



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년06월30일

(11) 등록번호 10-2415896

(24) 등록일자 2022년06월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/64 (2006.01) A61K 38/48 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01) C07K 14/745 (2006.01)

C12N 15/52 (2006.01) C12N 15/864 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/644 (2013.01)

A61K 38/4846 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-7032060(분할)

(22) 출원일자(국제) 2016년06월23일

심사청구일자 2021년06월22일

(85) 번역문제출일자 2020년11월05일

(65) 공개번호 10-2020-0128215

(43) 공개일자 2020년11월11일

(62) 원출원 특허 10-2018-7002040

원출원일자(국제) 2016년06월23일

심사청구일자 2018년05월31일

(86) 국제출원번호 PCT/US2016/039075

(87) 국제공개번호 WO 2016/210170

국제공개일자 2016년12월29일

(30) 우선권주장

62/183,599 2015년06월23일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

WO2001098482 A2*

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 28 항

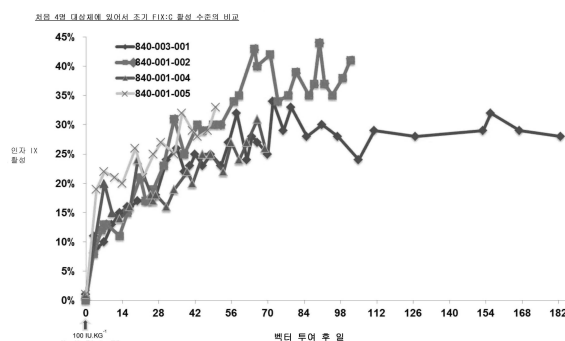
심사관 : 김정아

(54) 발명의 명칭 변형된 인자 IX, 및 세포, 기관 및 조직으로 유전자를 전달하기 위한 조성물, 방법 및 용도

(57) 요약

본 발명은 변형된 인자 IX 코딩 서열, 발현 카세트, 벡터 예컨대, 바이러스(예를 들어, 렌티- 또는 아데노-관련 바이러스) 벡터, 및 유전자 전달 방법 및 용도에 관한 것이다. 특히, 인자 IX 핵산을 인자 IX의 발현(전사)을 위한 세포, 조직 또는 기관 내로 표적화시키는 것에 관한 것이다.

대표도 - 도19



(52) CPC특허분류

A61K 48/00 (2013.01)
C07K 14/745 (2013.01)
C12N 15/52 (2013.01)
C12N 15/8645 (2013.01)
C12Y 304/21022 (2013.01)
C12N 2750/14132 (2013.01)
C12N 2750/14141 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

Grimm D. et al, JOURNAL OF VIROLOGY,
 82(12):pp.5887~5911 (2008. 6.)*
 Hodges B.L. et al, MOLECULAR THERAPY
 10(2):pp.269~278. (2004. 8.)*
 Rogers G. et al, Jour. of Translational
 Medicine 12(1): e25 (2014.)*

US20150023924 A1

W02013078316 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(30) 우선권주장

62/315,453	2016년03월30일	미국(US)
62/338,315	2016년05월18일	미국(US)
62/348,781	2016년06월10일	미국(US)
62/349,572	2016년06월13일	미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

AAV 캡시드 및 계놈, 인간 인자 IX(FIX) 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동 가능하게 연결된 간 조직-특이적 발현이 부여된 발현 조절 요소, 및 폴리아데닐화 신호 서열을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터로서, 상기 계놈은 적어도 두 개의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역방위 말단 반복부(ITR)를 포함하고, 상기 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열은 SEQ ID NO: 10과 적어도 80%의 동일성을 가지며, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 야생형 뉴클레오티드 서열 대비 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 가지며, SEQ ID NO:10에 의해 인코딩된 동일한 인간 FIX 단백질을 인코딩하는, 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 벡터.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 계놈은 인트론을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 인트론은 상기 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 사이에 위치한, rAAV 벡터.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 인트론은 상기 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열 전에 위치한, rAAV 벡터.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 발현 조절 요소는 인핸서 및 프로모터를 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 벡터 계놈은, 5'에서 3' 순서로, 제1 AAV ITR, 상기 인핸서, 상기 프로모터, 상기 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오티드 서열, 상기 폴리아데닐화 신호 서열, 및 제2 AAV ITR을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 인핸서는 아포지질단백질 HCR-1 또는 HCR-2 인핸서인, rAAV 벡터.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 프로모터는 알파 1-안티트립신 유전자 프로모터인, rAAV 벡터.

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 폴리아데닐화 신호 서열은 bGH 유전자로부터인, rAAV 벡터.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 인핸서는 아포지질단백질 HCR-1 인핸서인, rAAV 벡터.

청구항 11

제6항에 있어서, 상기 AAV ITR은 AAV2 ITR인, rAAV 벡터.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 인헨서는 아포지질단백질 HCR-1 인헨서이고, 그리고 상기 프로모터는 알파 1-안티트립신 유전자 프로모터인, rAAV 벡터.

청구항 13

제12항에 있어서, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 사이에 위치한 인트론을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 14

제12항에 있어서, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 뉴클레오타이드 서열 전에 위치한 인트론을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 15

제1항에 있어서, 상기 게놈은 선형 단일-가닥 DNA인, rAAV 벡터.

청구항 16

제6항에 있어서, 상기 AAV 캡시드는:

(i) 혈청형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, 또는 AAV-2i8의 AAV 캡시드;

(ii) SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, 또는 SEQ ID NO: 9의 아미노산 서열로 구성된 VP1 단백질을 포함하는 AAV 캡시드;

(iii) SEQ ID NO: 1의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202 중 임의의 하나 이상에서 아미노산 치환을 가지는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 구성된 VP1 단백질을 포함하는 AAV 캡시드;

(iv) SEQ ID NO: 1에서 임의의 하나 이상의 리신 대신 아르기닌으로의 아미노산 치환을 가지는 SEQ ID NO: 1의 아미노산 서열로 구성된 VP1 단백질을 포함하는 AAV 캡시드

로 구성된 군으로부터 선택되는, rAAV 벡터.

청구항 17

중증 혈우병 B를 가지는 인간 대상체를 치료하는 방법에 사용하기 위한 제12항의 rAAV 벡터로서, 약학적 조성물로 상기 rAAV 벡터의 치료학적 유효량을 상기 대상체에게 투여하는 것을 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 치료는 혈우병 증상을 중증으로부터 중등증 또는 경증 혈우병 B의 것으로 감소시키기에 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 19

제17항에 있어서, 상기 rAAV 벡터의 상기 치료학적 유효량은 대상체의 체중 킬로그램 당 5×10^{11} 내지 5×10^{13} 의 벡터 게놈(vg/kg)의 범위의 투여량인, rAAV 벡터.

청구항 20

제19항에 있어서, 상기 치료는 적어도 12개월의 지속 기간 동안 적어도 30%의 혈장 FIX 활성을 달성하는데 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 21

제19항에 있어서, 상기 치료는 자연적 관절 출혈 또는 뇌 출혈의 평균적인 빈도를 적어도 90%로 감소시키는데 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 22

제19항에 있어서, 상기 치료는 적절한 지혈을 적어도 90%로 유지하기 위해 FIX 단백질 대체 요법의 평균 빈도를 감소시키는 데 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 23

제19항에 있어서, 상기 rAAV 벡터의 상기 치료학적 유효량은 1×10^{12} 내지 5×10^{13} vg/kg 대상체 체중 범위의 투여량이며, 그리고 상기 AAV 캡시드는 AAV5 캡시드인, rAAV 벡터.

청구항 24

제23항에 있어서, 상기 rAAV 벡터의 상기 치료학적 유효량은 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 9×10^{12} , 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 및 5×10^{13} vg/kg 대상체 체중으로 구성된 군으로부터 선택되는 투여량인, rAAV 벡터.

청구항 25

제24항에 있어서, 상기 rAAV 벡터의 상기 치료학적 유효량은 2×10^{13} vg/kg 대상체 체중의 투여량인, rAAV 벡터.

청구항 26

제23항에 있어서, 상기 벡터 계놈은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 핵산 서열 전에 위치한 인트론을 추가로 포함하는, rAAV 벡터.

청구항 27

제19항에 있어서, 상기 치료는 0.06 내지 1.50 IU/mL의 혈장 FIX 수준을 생산하는데 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 28

제25항에 있어서, 상기 치료는 0.06 내지 1.50 IU/mL의 혈장 FIX 수준을 생산하는데 효과적인, rAAV 벡터.

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

청구항 127

삭제

청구항 128

삭제

청구항 129

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 관련 출원

[0002] 본 특허 출원은 2015년 6월 23일 출원된 미국 특허 출원 제 62/183,599, 2016년 3월 30일 출원된 출원 번호 제 62/315,453호, 2016년 5월 18일 출원된 출원 번호 제 62/338,315호, 2016년 6월 10일 출원된 출원 번호 제 62/348,781호 및 2016년 6월 13일 출원된 출원 번호 제 62/349,572호의 이익을 청구하며, 이들 출원 모두는 그

전체가 분명히 본원에 참조로 포함된다.

배경 기술

[0003]

도입

[0004]

바람직한 유전자의 부재 또는 결함 (기능 상실) 또는 바람직하지 않거나 결함이 있는 유전자의 발현 (기능 획득)에 의해 초래되는 유전자 장애는 다양한 질병을 유발한다. 기능 상실 유전자 장애의 한 예는 혈우병으로서, 응고인자 VIII (FVIII, 혈우병 A) 또는 인자 IX(FIX, 혈우병 B)의 결핍에 의해 초래된 유전 출혈 장애이다. 기능 획득 유전자 장애의 한 예는 헌팅턴병으로서, 특히, 기저핵 및 대뇌 피질의 뉴론 내에서 축적되어 뉴론의 점진적 파괴를 초래하는 변이된 단백질을 인코딩하는 병리학적 "HTT" 유전자 (헌팅턴 단백질을 인코딩함)에 의해 초래되는 질병이다.

[0005]

현재 혈우병 치료는 출혈 발생시 요구에 따라 또는 예방적으로 재조합 응고 인자를 정맥 내 투여하는 것으로 구성된다. 그러나, 이러한 치료학적 접근법에는 반복적인 주입의 필요성, 치료 비용, 항-치료 인자 면역 반응의 발달 위험성, 및 잠재적으로 치명적인 출혈의 위험성과 같은 수개의 단점이 있다. 이러한 한계는 혈우병에 대한 유전자-기반 치료법의 개발을 촉발시켰다. 이를 위해, 혈우병은 유전자 전달에 기초한 요법에 이상적인데, 1) 정상인 1%를 넘는 수준이 이미 중증 내지 중등증의 표현형 변화를 발생시킬 수 있으며, 100%의 수준은 어떠한 부작용과도 관련되지 않기 때문에 치료 범위가 매우 광범위하며; 2) 치료학적 전이유전자의 조직 특이적 발현이 엄격히 요구되지 않으며; 3) 치료 효능의 중점을 측정하는데 상당한 경험이 존재하기 때문이다.

[0006]

최근에는, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터가 생체내에서 유전자 전달을 위한 최고의 안전성 및 효능 프로파일을 갖기 때문에 선택되는 유전자 전달 벡터로서 인식된다. 지금까지 분리된 AAV 혈청형 중, AAV2 및 AAV8은 중증의 혈우병 B에 감염된 인간의 간을 표적으로 하는데 사용되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007]

생체내에서 유전자 전달을 위한 최고의 안전성 및 효능 프로파일을 갖는 유전자 전달 벡터를 제공한다.

과제의 해결 수단

[0008]

개요

[0009]

본 발명은 핵산이 인자 IX (예를 들어, 인간 인자 IX)를 인코딩하는, 핵산 서열, 발현 벡터(예를 들어, 벡터 게놈) 및 플라스미드, 조성물 및 바이러스 벡터를 제공한다. 인자 IX를 인코딩하는 핵산은 비교 FIX 코딩 서열과 비교하여 CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된다. 특정 구체예에서, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산은 인간 인자 IX를 인코딩하는 야생형 또는 천연 서열 대비 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖는다.

