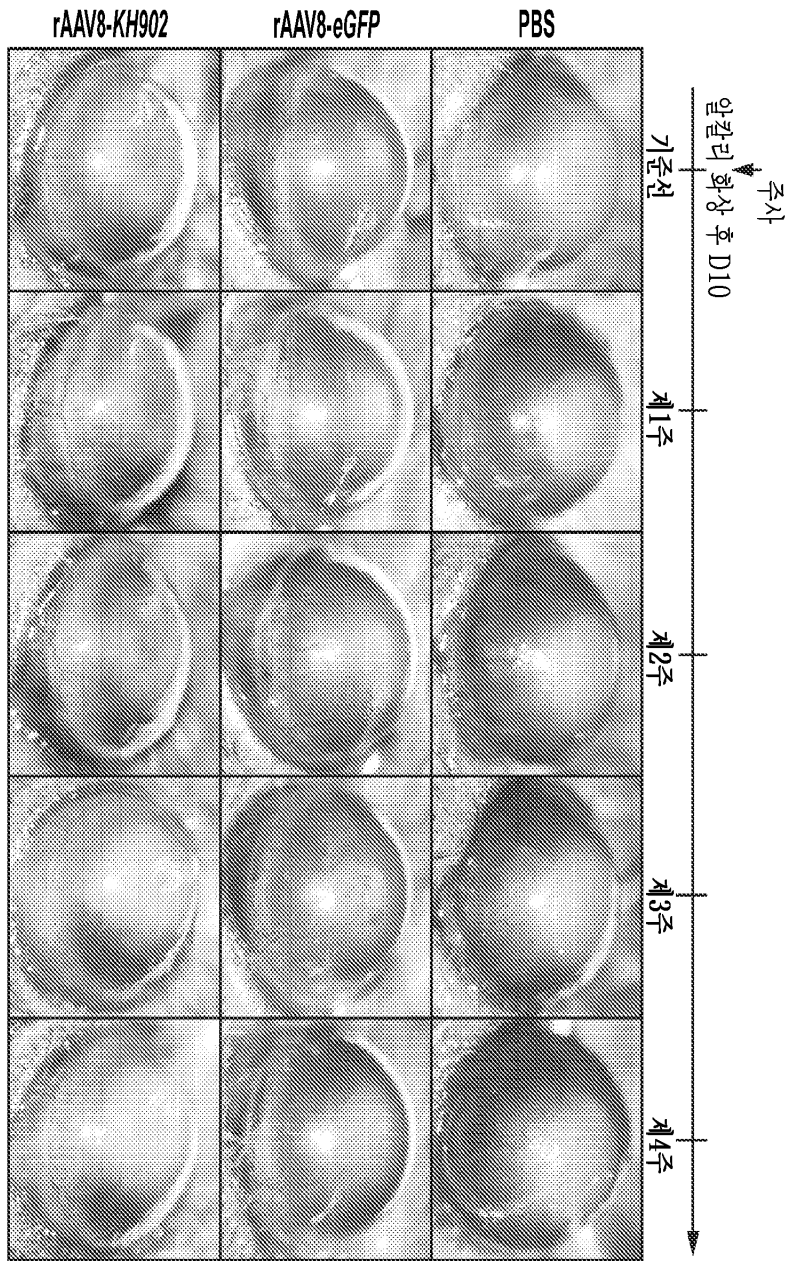
도면17e



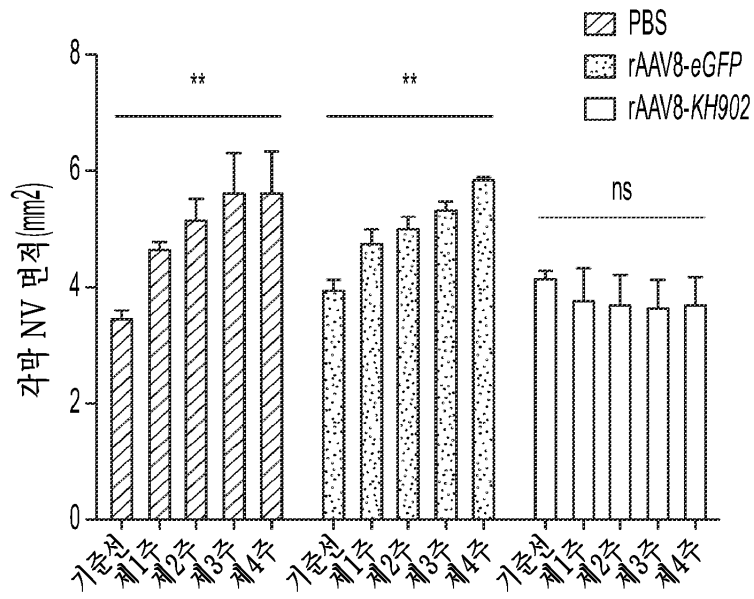
도면17f



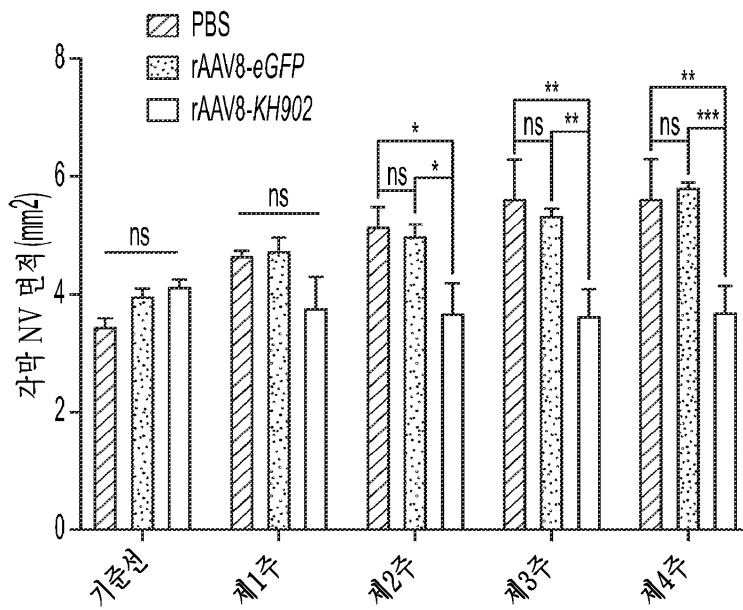
도면18a



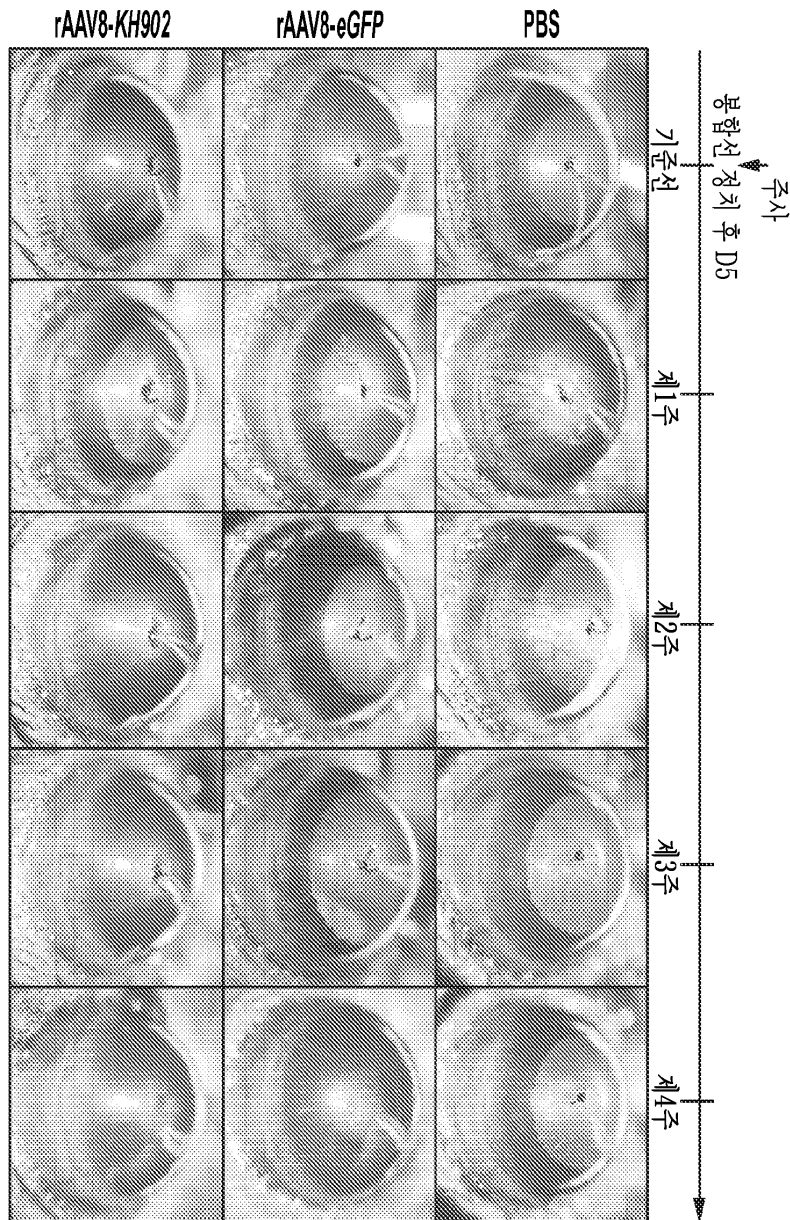
도면18b



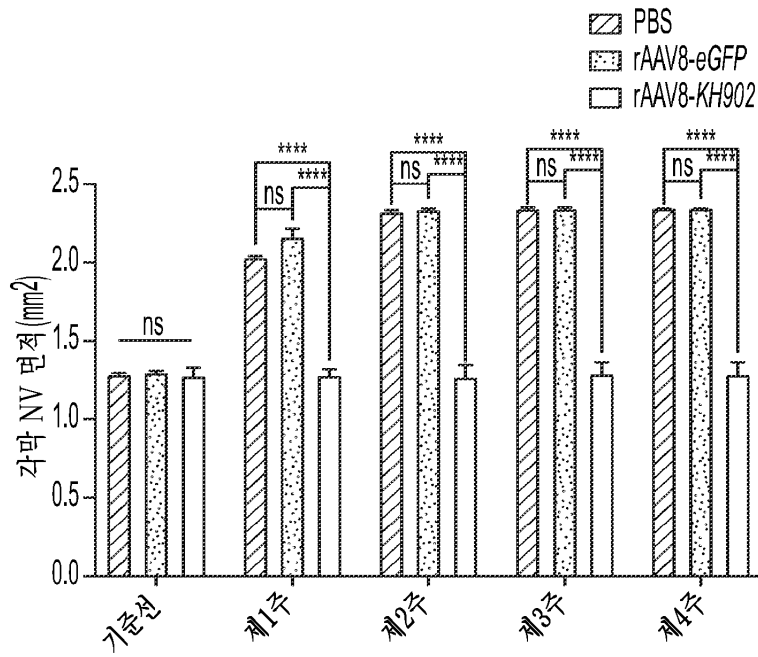
도면18c



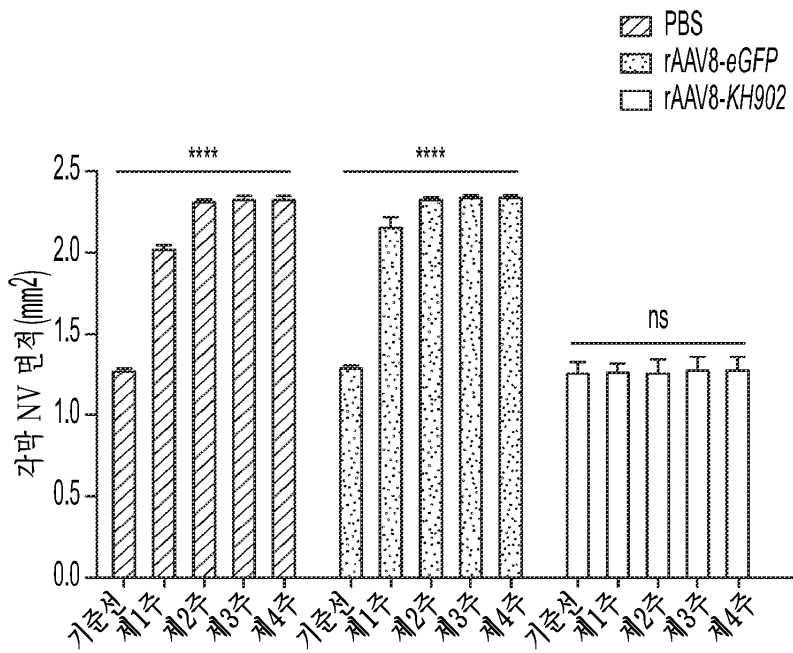
도면 19a



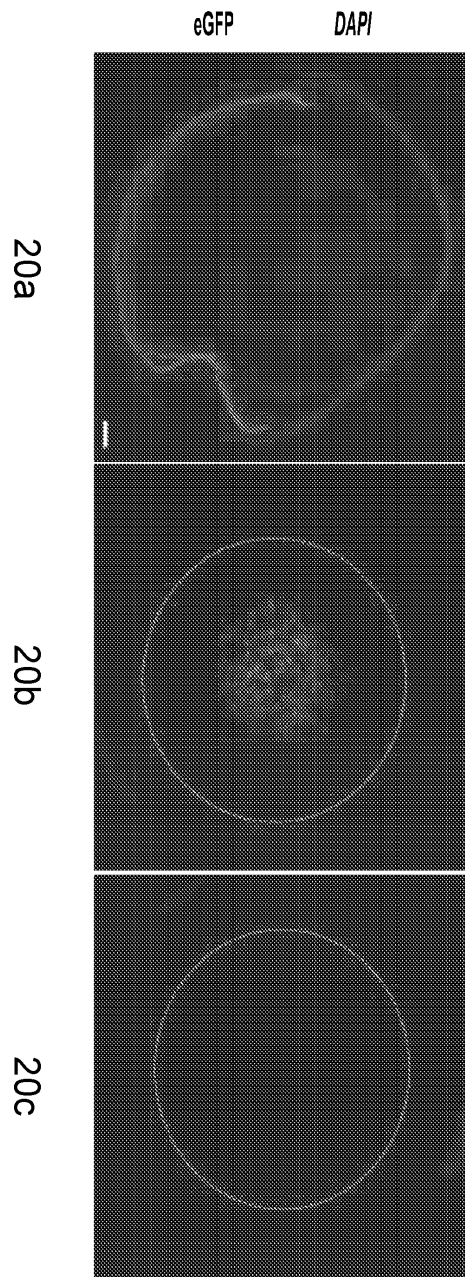
도면19b



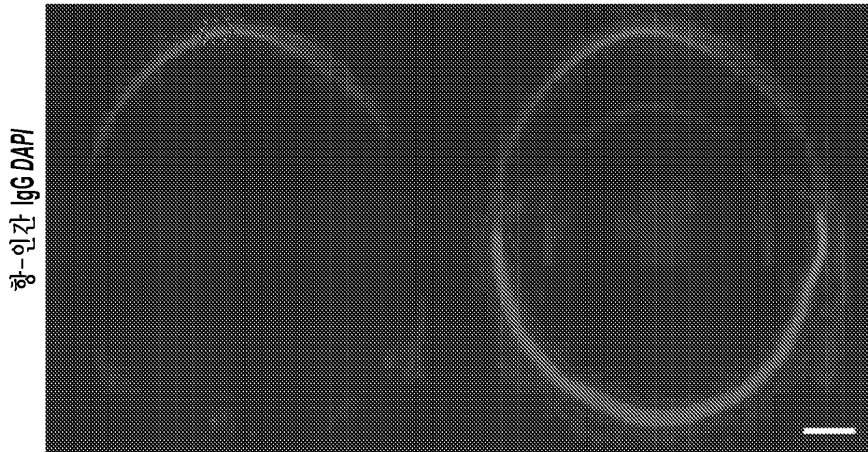
도면19c



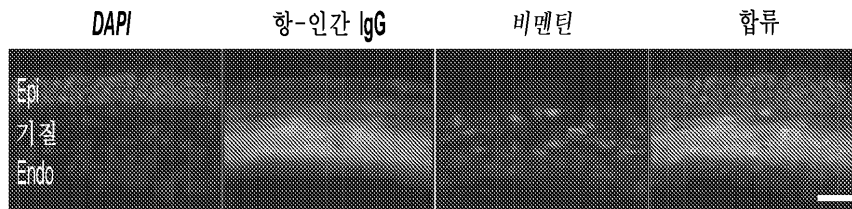
도면20



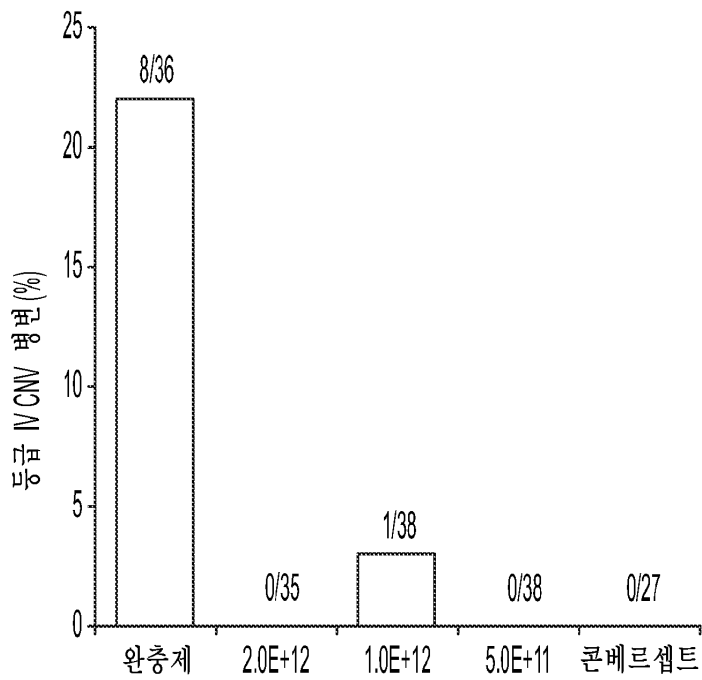
도면21a



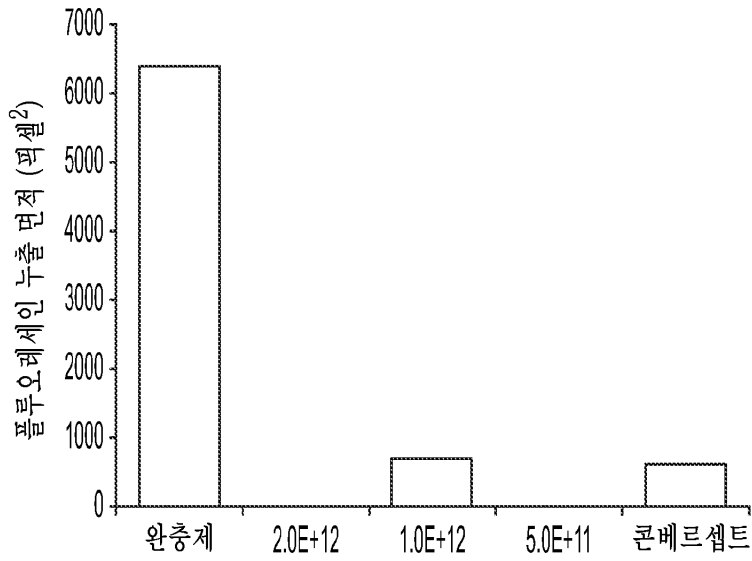
도면21b



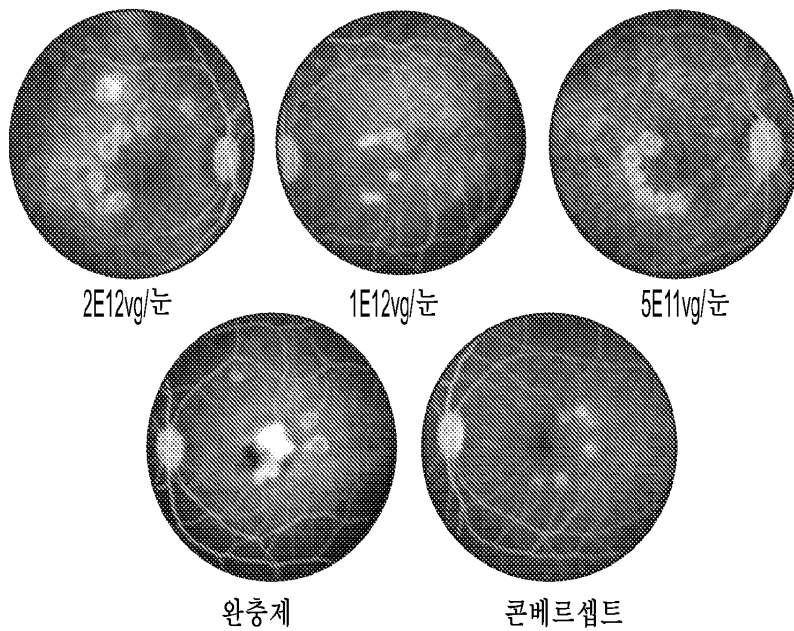
도면22a



도면22b



도면22c



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> University of Massachusetts