[0010]

CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 인자 IX 예컨대, FIX를 인코딩하는 변형된 핵산은 벡터 예컨대, 바이러스 벡터 내에 포함될 수 있다. 대표적인 바이러스 벡터는 예를 들어, 기타 세포 유형 중 간의 간세포를 표적으로 하는 렌티- 및 파르보-바이러스 벡터(예를 들어, 아데노바이러스 또는 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터)를 포함한다. 핵산 서열 전달을 위한 벡터로서, AAV 벡터는 세포에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 추진한다. 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오타이드 예컨대, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산은 선택적으로 치료학적 수준으로 투여 후 발현될 수 있다.

[0011]

따라서, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산을 포함하는 벡터 게놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 재조합 AAV 벡터를 제공한다. 특정 구체예에서, 재조합 AAV 입자는 벡터 게놈을 캡시드화 또는 패키징한다. 본 발명의 재조합 AAV 입자는 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)을 포함하는 바이러스 벡터 게놈을 포함한다. 한 구체예에서, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산을 포함하는 벡터 게놈은 AAV 캡시드 또는 AAV 캡시드 변이체에 의해 캡시드화 또는 패키징된다.

[0012]

본 발명의 재조합 AAV 벡터에서, 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열은 전사되고 후속하여 단백질로 번역될 수 있다. 다양한 양태에서, 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열은 치료학적 단백질을 인코딩한다. 특정 양태에서, 단백질은 혈

액 응고 인자 (예를 들어, 인자 IX, 인자 XIII, 인자 X, 인자 VIII, 인자 VIIa, 또는 단백질 C)이다. 더욱 특정 양태에서, 벡터는 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산 (예를 들어, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)을 포함한다.

[0013] AAV 및 AAV 변이체 예컨대, 캡시드 변이체는 바람직한 또는 치료학적 이점을 제공하는 폴리뉴클레오타이드 및/또는 단백질을 전달하여, 다양한 질병을 치료할 수 있다. 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 및 이들의 변이체 및 AAV 캡시드 변이체 (예를 들어, 4-1)는 혈우병 A, B 등을 치료하기 위한 치료학적 유전자(예를 들어, 인자 IX)를 세포, 조직 및 기관에 전달하는데 유용한 벡터이다.

[0014] 본 발명에서, 벡터 계놈 (바이러스 또는 AAV)을 포함(캡슐화, 패키징)하는 재조합 바이러스 및 AAV 벡터는 시스템 또는 트랜스로 기능하는 추가적인 요소를 포함한다. 특정 구체예에서, 벡터 계놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 재조합 바이러스(예를 들어, AAV) 벡터는 또한 하기를 갖는다: 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)의 5' 또는 3' 말단에 측면인접한 하나 이상의 역방위 말단 반복부(ITR) 서열; 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열(예를 들어, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)의 전사를 추진하는 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터 또는 인핸서), 예컨대, 항시적 또는 조절가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소; 인트론 서열, 스테퍼 또는 필터 폴리뉴클레오타이드 서열; 및/또는 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열의 3'에 위치한 폴리-아데닐화 서열.

[0015] 따라서, 벡터는 인트론, 발현 조절 요소 (예를 들어, 예컨대, 간 발현을 위한, 항시적 또는 조절가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소 또는 프로모터 예를 들어, 인간 α_1 -항-트립신(hAAT) 프로모터 및/또는 아포지질단백질 E(ApoE) HCR-1 또는 HCR-2 인핸서), 하나 이상의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역방위 말단 반복부(ITR) (예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형의 ITR 서열) 및/또는 필터 폴리뉴클레오타이드 서열을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 첨가 요소의 위치는 다양할 수 있다. 특정 양태에서, 인트론은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 서열 내부에 있으며/거나 발현 조절 요소는 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 서열에 작동가능하게 연결되고/거나 AAV ITR(들)은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 서열의 5' 또는 3' 말단에 측면인접하고/거나 여기에서, 필터 폴리뉴클레오타이드 서열은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 서열의 5' 또는 3' 말단에 측면인접한다.

[0016] 다양한 구체예에서, CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX 핵산은 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연 또는 야생형 서열보다 1-5개 더 적은, 5-10개 더 적은, 10-15개 더 적은, 15-20개 더 적은, 20-25개 더 적은, 25-30개 더 적은, 30-40개 더 적은, 40-55개 더 적은, 55-75개 더 적은, 75-100개 더 적은, 100-150개 더 적은, 150-200개 더 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 특정 양태에서, 본원에 제시된 변형된 FIX 핵산은 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖지 않는 인간 인자 IX를 인코딩하는 야생형 또는 천연 서열보다 높은 수준으로 또는 이와 유사하게 발현되는 인간 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0017] 추가의 구체예에서, 인트론, 발현 조절 요소 (예를 들어, 예컨대, 간 발현을 위한, 항시적 또는 조절가능한 조절 요소, 또는 조직-특이적 발현 조절 요소 또는 프로모터 예를 들어, 인간 α_1 -항-트립신(hAAT) 프로모터 및/또는 아포지질단백질 E(ApoE) HCR-1 또는 HCR-2 인핸서), 하나 이상의 아데노-관련 바이러스(AAV) 역방위 말단 반복부(ITR) (예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형의 ITR 서열) 및/또는 필터 폴리뉴클레오타이드 서열은 대응되는 천연 또는 야생형 발현 조절 요소, 아데노-관련 바이러스(AAV) 역방위 말단 반복부(ITR) 및/또는 필터 폴리뉴클레오타이드 서열 대비 CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수가 감소되도록 변형될 수 있다. 특정 양태에서, 발현 조절 요소, 아데노-관련 바이러스(AAV) 역방향 말단 반복부(ITR) 및/또는 필터 폴리뉴클레오타이드 서열은 천연 또는 야생형 상대 서열 보다 1-5개 더 적은, 5-10개 더 적은, 10-15개 더 적은, 15-20개 더 적은, 20-25개 더 적은, 25-30개 더 적은, 30-40개 더 적은, 40-55개 더 적은, 55-75개 더 적은, 75-100개 더 적은, 100-150개 더 적은, 150-200개 더 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖는다.

[0018] 예시적인 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 임의의 것의 AAV 캡시드 서열, 또는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 캡시드 변이체를 포함한다. 본 발명의 재조합 AAV 입자는 또한, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 및 이의 변이체를 포함한다. 특정 캡시드 변이체는 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9,

AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 캡시드 변이체, 예컨대, 아미노산 치환, 결실 및/또는 삽입/추가를 갖는 캡시드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 치환은 Rh74 VP1 캡시드 서열(SEQ ID NO:1), 예를 들어, 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서 이루어진다. 더욱 특정 양태에서, 치환된 잔기는 Rh74 VP1 캡시드 서열의 아미노산 위치 195, 199, 201 또는 202번 중 어느 하나에서 A, V, P 또는 N 아미노산에 상응한다. 추가의 특정 양태에서, 캡시드 서열은 Rh74 VP1 캡시드 서열의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기를 갖는다. 추가의 특정 양태에서, 캡시드 서열은 하기 중 임의의 2개, 3개 또는 4개 모두를 갖는다: Rh74 VP1 캡시드 서열의 아미노산 위치 195번에서 A 잔기; 아미노산 위치 199번에서 V 잔기, 아미노산 위치 201번에서 P 잔기, 또는 아미노산 위치 202번에서 N 잔기.

[0019] 더욱 특정 양태에서, 캡시드 변이체는 SEQ ID NO:4-9 중 임의의 서열을 포함한다. 추가의 구체예에서, AAV 벡터는 임의의 AAV 혈청형 중 임의의 VP1, VP2 및/또는 VP3와 90% 또는 그 초과 서열 동일성을 갖는 AAV VP1, VP2 및/또는 VP3 서열을 갖는 캡시드 서열을 갖는다. 특정 양태에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 VP1, VP2 및/또는 VP3 서열과 90% 또는 그 초과 동일성을 갖는 VP1, VP2 및/또는 VP3 캡시드 서열을 갖는 캡시드 서열을 갖는다. 더욱 특정 양태에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 AAV 혈청형 중 임의의 혈청형으로부터 선택된 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 서열을 갖는 캡시드 서열을 갖는다.

[0020] 추가의 구체예에서, 재조합 벡터 게놈은 CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드의 수를 감소시키도록 변형된 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산 및 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 양태에서, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산은 약 4.7kb 보다 짧은 길이를 갖는다. 추가의 특정 양태에서, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산은 4.7kb 미만의 길이를 가지며, 하나 이상의 AAV ITR에 의해 측면인접하거나 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 내부에 위치한다. 추가의 특정 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산과 조합될 경우 인자 IX 인코딩 핵산 서열 및 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열의 합친 총 길이가 약 3.0-5.5kb, 또는 약 4.0-5.0kb, 또는 약 4.3kb - 4.8kb가 되는 길이를 갖는다.

[0021] 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 벡터의 기능 또는 활성을 방해하지 않도록 임의의 요망되는 위치에 벡터 서열 내에 위치할 수 있다. 한 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 감소된 수의 CpG(시토신-구아닌) 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX 인코딩 핵산 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR (예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 ITR, 및 이들의 변이체) 사이에 위치한다. 또 다른 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX 인코딩 핵산 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR 내부에 위치한다. 추가의 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX 인코딩 핵산 서열의 각 5' 및/또는 3' 말단에 측면인접한 5' 및/또는 3' ITR에 인접하게 위치한다. 추가의 양태에서, 예를 들어, 게놈 핵산 내부의 인트론과 유사한 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산 내부에 위치한다.

[0022] 따라서, 다양한 구체예에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 AAV ITR 서열에 인접하게 위치하거나; 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 내부에 위치하거나; 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 외부에 위치하거나; 2개의 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열로서, 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 내부에 위치한 제1 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열, 및 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 외부에 위치한 제2 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열이 존재한다.

[0023] 더욱 특정 양태에서, 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 내부에 위치할 때 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산과 조합될 경우, 이중성 폴리뉴클레오타이드 서열 및 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열의 합친 총 길이가 약 3.0kb-5.5kb, 약 4.0-5.0kb, 또는 약 4.3kb-4.8kb가 되는 길이를 갖는다. 기타 더욱 특정 양태에서, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 2개의 아데노-관련 바이러스(AAV) ITR 서열 외부에 위치할 때 4.7kb 초과, 약 5.0-10.0kb, 또는 약 6.0-8.0kb의 길이를 갖는다.

[0024] 전형적으로, 필러 또는 스터퍼 폴리뉴클레오타이드 서열은 불활성 또는 무해성이며, 기능 또는 활성을 갖지 않는다

다. 다양한 특정 양태에서, 필터 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 박테리아 폴리뉴클레오티드 서열이 아니며, 필터 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 단백질 또는 펩티드를 인코딩하는 서열이 아니며, 필터 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산), AAV 역방위 말단 반복부(ITR) 서열, 발현 조절 요소, 복제 기점, 선택 마커 또는 폴리-아데닐화(폴리-A) 신호 서열 중 임의의 것과 구별되는 서열이다.

[0025] 다양한 추가적인 특정 양태에서, 필터 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)과 관련되거나 관련되지 않은 인트론 서열이다. 특정 양태에서, 인트론 서열은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산) 내부에 위치한다. 기타 특정 양태에서, 인트론 서열은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)과 관련되는데, 인트론이 게놈 DNA, 예컨대, 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)에 의해 또한 인코딩된 단백질을 인코딩하는 게놈 DNA에 존재하기 때문이다.

[0026] 본 발명의 제조합 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 제조합 AAV 벡터 게놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 변이체 예컨대, 캡시드 변이체(예를 들어, 4-1) 입자가 세포 내부에 포함될 수 있다. 이러한 구체예에서, 세포는 바이러스(AAV) 입자를 생성하거나 용해되어 바이러스(AAV) 입자를 생성할 수 있는 패키징 세포, 또는 이중성 폴리뉴클레오티드 서열 발현이 요망되는 표적 세포를 포함할 수 있다. 따라서, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 변형된 인자 IX 인코딩 핵산, 벡터 및 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 변이체(예를 들어, 예컨대, 4-1) 입자를 포함하는 세포가 제공된다.

[0027] 추가의 구체예에서, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 핵산(여기에서 상기 핵산은 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연 서열 대비 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오티드를 가짐), 또는 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 핵산 서열을 포함하는 발현 벡터 또는 플라스미드(여기에서, 상기 핵산은 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연 서열 대비 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오티드를 가짐)가 조성물에 포함된다. 특정 양태에서, 이러한 핵산 서열은 약학적 조성물에 포함될 수 있다. 따라서, 본 발명의 제조합 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 벡터 게놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 변이체(예를 들어, 4-1) 입자가 약학적 조성물 내부에 포함될 수 있다. 이러한 조성물은 제조합 벡터(예를 들어, AAV) 및 바이러스 입자 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 및 벡터(예를 들어, AAV) 게놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 변이체(예를 들어, 4-1)의 대상체로의 투여에 유용하다.

[0028] 본 발명의 제조합 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 벡터 게놈을 포함(캡시드화, 패키징)하는 변이체(예를 들어, 4-1) 입자가 다양한 방법 및 용도에 사용될 수 있다. 따라서, 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)을 유기체 또는 세포 예컨대, 포유동물 또는 포유동물의 세포 내로 전달하거나 이동시키기 위한 방법 및 용도가 제공된다.

[0029] 한 구체예에서, 방법 또는 용도는 포유동물 또는 포유동물의 세포 내로 이중성 폴리뉴클레오티드 서열을 전달하거나 이동시키기에 적합한 조건하에 포유동물 또는 포유동물의 세포에 벡터 게놈(캡시드화, 패키징) 중의 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산) 입자를 포함하는 렌티- 또는 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 또는 변이체를 투여하는 것을 포함한다. 한 양태에서, 방법 또는 용도는 이중성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)를 포유동물 및/또는 세포 내로 전달/이동시킨다. 또 다른 양태에서, 방법은 이중성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)의 세포 내로의 전달/이동을 허용하고, 후속 전사에 의해 전사물을 형성시키고 후속 번역하여 유전자 생성물(예를 들어, 인자 IX)을 형성시킨다.

[0030] 추가의 구체예에서, 단백질 발현 또는 기능이 결핍되거나 이를 필요로 하는 대상체(예를 들어, 포유 동물)을 치료하는 방법 또는 용도는 렌티- 또는 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4,

AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 또는 변이체, 복수의 이러한 바이러스(예를 들어, AAV) 입자, 또는 렌티- 또는 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 또는 변이체, 입자 또는 복수의 이러한 바이러스(예를 들어, AAV) 입자의 약학적 조성물을 제공하고; 바이러스 입자, 복수의 바이러스 입자, 또는 바이러스 입자 또는 복수의 바이러스 입자의 약학적 조성물을 대상체(예를 들어, 포유동물)에 투여하는 것을 포함한다. 이렇게 투여된 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)은 후속하여 대상체(예를 들어, 포유동물)에서 발현될 수 있다.

[0031] 투여 또는 전달을 위한 방법 및 용도는 대상체에 적합한 임의의 방식을 포함한다. 특정 구체예에서, 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 변이체, 또는 복수의 이러한 바이러스 입자는 비경구적으로 예컨대, 정맥내, 동맥내, 근육내, 피하, 또는 카테터를 통해 투여 또는 전달된다.

[0032] 대상체는 포유동물 예컨대, 인간 및 비-인간(예를 들어, 영장류)를 포함한다. 특정 구체예에서, 대상체는 이중성 폴리뉴클레오티드 서열의 발현으로부터 유익을 얻거나 이의 발현을 필요로 한다. 더욱 특정 구체예에서, 대상체 예를 들어, 감소된 양의 인자 IX를 발현하는 대상체 예컨대, 혈우병 B를 갖는 대상체는 인자 IX 발현 또는 기능으로부터 유익을 얻을 것이다.

[0033] 본 발명에 따르면, 벡터 계통을 포함(캡시드화, 패키징)하는 재조합 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 및 변이체를 생성하는 방법이 제공된다. 한 구체예에서, 방법은 패키징 세포 내로 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드를 도입시켜 생산성 바이러스 감염을 유도하고; 재조합 바이러스 입자를 생성하기 위한 조건하에서 패키징 세포를 배양하는 것을 포함한다. 또 다른 구체예에서, 재조합 바이러스 벡터가 오염 핵산을 포함하는, 감소된 양의 재조합 바이러스 입자를 갖는 재조합 바이러스 또는 AAV 입자를 생성하는 방법은 패키징 세포 내로 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드를 도입시키고; 재조합 바이러스 입자를 생성하기 위한 조건하에서 패키징 세포를 배양시키는 것을 포함하며, 생성된 재조합 바이러스 입자는 재조합 바이러스 벡터에 필러 또는 스퍼터 폴리뉴클레오티드 서열이 부재하는 조건하에 생성된 오염 핵산을 함유하는 바이러스 입자 수와 비교하여 오염 핵산을 함유하는 벡터 계통을 갖는 감소된 수의 바이러스 입자를 갖는다. 특정 양태에서, 오염 핵산은 박테리아 핵산; 또는 이중성 폴리뉴클레오티드 서열, 또는 ITR, 프로모터, 인핸서, 복제 기점, 폴리-A 서열, 또는 선택 마커 이외의 서열이다.

[0034] 패키징 세포는 포유동물 세포를 포함한다. 특정 구체예에서, 패키징 세포는 (이중성 폴리뉴클레오티드) 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산), 발현 벡터(예를 들어, 벡터 계통)를 바이러스 입자(예를 들어, AAV 입자) 내로 패키징시키는 헬퍼(예를 들어, AAV) 기능을 포함한다. 특정 양태에서, 패키징 세포는 AAV Rep 및/또는 Cap 단백질(예를 들어, Rep78 또는/및 Rep68 단백질을 제공하고/거나; 패키징 세포는 Rep 및/또는 Cap 단백질 서열(들)을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드(들)로 안정하게 또는 일시적으로 형질감염되고/거나; 패키징 세포는 Rep78 및/또는 Rep68 단백질 폴리뉴클레오티드 인코딩 서열(들)로 안정하게 또는 일시적으로 형질감염된다.

[0035] 본 발명에서, 재조합 렌티- 또는 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터, 및 동반된 시스 (예를 들어, 발현 조절 요소, ITR, 폴리A) 또는 트랜스(예를 들어, 캡시드 단백질, 패키징 기능 예컨대, Rep/Cap 단백질) 요소는 임의의 유기체, 종, 균주 또는 혈청형을 기반으로 할 수 있다. 본 발명의 재조합 바이러스(예를 들어, AAV) 입자는 전형적으로, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 및 이의 변이체를 기반으로 하나, 또한 다양한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라를 포함한다. 대표적인 AAV 혈청형은 비제한적으로, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8 혈청형을 포함한다. 따라서, 벡터 계통을 포함하는 본 발명의 재조합 바이러스(예를 들어, AAV) 입자는 상이한 혈청형, 혈청형의 혼합물, 또는 상이한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라로부터의 캡시드 단백질 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 혈청형의 VP1, VP2 또는 VP3 캡시드 단백질을 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 재조합 렌티- 및 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8, 서열, 플라스미드, 벡터 계통은 어느 하나의 혈청형, 혈청형의 혼합물, 또는 상이한 혈청형의 하이브리드 또는 키메라로부터의 요소를 포함할 수 있다. 다양한 구체예에서, 재조합 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및/또는 AAV-2i8 혈청형, 또는 상기 AAV 혈청형 중의 임의의 혈청형의 혼합물, 하이브리드 또는 키메라로부터 유래된 ITR, Cap, Rep, 및/

또는 서열을 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0036]

- 도 1은 Rh74 VP1의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 2은 Rh74 VP2의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 3은 Rh74 VP3의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 4는 캡시드 변이체 4-1 VP1 단백질의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 5는 캡시드 변이체 15-1의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 6은 캡시드 변이체 15-2의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 7은 캡시드 변이체 15-3/15-5의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 8은 캡시드 변이체 15-4의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 9는 캡시드 변이체 15-6의 아미노산 서열을 보여준다.
- 도 10은 FIX39의 핵산 서열을 보여준다.
- 도 11은 FIX19의 핵산 서열을 보여준다.
- 도 12a는 FIX39 플라스미드의 서열을 보여준다.
- 도 12b는 pHFIX39v2 플라스미드의 서열을 보여준다.
- 도 13은 FIX39 플라스미드의 맵을 보여준다.
- 도 14는 인트론 A 핵산 서열을 보여준다.
- 도 15는 FIX39 + 인트론 A의 핵산 서열을 보여준다.
- 도 16은 시험관 내 환경에서 분석한 AAV-4-1 캡시드 변이체(SEQ ID NO:4)의 형질도입 효율을 보여준다.
- 도 17은 1×10^{11} 또는 1×10^{12} vg/kg의 AAV-FIX39-Padua(정사각형/원형) 및 AAV-FIX19-Padua (마름모/육각형)로 생후 8주째에 정맥 내 주사 후 야생형 마우스의 혈장에서의 hFIX 수준을 보여준다. 인간 FIX 혈장 수준은 ELISA에 의해 검정하였고, 연구 과정 동안 동일한 군의 동물에 대해 연속 출혈에 의해 얻어진 다중 측정치를 나타낸다 (각 집단에서 $n = 5$ 마우스). 오차 막대는 평균의 표준 오차를 의미한다.
- 도 18은 5 μ g의 pFIX19-Padua 또는 pFIX39-Padua 플라스미드의 유체역학적 꼬리 정맥 주입 후 24시간에 마우스 혈장에서 인간 FIX의 순환 수준을 보여준다. $P=0.3337$.
- 도 19는 본 발명에 따른 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 4명의 인간 혈우병 B 환자, 및 후속 평가 기간(각각, 183, 102, 69 및 50일)에 걸친 FIX 활성 (%)의 데이터 요약을 보여준다.
- 도 20a는 183일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 제1의 인간 혈우병 B 환자의 FIX 활성(%) 데이터를 보여준다.
- 도 20b는 183일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 제1의 인간 혈우병 B 환자의 간 기능 검사(ALT, AST 및 LDH 효소) 데이터를 보여준다. 플롯팅된 LDH 값(LDH¹)을 ALT 및 AST 값과 표시하기 위해 10으로 나누었다.
- 도 21a는 102일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 제2의 인간 혈우병 B 환자의 FIX 활성(%) 데이터를 보여준다.
- 도 21b는 102일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 제2의 인간 혈우병 B 환자의 간 기능 검사(ALT, AST 및 LDH 효소) 데이터를 보여준다. 플롯팅된 LDH 값(LDH¹)을 ALT 및 AST 값과 표시하기 위해 10으로 나누었다.
- 도 22a는 69일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 벡터가 단일 주입으로 투여된 제3의 인간

혈우병 B 환자의 FIX 활성(%) 데이터를 보여준다.

도 22b는 69일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 백터가 단일 주입으로 투여된 제3의 인간 혈우병 B 환자의 간 기능 검사(ALT, AST 및 LDH 효소) 데이터를 보여준다. 플롯팅된 LDH 값(LDH¹)을 ALT 및 AST 값과 표시하기 위해 10으로 나누었다.

도 23a는 50일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 백터가 단일 주입으로 투여된 제4의 인간 혈우병 B 환자의 FIX 활성(%) 데이터를 보여준다.

도 23b는 50일 평가 기간에 걸쳐 AAV-FIX Padua 변이체(FIX39) 보유 백터가 단일 주입으로 투여된 제4의 인간 혈우병 B 환자의 간 기능 검사(ALT, AST 및 LDH 효소) 데이터를 보여준다. 플롯팅된 LDH 값(LDH¹)을 ALT 및 AST 값과 표시하기 위해 10으로 나누었다.

도 24a는 인간 대상체에서 AAV-FIX39-Padua의 낮은 면역원성 프로파일을 보여준다.

도 24b는 인간 대상체에서 AAV-FIX39-Padua 및 AAV8-FIX19의 유사한 면역원성 프로파일을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

상세한 설명

본 발명은 적어도 부분적으로, 단백질 예컨대, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 변형된 핵산 서열의 개발을 기반으로 한다. 다양한 구체예에서, 변형된 핵산은 인자 IX를 인코딩하는 참조 핵산 서열 예컨대, 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열 대비 감소된 수의 CpG(시토신-구아닌) 디-뉴클레오타이드를 갖는다. 추가의 구체예에서, 참조 인자 IX 인코딩 핵산(예를 들어, 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연 서열) 대비 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖는 그러한 변형된 핵산이 발현 백터(예를 들어, 백터 게놈) 또는 플라스미드 내부에 포함된다.