<120> ADENO-ASSOCIATED VIRUS FOR DELIVERY OF KH902 (CONBERCEPT) AND  
USES THEREOF

<130> U0120.70148W000

<140> Not Yet Assigned

<141> Concurrently Herewith  
 <150> US 63/179,700  
 <151> 2021-04-26  
 <150> US 63/074,361  
 <151> 2020-09-03  
 <160> 32  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 1659  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 1

atggtcagct actgggacac cggggctcctg ctgtgcgcgc tgctcagctg tctgcttctc 60

acaggatcta gttccggagg tagaccttc gtagagatgt acagtgaaat ccccgaatt 120

atacacatga ctgaaggaag ggagctcgtc attccctgcc gggttacgtc acctaacatc 180

actgttactt taaaaaagtt tccaactgac actttgatcc ctgatggaaa acgcataatc 240

tgggacagta gaaagggctt catcatatca aatgcaactg acaaagaaat agggcttctg 300

acctgtgaag caacagtcaa tgggcatttg tataagacaa actatctcac acatcgacaa 360

accaatacaa tcatagatgt ggttctgagt ccgtctcatg gaattgaact atctgttggg 420

gaaaagcttg tcttaaattg tacagcaaga actgaactaa atgtggggat tgacttcaac 480

tgggaatacc ctcttcgaa gcatcagcat aagaaacttg taaaccgaga cctaaaaacc 540

cagtctggga gtgagatgaa gaaatTTTTg agcacctaa ctatagatgg tgtaaccgg 600

agtgaccaag gattgtacac ctgtgcagca tccagtgggc tgatgaccaa gaagaacagc 660

acatttgta gggTccatga aaaacctttt gttgcttttg gaagtggcat ggaatctctg 720

gtggaagcca cggTggggga gcgtgtcaga atccctgcga agtaccttgg ttaccaccc 780

ccagaaataa aatggataa aaatggaata ccccttgagt ccaatcacac aattaaagcg 840

gggcatgtac tgacgattat ggaagtgagt gaaagagaca caggaaatta cactgcatc 900

cttaccaatc ccatttcaaa ggagaagcag agccatgtgg tctctctggt tgtgtatgtc 960

ccaccgggce cgggcgacaa aactcacaca tgeccaactgt gcccagcacc tgaactcctg 1020

gggggaccgt cagtcttctt cttccccca aaaccaagg acaccctcat gatctccgg 1080

accctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 1140

aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 1200  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 1260  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1320

atctccaaag ccaaagggca gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg 1380  
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctag tcaaaggctt ctatcccagc 1440  
 gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactaaa ggccacgcct 1500  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcaccgt ggacaagagc 1560  
 aggtggcagc aggggaacct cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1620  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaatga 1659

<210> 2

<211> 4011

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 2

ctgcgcgctc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggcgtcg ggcgaccttt 60  
 ggtcgcccg cctcagtgag cgagcgagcg cgcagagagg gaggggccaa ctccatcact 120  
 aggggttct ttagttaat gattaaccg ccatgctact tatctaccag ggtaatgggg 180  
 atcctctaga actatagcta gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat 240  
 tacggggtea ttagttcata gcccatatat ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa 300  
 tggcccgcct ggctgaccgc ccaacgacc ccgccattg acgtcaataa tgacgtatgt 360  
 tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggtg 420

aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt 480  
 caatgacggt aaatggcccc cctggcatta tgcccagtac atgacctat gggactttcc 540  
 tacttggcag tacatctacg tattagteat cgtattacc atggtcgagg tgageccccc 600  
 gttctgcttc actctcccca tctcccccc ctccccacc ccaattttgt atttatttat 660  
 tttttaatta ttttgtgac cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg 720  
 ggcggggcgg ggcgaggggc ggggcggggc gagcgggaga ggtgcggcgg cagccaatca 780  
 gagcggcgcg ctccgaaagt ttcttttat ggcgagcgg cggcggcggc ggcctataa 840

aaagcgaagc gcgcggcggg cggggagtcg ctgcgacgct gccttcgccc cgtgccccgc 900  
 tccgcccgg cctcgcgccg cccgccccg ctctgactga ccgcttact cccacaggtg 960

agcgggaggc acggcccttc tcctccgggc tgaattagc gcttggttta atgacggctt 1020  
 gtttcttttc tgtggctcgc tgaagccctt gaggggctcc gggaggggccc tttgtgcggg 1080  
 gggagcggct cggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcggcgc gtgcggctcc 1140  
 gcgctgcccc gcggctgtga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 1200  
 gtgcgcgagg ggagcggcgc cgggggaggc gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 1260  
  
 aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg 1320  
 gtcgggctgc aacccccctt gcacccccct ccccagattg ctgagcacgg cccggcttcg 1380  
 ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcggcg tgccggggcg ggggtggcgg 1440  
 caggtggggg tgccggggcg ggcggggccg cctcggggcg gggagggtct gggggagggg 1500  
 cgcggcggcc cccggagcgc cggcggctgt cgaggcgcgg cgagccgcag ccattgcctt 1560  
 ttatgtaat cgtgcgagag ggcgcaggga ctctctttgt cccaaatctg tgcggagccg 1620  
 aaatctggga ggcgccggcg caccctctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcggc 1680  
  
 ggcaggaagg aaatgggcgg ggaggccctt cgtgcgtcgc cgcgccggcg tccccttctc 1740  
 cctctccage ctccgggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acggggcagg 1800  
 gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1860  
 gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1920  
 tttggcaaa aattcgccac catggtcagc tactgggaca cggggctcct gctgtgcgcg 1980  
 ctgctcagct gtctgcttct cacaggatct agttccggag gtagacctt ctagagatg 2040  
 tacagtgaat tccccgaat tatacatg actgaaggaa gggagctcgt cattccctgc 2100  
  
 cgggttacgt cacctaact cactgttact ttaaaaaagt ttccacttga cactttgatc 2160  
 cctgatgaa aacgcataat ctgggacagt agaaaggct tcatcatac aaatgcaacg 2220  
 tacaagaaa taggcttct gacctgtgaa gcaacagtca atgggcattt gtataagaca 2280  
 aactatctca cacatcgaca aaccaataca atcatagatg tggttctgag tccgtctcat 2340  
 ggaattgaac tatctgttgg agaaaagctt gtcttaaatt gtacagcaag aactgaacta 2400  
 aatgtgggga ttgacttcaa ctgggaatac ctttcttca agcatcagca taagaaactt 2460  
 gtaaaccgag acctaaaaac ccagtctggg agtgagatga agaaatttt gagcacctta 2520  
  
 actatagatg gtgtaaccgc gactgaccaa ggattgtaca cctgtgcagc atccagtggg 2580  
 ctgatgacca agaagaacag cacatttgc agggctccatg aaaaacctt tgttgccttt 2640  
 ggaagtggca tggaaatctt ggtggaagcc acgggtgggg agcgtgtcag aatccctgcg 2700  
 aagtaccttg gttaccacc cccagaaata aaatggtata aaaatggaat accccttgag 2760  
 tccaatcaca caattaaagc ggggcatgta ctgacgatta tggaagtgag tgaagagac 2820

acaggaatt acactgtcat ccttaccaat cccatttcaa aggagaagca gagccatgtg 2880  
 gtctctctgg ttgtgtatgt cccaccgggc cgggcgaca aaactcacac atgcccactg 2940

tgcccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttccccc aaaaccaag 3000  
 gacacctca tgatctccc gaccctgag gtcacatgcg tgggggtgga cgtgagccac 3060  
 gaagacctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 3120  
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 3180  
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtga aggtctcaa caaagcctc 3240  
 ccagcccca tcgaaaaac catctccaaa gccaaagggc agccccgaga accacaggtg 3300  
 tacacctgc cccatccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgcta 3360

gtcaaaggct tctatccag cgacatgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 3420  
 aacaactaca agcccagcc tccctgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 3480  
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 3540  
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgag aagagcctct ccctgtctcc gggtaaatga 3600  
 acgctggta cctctagagt cgaccgggc gcctcgagg acgggtgaa ctacgcctga 3660  
 ggatccgac ttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 3720  
 ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttattgcaa tagtgtgttg gaatttttg 3780

tgtctctcac tcggaagcaa ttcgttgatc tgaatttca ccaccataa taccattac 3840  
 cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 3900  
 gtggccact cctctctgc gcgctcctc gctcactgag gccggcgac caaaggtcgc 3960  
 ccgacgccc ggctttgcc gggcgccctc agtgagcgag cgagcgca g 4011

<210> 3  
 <211> 6052  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 3

gagcggcgcg ctccgaaagt ttccttttat ggcgagcgg cgcgcgcgcc gccctataa 60  
 aaagcgaagc gcgcgcggg cggggagtgc ctgcgacgt gccttcgcc cgtgccccgc 120

tccgccgccc cctcgcgccc cccgccccgg ctctgactga ccgcttact cccacaggtg 180  
 agcggcgggc acggccttc tctcgggc tgtaattagc gcttggttta atgacggctt 240  
 gtttctttc tgggctgcg tgaagcctt gaggggctcc gggagggcc tttgtcggg 300

gggagcggct cggggggtgc gtgcgtgtgt gtgtgcgtgg ggagcggcgc gtgcggctcc 360  
 gcgctgcccc gcggcttga gcgctgcggg cgcggcgcgg ggctttgtgc gctccgcagt 420  
 gtgcgcgagg ggagcgcggc cgggggcggt gccccgcggt gcgggggggg ctgcgagggg 480  
 aacaaaggct gcgtgcgggg tgtgtgcgtg ggggggtgag cagggggtgt gggcgcgtcg 540  
  
 gtcgggtgc aacccccct gcacccccct ccccgagttg ctgagcacgg cccggttcg 600  
 ggtgcggggc tccgtacggg gcgtggcgcg gggctcggc tgccgggcgg ggggtggcgg 660  
 caggtggggg tgccgggcgg ggcggggccg cctcgggccg gggagggctc gggggagggg 720  
 cgcggcggcc cccggagcgc gggcggtgt cgaggcgcgg cgagccgag ccattgcctt 780  
 ttatgtaat cgtgcgagag ggcgcaggga cttcctttgt cccaaatctg tgcggagccg 840  
 aaatctggga ggcgcccg caccctct agcgggcgcg gggcgaagcg gtgcggcgc 900  
 ggcaggaagg aaatggcgg ggagggcctt cgtgcgtgc cgcgcccg tcccctctc 960  
  
 cctctccagc ctggggctg tccgcggggg gacggctgcc ttcggggggg acgggacagg 1020  
 gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag cctctgctaa ccatgttcat 1080  
 gccttcttct tttcttaca gctctgggc aacgtgctgg ttattgtgct gtctcatcat 1140  
 tttggcaaag aatcggcac catggtcagc tactgggaca cggggctct gctgtgcgcg 1200  
 ctgctcagct gtctgcttct cacaggatct agtccggag gtagacctt ctagagatg 1260  
 tacagtgaat tcccgaat tatacatg actgaaggaa gggagctcgt cattectgc 1320  
 cgggttacgt cacctaact cactgttact ttaaaaagt ttcacttga cactttgatc 1380  
  