본 발명은 또한, 조성물 예컨대, 인간 FIX를 인코딩하는 변형된 핵산 서열을 포함하는 조성물을 포함한다. 이러한 조성물에서, 변형된 핵산은 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열과 같은 참조 서열과 비교하여 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖는다. 조성물은 또한, 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖는 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 그러한 변형된 핵산 서열을 포함하는 발현 백터(예를 들어, 바이러스 백터/백터 게놈) 및 플라스미드를 포함한다.

특정 양태에서, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 핵산 서열은 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연 서열보다 1-5개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 5-10개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 10-15개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 15-20개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 20-25개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 25-30개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 30-40개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 인간 인자 IX를 인코딩하는 천연(야생형) 서열보다 40-55개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 모든 CpG 디-뉴클레오타이드가 완전하게 제거된다.

감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산은 하나 이상의 추가의 시스 요소를 추가로 포함할 수 있다. 대표적인 시스 요소는 비제한적으로, 발현 조절 요소, 인트론, ITR, 정지 코돈, 폴리A 서열, 및/또는 필러 폴리뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 특정 구체예에서, 이러한 시스-작용 요소는 또한 변형될 수 있다. 예를 들어, 시스 작용 요소 예컨대, 발현 조절 요소, 인트론, ITR, 폴리-A 서열, 및/또는 필러 폴리뉴클레오타이드 서열은 감소된 수의 CpG 디-뉴클레오타이드를 가질 수 있다. 한 양태에서, 하나 이상의 시스 작용 요소 예컨대, 발현 조절 요소, 인트론, ITR, 폴리-A 서열, 및/또는 필러 폴리뉴클레오타이드 서열에는 CpG 디-뉴클레오타이드가 존재하지 않는다. 특정 양태에서, 하나 이상의 시스 작용 요소 예컨대, 발현 조절 요소, 인트론, ITR, 폴리-A 서열 및/또는 필러 폴리뉴클레오타이드 서열은 기준 시스-작용 요소보다 1 내지 5개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 5-10개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 10-15개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 15-20개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 20-25개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 25-30개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스-작용 요소보다 30-40개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 기준 시스 요소보다 40-55개 적은 CpG 디-뉴클레오타이드를 갖거나; 임의의 CpG 디-뉴클레

오티드가 전혀 없다.

[0042] 본 발명은 또한 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 변형된 핵산 서열을 포함하는 바이러스 벡터를 포함한다. 특정 구체예에서, 벡터는 렌티- 또는 파르보-바이러스 벡터 예컨대, 아데노-바이러스 벡터를 포함한다. 더욱 특정 구체예에서, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 변형된 핵산 서열은 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터에 포함된다.

[0043] 추가의 특정 구체예에서, 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8 뿐만 아니라 이의 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체, 예컨대, 아미노산 삽입, 첨가 및 치환)로부터 유래된 캡시드를 포함한다. 당업자가 인식할 수 있는 바와 같이, AAV 캡시드 VP1 단백질 및 본질적으로 VP1의 아미노-말단 절두부인 VP2 및 VP3로 불리는 2개의 더 짧은 단백질을 전형적으로 포함한다. 캡시드 및 당업자에게 공지된 다른 인자에 따라, 3개의 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3는 각각 대략 1:1:10 비율로 캡시드에 전형적으로 존재하며, 그러나, 특히 VP3의 이러한 비율은 현저하게 변화될 수 있으며 어떠한 면에서도 제한하는 것으로 간주되어서는 안된다.

[0044] AAV 변이체는 AAV-Rh74 변이체, 예를 들어, 비제한적으로 표 1에 기술된 변이체 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6을 포함하는 Rh74 VP1 캡시드 서열(SEQ ID NO:1; 도 1)의 AAV 캡시드 변이체를 포함한다. Rh74 VP2 및 Rh74 VP3 아미노산 서열은 각각 SEQ ID NO: 2(도 2) 및 SEQ ID NO: 3(도 3)에 제공된다.

[0045] 표 1. AAV 캡시드 변이체

변이체	Rh74 VP1 캡시드에서 아미노산 치환 및 지시된 위치	서열 식별자	도
4-1	G195A-L199V-S201P-G202N	SEQ ID NO:4	도 4
15-1	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/169/547)R	SEQ ID NO:5	도 5
15-2	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/169)R	SEQ ID NO:6	도 6
15-3/15-5	G195A-L199V-S201P-G202NK (137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/547) R (변이체 15-3) G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/163)R (변이체 15-5)	SEQ ID NO:7	도 7
15-4	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/163/668)R	SEQ ID NO:8	도 8
15-6	G195A-L199V-S201P-G202N K(137/259/333/530/552/569/38/51/77/547/688)R	SEQ ID NO:9	도 9

[0046]

[0047] 4-1 변이체(SEQ ID NO: 4)는 VP1 캡시드의 아미노산 위치 195, 199, 201 및 202번 각각에서 알라닌, 발린, 프롤린 및 아스파라긴 치환을 가졌다. 밑줄 치고 굵게 표시한 치환된 잔기 a, v, p 및 n을 갖는 4-1 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열은 도 4(SEQ ID NO:4)에 나타내었다. 변이체 4-1에 있어서, VP2 서열은 SEQ ID NO: 27로 구성되고, VP3 서열은 SEQ ID NO: 3으로 각각 구성된다.

[0048] 15-1, 15-2, 15-3, 15-4, 1-5 및 15-6 변이체는 또한, VP1 캡시드의 아미노산 위치 195, 199, 201 및 202번 각각에서 알라닌, 발린, 프롤린 및 아스파라긴 치환을 가졌다. 또한, 이들 변이체는 다양한 위치에서 리신의 다중 아르기닌 치환을 가졌다. 15-1 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO: 5)은 도 5에 나타내고; 15-2 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO: 6)은 도 6에 나타내고; 15-3/15-5 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO: 7)은 도 7에 나타내고; 15-4 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO: 8)은 도 8에 나타내고; 15-6 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO: 9)은 도 9에 나타낸다. 본원에 사용될 수 있는 캡시드의 예는 비제한적으로, 미국 특허 공개 번호 2015/0023924에 기술된 것들을 포함한다.

[0049] 따라서, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오타이드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 변형된 핵산 서열을 포함하는 벡터 계통을 포함(캡시드화 또는 패키징)하는 렌티- 및 파르보-바이러스 벡터 예컨대, AAV 벡터 및 바이러스 벡터 변이체 예컨대, AAV 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체 예컨대, 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6)가 제공된다.

[0050] 예시적인 연구에서, AAV-Rh74 매개된 유전자 전달/이동은 수개의 다른 혈청형보다 현저하게 더 높은 단백질 발현 수준을 유도하였다. 특히, AAV-Rh74 벡터 및 캡시드 변이체(예를 들어, 4-1)는 혈우병 B 개 및/또는 마우스 및/또는 마카크에서 간 형질도입을 위한 최고 기준과 적어도 유사한 효율로 AAV8을 간으로 전달하기 위한 유전

자를 표적으로 한다.

- [0051] 본원에 제시된 바와 같이, AAV 혈청형 및 변이체를 포함하는 렌티- 및 파르보-바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터는 폴리뉴클레오티드 서열을 생체외, 시험관내 및 생체내 세포로 전달하기 위한 수단을 제공하며, 이는 세포가 인코딩된 단백질을 발현하도록 단백질을 인코딩할 수 있다. 예를 들어, 재조합 AAV 벡터는 요망되는 단백질 또는 펩티드 (예를 들어, 인자 IX)를 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 따라서, 대상체(예를 들어, 포유 동물)로의 벡터 전달 또는 투여는 대상체에 인코딩된 단백질 및 펩티드를 제공한다. 따라서, AAV 혈청형 및 변이체 예컨대, 캡시드 변이체(예를 들어, 4-1)을 포함하는 바이러스 벡터 예컨대, 렌티- 및 파르보-바이러스 벡터가 발현을 위한 및 선택적으로 다양한 질병을 치료하기 위한 이중성 폴리뉴클레오티드를 전달/이동시키는데 사용될 수 있다.
- [0052] 특정 구체예에서, 재조합 벡터(예를 들어, AAV)는 파르보바이러스 벡터이다. 파르보바이러스는 단일-가닥 DNA 게놈을 갖는 작은 바이러스이다. "아데노-관련 바이러스"(AAV)는 파르보바이러스 과에 속한다.
- [0053] AAV를 포함하는 파르보바이러스는 유전자 요법 벡터로서 유용한 바이러스인데, 이들은 세포를 침투하여 핵산/유전자 물질을 도입시켜 핵산/유전자 물질이 세포 내에 안정적으로 유지될 수 있게 하기 때문이다. 또한, 이들 바이러스는 핵산/유전자 물질을 특정 부위 예를 들어, 19번 염색체의 특정 부위 내로 도입시킬 수 있다. AAV는 인간에서 병원성 질환과 관련이 없기 때문에, AAV 벡터는 실질적인 AAV 발병기전 또는 질병을 초래하지 않으면서 인간 환자에 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 치료학적 단백질 및 제제)을 전달할 수 있다.
- [0054] 예를 들어, AAV1-AAV11, Rh74 또는 Rh10 (예를 들어, 임의의 AAV1-AAV11, Rh74 또는 Rh10 혈청형 중 임의의 혈청형의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열과 구별됨)를 포함하는 AAV 및 AAV 변이체 (예를 들어, 캡시드 변이체 예컨대, 4-1) 혈청형 (예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)은 다른 AAV 혈청형과 구별될 수 있거나 없다.
- [0055] 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "혈청형"은 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV를 지칭하는데 사용되는 구별법이다. 혈청학적 차별성은 다른 AAV와 비교하여 하나의 AAV에 대한 항체 간의 교차 반응성의 결여에 기초하여 결정된다. 이러한 교차-반응성 차이는 일반적으로 캡시드 단백질 서열/항원 결정인자의 차이(예를 들어, AAV 혈청형의 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열 차이로 인한)로 인한 것이다. 캡시드 변이체를 포함하는 AAV 변이체가 기준 AAV 또는 기타 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되지 않을 수 있는 가능성에도 불구하고, 이들은 기준 또는 기타 AAV 혈청형과 비교하여 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기에 의해 구별된다.
- [0056] 전통적인 정의하에, 혈청형은 관심 바이러스가 중화 활성을 위한 모든 존재하는 특성규명된 혈청형에 대해 특이적인 혈청에 대해 평가되었으며, 어떠한 항체도 관심 바이러스를 중화시키는 것으로 밝혀지지 않았음을 의미한다. 보다 자연적으로 발생하는 바이러스 분리군이 발견되고/거나 캡시드 돌연변이체가 발생하기 때문에, 현재 존재하는 임의의 혈청형과 혈청학적으로 차이가 있을 수 있거나 없다. 따라서, 새로운 바이러스 (예를 들어, AAV)가 혈청학적 차이를 갖지 않는 경우, 이러한 새로운 바이러스 (예를 들어, AAV)는 상응하는 혈청형의 하위군 또는 변이체일 것이다. 그러나, 많은 경우에, 중화 활성에 대한 혈청 검사는 이들이 혈청형의 전통적인 정의에 따라 다른 혈청형인지의 여부를 결정하기 위해 캡시드 서열 변형을 갖는 돌연변이체 바이러스에서 수행되어야 한다. 따라서, 편의를 위해 그리고, 반복을 피하기 위해 용어 "혈청형"은 광범위하게는 혈청학적으로 구별되는 바이러스 (예를 들어, AAV)는 물론 주어진 혈청형의 하위군 또는 변이체에 속할 수 있는 혈청학적으로 구별되지 않는 바이러스 (예를 들어, AAV) 둘 모두를 지칭한다.
- [0057] 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드, 벡터(예를 들어, AAV) 게놈은 물론 이의 방법 및 용도는 임의의 바이러스 군주 또는 혈청형을 포함한다. 비제한적 예로서, 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드 또는 벡터(예를 들어, AAV) 게놈은 예를 들어, AAV-1, -2, -3, -4, -5, -6, -7, -8, -9, -10, -11, -rh74, -rh10 또는 AAV-2i8과 같은 임의의 AAV 게놈을 기반으로 할 수 있다. 이러한 벡터는 동일한 군주 또는 혈청형 (또는 하위군 또는 변이체)를 기반으로 할 수 있거나, 서로 상이할 수 있다. 비제한적 예로서, 하나의 혈청형 게놈을 기반으로 하는 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드 또는 벡터(예를 들어, AAV) 게놈은 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상과 동일할 수 있다. 또한, 재조합 벡터(예를 들어, AAV) 플라스미드 또는 벡터(예를 들어, AAV) 게놈은 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상과 구별되는 AAV(예를 들어, AAV2) 혈청형 게놈을 기반으로 할 수 있으며, 이러한 경우, 3개의 캡시드 단백질 중 적어도 하나는 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 또는 변이체 예컨대, AAV-Rh74 변이체 (예를 들어, 캡시드 변이체 예컨대, 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6)일 수 있다.

- [0058] 따라서, AAV 벡터는 특정 혈청형에 대한 유전자/단백질 서열 특성과 동일한 유전자/단백질 서열을 포함한다. 본원에서 사용되는 "AAV1과 관련된 AAV 벡터"는 AAV1을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. 유사하게, "AAV8과 관련된 AAV 벡터"는 AAV8을 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. "AAV-Rh74와 관련된 AAV 벡터"는 AAV-Rh74를 포함하는 하나 이상의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열과 실질적인 서열 동일성을 갖는 하나 이상의 AAV 단백질(예를 들어, VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)을 나타낸다. (예를 들어, 도 1-3의 VP1, VP2, VP3 참조). 따라서, 또 다른 혈청형, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8과 관련된 상기 AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 및 AAV-2i8로부터의 하나 이상의 구별되는 서열을 가지나, 하나 이상의 유전자 및/또는 단백질과 실질적인 서열 동일성을 나타낼 수 있고/있거나 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8의 하나 이상의 기능성 특징(예를 들어, 세포/조직 향성)을 가질 수 있다. 예시적인 비제한적 AAV-Rh74 및 관련된 AAV 변이체 예컨대, AAV-Rh74 또는 관련된 AAV 예컨대, AAV-Rh74 변이체(예를 들어, 캡시드 변이체 예컨대, 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6) 서열은 본원 예를 들어, 도 1-9에 제시된 VP1, VP2, 및/또는 VP3을 포함한다.
- [0059] 다양한 예시적인 구체예에서, 참조 혈청형과 관련된 AAV 벡터는 하나 이상의 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8(예를 들어, 도 1-9에 제시된 AAV-Rh74 VP1, VP2, 및/또는 VP3 서열)과 적어도 80% 또는 그 초과 (예를 들어, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 등)로 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성되는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이들의 하위서열을 갖는다.
- [0060] 본 발명의 방법 및 용도는 참조 AAV 혈청형, 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, 또는 AAV-2i8 예를 들어, AAV-Rh74 유전자 또는 단백질 서열(예를 들어, 도 1-9에 제시된 VP1, VP2 및/또는 VP3 서열)과 100% 미만의 서열 동일성을 나타내나, 공지된 AAV 유전자 또는 단백질, 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8, 유전자 또는 단백질 등으로부터 구별되고 동일하지 않은 AAV 서열(폴리펩티드 및 뉴클레오티드), AAV-Rh74 서열(폴리펩티드 및 뉴클레오티드) 및 이의 하위서열을 포함한다. 한 구체예에서, AAV 폴리펩티드 또는 이의 하위서열은 임의의 참조 AAV 서열 또는 이의 하위서열, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8(예를 들어, 도 1-9에 제시된 VP1, VP2 및/또는 VP3 서열)과 적어도 80% 또는 그 초과로 동일한, 예를 들어, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 등, 즉, 100% 이하 동일한 서열을 포함하거나 이로 구성된다. 특정 양태에서, AAV 변이체는 4개 아미노산 치환 중 1, 2, 3 또는 4개 (예를 들어, 캡시드 변이체 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6)를 갖는다.
- [0061] AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 및 변이체, 관련 하이브리드 및 키메라 서열을 포함하는 재조합 벡터(예를 들어, AAV)는 당업자에게 공지된 재조합 기술을 이용하여 하나 이상의 기능성 AAV ITR 서열에 측면인접된 하나 이상의 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(전이유전자)을 포함하도록 작제될 수 있다. 이러한 벡터는 전체적으로 또는 부분적으로 결실된 하나 이상의 야생형 AAV 유전자 예를 들어, rep 및/또는 cap 유전자를 가질 수 있으나, 필요에 따라 AAV 벡터 입자 내로의 재조합 벡터의 구체, 복제 및 패키징을 위한 적어도 하나의 기능성 측면인접 ITR 서열을 보유한다. 따라서, AAV 벡터 계통은 복제 및 패키징을 위해 시스로 요구되는 서열(예를 들어, 기능성 ITR 서열)을 포함할 것이다.
- [0062] 용어 "폴리뉴클레오티드" 및 "핵산"은 본원에서 상호교환적으로 사용되어 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA)을 포함하는, 모든 형태의 핵산, 올리고뉴클레오티드를 나타낸다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 DNA, cDNA 및 안티센스 DNA, 및 스플라이싱되거나 스플라이싱되지 않은 mRNA, rRNA tRNA 및 억제 DNA 또는 RNA(RNAi, 예를 들어, 작거나 짧은 헤어핀(sh)RNA, 마이크로RNA(miRNA), 작거나 짧은 간섭(si)RNA, 트랜스-스플라이싱 RNA, 또는 안티센스 RNA)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 천연 발생, 합성, 및 의도적으로 변형되거나 변경된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 감소된 CpG 디뉴클레오티드를 가짐)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 단일, 이중 또는 삼중의 선형 또는 원형일 수 있고, 임의의 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의함에 있어서, 특정 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 서열을 5'에서 3' 방향으로 제공하는 관례에 따라 본원에서 기술될 수 있다.
- [0063] "이중성" 폴리뉴클레오티드는 세포 내로의 폴리뉴클레오티드의 벡터 매개된 전달/이동을 위한 벡터(예를 들어, AAV) 내로 삽입된 폴리뉴클레오티드를 지칭한다. 이중성 폴리뉴클레오티드는 전형적으로 벡터(예를 들어, AAV)

핵산과 구별되며 즉, 바이러스 (예를 들어, AAV) 핵산과 관련하여 비-천연성이다. 일단 세포 내로 전달/이동되면, 벡터 내부에 함유된 이중성 폴리뉴클레오티드가 발현될 수 있다 (예를 들어, 적절하다면 전사되고 번역될 수 있다). 대안적으로, 벡터 내부에 함유된 세포 중 전달/이동된 이중성 폴리뉴클레오티드는 발현될 필요는 없다. 용어 "이중성"은 폴리뉴클레오티드와 관련하여 본원에서 항상 사용되는 것은 아니지만, 수식어 "이중성"이 없이도 폴리뉴클레오티드에 대한 언급은 이의 생략에도 불구하고 이중성 폴리뉴클레오티드를 포함하는 것으로 의도된다. 이중성 서열의 예는 인자 IX 인코딩 핵산 예를 들어, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산 예컨대, 참조 핵산 서열 대비 감소된 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 핵산일 것이다.

[0064] "폴리뉴클레오티드 서열"에 의해 인코딩된 "폴리펩티드," "단백질" 및 "펩티드"는 천연 발생 단백질과 마찬가지로 전장 천연 서열, 뿐만 아니라 기능성 하위서열, 변형된 형태, 또는 서열 변이체가 천연 전장 단백질의 소정의 기능성을 보유하는 한, 기능성 하위서열, 변형된 형태 또는 서열 변이체를 포함한다. 본 발명의 방법 및 용도에서, 폴리뉴클레오티드 서열에 의해 인코딩된 이러한 폴리펩티드, 단백질 및 펩티드는 결합이 있거나, 처리된 포유동물에서 이의 발현이 불충분하거나 결핍된 내인성 단백질과 동일할 수 있지만 반드시 동일한 필요는 없다.

[0065] 본 발명에서, 렌터- 및 파르보-바이러스 벡터 예컨대, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8을 포함하는 아데노-바이러스 벡터 및 AAV 벡터 및 관련된 AAV 변이체 예컨대, AAV-Rh74 변이체 (예를 들어, 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및 15-6과 같은 캡시드 변이체)가 폴리뉴클레오티드를 세포 및 이들의 후손 내로 안정하게 또는 일시적으로 도입/전달하는데 사용될 수 있다. 용어 "전이유전자"는 본원에서 편리하게, 세포 또는 유기체에 도입되도록 의도되거나 도입된 이중성 폴리뉴클레오티드를 지칭하기 위해 사용된다. 전이유전자는 임의의 폴리뉴클레오티드, 예컨대, 폴리펩티드 또는 단백질을 인코딩하는 유전자(예를 들어, 인자 IX)를 포함한다.

[0066] 예를 들어, 전이유전자를 갖는 세포에서, 전이유전자는 벡터, 예컨대, AAV에 의해, 세포의 "형질도입" 또는 "형질감염"에 의해 도입/전달되었다. 용어 "형질도입하다" 및 "형질감염하다"는 세포 또는 숙주 유기체에 폴리뉴클레오티드와 같은 분자의 도입을 지칭한다.

[0067] 전이유전자가 도입된 세포는 "형질도입된 세포"라고 한다. 따라서, "형질도입된" 세포(예를 들어, 포유동물에서, 예컨대, 세포 또는 조직 또는 장기 세포)는 세포에 외인성 분자, 예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 단백질(예를 들어, 전이유전자)의 혼입 후 세포에서의 유전자 변화를 의미한다. 이에 따라, "형질도입된" 세포는 예를 들어, 외인성 분자가 도입된 세포, 또는 이의 자손이다. 세포(들)는 증식될 수 있고, 도입된 단백질도 발현될 수 있거나, 핵산이 전사될 수 있다. 유전자 요법 사용 및 방법에 있어서, 형질도입된 세포는 대상체에 존재할 수 있다.

[0068] 도입된 폴리뉴클레오티드는 수용체 세포 또는 유기체의 핵산 내로 통합될 수 있거나 통합되지 않을 수 있다. 도입된 폴리뉴클레오티드가 수용체 세포 또는 유기체의 핵산(게놈 DNA)에 통합되는 경우, 이는 그러한 세포 또는 유기체에서 안정적으로 유지될 수 있고, 추가로 수용체 세포 또는 유기체의 자손 세포 또는 유기체 쪽으로 진행되거나 이에 의해 유전될 수 있다. 마지막으로, 도입된 핵산은 수용체 세포 또는 숙주 유기체에 단지 일시적으로 존재할 수 있다.

[0069] 형질도입될 수 있는 세포는 임의의 기원(예를 들어, 중배엽, 외배엽 또는 내배엽)의 임의의 조직 또는 장기 유형의 세포를 포함한다. 세포의 비제한적인 예는 간(예를 들어, 간세포, 동모양 내피 세포), 췌장(예를 들어, 베타 섬 세포), 폐, 중추 또는 말초 신경계, 예컨대, 뇌(예를 들어, 신경, 아교 또는 뇌실막 세포) 또는 척추, 신장, 눈(예를 들어, 망막, 세포 요소), 비장, 피부, 흉선, 고환, 폐, 횡격막, 심장(심), 근육 또는 요근, 또는 장(예를 들어, 내분비), 지방 조직(백색, 갈색 또는 베이지), 근육(예를 들어, 섬유모세포), 윤활막 세포, 연골세포, 파골 세포, 상피 세포, 내피 세포, 타액선 세포, 내이 신경 세포 또는 조혈(예를 들어, 혈액 또는 림프) 세포를 포함한다. 추가적인 예는 줄기 세포 예컨대, 간으로 발달 또는 분화되는 만능성 또는 다능성 전구체 세포(예를 들어, 간세포, 동모양 내피 세포), 췌장(예를 들어, 베타 섬 세포), 폐, 중추 또는 말초 신경계, 예컨대, 뇌(예를 들어, 신경, 아교 또는 뇌실막 세포) 또는 척추, 신장, 눈(망막, 세포 요소), 비장, 피부, 흉선, 고환, 폐, 횡격막, 심장(심), 근육 또는 요근, 또는 장(예를 들어, 내분비), 지방 조직(백색, 갈색 또는 베이지), 근육(예를 들어, 섬유모세포), 윤활막 세포, 연골세포, 파골 세포, 상피 세포, 내피 세포, 타액선 세포, 내이 신경 세포 또는 조혈(예를 들어, 혈액 또는 림프) 세포를 포함한다.