 cctgatggaa aacgcataat ctgggacagt agaaaggct tcatcatac aaatgcaacg 1440  
 tacaagaaa tagggcttct gacctgtgaa gcaacagtca atgggcatth gtataagaca 1500  
 aactatcaca cacatgaca aaccaataca atcatagatg tggttctgag tccgtctcat 1560  
 ggaattgaac tatctgttgg agaaaagctt gtcttaaat gtacagcaag aactgaacta 1620  
 aatgtgggga ttgacttcaa ctgggaatac cttcttca agcatcagca taagaaactt 1680  
 gtaaaccgag acctaaaaac ccagctcggg agtgagatga agaaattht gagcacctta 1740  
 actatagatg gtgtaaccg gagtgaccaa ggattgtaca cctgtgcagc atccagtggg 1800  
  
 ctgatgacca agaagaacag cacatttgc agggctcatg aaaaactth tgttgctth 1860  
 ggaagtggca tggaatctct ggtggaagc acgggtgggg agcgtgtcag aatccctgcg 1920  
 aagtacctg gtiaccacc cccagaaata aaatggtata aaaatggaat accccttgag 1980  
 tccaatcaca caattaaagc ggggcatgta ctgacgatta tggaagtgag taaaagagac 2040  
 acaggaat acactgtcat ccttaccat cccatttcaa aggagaagca gagccatgtg 2100  
 gtctctctgg ttgtgatgt cccaccggc cgggcgaca aaactcacac atgcccactg 2160

tccccagcac ctgaactcct ggggggaccg tcagtcttcc tcttcccccc aaaaccaag 2220  
  
 gacaccctca tgatctcccg gaccctgag gtcacatgcg tggtggtgga cgtgagccac 2280  
 gaagaccctg aggtcaagtt caactggtac gtggacggcg tggaggtgca taatgccaag 2340  
 acaaagccgc gggaggagca gtacaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcacctc 2400  
 ctgcaccagg actggctgaa tggcaaggag tacaagtca aggtctcaa caaagccctc 2460  
 ccagccccc tegagaaaac catctccaaa gccaagggc agccccgaga accacaggtg 2520  
 tacaccctgc ccccatccc ggatgagctg accaagaacc aggtcagcct gacctgccta 2580  
 gtcaaaggct tctatcccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 2640  
  
 aacaactaca aggccacgcc tcccgtgctg gactccgacg gctccttctt cctctacagc 2700  
 aagctcaccg tggacaagag caggtggcag caggggaacg tcttctcatg ctccgtgatg 2760  
 catgaggctc tgcacaacca ctacacgcag aagagcctct cctgtctcc gggtaaatga 2820  
 acgcgtggta ccctagagt cgaccgggc gcctcagg acggggtgaa ctacgcctga 2880  
 ggatccgac ttttccctc tgccaaaaat tatggggaca tcatgaagcc ccttgagcat 2940  
 ctgacttctg gctaataaag gaaatttatt ttattgcaa tagtgtgtg gaattttttg 3000  
 tgtctctcac tcggaagcaa ttcgttgatc tgaatttcga ccaccataa taccattac 3060  
  
 cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac aaggaacccc tagtgatgga 3120  
 gttggccact ccctctctgc gcgctcgctc gctcactgag gccgggcgac caaaggtcgc 3180  
 ccgacgcccc ggctttgcc gggcggcctc agtgagcgag cgagcgcgca gccttaatta 3240  
 acctaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca 3300  
 acttaatcgc ctigcagcac atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccc 3360  
 caccgatcgc cttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgggacg cgcctgtag 3420  
 cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgcgcagc gtgaccgcta cacttgccag 3480  
  
 cgccctagcg cccgctcctt tcgctttctt cccttcctt ctcgccacgt tcgcccgtt 3540  
 tccccgtaa gctctaate gggggctccc tttagggttc cgatttagtg ctttacggca 3600  
 cctcgacccc aaaaaacttg attagggtga tggttcacgt agtggccat cgccctgata 3660  
 gacggttttt cgcctttga cgttggagtc cacgttctt aatagtggac tcttgttcca 3720  
 aactggaaca aactcaacc ctatctcggt ctattcttt gatttataag ggattttgcc 3780  
 gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaaca aaatttaac cgaattttaa 3840  
 caaatatta acgcttaca tttagggtgc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccct 3900

atttgtttat ttttctaagt acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataacctga 3960  
 taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgcc 4020  
 ctattccct tttttcgccg attttgcctt cctgtttttg ctcacccaga aacgctggtg 4080  
 aaagtaaaag atgctgaaga tcagttgggt gcacgagtggt gttacatcga actggatctc 4140  
 aacagcggta agatccttga gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact 4200  
 tttaaagtgc tgctatgtgg cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc 4260  
 ggtcgcgca tacactattc tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag 4320  
  
 catcttacgg atggcatgac agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat 4380  
 aacactgagg ccaacttact tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt 4440  
 ttgcacaaca tgggggatca tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa 4500  
 gccatacaca acgacgagcg tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgcgc 4560  
 aaactattaa ctggcgaact acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg 4620  
 gaggcggata aagttgcagg accacttctg cgctcggccc ttccggctgg ctggtttatt 4680  
 gctgataaat ctggagccgg tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca 4740  
  
 gatgtaagc cctcccgtat cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat 4800  
 gaacgaata gacagatcgc tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca 4860  
 gaccaagttt atcatalat actttagatt gatttaaac ttcattttta atttaaaagg 4920  
 atctagtgta agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagttttcg 4980  
 ttccactgag cgtcagaccc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt 5040  
 ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg 5100  
 ccgatcaag agctaccaac tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata 5160  
  
 ccaaatactg ttcttctagt gtagecgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagea 5220  
 ccgcctacat acctcgctct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag 5280  
 tcgtgtctta ccgggttggg ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc 5340  
 tgaacggggg gttcgtgcac acageccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga 5400  
 tacctacagc gtgagctatg agaaagcgcc acgcttcccg aaggagagaaa ggcggacagg 5460  
 tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaaac 5520  
 gcctggtatc ttiatagtc tgctgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg 5580  
  
 tgatgctcgt caggggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg 5640  
 ttctggcct tttgctggcc ttttctcacc atgttctttc ctgctttatc cctgattct 5700  
 gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataacc ctcgcccag ccgaacgacc 5760

gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgcc caatagcaa accgcctctc 5820  
 cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg 5880  
 ggcaagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggettta 5940  
 cactttatgc ttccggctcg tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca 6000

ggaaacagct atgacatga ttacgccaga ttttaattaag gccttaatta gg 6052

<210> 4

<211> 6

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 4

gccrcc

6

<210> 5

<211> 552

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 5

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1                    5                    10                    15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu

20                    25                    30

Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu

35                    40                    45

Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu

50                    55                    60

Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile

65                    70                    75                    80

Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu

85                    90                    95

Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys

100                    105                    110

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



1                    5                    10                    15  
 Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu  
                          20                    25                    30  
 Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu  
                          35                    40                    45  
 Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu  
                          50                    55                    60  
 Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile  
 65                    70                    75                    80  
 Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu  
                          85                    90                    95  
 Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys

                         100                    105                    110  
 Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val  
                          115                    120                    125

<210> 7

<211> 195

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 7

Val Leu Ser Pro Ser His Gly Ile Glu Leu Ser Val Gly Glu Lys Leu  
 1                    5                    10                    15  
 Val Leu Asn Cys Thr Ala Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe  
                          20                    25                    30  
  
 Asn Trp Glu Tyr Pro Ser Ser Lys His Gln His Lys Lys Leu Val Asn  
                          35                    40                    45  
 Arg Asp Leu Lys Thr Gln Ser Gly Ser Glu Met Lys Lys Phe Leu Ser  
                          50                    55                    60  
 Thr Leu Thr Ile Asp Gly Val Thr Arg Ser Asp Gln Gly Leu Tyr Thr  
 65                    70                    75                    80  
 Cys Ala Ala Ser Ser Gly Leu Met Thr Lys Lys Asn Ser Thr Phe Val

85 90 95

Arg Val His Glu Lys Pro Phe Val Ala Phe Gly Ser Gly Met Glu Ser  
 100 105 110

Leu Val Glu Ala Thr Val Gly Glu Arg Val Arg Ile Pro Ala Lys Tyr  
 115 120 125

Leu Gly Tyr Pro Pro Pro Glu Ile Lys Trp Tyr Lys Asn Gly Ile Pro  
 130 135 140

Leu Glu Ser Asn His Thr Ile Lys Ala Gly His Val Leu Thr Ile Met  
 145 150 155 160

Glu Val Ser Glu Arg Asp Thr Gly Asn Tyr Thr Val Ile Leu Thr Asn  
 165 170 175

Pro Ile Ser Lys Glu Lys Gln Ser His Val Val Ser Leu Val Val Tyr  
 180 185 190

Val Pro Pro  
 195

<210> 8

<211> 322

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 8

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser  
 1 5 10 15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu  
 20 25 30

Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu  
 35 40 45

Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu  
 50 55 60

Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile  
 65 70 75 80



<210> 9

<211> 357

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400

> 9

Met Val Ser Tyr Trp Asp Thr Gly Val Leu Leu Cys Ala Leu Leu Ser

1                    5                    10                    15

Cys Leu Leu Leu Thr Gly Ser Ser Ser Gly Gly Arg Pro Phe Val Glu

20                    25                    30

Met Tyr Ser Glu Ile Pro Glu Ile Ile His Met Thr Glu Gly Arg Glu

35                    40                    45

Leu Val Ile Pro Cys Arg Val Thr Ser Pro Asn Ile Thr Val Thr Leu

50                    55                    60

Lys Lys Phe Pro Leu Asp Thr Leu Ile Pro Asp Gly Lys Arg Ile Ile

65                    70                    75                    80

Trp Asp Ser Arg Lys Gly Phe Ile Ile Ser Asn Ala Thr Tyr Lys Glu

85                    90                    95

Ile Gly Leu Leu Thr Cys Glu Ala Thr Val Asn Gly His Leu Tyr Lys

100                    105                    110

Thr Asn Tyr Leu Thr His Arg Gln Thr Asn Thr Ile Ile Asp Val Gly

115                    120                    125

Pro Gly Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Leu Cys Pro Ala Pro Glu Leu

130                    135                    140

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr

145                    150                    155                    160

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val

165                    170                    175

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

180                    185                    190

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser





Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
 290 295 300

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
 305 310 315 320

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
 325 330 335

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
 340 345 350

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
 355 360 365

Tyr Lys Ala Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
 370 375 380

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
 385 390 395 400

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
 405 410 415

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 420 425

<210> 11  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 11

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
 35 40 45

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





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

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

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

<210> 12  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 12

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30

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



Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540  
 Gln Asp Ser Glu Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Arg Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575  
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590  
 Ser Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605  
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
 610 615 620  
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625 630 635 640  
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
 645 650 655  
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670  
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
 675 680 685  
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
 690 695 700  
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr  
 705 710 715 720  
 Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730 735  
 <210> 13  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 13

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                    40                    45

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

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

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

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

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

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

Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145                    150                    155                    160