[0070] 한 구체예에서 "치료학적 분자"는 세포 또는 대상체에서 단백질의 부재 또는 결함으로부터 발생한 증상을 경감 또는 감소시킬 수 있는 펩티드 또는 단백질이다. 대안적으로, 전이유전자에 의해 인코딩된 "치료학적" 펩티드

또는 단백질은 예를 들어, 유전자 결함을 교정하고, 유전자 (발현 또는 기능) 결핍을 교정하기 위해 대상체에게 이익을 주는 것이다.

[0071] 본 발명에 따라 유용한 유전자 생성물(예를 들어, 치료학적 단백질)을 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드의 비제한적 예는 비제한적으로, 혈액 응고 장애 예컨대, 혈우병 A, 혈우병 B, 지중해 혈증, 및 빈혈을 포함하는 질환 또는 장애의 치료에 사용될 수 있는 것들을 포함한다.

[0072] 본원에 기재된 비제한적 유전자 및 단백질을 포함하는 유전자 생성물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의 모든 포유동물 및 비-포유동물 형태는 공지되거나 비공지된 것으로 명시적으로 포함된다. 따라서, 본 발명은 비-포유동물, 인간 이외의 포유동물, 및 인간으로부터의 유전자 및 단백질을 포함하며, 이러한 유전자 및 단백질은 본원에 기술된 인간 유전자 및 단백질과 실질적으로 유사한 방식으로 기능한다. 포유동물 비-인간 인자 IX 서열의 비제한적 예는 문헌 [Yoshitake et al., 1985, supra; Kurachiet al., 1995, supra; Jallat et al., 1990, supra; Kurachiet al., 1982, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:6461-6464; Jaye et al., 1983, Nucl. Acids Res. 11:2325-2335; Anson et al., 1984, EMBO J. 3: 1053-1060; Wuet al., 1990, Gene 86:275-278; Evans et al., Proc Natl Acad Sci USA 86:10095 (1989), Blood 74:207-212; Pendurthi et al., 1992, Thromb. Res. 65:177-186; Sakar et al., 1990, Genomics 1990, 6:133-143; and, Katayama et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4990-4994.]에 기술되어 있다.

[0073] 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 및 이의 하위서열은 변형된 및 변이체 형태를 포함한다. 본원에서 사용되는 용어 "변형시키다" 또는 "변이체" 및 이의 문법적 변형예는 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이의 하위서열이 참조 서열에서 벗어남을 의미한다. 그러므로, 변형된 및 변이체 서열은 실질적으로 참조 서열과 동일하거나, 참조 서열에 비해 더 크거나 적은 활성 또는 기능을 가질 수 있지만, 적어도 참조 서열의 부분 활성 또는 기능을 보유한다. 특정 구체예에서, 변형된 핵산은 인자 IX를 인코딩하며, 핵산을 인코딩하는 참조 인자 IX 인코딩 핵산과 비교하여 CpG 디뉴클레오티드의 수를 감소하도록 변형시켰다 (예를 들어, 야생형 인자 IX 서열, 예컨대, 인간 또는 기타 포유동물 인자 IX 유전자 서열).

[0074] 변이체는 또한 기능 변이체의 획득 및 손실을 포함한다. 예를 들어, 야생형 인간 인자 IX DNA 서열에 있어서, 이의 단백질 변이체 또는 돌연변이체는 활성을 보유하거나, 치료학적으로 효과적이거나, 본 발명의 방법 및 용도에서 불변의 인간 인자 IX에 필적하거나 심지어 더욱 치료학적으로 활성이다. "Padua"로 불리는 자연 발생 인간 인자 IX 변이체의 한 비제한적 예에서, 인간 인자 IX는 위치 338번에서 R(아르기닌) 대신 L(류신)을 갖는다. Padua FIX는 Padua 돌연변이가 없는 인간 인자 IX에 비해 더 큰 촉매 및 응고 활성을 갖는다. 인간 인자 IX의 잔기 338번을 아르기닌에서 알라닌으로 변화시키면 촉매 활성 증가를 초래한다 (Chang et al., J. Biol. Chem., 273 : 12089-94 (1998)). 또 다른 특정 예에서, 콜라겐 IV는 인자 IX를 포획하는 작용을 하며, 이는 포유동물의 근육 조직 내로 도입될 경우, 인자 IX의 일부가 혈액 응고에 관여할 수 없음을 의미하는데, 왜냐하면 이들이 근육 조직의 틈새 공간에 보유되기 때문이다. 콜라겐 IV로의 결합이 감소된 (예를 들어, 기능 손실) 단백질을 발생시키는 인자 IX의 서열의 돌연변이는 예를 들어, 혈우병 치료에 유용한 돌연변이이다. 그러한 돌연변이 인자 IX 유전자의 예는 성숙 단백질의 시작부터 5번째 아미노산 위치에서 리신 대신 아미노산 알라닌을 갖는 인간 FIX 단백질을 인코딩한다.

[0075] 변형의 비제한적인 예는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환(예를 들어, 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100 또는 그 초과 뉴클레오티드 또는 잔기), 예컨대, 전이유전자에서 대체 디뉴클레오티드로의 CpG 치환(예를 들어, 인자 IX 인코딩 유전자 예컨대, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX 인코딩 유전자)을 포함한다. 아미노산 치환의 예는 캡시드 서열에서 보존적 아미노산 치환이다. 아미노산 치환의 또 다른 예는 아르기닌 대신 리신 잔기이다 (예를 들어, 임의의 4-1, 15-1, 15-2, 15-3/15-5, 15-4 및/또는 15-6에 제시된 바와 같은 리신의 하나 이상의 아르기닌 치환). 추가의 변형은 참조 서열의 첨가 (예를 들어, 삽입 또는 1-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-20, 20-25, 25-30, 30-40, 40-50, 50-100개 또는 그 초과 뉴클레오티드 또는 잔기) 및 결실 (예를 들어, 하위서열 또는 단편)을 포함한다. 특정 구체예에서, 변형된 또는 변이체 서열은 비변형된 서열의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 보유한다. 이러한 변형된 형태 및 변이체는 예를 들어, 본원에 기술된 바와 같은 참조 서열과 동일한, 그 미만의 또는 그 초과 기능 또는 활성을 가질 수 있으며, 적어도 이의 일부를 가질 수 있다.

[0076] 본원에 제시된 바와 같이, 변이체는 하나 이상의 비-보존적 또는 보존적 아미노산 서열 차이 또는 변형, 또는 이 둘 모두를 가질 수 있다. "보존적 치환"은 생물학적, 화학적 또는 구조적으로 유사한 잔기에 의한 하나의 아미노산의 대체이다. 생물학적으로 유사하다는 것은 치환이 생물학적 활성을 파괴하지 않음을 의미한다. 구조적

으로 유사하다는 것은 아미노산이 유사한 길이를 갖는 측쇄 예컨대, 알라닌, 글리신 및 세린 또는 유사한 크기를 가짐을 의미한다. 화학적 유사성은 잔기가 동일한 전하를 갖거나 친수성 또는 소수성 둘 모두임을 의미한다. 특정 예는 하나의 소수성 잔기 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또 다른 소수성 잔기로의 치환, 또는 하나의 극성 잔기의 또 다른 극성 잔기로의 치환 예컨대, 아르기닌의 리신으로, 글루탐산의 아스파르트산으로, 또는 글루타민의 아스파라긴으로, 세린의 트레오닌으로의 치환, 및 기타 등등을 포함한다. 보존적 치환의 특정 예는 소수성 잔기 예컨대, 이소류신, 발린, 류신 또는 메티오닌의 또 다른 잔기로의 치환, 극성 잔기의 또 다른 잔기로의 치환 예컨대, 아르기닌의 리신으로, 글루탐산의 아스파르트산으로, 또는 글루타민의 아스파라긴으로의 치환, 및 기타 등등을 포함한다. 예를 들어, 보존적 아미노산 치환은 전형적으로 하기 그룹 내에서의 치환을 포함한다: 글리신, 알라닌; 발린, 이소류신, 류신; 아스파르트산, 글루탐산; 아스파라긴, 글루타민; 세린, 트레오닌; 리신, 아르기닌; 및 페닐알라닌, 티로신. "보존적 치환"은 또한 비치환된 어미 아미노산 대신 치환된 아미노산의 사용을 포함한다.

[0077] 따라서, 본 발명은 하나 이상의 생물학적 활성(예를 들어, 혈액 응고 기능 등)을 보유하는 (예를 들어, 본원에 기술된 단백질을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드의) 유전자 및 단백질 변이체를 포함한다. 변이체는 참조 서열 예컨대, 천연 발생 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 펩티드와 상이할 수 있다. 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 펩티드의 이러한 변이체는, 재조합 DNA 기술을 사용하여 변형되었거나 변형될 수 있어 폴리뉴클레오티드, 단백질 또는 펩티드가 변형된 또는 추가의 특성을 지니게 되는 단백질 또는 펩티드를 포함한다.

[0078] 뉴클레오티드 서열 수준에서, 천연 및 비-천연 발생 변이체 유전자는 전형적으로 참조 유전자와 적어도 약 50% 동일하거나, 더욱 전형적으로 약 70% 동일하거나, 더욱 더 전형적으로 약 80% 동일할 것이다. 따라서, 예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX 유전자는 야생형 FIX 유전자에 대해 80% 또는 그 초과 동일성, 또는 야생형 FIX 유전자에 대해 80-85%, 85-90%, 90-95% 또는 그 초과 동일성, 예를 들어, 야생형 FIX 유전자에 대해 96%, 97%, 98% 또는 99% 또는 그 초과 동일성을 가질 수 있다.

[0079] 아미노산 서열 수준에서, 천연 및 비-천연 발생 변이체 단백질은 전형적으로는 참조 단백질과 적어도 약 70% 동일하고, 더욱 전형적으로는 약 80% 동일하고, 더욱 더 전형적으로는 약 90% 또는 그 초과로 동일하지만, 실질적인 비-동일 영역이 보존되지 않은 영역에서 허용된다 (예를 들어, 70% 미만의 동일성 예컨대, 60%, 50% 또는 심지어 40% 미만의 동일성). 기타 구체예에서, 서열은 참조 서열에 대해 적어도 60%, 70%, 75% 또는 그 초과 동일성 (예를 들어, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 그 초과 동일성)을 갖는다.

[0080] 용어 "동일성," "상동성" 및 이들의 문법적 변형은, 2개 또는 그 초과 언급된 실체가 "정렬된" 서열일 때, 이들이 동일함을 의미한다. 이에 따라, 예로서, 2개의 펩티드 서열이 동일할 때, 이들은 적어도 언급된 영역 또는 부분 내에서 동일한 아미노산 서열을 갖는다. 2개의 뉴클레오티드 서열이 동일할 경우에, 이들은 적어도 언급된 영역 또는 부분 내에서 동일한 뉴클레오티드 서열을 갖는다. 동일성은 서열의 규정된 구역(영역 또는 도메인)에 걸쳐 존재할 수 있다. 동일성의 "부위" 또는 "영역"은 동일한 2개 또는 그 초과 언급된 실체물의 일부를 지칭한다. 이에 따라, 2개의 단백질 또는 핵산 서열이 하나 이상의 서열 부위 또는 영역에 걸쳐 동일한 경우에, 이들은 그러한 영역 내에서 동일성을 공유한다. "정렬된" 서열은 참조 서열과 비교하여 종종 결손 또는 추가적인 염기 또는 아미노산(갭)에 대한 교정(correction)을 함유한 다수의 뉴클레오티드 또는 단백질(아미노산) 서열을 지칭한다.

[0081] 동일성은 서열의 전체 길이 또는 일부에 걸쳐 연장될 수 있다. 특정 양태에서, 동일성 퍼센트를 공유하는 서열의 길이는 2, 3, 4, 5개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20개, 등의 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산이다. 추가적인 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 21개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40개, 등의 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산이다. 추가의 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 41개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50개 등의 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산이다. 또한 추가의 특정 양태에서, 동일성을 공유하는 서열의 길이는 50개 또는 그 초과 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산, 예를 들어, 50 내지 55, 55 내지 60, 60 내지 65, 65 내지 70, 70 내지 75, 75 내지 80, 80 내지 85, 85 내지 90, 90 내지 95, 95 내지 100, 100 내지 110개, 등의 연속 뉴클레오티드 또는 아미노산이다.