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

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
                   180                    185                    190

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

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

Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile  
 225                    230                    235                    240

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

245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270

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

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

Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Ser Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320

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

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

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

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380

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

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

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

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

Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495

Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510

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

Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Ser Asn Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590

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

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

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

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

Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670

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

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

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

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

<210> 14

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 14

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

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

Lys Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
65                    70                    75                    80

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

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

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

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

Pro Val Glu His Phe Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
145                    150                    155                    160

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

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
                         180                    185                    190

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

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



Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465                      470                      475                      480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
                                  485                      490                      495  
 Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
                                  500                      505                      510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
                                  515                      520                      525  
 Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
                                  530                      535                      540  
 Gln Asp Ser Gly Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
  
 545                      550                      555                      560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
                                  565                      570                      575  
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
                                  580                      585                      590  
 Thr Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
                                  595                      600                      605  
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
  
                                  610                      615                      620  
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625                      630                      635                      640  
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
                                  645                      650                      655  
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
                                  660                      665                      670  
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
  
                                  675                      680                      685  
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
                                  690                      695                      700  
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr

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

<210> 15  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 15  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
                                  20                      25                      30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Lys Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                                  35                      40                      45  
 Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro  
                                  50                      55                      60

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

Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                                  130                      135                      140  
 Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Ser Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
                                  165                      170                      175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro



Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr  
 435 440 445  
  
 Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495  
 Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510  
  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
 515 520 525  
 Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540  
 Gln Gly Ser Asn Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575  
  
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590  
 Ser Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605  
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
 610 615 620  
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625 630 635 640  
  
 His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
 645 650 655  
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670  
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys



Pro Val Glu His Ser Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
  
 145                      150                      155                      160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
  
                             165                      170                      175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
  
                             180                      185                      190  
 Ala Ala Pro Ser Gly Leu Gly Thr Asn Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
  
                             195                      200                      205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
  
  
                             210                      215                      220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Met Gly Asp Arg Val Ile  
  
 225                      230                      235                      240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
  
                             245                      250                      255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
  
                             260                      265                      270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
  
  
                             275                      280                      285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
  
                             290                      295                      300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
  
                             325                      330                      335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
  
  
                             340                      345                      350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
  
                             355                      360                      365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
  
                             370                      375                      380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser

385                    390                    395                    400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
  
                          405                    410                    415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
                          420                    425                    430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr  
                          435                    440                    445  
 Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
                          450                    455                    460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
  
 465                    470                    475                    480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
                          485                    490                    495  
 Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
                          500                    505                    510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
                          515                    520                    525  
 Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
  
                          530                    535                    540  
 Gln Asp Ser Gly Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545                    550                    555                    560  
 Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
                          565                    570                    575  
 Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
                          580                    585                    590  
 Thr Asp Val Asn Thr Gln Gly Val Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
  
                          595                    600                    605  
 Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr  
                          610                    615                    620  
 Asp Gly His Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys  
 625                    630                    635                    640

His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asn  
                   645                  650                  655  
 Pro Ser Thr Thr Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
                   660                  665                  670  
 Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys  
                   675                  680                  685  
 Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr  
                   690                  695                  700  
 Asn Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr  
 705                  710                  715                  720  
 Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
                   725                  730                  735  
 <210> 17  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 17  
 Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1                  5                  10                  15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
                   20                  25                  30  
 Lys Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser Arg Gly Leu Val Leu Pro  
                   35                  40                  45  
                   50                  55                  60  
 Val Asn Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                  70                  75                  80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
                   85                  90                  95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly



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

Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380

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

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

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

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

Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460

Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495

Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510

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

Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Asp Ser Gly Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Ser Val Ser Thr Asn Leu Gln Ser Gly Asn Thr Gln Ala Ala Thr  
 580 585 590

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





305                    310                    315                    320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
  
                          325                    330                    335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
                          340                    345                    350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
                          355                    360                    365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
                          370                    375                    380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
  
 385                    390                    395                    400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
                          405                    410                    415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
                          420                    425                    430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr  
                          435                    440                    445  
 Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
  
                          450                    455                    460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465                    470                    475                    480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
                          485                    490                    495  
 Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
                          500                    505                    510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
  
                          515                    520                    525  
 Asp Glu Glu Lys Tyr Phe Pro Gln Ser Gly Val Leu Ile Phe Gly Lys  
                          530                    535                    540  
 Gln Asp Ser Gly Lys Thr Asn Val Asp Ile Glu Lys Val Met Ile Thr  
 545                    550                    555                    560





Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415  
  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Lys Thr  
 435 440 445  
 Asn Ala Pro Ser Gly Thr Thr Thr Met Ser Arg Leu Gln Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Ala Ser Asp Ile Arg Asp Gln Ser Arg Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Lys Thr Ala Ala Asp Asn Asn  
 485 490 495  
 Asn Ser Asp Tyr Ser Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp



<220><223> Synthetic

<400> 20

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1                    5                    10                    15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
                   20                    25                    30  
 Arg Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
                   85                    90                    95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
                   100                    105                    110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro  
                   115                    120                    125  
 Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
                   130                    135                    140  
 Pro Val Glu His Ser Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
 145                    150                    155                    160  
 Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
                   165                    170                    175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
                   180                    185                    190  
 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Thr Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
                   195                    200                    205  
 Ala Pro Met Ala Gly Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
                   210                    215                    220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225                    230                    235                    240

Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Arg Thr  
 435 440 445  
 Gln Ser Asn Ser Gly Thr Leu Gln Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Pro Thr Ser Met Ser Leu Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Gln Ala Asn Asp Asn Asn



<210> 21

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 21

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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Arg Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

                  130                    135                    140

Pro Val Glu His Ser Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Pro Gly Gln Pro Pro

                  180                    185                    190

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



Gln Ser Asn Ser Gly Thr Leu Gln Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln  
 450 455 460

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

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Gln Ala Asn Asp Asn Asn  
 485 490 495

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

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

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Thr Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Thr Asn Ala Asn Asp Ala Asp Leu Glu His Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Asn Val Ser Asn Asn Leu Gln Asn Ser Asn Thr Gly Pro Thr Thr  
 580 585 590

Glu Asn Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605

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

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

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

Pro Pro Thr Asn Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670

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

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



Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
 165 170 175  
 Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
 180 185 190  
 Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Thr Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
 195 200 205  
 Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
 210 215 220  
 Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
 225 230 235 240  
 Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
 245 250 255  
 Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
 260 265 270  
 Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
 275 280 285  
 Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Ser Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu



Pro Thr Asn Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr  
 660 665 670  
 Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu  
 675 680 685  
 Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Asn  
 690 695 700  
 Lys Ser Val Asn Val Asp Phe Thr Val Asp Thr Asn Gly Val Tyr Ser  
 705 710 715 720  
 Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu  
 725 730

<210> 23

<211> 735

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 23

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Thr Leu Ser  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Ile Arg Gln Trp Trp Lys Leu Lys Pro Gly Pro Pro Pro Pro  
 20 25 30  
 Arg Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp  
 65 70 75 80  
 Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
 85 90 95  
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
 100 105 110  
 Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro



Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380

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

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

Asp Val Ser Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430

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

Gln Ser Asn Ser Gly Thr Leu Gln Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln  
 450 455 460

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

Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Gln Ala Asn Asp Asn Asn  
 485 490 495

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

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

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Thr Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Thr Asn Ala Asn Asp Ala Asp Leu Glu His Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Asn Val Ser Asn Asn Leu Gln Asn Ser Asn Thr Gly Pro Thr Thr  
 580 585 590

Glu Asn Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605

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



Arg Gln Leu Asp Ser Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Lys Tyr Asn His Ala  
85 90 95  
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Lys Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly  
100 105 110  
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Arg Arg Val Leu Glu Pro  
115 120 125  
Leu Gly Leu Val Glu Glu Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg  
130 135 140  
Pro Val Glu His Ser Pro Val Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly  
145 150 155 160  
Lys Ala Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln Thr  
165 170 175  
Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro  
180 185 190  
Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Ser Thr Thr Met Ala Thr Gly Ser Gly  
195 200 205  
Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Asn Ser  
210 215 220  
Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Gln Trp Leu Gly Asp Arg Val Ile  
225 230 235 240  
Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His Leu  
245 250 255  
Tyr Lys Gln Ile Ser Ser Gln Ser Gly Ala Ser Asn Asp Asn His Tyr  
260 265 270  
Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His  
275 280 285  
Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
290 295 300  
Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
305 310 315 320  
Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu



Gly Thr Val Ser Asn Asn Leu Gln Asn Ser Asn Thr Gly Pro Thr Thr  
 580 585 590

Gly Thr Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605

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

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

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

Pro Pro Thr Asn Phe Ser Ser Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670

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

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

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

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

<210> 25  
 <211> 735  
 <212> PRT  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 25

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

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

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



Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp  
 290 295 300  
  
 Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val  
 305 310 315 320  
 Lys Glu Val Thr Gln Asn Asp Gly Thr Thr Thr Ile Ala Asn Asn Leu  
 325 330 335  
 Thr Gly Thr Val Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr  
 340 345 350  
 Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp  
 355 360 365  
  
 Val Phe Met Val Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser  
 370 375 380  
 Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser  
 385 390 395 400  
 Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Thr Phe Ser Tyr Thr Phe Glu  
 405 410 415  
 Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg  
 420 425 430  
  
 Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Asn Lys Thr  
 435 440 445  
 Gln Ser Asn Ser Gly Thr Leu Gln Gln Ser Arg Leu Leu Phe Ser Gln  
 450 455 460  
 Ala Gly Pro Thr Ser Met Ser Leu Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly  
 465 470 475 480  
 Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Leu Ser Lys Gln Ala Asn Asp Asn Asn  
 485 490 495  
  
 Asn Ser Asn Phe Pro Trp Thr Ala Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly  
 500 505 510  
 Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Pro Ala Met Ala Ser His Lys Asp  
 515 520 525  
 Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Thr Leu Ile Phe Gly Lys



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

1                    5                    10                    15

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

                  20                    25                    30

Arg Pro Ala Glu Arg His Gln Asp Asp Ser 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 Glu Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

65                    70                    75                    80

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

                  85                    90                    95

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

                  100                    105                    110

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

                  115                    120                    125

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

130                    135                    140

Pro Val Glu His Ser Pro Ala Glu Pro Asp Ser Ser Ser Gly Thr Gly

145                    150                    155                    160

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

                  165                    170                    175

Gly Asp Ala Asp Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Leu Gly Gln Pro Pro

                  180                    185                    190

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

195                    200                    205

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

210                    215                    220

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

225                    230                    235                    240

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



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

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

Asp Glu Glu Lys Phe Phe Pro Met His Gly Thr Leu Ile Phe Gly Lys  
 530 535 540

Gln Gly Thr Asn Ala Asn Asp Ala Asp Leu Glu His Val Met Ile Thr  
 545 550 555 560

Asp Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr  
 565 570 575

Gly Asn Val Ser Asn Asn Leu Gln Asn Ser Asn Thr Gly Pro Thr Thr  
 580 585 590

Glu Asn Val Asn His Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asp  
 595 600 605