[0082] 용어 "상동" 또는 "상동성"은 2개 또는 그 초과 언급된 실체물이 제공된 영역 또는 부분에 걸쳐 적어도 일부 동일성을 공유하는 것을 의미한다. 상동성 또는 동일성의 "부위, 영역 또는 도메인"은 둘 또는 그 초과 언급

된 실체물의 일부가 상동성을 공유하거나 동일한 것을 의미한다. 이에 따라, 2개의 서열이 하나 이상의 서열 영역에 걸쳐 동일한 경우에, 이러한 것들은 이러한 영역에서 동일성을 공유한다. "실질적인 상동성"은 참조 분자, 또는 상동성을 공유하는 참조 분자의 관련/상응하는 영역 또는 부분의 구조 또는 기능(예를 들어, 생물학적 기능 또는 활성) 중 하나 이상의 적어도 일부 구조 또는 기능을 갖거나 갖는 것으로 예측되도록, 분자가 구조적으로 또는 기능적으로 보존됨을 의미한다.

[0083] 두 서열 간의 동일성(상동성)의 정도는 컴퓨터 프로그램 및/또는 수학적 알고리즘을 사용하여 확인될 수 있다. 서열 동일성(상동성) 퍼센트를 계산하는 이러한 알고리즘은 일반적으로 비교 영역 또는 부위에 걸친 서열 겹 및 불일치를 설명한다. 예를 들어, BLAST (예를 들어, BLAST 2.0) 검색 알고리즘 (NCBI를 통해 공개적으로 입수 가능한 문헌 [Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403 (1990)] 참조)은 하기와 같은 예시적 검색 파라미터를 갖는다: 불일치 - 2; 겹 오픈 5; 겹 연장 2. 폴리펩티드 서열 비교에 있어서, BLASTP 알고리즘은 전형적으로 PAM100, PAM 250, BLOSUM 62 또는 BLOSUM 50과 같은 스코어 매트릭스와 함께 이용된다. FASTA (예를 들어, FASTA2 및 FASTA3) 및 SSEARCH 서열 비교 프로그램이 또한 동일성의 정도를 정량화하는데 이용된다 (Pearson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988); Pearson, Methods Mol Biol. 132:185 (2000); and Smith et al., J. Mol. Biol. 147:195 (1981)). Delaunay-기반 토폴로지 매핑을 사용하여 단백질 구조 유사성을 정량화하는 프로그램도 개발되었다 (Bostick et al., Biochem Biophys Res Commun. 304:320 (2003)).

[0084] 폴리뉴클레오티드는 부가 및 삽입 예를 들어, 하나 이상의 이중성 도메인을 포함한다. 부가 (예를 들어, 이중성 도메인)은 임의의 유형의 분자의 조성물로의 공유 또는 비-공유 부착될 수 있다. 전형적으로, 부가 및 삽입(예를 들어, 이중성 도메인)은 상보적 또는 별개의 기능 또는 활성을 부여한다.

[0085] 부가 및 삽입은 서열에 공유 결합된 참조 천연 (야생형) 서열에 정상적으로 존재하지 않는 하나 이상의 분자를 갖는 폴리뉴클레오티드 또는 단백질 서열인 키메라 및 융합 서열을 포함한다. 용어 "융합" 또는 "키메라" 및 이의 문법적 변형은 분자와 관련하여 사용되는 경우, 분자의 일부 또는 부분이 분자와 구별되는 (이중성의) 상이한 실체를 함유함을 의미한다 - 왜냐하면 전형적으로 이들은 자연적으로 함께 존재하지 않기 때문이다. 즉, 예를 들어, 융합 또는 키메라의 한 부분은 자연계에서 함께 존재하지 않으며 구조적으로 구별되는 부분을 포함하거나 이러한 부분으로 구성된다.

[0086] 용어 "벡터"는 폴리뉴클레오티드의 삽입 또는 혼입에 의해 조작될 수 있는 플라스미드, 바이러스(예를 들어, AAV 벡터), 또는 그 밖의 비히클을 나타낸다. 이러한 벡터는 폴리뉴클레오티드를 세포 내로 도입/전달하고, 세포에서 삽입된 폴리뉴클레오티드를 전사 또는 번역하기 위한 유전자 조작 (즉, "클로닝 벡터")에 사용될 수 있다. 벡터 핵산 서열은 일반적으로 적어도 세포에서의 증식을 위한 복제 기점, 및 임의로 추가의 요소, 예컨대, 이중성 폴리뉴클레오티드 서열, 발현 조절 요소 (예를 들어, 프로모터, 인핸서), 인트론, ITR(들), 선택 마커 (예를 들어, 항생제 내성), 폴리-아데닌(또한, 폴리-아데닐화로 언급됨) 서열을 함유한다.

[0087] 바이러스 벡터는 바이러스 계통을 포함하는 하나 이상의 핵산 요소로부터 유래되거나 이를 기반으로 한다. 특정 바이러스 벡터는 렌티-바이러스 및 파르보-바이러스 벡터, 예컨대 아데노-관련 바이러스 (AAV) 벡터를 포함한다.

[0088] 본원에 사용된 바와 같은, 바이러스 벡터의 수식어, 예컨대, 재조합 렌티- 또는 파르보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터, 뿐만 아니라, 재조합 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 같은 서열의 수식어로서, 용어 "재조합"은 조성물(예를 들어, AAV 또는 서열)이 일반적으로 자연에서 일어나지 않는 방식으로 조작(즉, 공학처리)되었음을 의미한다. AAV 벡터와 같은 재조합 벡터의 특정 예는 야생형 바이러스(예를 들어, AAV) 계통에 일반적으로 존재하지 않는 폴리뉴클레오티드가 바이러스 계통 내에 삽입되는 경우일 것이다. 예를 들어, 재조합 폴리뉴클레오티드의 예는, 단백질을 인코딩하는 이중성 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 유전자)가 보통은 바이러스(예를 들어, AAV) 계통 내에서 유전자가 결합되어 있는 5', 3' 및/또는 인트론 영역이 있거나 없는 벡터에 클로닝되는 경우일 것이다. 용어 "재조합"이 본원에서 벡터 예컨대, 바이러스 및 AAV 벡터뿐만 아니라 서열 예컨대, 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드와 관련하여 항상 사용되는 것은 아니지만, 재조합 형태의 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드를 포함하는 바이러스, AAV 및 서열은 임의의 이러한 생략에도 불구하고 분명하게 포함된다.

[0089] 재조합 바이러스 "벡터" 또는 "AAV 벡터"는 예컨대, 바이러스(예를 들어, AAV)로부터 야생형 계통을 제거하기 위한 분자 방법을 이용하고, 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX를 인코딩하는 변형된 핵산 서열)과 같은 비-천연 핵산으로 대체함으로써, AAV와 같은 바이러스의 야생형 계통으로부터 유래된다. 전형적으로, AAV에 있어서, AAV 계통의 역방위 말단 반복부(ITR) 서열들 중 하나 또는 둘 모두는 AAV 벡터에 보유된다. "재조합" 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)는, 바이러스 계통 전부

또는 일부가 이중성 폴리뉴클레오티드 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX를 인코딩하는 변형된 핵산 서열)과 같은 바이러스(예를 들어, AAV) 게놈 핵산에 대해 비-천연 서열로 대체되었기 때문에, 바이러스(예를 들어, AAV) 게놈과는 구별된다. 따라서, 비-천연 서열(예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인간 FIX를 인코딩하는 변형된 핵산 서열)의 혼입은 바이러스 벡터(예를 들어, AAV)를 "재조합" 벡터로서 규정하며, AAV의 경우에, "rAAV 벡터"로서 지칭될 수 있다.

[0090] 재조합 벡터(예를 들어, 렌티- 파르보-, AAV) 서열은 패키징될 수 있으며, 이는 본원에서 생체외, 시험관내 또는 생체내에서 세포의 후속 감염(형질도입)을 위한 "입자"로서 지칭된다. 재조합 벡터 서열이 AAV 입자에 캡시드화(encapsidate)되거나 패키징되는 경우에, 입자는 또한, "rAAV"로서 지칭될 수 있다. 이러한 입자는 벡터 게놈을 캡시드화하거나 패키징하는 단백질을 포함한다. 특정 예는 바이러스 외피 단백질, 및 AAV의 경우에, 캡시드 단백질을 포함한다.

[0091] 재조합 플라스미드에 있어서, 벡터 "게놈"은 바이러스(예를 들어, AAV) 입자를 형성시키기 위해 최종적으로 패키징되거나 캡시드화되는 재조합 플라스미드 서열의 일부를 지칭한다. 재조합 벡터를 삭제하거나 제작하기 위해 재조합 플라스미드가 사용되는 경우에, 벡터 게놈은 재조합 플라스미드의 벡터 게놈 서열에 상응하지 않는 "플라스미드"의 일부를 포함하지 않는다. 재조합 플라스미드의 이러한 비-벡터 게놈 부분은 "플라스미드 백본"으로서 지칭되는데, 이는 증식 및 재조합 바이러스 생산을 위해 필요한 과정인 플라스미드의 클로닝 및 증폭을 위해서는 중요하지만, 바이러스(예를 들어, AAV) 입자로 캡시드화되거나 그 자체로 패키징되지 않는다.

[0092] 이에 따라, 벡터 "게놈"은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열을 함유하며, 바이러스(예를 들어, AAV)에 의해 패키징되거나 캡시드화되는 벡터 플라스미드의 일부를 지칭한다. 재조합 플라스미드의 비 벡터 게놈 부분은 플라스미드의 클로닝 및 증폭에 중요한 "플라스미드 백본"이며, 예를 들어, 선택 마커 예컨대, 카나마이신을 가지며, 바이러스(예를 들어, AAV)에 의해서 그 자체로 패키징되거나 캡시드화되지 않는다.

[0093] 벡터 게놈을 캡시드화/패키징하는 rAAV의 양은 예를 들어, 정량적 PCR에 의해 결정될 수 있다. 이러한 검정은 실시간 정량적 폴리머라제 사슬 반응에 의해 패키징된 벡터 게놈의 물리적 수를 측정하고, 예를 들어, 벌크 AAV 벡터 및 최종 생성물에 대한 제작/정제 공정의 다양한 단계에서 수행될 수 있다.

[0094] 재조합 벡터 서열은 폴리뉴클레오티드의 삽입 또는 혼입에 의해 조작된다. 본원에 기재된 바와 같이, 벡터 플라스미드는 일반적으로, 적어도 세포의 증식을 위한 복제 기점 및 하나 이상의 발현 조절 요소를 함유한다.

[0095] AAV 벡터를 포함하는 벡터 서열은 하나 이상의 "발현 조절 요소"를 포함할 수 있다. 전형적으로, 발현 조절 요소는 작동 가능하게 연결된 폴리뉴클레오티드의 발현에 영향을 주는 핵산 서열(들)이다. 벡터 내에 존재하는 프로모터 및 인핸서와 같은 본원에 제시된 발현 조절 요소를 포함하는 조절 요소는 적절한 이중성 폴리뉴클레오티드 전사 및 적합한 경우에, 번역(예를 들어, 프로모터, 인핸서, 인트론을 위한 스플라이싱 신호, mRNA의 인-프레임 번역을 적용하기 위한 유전자의 정확한 판독 프레임의 유지, 및 정지 코돈, 등)을 촉진시키기 위해 포함된다. 이러한 요소는 전형적으로, "시스 작용" 요소로서 지칭되는 시스로 작용하지만, 또한 트랜스로 작용할 수 있다.

[0096] 발현 조절은 전사, 번역, 스플라이싱, 메세지 안정성 등의 수준에서 영향을 받을 수 있다. 전형적으로, 전사를 조절하는 발현 조절 요소는 (예를 들어, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산의) 전사된 폴리뉴클레오티드의 5' 말단(즉, "업스트림") 부근에 나란히 놓인다. 발현 조절 요소는 또한, 전사된 서열의 3' 말단(즉, "다운스트림")에 또는 전사물 내에(예를 들어, 인트론에) 위치할 수 있다. 발현 조절 요소는 전사된 서열에 인접하거나 간격을 두고 떨어져서 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드로부터의 1 내지 10, 10 내지 25, 25 내지 50, 50 내지 100, 100 내지 500개, 또는 그 초과개의 뉴클레오티드), 또는 심지어 상당한 거리를 두고 위치할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 특정 벡터, 예를 들어, AAV 벡터의 폴리뉴클레오티드 길이 제한으로 인하여, 이러한 발현 조절 요소는 전형적으로, 전사된 폴리뉴클레오티드로부터 1 내지 1000개의 뉴클레오티드 내에 존재할 것이다.