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

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

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

Pro Pro Thr Asn Phe Ser Ala Ala Lys Phe Ala Ser Phe Ile Thr Gln  
 660 665 670

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

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

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

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

<210> 27

<211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 27  
 ggacatacac aaccagagag ac 22  
 <210> 28  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 28  
 gtgagtgaaa gagacacagg aa 22

<210> 29  
 <211> 26  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <220><221> misc\_feature  
 <222> (9)..(10)  
 <223> May be modified by ZEN  
 <400> 29  
 cccatttcaa aggagaagca gagcca 26

<210> 30  
 <211> 6764  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> Synthetic  
 <400> 30  
 ggtacctcta gagtcgacctc gggcggcctc gaggacgggg tgaactacgc ctgaggatcc 60  
 gatctttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga agccccttga gcatctgact 120

tctggctaataaaggaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 180  
 tcaactggaa gcaattcggt gatctgaatt tcgaccaccc ataataacca ttaccctggt 240

agataagtag catggcgggt taatcattaa ctacaaggaa cccctagtga tggagttggc 300  
 cactcctct ctgcgcctc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccgacg 360  
 cccgggcttt gcccgggagg cctcagttag cgagcgagcg cgcagcctta attaacctaa 420  
 ttcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaaac cctggcgta cccaacttaa 480  
 tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg cccgcaccga 540  
  
 tcgccttcc caacagtgc gcagcctgaa tggcgaatgg gacgcgcct gtagcggcgc 600  
 attaagcgcg gcgggtgtgg tggttacgcg cagcgtgacc gctacacttg ccagcgcct 660  
 agcggccgct ctttcgctt ttttccttc ctttctgcc acgttcgccg gctttccccg 720  
 tcaagctcta aatcgggggc tcccttagg gttccgattt agtgccttac ggcacctcga 780  
 ccccaaaaaa cttagtagg gtgatggttc acgtagtggg ccatcgccct gatagacggt 840  
 ttttcgccct ttgacttgg agtccactt ctttaatagt ggactcttgt tccaaactgg 900  
 aacaacactc aaccctatct cggctctattc ttttgattta taagggattt tgccgatttc 960  
  
 ggctattgg ttaaaaaatg agctgattta acaaaaattt aacgcgaatt ttaaaaaat 1020  
 attaacgctt acaatttagg tggcactttt cggggaaatg tgcgcggaac ccctatttgt 1080  
 ttatttttct aaatacttc aaatatgtat ccgctcatga gacaataacc ctgataaatg 1140  
 cttaataat attgaaaag gaagagtatg attgaacaag atggattgca cgcaggttct 1200  
 ccggccgctt ggggtgagag gctattcggc tatgactggg cacaacagac aatcggtcgc 1260  
 tctgatgccg ccgtgttccg gctgtcagcg caggggcgcc cggttctttt tgtcaagacc 1320  
 gacctgtccg gtgccctgaa tgaactgcaa gacgaggcag cgcggctatc gtggctggcc 1380  
  
 acgacggcgc ttcttgcgc agctgtgctc gacgttgtca ctgaagcggg aagggactgg 1440  
 ctgctattgg gcgaagtgcc ggggcaggat ctctgtcat ctaccttgc tctgcccag 1500  
 aaagtatcca tcatggetga tgcaatgcgg cggctgcata cgcttgatcc ggctacctgc 1560  
 ccattcgacc accaagcga acatcgcatc gagcgagcac gtactcggat ggaagccggt 1620  
 cttgtcgatc aggatgatct ggacgaagag catcaggggc tcgcgccagc cgaactgttc 1680  
 gccaggctca aggcgagcat gcccgacggc gaggatctcg tcgtgacca tggcgatgcc 1740  
 tgcttgccga atatcatggt ggaaaatggc cgcttttctg gattcatcga ctgtggccgg 1800  
  
 ctgggtgtgg cggaccgcta tcaggacata gcgttgcta cccgtgatat tgctgaagag 1860  
 cttggcggcg aatgggctga ccgcttcttc gtgctttacg gtatcgccgc tcccgattcg 1920  
 cagcgcacgc cttctatcg cttcttgac gagttcttct gactgtcaga ccaagtttac 1980  
 tcatatatac tttagattga tttaaaactt catttttaat ttaaaaggat ctaggtgaag 2040  
 atcctttttg ataactcat gacaaaatc ccttaactg agttttcgtt cactgagcg 2100

tcagaccccg tagaaaagat caaaggatct tcttgagatc ctttttttct gcgcgtaatc 2160  
 tgctgcttgc aaacaaaaaa accaccgcta ccagcgggtgg tttgtttgcc ggatcaagag 2220

ctaccaacte tttttccgaa ggtaactggc ttcagcagag cgcagatacc aaatactgtt 2280  
 cttctagtgt agccgtagtt aggccaccac ttcaagaact ctgtagcacc gcctacatac 2340  
 ctgctctgce taatcctgtt accagtggct gctgccagtg cgcataagtc gtgtcttacc 2400  
 gggttggact caagacgata gttaccggat aaggcgcagc ggtcgggctg aacgggggggt 2460  
 tcgtgcacac agcccagctt ggagcgaacg acctacaccg aactgagata cctacagcgt 2520  
 gagctatgag aaagcggcag ctttcccgaa gggagaaagg cggacaggta tccggtaagc 2580  
 ggcagggtcg gaacaggaga gcgcacgagg gagcttccag ggggaaacgc ctggtatctt 2640

tatagtctg tcgggtttcg ccacctctga cttgagcgtc gatttttgtg atgctcgtca 2700  
 gggggggcgga gcctatggaa aaacgccagc aacgcggcct ttttacggtt cctggccttt 2760  
 tgctggcctt ttgctcacat gttctttcct gcgttatccc ctgattctgt ggataaccgt 2820  
 attaccgctt ttgagtgagc tgataccgct cgccgcagcc gaacgaccga gcgcagcgag 2880  
 tcagtgagcg aggaagcggga agagcgcceca atacgcaaac cgctctctcc cgcgcgttgg 2940  
 ccgattcatt aatgcagctg gcacgacagg tttcccgact ggaaagcggg cagtgagcgc 3000  
 aacgcaatta atgtgagtta gctcactcat taggcacccc aggcctttaca ctttatgctt 3060

ccggctcgta tgttgtgtgg aattgtgagc ggataacaat ttcacacagg aaacagctat 3120  
 gaccatgatt acgccagatt taattaaggc ctttaattagg ctgcgcgctc gctcgtcac 3180  
 tgaggccgcc cgggcaaagc ccgggcgctg ggcgaccttt ggtcgcccgg cctcagtgag 3240  
 cgagcgagcg cgcagagagg gagtggccaa ctccatcact aggggttctt tgtagttaat 3300  
 gattaaccgg ccatgctact tatctaccag ggtaaatgggg atcctctaga actatagcta 3360  
 gtcgacattg attattgact agttattaat agtaatcaat tacggggtca ttagttcata 3420  
 gcccatatat ggagtccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 3480

ccaacgacce ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 3540  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccacac ttggcagtac 3600  
 atcaagtgta tcatatgcca agtaccccc ctattgacgt caatgacggt aatggccccg 3660  
 cctggcatta tgcccagtac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 3720  
 tattagtcat cgctattacc atggctgagg tgagccccac gttctgcttc actctcecca 3780  
 tctccccccc ctccccacc ccaattttgi atttatttat ttttaatta ttttgtgcag 3840

cgatgggggc gggggggggg ggggggcgcg cgccaggcgg ggcggggcgg ggcgaggggc 3900  
  
 ggggcggggc gaggcggaga ggtgcggcgg cagccaatca gagcggcgcg ctccgaaagt 3960  
 ttctttttat ggcgagggcg cggcggcggc ggccctataa aaagcgaagc gcgcggcggg 4020  
 cgggagtcgc tgcgcgctgc cttcggcccg tggcccgctc cgccggccgc tcgcgccgc 4080  
 cggcccgct ctgactgacc gcgttactcc cacaggtgag cgggcgggac ggcccttctc 4140  
 ctccgggctg taattagcgc ttggtttaat gacggcttgt ttctttctg tggctgcgtg 4200  
 aaagccttga ggggctccgg gagggccctt tgtgcggggg gagcggctcg gggggtgcgt 4260  
 gcgtgtgtgt gtgcgtgggg agcggcgcgt gcggctccgc gctgcccggc ggctgtgagc 4320  
  
 gctgcgggcg cggcgcgggg ctttgtgcgc tccgcagtgt gcgcgagggg agcgcggccg 4380  
 ggggcgggtgc cccgcggtgc ggggggggct gcgaggggaa caaaggctgc gtgcggggtg 4440  
 tgtgcgtggg ggggtgagca gggggtgtgg gcgcgtcggt cgggctgcaa cccccctgc 4500  
 accccctcc ccgagttgct gagcacggcc cggcttcggg tgcggggctc cgtacggggc 4560  
 gtggcgggg gctcggcgtg ccggcggggg ggtggcggca ggtgggggtg ccggcgggg 4620  
 cggggccgc tcgggcccgg gagggctcgg gggagggggc cggcggcccc cggagcgcg 4680  
 gcggctgtcg aggcgcggcg agcccgagcc attgccttt atggtaatcg tgcgagaggg 4740  
  
 cgcagggact tcctttgtcc caaatctgtg cggagccgaa atctgggagg cgcccccga 4800  
 cccctctag cgggcgcggg gcgaagcggg gcggcggcgg caggaaggaa atgggcgggg 4860  
 agggccttcg tgcgtcgccg gcgcccgctc cccttctccc tctccagcct cgggctgtc 4920  
 cggggggga cggctgcctt cgggggggac ggggcagggc ggggttcggc ttctggcgtg 4980  
 tgaccggcgg ctctagagcc tctgtaacc atgttcatgc cttctcttt ttctacagc 5040  
 tcctgggcaa cgtgctggtt attgtgctgt ctcatcttt tggcaaagaa ttgccacca 5100  
 tggctagcta ctgggacacc ggggtcctgc tgtgcgcgct gctcagctgt ctgcttctca 5160  
  
 caggatctag ttccggaggg agaccttcg tagagatgta cagtgaaatc cccgaaatta 5220  
 tacacatgac tgaaggaagg gagctcgtca ttccctgccg ggttactca ctaaacatca 5280  
 ctgttacttt aaaaaagttt ccacttgaca ctttgatccc tgatggaaaa cgcataatct 5340  
 gggacagtag aaaggccttc atcatatcaa atgcaacgta caaagaaata gggcttctga 5400  
 cctgtgaagc aacagtcaat gggcatttgt ataagacaaa ctatctcaca catcgacaaa 5460  
 ccaatacaat catagatgtg gttctgagtc cgtctcatgg aattgaacta tctgttgag 5520  
 aaaagcttgt cttaaatgt acagcaagaa ctgaactaaa tgtggggatt gacttcaact 5580

gggaatacc ttcttgaag catcagcata agaaacttgt aaaccgagac ctaaaaacc 5640  
 agtctgggag tgagatgaag aaatTTTTga gcacctaac tatagatggt gtaaccgga 5700  
 gtgaccaagg attgtacacc tgtgcagcat ccagtgggct gatgaccaag aagaacagca 5760  
 catttgtcag ggiccatgaa aaaccttttg ttgcttttgg aagtggcatg gaatctctgg 5820  
 tggaaagccac ggtggggag cgtgtcagaa tccttgcgaa gtaccttgggt taccacccc 5880  
 cagaaataaa atggtataaa aatggaatac cccttgagtc caatcacaca attaaagcgg 5940  
 ggcatgtact gacgattatg gaagtgagtg aaagagacac aggaaattac actgtcatcc 6000

ttaccaatcc catttcaag gagaagcaga gccatgtggt ctctctggtt gtgtatgtcc 6060  
 caccgggccc gggcgacaaa actcacacat gccactgtg cccagcacct gaactcctgg 6120  
 ggggaccgtc agtcttctc tccccccaa aaccaagga caccctcatg atctcccga 6180  
 ccctgaggt cacatgctg gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttea 6240  
 actggtactg ggacggcgtg gaggtgcata atccaagac aaagccgagg gaggagcagt 6300  
 acaacagcac gtaccgtgtg gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg 6360  
 gcaaggagta caagtgaag gtctccaaca aagccctccc agcccccatc gagaaaacca 6420

tctccaaagc caaagggcag ccccgagaac cacaggtgta caccctgccc ccatcccggg 6480  
 atgagctgac caagaaccag gtcagcctga cctgcctagt caaaggcttc tatcccagcg 6540  
 acatgccctg ggagtgggag agcaatgggc agccggagaa caactacaag gccacgctc 6600  
 ccgtgtgga ctccgacggc tcttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca 6660  
 ggtggcagca ggggaacgtc ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact 6720  
 acacgcagaa gagcctctcc ctgtctccgg gtaaatgaac gcgt 6764

<210> 31

<211> 5673

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 31

cagacatgat aagatacatt gatgagtttg gacaaaccac aactagaatg cagtgaaaaa 60  
 aatgctttat ttgtgaaatt tgtgatgctt ttgctttatt tgtaaccatt ataagctgca 120  
 ataaacaagt taacaacaac aattgcattc attttatggt tcaggttcag ggggagatgt 180  
 gggaggtttt ttaaagcaag taaaacctct acaaatgtgg tactcgagga agcaattcgt 240  
 tgatctgaat ttcgaccacc cataatacc attaccctgg tagataagta gcatggcggg 300  
 ttaatcatta actacaagga acccctagt atggagtgg ccactccctc tctgcgcgt 360

cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccac gcccgggctt tgcccgggcg 420

gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagcctt aattaaccta attcactggc cgtcgtttta 480

caacgtcgtg actgggaaaa ccctggcggtt acccaactta atcgcccttg agcacatccc 540

cctttcgcca gctggcgtaa tagcgaagag gcccgcaccc atcgcccttc ccaacagttg 600

cgcagcctga atggcgaatg ggacgcgccc ttagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg 660

gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgcce tagcggcccgc tectttcgct 720

ttcttccctt cctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg 780

ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgattag 840

ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg ttttcgccc tttgacgttg 900

gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caaccctatc 960

tcggtctatt cttttgattt ataagggatt ttgccgattt cggcctattg gttaaaaaat 1020

gagctgattt acaaaaaatt taacgcgaat ttaacaaaa tattaacgct tacaatttag 1080

gtggcacttt tcggggaat gtgcgcggaa ccctatttg tttatttttc taaatacatt 1140

caaatatgta tccgctcatg agacaataac cctgataaat gcttcaataa tattgaaaaa 1200

ggaagagtat gattgaacaa gatggattgc acgcaggttc tccggccgct tgggtggaga 1260

ggctattcgg ctatgactgg gcacaacaga caatcggtg ctctgatgcc gccgtgttcc 1320

ggctgtcagc gcagggggcg cgggttcttt ttgtcaagac cgacctgtcc ggtgcctga 1380

atgaactgca agacgaggca gcgcggctat cgtggctggc cacgacgggc gttccttgcg 1440

cagctgtgct cgacgttgct actgaagcgg gaagggactg gctgctattg ggcgaagtgc 1500

cggggcagga tctcctgca tctcaccttg ctctgccga gaaagtatcc atcatggctg 1560

atgcaatgcg gcggctgcat acgcttgatc cgctacctg cccattcgac caccaagcga 1620

aacatcgcat cgagcgagca cgtaactgga tggaaagcgg tcttgtcgat caggatgatc 1680

tggacgaaga gcatcagggg ctcgcccag ccgaactgtt cgccaggctc aaggcgagca 1740

tgcccagcg cgaggatctc gtcgtgacce atggcgatgc ctgcttgccg aatatcatgg 1800

tggaaaatgg ccgcttttct ggattcatcg actgtggccg gctgggtgtg gcggaccgct 1860

atcaggacat agcgttggtt acccgtgata ttgctgaaga gcttggcggc gaatgggctg 1920

accgttctct cgtgctttac ggtatcgccg ctcccattc gcagcgcac gccttctatc 1980

gccttcttga cgagttcttc tgactgtcag accaagtta ctcatatata ctttagattg 2040

atttaaaact tcatttttaa tttaaaagga tctaggtgaa gatccttttt gataatctca 2100

tgaccaaagt cccttaacgt gagttttcgt tccactgagc gtcagacccc gtagaaaaga 2160  
 tcaaaggatc ttcttgagat ctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg caaacaaaaa 2220  
 aaccaccgct accagcgggtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact ctttttccga 2280  
 aggtaactgg cticagcaga gcgcagatac caaatactgt tcttctagt tagccgtagt 2340  
 taggccacca cttaagaac tctgtagcac gcctacata cctcgtctg ctaatcctgt 2400  
 taccagtggc tgcctccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac tcaagacgat 2460  
 agttaccgga taaggcgcag cggctcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca cagcccagct 2520  
  
 tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga gaaagcgcga 2580  
 cgcttcccga agggagaaaag gcggacaggt atccggttaag cggcagggtc ggaacaggag 2640  
 agcgcacgag ggagcttcca gggggaacg cctggatct ttatagtcct gtcgggtttc 2700  
 gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg agcctatgga 2760  
 aaaacccag caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgctggcct tttgctcaca 2820  
 tgttctttcc tgcgttatcc cctgattctg tggataaccg tattaccgcc tttgagttag 2880  
 ctgataccgc tcgccgcagc cgaacgaccg agcgcagcga gtcagtgagc gaggaagcgg 2940  
  
 aagagcgcgc aatagcaaa ccgctctcc ccgcgcttg gccattcat taatgcagct 3000  
 ggcacgacag gtttcccagc tggaaagcgg gcagttagcg caacgcaatt aatgtgagtt 3060  
 agctcactca ttaggcacc caggetttac actttatgct tccggctcgt atgttgtgtg 3120  
 gaattgtgag cggataacaa tttcacacag gaaacagcta tgaccatgat tacgccagat 3180  
 ttaattaagg ccttaattag gctgcgcgct cgctcgtca ctgaggccgc cggggcaaag 3240  
 cccgggcgct gggcgacctt tggctgcccc gcctcagtga gcgagcagc gcgcagagag 3300  
 ggagtggcca actccatcac taggggttcc ttgtagttaa tgattaacc gccatgctac 3360  
  
 ttatctacca gggtaatggg gatccggagt tccgcgttac ataacttac gtaaatggcc 3420  
 cgctggctg accgccaac gacccccgc cattgacgtc aataatgacg tatgttccca 3480  
 tagtaacgcc aatagggact ttccattgac gtcaatgggt ggagtattta cggtaaaactg 3540  
 cccacttggc agtacatcaa gtgtatcata tgccaagtac gcccctatt gacgtcaatg 3600  
 acggtaaatg gccgcctgg cattatgcc agtacatgac cttatgggac tttcctactt 3660  
 ggcagtacat ctacgtatta gtcacgcta ttaccatggt gatgcggttt tggcagtaca 3720  
 ccaatggcgc tggatagcgg tttgactcac ggggatttcc aagtctccac cccattgacg 3780  
  
 tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt cgtaacaact 3840  
 ccgccccatt gacgcaaatg ggcgtaggc gtgtacggtg ggaggtctat ataagcagag 3900  
 ctcgtttagt gaaccgtcag atcgctgga gacgccatcc acgctgtttt gacctccata 3960

gaagacaccg acictactag aggatctatt tccggtgaat tcgccacat ggtgagctac 4020  
 tgggacaccg gcgtgctgct gtgcgccctg ctgagctgcc tgctgctgac cggcagcagc 4080  
 agcggcgcca gacctttcgt ggagatgtac tccgagatcc ccgagatcat ccacatgacc 4140  
 gagggcaggg agctcgtgat cccctgcaga gtgaccagcc ccaacatcac cgtgaccctg 4200

aagaagtcc ccttgacac cctgatcccc gacggcaaga gaatcatctg ggacagcaga 4260  
 aagggttca teatctcaa cgccacctac aaggagatcg gcctgctgac ctgagagcc 4320  
 accgtgaacg gccacctgta caagaccaat tacctgacct acaggcagac caataccatc 4380  
 atcgactgg tgctgtcccc cagccacggc atcgagctga gcgtggcgga gaagctggtg 4440  
 ctgaactgca ccgccaggac cgagctgaac gtggggatcg attttaactg ggagtacccc 4500  
 agcagcaagc accagcaca gaagctggtg aatagggacc tgaaaacca gagcgggaagc 4560  
 gagatgaaga agtttctgag caccctgacc atcgacggcg tgaccggag cgaccagggc 4620

ctgtacacct gcgccgctc cagcggcctg atgactaaga agaacagcac ctttgtcgg 4680  
 gtgcacgaga agcccttctg ggccctcggc agcgggatgg agtctctggt ggaggctacc 4740  
 gtggcgcgaga gagtgagaat ccccaccaag tacctgggct acccccctcc tgagatcaag 4800  
 tggataaga acggcatccc tctggagtcc aaccacacca tcaaggcagg ccactgctg 4860  
 accatcatgg aagtgagcga gagggacacc ggcaactaca ccgtgatcct gaccaacccc 4920  
 atctccaagg agaagcagag ccactggtg agcctggtgg tgtactgccc tccagggcct 4980  
 ggcgataaga cccacacatg cccctgtgc cccgccccg agctgctggg cggaccaagc 5040

gtgttctgt tcccaccaa gcctaaggac acctgatga tcagccggac ccccaggtg 5100  
 acctgctgg tggatgatgt gagccacgag gatccagagg tgaagtttaa ctggtatgtg 5160  
 gacggcgtgg aggtgcaca gcceaagacc aagcccaggg aggagcagta caacagcacc 5220  
 tacagagtgg tgagcgtgct gaccgtgctg caccaggact ggctgaacgg caaggagtac 5280  
 aagtgaagg tgagcaaaa ggccctgccc gccctatcg agaaaacat cagcaaggcc 5340  
 aagggccagc cccgcgagcc ccaggtgtac aactgcccc ctagcccgca cgagctgacc 5400  
 aagaaccagg tgcctctgac ctgctggtg aagggttct accccagcga catcgccgtg 5460

gagtgggaga gcaacggcca gcccgagaac aactacaagg ccaccccc tgtgctggac 5520  
 tccgacgcca gcttcttct gtacagcaag ctgacctgg acaagtcccg ctggcagcag 5580  
 ggcaactgt tcaactgtag cgtgatgcac gagccctgc acaaccacta caccagaag 5640  
 tcctgagcc tgagccccg caagtgaacg cgt 5673

<210> 32

<211> 6318

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Synthetic

<400> 32

```

aattcgatat caagcttata gataatcaac ctctggatta caaaatttgt gaaagattga      60
ctggtattct taactatggt gctcctttta cgtatgtgg atacgctgct ttaatgcctt      120

tgtatcatgc tattgcttcc cgtatggctt tcattttctc ctccttgtat aaatcctggt      180
tgctgtctct ttatgaggag ttgtggcccg ttgtcaggca acgtggcgtg gtgtgcaactg      240
tgtttgctga cgcaaccccc actggttggg gcattgccac cacctgtcag ctcctttccg      300
ggactttcgc ttccccctc cctattgcc aegcggaact catcggccc gccttgccc      360
gctgtgggac aggggctcgg ctgttgggca ctgacaattc cgtggtgttg tcggggaaat      420
catcgtcctt tccttggctg ctgcctgtg ttgccactg gattctgcgc gggacgtcct      480
tctgctacgt cccttcggcc ctcaatccag cggaccttc tccccgggc ctgctgccgg      540

ctctcgggce tcttcecgct cttegccttc gccctcagac gaggcggatc tecctttggg      600
ccgcctcccc gcatcgatac cgtcgaccgg ggcggccgct tcgagcagac atgataagat      660
acattgatga gtttgacaaa accacaacta gaatgcagtg aaaaaaatgc tttatttgtg      720
aaatttgtga tgctattgct ttatttgtaa ccattataag ctgcaataaa caagttaaca      780
acaacaattg catcattttt atgtttcagg ttcaggggga gatgtgggag gttttttaa      840
gcaagtaaaa cctctacaaa tgtgttactc gaggaagcaa ttcgttgatc tgaatttcga      900
ccaccataa taaccattac cctggtagat aagtagcatg gcgggttaat cattaactac      960

aaggaacccc tagtgatgga gttggccact cctctctgc gcctcgtc gctcactgag      1020
gccggcgac caaaggctgc ccgacgccg ggcctttgcc gggcggcctc agtgagcgag      1080
cgagcgcga gccttaatta acctaattca ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg      1140
gaaaacctg gcgttaccca acttaategc ctgacagcac atccccctt cgccagctgg      1200
cgtaatagcg aagaggcccc caccgategc cttccaac agttgcgag cctgaatggc      1260
gaatgggacg cgcctgtag cggcgatta agcgcggcgg gtgtggtggt tacgvcagc      1320
gtgaccgcta cacttgccag gccttagcg cccgtcctt tcgctttctt cccttcctt      1380

ctcgccactg tcgcccgtt tccccgtaa gctctaaatc gggggctccc tttagggttc      1440
cgatttagtg ctttacggca cctcgacccc aaaaaactg attagggtga tggttcacgt      1500
agtgggcat cgcctgata gacggttttt cgcctttga cgttggagtc cacgttcttt      1560
aatagtgac tctgttcca aactggaaca aactcaacc ctatctcggc ctattcttt      1620

```

gatttataag ggattttgcc gatttcggcc tattggttaa aaaatgagct gatttaacaa 1680  
aaatttaacg cgaattttaa caaaatatta acgcttacia tttagggtgc acttttcggg 1740  
gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaata acattcaaat atgtatccgc 1800  
  
tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg aaaaaggaag agtatgattg 1860  
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 1920  
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccggctg tcagegcagg 1980  
ggcggccggt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaagacg 2040  
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcgttcc ttgvcagct gtgctcgacg 2100  
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggca agtgccgggg caggatctcc 2160  
tgtcatctca ccttgcctct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcggcggc 2220  
  
tgcatacgtt tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcacgagc 2280  
gagcacgtac tcggatggaa gccggtcttg tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2340  
aggggctcgc gccagccgaa ctgttcgcca ggctcaaggc gagcatgcc gacggcgagg 2400  
atctcgtcgt gaccatggc gatgctctgt tgcgaatat catggtggaa aatggccgct 2460  
tttctggatt catcactgt ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2520  
tggtaccgg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttcctcgtgc 2580  
tttacgggat cgcgctccc gattcgcagc gcategcctt ctatgcctt cttgacgagt 2640  
  
tcttctgact gtcagaccaa gtttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt 2700  
tttaatttaa aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt 2760  
aacgtgagtt ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt 2820  
gagatccttt ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaacca ccgctaccag 2880  
cgggtggtttg tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggettea 2940  
gcagagcgca galaccaaact actgttcttc tagttagacc gtagttaggc caccacttca 3000  
agaactctgt agcaccgctt acatacctcg ctctgctaat cctgttacca gtggctgctg 3060  
  
ccagtggcga taagtctgtt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccggataagg 3120  
cgcagcggtc gggctgaacg gggggttctg gcacacagcc cagcttgag cgaacacct 3180  
acaccgaact gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga 3240  
gaaaggcggga caggatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgaggagc 3300  
ttccaggggg aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg 3360  
agcgtcgatt tttgtgatgc tcgtcagggg ggcgggacct atggaaaaac gccagcaacg 3420

cgcccttttt acggttctcg gccttttgc ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt 3480  
  
 tatcccctga ttcctgtgat aaccgtatta ccgcctttga gtgagctgat accgctcgcc 3540  
 gcagccgaac gaccgagcgc agcgagtcag tgagcgagga agcggaagag cgcccaatac 3600  
 gcaaaccgcc tctccccgcg cgttggccga ttcattaatg cagctggcac gacaggtttc 3660  
 ccgactggaa agcgggcagt gagcgcaacg caattaatgt gagttagctc actcattagg 3720  
 caccaccagge tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt gtgtggaatt gtgagcggat 3780  
 aacaatttca cacaggaaac agctatgacc atgattacgc cagatttaat taaggcctta 3840  
 attagctgc gcgctcgctc gctcaactgag gccgcccggg caaagcccgg gcgtcgggcg 3900  
  
 acctttggtc gcccggcctc agtgagcgcg gagagggagt ggccaactcc 3960  
 atcactaggg gttccttga gttaatgatt aaccgcat gctacttacc taccagggtta 4020  
 atggggatcc ggagttccgc gttacataac ttacggtaaa tggcccgcct ggctgaccgc 4080  
 ccaacgacct ccgcccattg acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag 4140  
 ggactttcca ttgacgtcaa tgggtggagt atttacggta aactgccac ttggcagtac 4200  
 atcaagtgtg tcatatgcca agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aatggccccg 4260  
 cctggcatta tgcccaglac atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg 4320  
  
 tattagtcat cgctattacc atgggatgc ggttttggca gtacaccaat gggcgtggat 4380  
 agcggtttga ctacgggga tttccaagtc tccaccccat tgacgtcaat gggagtttgt 4440  
 tttggcacca aatcaacgg gactttcaa aatgctgtaa caactccgcc ccattgacgc 4500  
 aatggggcg taggcgtgta cgggtgggagg tctatataag cagagctcgt ttagtgaacc 4560  
 gtcagatcgc ctggagacgc catccacgct gttttgacct ccatagaaga caccgactct 4620  
 actagaggat ctatttccgg tgaattgcc accatggtga gctactggga caccggcgtg 4680  
 ctgctgtgcg cctgctgag ctgctgctg ctgaccggca gcagcagcgg cggcagacct 4740  
  
 ttcgtggaga tgiactccga gatccccgag atcatccaca tgaccgaggg caggagctc 4800  
 gtgatccct gcagagtgc cagcccaac atcaccgtga cctgaagaa gttccccctg 4860  
 gacaccctga tccccgacgg caagagaatc atctgggaca gcagaaaggg cttcatcatc 4920  
 tccaacgcca cctacaagga gatcggcctg ctgacctgcg aggccaccgt gaacggccac 4980  
 ctgtacaaga ccaattacct gaccacaggg cagaccaata ccatcatcga cgtggtgctg 5040  
 tccccagcc acggcatcga gctgagcgtg ggcgagaagc tggctgctgaa ctgcaccgcc 5100  
 aggaccgagc tgaacgtggg gatcgatttt aactgggagt accccagcag caagcaccag 5160

cacaagaagc tggatgaatag ggacctgaaa acccagagcg gaagcgagat gaagaagttt 5220  
 ctgagcacc tgaccatcga cggcgtgacc cggagcgacc agggcctgta cacctgcgcc 5280  
 gcctccagcg gcctgatgac taagaagaac agcacctttg tgcgggtgca cgagaagccc 5340  
 ttcgtggcct tcggcagcgg gatggagtct ctggtggagg ctaccgtggg cgagagagtg 5400  
 agaatcccc ccaagtacct gggctacccc ctcctgaga tcaagtgta taagaacggc 5460  
 atccctctgg agtccaacca caccatcaag gcaggccacg tgctgacat catggaagtg 5520  
 agcgagaggg acaccggcaa ctacaccgtg atcctgacca accccatctc caaggagaag 5580  
  
 cagagccacg tggtagcct ggtggtgtac gtgcctccag ggctggcga taagaccac 5640  
 acatgcccc tgtgccccgc ccccgagctg ctgggcggac caagcgtgtt cctgttccca 5700  
 cccaagccta aggacacct gatgatcagc cggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg 5760  
 gatgtgagcc acaggatcc agaggtgaag tttactggt atgtggacgg cgtggaggtg 5820  
 cacaacgcca agaccaagcc cagggaggag cagtacaaca gcacctacag agtggtagc 5880  
 gtgctgacc tgctgcacca ggactggctg aacggcaagg agtacaagt caaggtgagc 5940  
 aacaaggccc tgccccccc tatcgagaaa accatcagca agccaaggg ccagccccgc 6000  
  
 gagccccagg tglacacact gcccctagc cgcgacgagc tgaccaagaa ccagggtcc 6060  
 ctgacctgcc tggatgaagg cttctacccc agcgacatcg ccgtggagt ggagagcaac 6120  
 ggccagcccc agaacaacta caaggccacc ccccctgtgc tggactccga cggcagcttc 6180  
 ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag tcccgtggc agcagggcaa cgtgttcagc 6240  
 tgtagcgtga tgcacgagc cctgcacaac cactacacc agaagtcct gagcctgagc 6300  
 cccggcaagt gaacgcgt 6318