[0097] 기능적으로, 작동가능하게 연결된 이중성 폴리뉴클레오티드의 발현은, 요소가 폴리뉴클레오티드의 전사, 및 적절한 경우에, 전사물의 번역을 조절하도록, 요소(예를 들어, 프로모터)에 의해 적어도 일부 조절가능하다. 발현 조절 요소의 특정 예는 일반적으로 전사된 서열의 5'에 위치한 프로모터이다. 발현 조절 요소의 또 다른 예는 전사된 서열의 5', 3' 또는 전사된 서열 내에 위치할 수 있는 인핸서이다.

[0098] 본원에 사용된 바와 같은 "프로모터"는 재조합 생성물을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열에 인접하여 위치하는 핵산(예를 들어, DNA) 서열을 지칭할 수 있다. 프로모터는 전형적으로 인접한 서열 예를 들어, 이중성 폴리

뉴클레오타이드(예를 들어, 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산)에 작동가능하게 연결된다. 프로모터는 전형적으로, 프로모터가 존재하지 않을 때 발현되는 양과 비교하여 이중성 폴리뉴클레오타이드로부터 발현되는 양을 증가시킨다.

[0099] 본원에서 사용된 바와 같은 "인핸서"는 이중성 폴리뉴클레오타이드에 인접하여 위치한 서열을 지칭할 수 있다. 인핸서 요소는 전형적으로 프로모터 요소의 업스트림에 위치하고 또한 기능하며, DNA 서열(예를 들어, 이중성 폴리뉴클레오타이드)의 다운스트림 또는 내에 위치할 수 있다. 따라서, 인핸서 요소는 이중성 폴리뉴클레오타이드의 업스트림 또는 다운스트림 100개 염기쌍, 200개 염기쌍, 또는 300개 이상의 염기쌍에 위치할 수 있다. 인핸서 요소는 전형적으로 이중성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 프로모터 요소에 의해 제공된 증가된 발현보다 높게 증가시킨다.

[0100] 발현 조절 요소(예를 들어, 프로모터)는 특별한 조직 또는 세포 유형에서 활성인 것을 포함하는데, 이는 본원에서 "조직-특이적 발현 조절 요소/프로모터"로서 지칭된다. 조직-특이적 발현 조절 요소는 전형적으로, 특정 세포 또는 조직(예를 들어, 간, 뇌, 중추신경계, 척수, 눈, 망막, 뼈, 근육, 폐, 췌장, 심장, 신장 세포, 등)에서 활성이다. 발현 조절 요소는 전형적으로, 이들이 특정 세포, 조직 또는 장기 타입에 대해 독특한, 전사 활성제 단백질, 또는 전사의 다른 조절제에 의해 인식되기 때문에, 이들 세포, 조직 또는 장기에서 활성이다.

[0101] 골격근에서 활성인 프로모터의 예는 골격 α -액틴, 미오신 경쇄 2A, 디스트로핀, 근육 크레아틴 키나제를 인코딩하는 유전자로부터의 프로모터 뿐만 아니라 천연 발생 프로모터보다 더 높은 활성을 갖는 합성 근육 프로모터를 포함한다(예를 들어, 문헌 [Li, et al., Nat. Biotech. 17:241-245 (1999)] 참조). 간에 대한 조직-특이적인 프로모터의 예는 특히, 인간 알파 1-안티트립신(hAAT) 프로모터; 알부민[Miyatake, et al. J. Virol., 71:5124-32 (1997)]; B형 간염 바이러스 코어 프로모터[Sandig, et al., Gene Ther. 3:1002-9 (1996)]; 알파-태아단백질(AFP) [Arbuthnot, et al., Hum. Gene Ther., 7:1503-14 (1996)]; 뼈(오스테로칼신, [Stein, et al., Mol. Biol. Rep., 24:185-96(1997)]); 뼈 시알로 단백질[Chen, et al., J. Bone Miner. Res. 11:654-64 (1996)], 림프구(CD2, [Hansal, et al., J. Immunol., 161:1063-8 (1998)]; 면역글로불린 중쇄; T 세포 수용체 사슬), 뉴런(뉴런-특이적 예놀라제(NSE) 프로모터[Andersen, et al., Cell. Mol. Neurobiol., 13:503-15 (1993)]; 뉴로필라멘트 경쇄 유전자[Piccioli, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:5611-5 (1991)]; 뉴론-특이적 vgf 유전자[Piccioli, et al., Neuron, 15:373-84 (1995)])가 있다. 간에서 활성인 인핸서의 예는 아포지질단백질 E(apoE) HCR-1 및 HCR-2이다[Allan et al., J. Biol. Chem., 272:29113-19 (1997)].

[0102] 발현 조절 요소는 또한, 다수의 상이한 세포 유형에서 폴리뉴클레오타이드의 발현을 유도할 수 있는 아주 흔하거나 불규칙한 프로모터/인핸서를 포함한다. 이러한 요소는 사이토메갈로바이러스(CMV) 급초기 프로모터/인핸서 서열, Rous 육종 바이러스(RSV) 프로모터/인핸서 서열, 및 다양한 포유동물 세포 유형 중에서 활성인 다른 바이러스 프로모터/인핸서, 또는 자연에 존재하지 않는 활성 요소(예를 들어, 문헌 [Boshart et al, Cell, 41:521-530 (1985)] 참조), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 환원효소 프로모터, 세포질 β -액틴 프로모터 및 포스포글리세롤 키나제 (PGK) 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다.

[0103] 발현 조절 요소는 또한, 조절가능한 방식으로 발현을 제공할 수 있으며, 즉, 신호 또는 자극은 작동적으로 연결된 이중성 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가시키거나 감소시킨다. 신호 또는 자극에 반응하여 작동적으로 연결된 폴리뉴클레오타이드의 발현을 증가시키는 조절가능한 요소는 또한, "유도성 요소(inducible element)"(즉, 신호에 의해 유도됨)로서 지칭된다. 특정 예는, 호르몬(예를 들어, 스테로이드) 유도성 프로모터를 포함하지만, 이로 제한되지 않는다. 신호 또는 자극에 대해 반응하여 작동가능하게 연결된 폴리뉴클레오타이드의 발현을 감소시키는 조절가능한 요소는 "억제 요소"로서 불린다(즉, 신호가 제거되거나 부재하는 경우 발현이 증가되도록 신호는 발현을 감소시킨다). 전형적으로, 이러한 요소에 의해 부여되는 증가 또는 감소의 양은 존재하는 신호 또는 자극의 양에 비례하며; 신호 또는 자극의 양이 클수록, 발현이 더욱 크게 감소하거나 증가한다. 특정한 비제한적인 예는 아연-유도성 양 메탈로티오닌(MT) 프로모터; 스테로이드 호르몬-유도성 마우스 포유동물 종양 바이러스(MMTV) 프로모터; T7 폴리머라제 프로모터 시스템(WO 98/10088); 테트라사이클린-억제제[Gossen, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551 (1992)]; 테트라사이클린-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)]; [Rivera, et al., Nat. Medicine. 2:1028-1032 (1996)]을 포함한다. 본 상황에서 유용할 수 있는 다른 조절가능한 조절 요소는 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기(acute phase), 발달에 의해 조절되는

것들이다.

- [0104] 발현 조절 요소는 또한, 이중성 폴리뉴클레오티드를 위한 천연 요소(들)를 포함한다. 천연 조절 요소(예를 들어, 프로모터)는, 이중성 폴리뉴클레오티드의 현이 천연 발현을 모방해야 하는 것이 요망될 때 사용될 수 있다. 천연 요소는, 이중성 폴리뉴클레오티드의 발현이 일시적으로 또는 점진적으로, 또는 조직-특이적 방식으로, 또는 특이적 전사 자극에 반응하여 조절하고자 할 때 사용될 수 있다. 다른 천연 발현 조절 요소, 예를 들어, 인트론, 폴리아데닐화 부위 또는 Kozak 컨센서스 서열이 또한 사용될 수 있다.
- [0105] 본원에 사용된 바와 같은 용어 "작동가능한 연결" 또는 "작동가능하게 연결된"은 구성요소가 이들의 의도된 방식으로 기능하는 것을 허용하도록 기술된 바와 같은 구성요소의 물리적 또는 기능적 병치를 지칭한다. 핵산과 작동가능하게 연결된 상태의 발현 조절 요소의 예에서, 조절 요소는 핵산의 발현을 조절하게 하는 관계에 놓인다. 더욱 상세하게, 예를 들어, 작동적으로 연결된 2개의 DNA 서열은, DNA 서열 중 적어도 하나가 다른 서열에 대한 생리학적 효과를 발휘할 수 있는 관계로 2개의 DNA가 배열(시스 또는 트랜스)되는 것을 의미한다.
- [0106] 따라서, 인간 FIX 단백질을 인코딩하는 변형된 핵산 서열, 및 바이러스 벡터 예컨대, AAV 벡터를 포함하는 렌티- 및 파르보바이러스 벡터를 포함하는 벡터 및 플라스미드, 뿐만 아니라 이들의 조성물은 추가의 핵산 요소를 포함할 수 있다. 이러한 요소는 비제한적으로, AAV ITR 서열의 하나 이상의 복사체, 발현 조절(예를 들어, 프로모터/인핸서) 요소, 전사 종결 신호 또는 중지 코돈, 폴리뉴클레오티드 서열에 측면인접한 5' 또는 3' 비번역된 영역(예를 들어, 폴리아데닐화(폴리 A) 서열), 또는 인트론 예컨대, 게놈 인간 인자 IX(SEQ ID NO:13)의 인트론 I의 전체 또는 일부를 포함한다.
- [0107] 핵산 요소는 예를 들어, 패키징을 개선시키고 오염 핵산의 존재를 감소시키기 위해, 예를 들어, 플라스미드 벡본의 패키징을 감소시키기 위해 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열을 추가로 포함한다. 본원에 기재된 바와 같은, AAV 벡터는 일반적으로 약 4kb 내지 약 5.2kb, 또는 약간 더 큰 규정된 크기 범위를 갖는 DNA의 삽입물을 전형적으로 수용한다. 따라서, 더 짧은 서열에 있어서, 삽입 단편에서 스테퍼 또는 필러의 포함은 바이러스 입자로의 AAV 벡터 패키징을 위해 허용가능한 바이러스 게놈 서열의 정상적인 크기 또는 이에 가까운 크기로 길이를 조정하기 위한 것이다. 다양한 구체예에서, 필러/스테퍼 핵산 서열은 핵산의 비번역된(비-단백질 인코딩) 세그먼트이다. AAV 벡터의 특정 구체예에서, 이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 4.7 Kb 미만의 길이를 가지며, 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 이중성 폴리뉴클레오티드 서열과 결합될 때(예를 들어, 벡터에 삽입될 때) 전체 길이가 약 3.0 내지 5.5Kb, 또는 약 4.0 내지 5.0Kb, 또는 약 4.3 내지 4.8Kb가 되는 길이를 갖는다.
- [0108] 인트론은 또한, 바이러스 입자로의 AAV 벡터 패키징을 위한 길이를 달성하기 위해 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 기능할 수 있다. 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 기능하는 인트론 및 인트론 단편(예를 들어, FIX의 인트론 I의 부분)은 또한 발현을 향상시킬 수 있다. 인트론 요소의 포함은 인트론 요소의 부재하의 발현과 비교하여 발현을 향상시킬 수 있다 (상기 Kurachiet et al., 1995).
- [0109] 인트론의 사용은 인자 IX 인트론 I 서열의 포함에 제한되지 않고, 다른 인트론을 또한, 포함하며, 이러한 인트론은 동일한 유전자와 회합될 수 있거나 (예를 들어, 핵산이 인자 IX를 인코딩하는 경우, 인트론은 인자 IX 게놈 서열에 존재하는 인트론으로부터 유래함) 완전히 다른 유전자 또는 다른 DNA 서열과 회합될 수 있다. 따라서, 핵산의 다른 비번역된 (비-단백질 인코딩) 영역 예컨대, 동족 (관련) 유전자 (이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 게놈 서열에 의해 인코딩된 동일한 단백질의 전부 또는 일부를 인코딩함) 및 비-동족 (비관련) 유전자 (이중성 폴리뉴클레오티드 서열은 게놈 서열에 의해 인코딩된 단백질과 구별되는 단백질을 인코딩함)로부터의 게놈 서열에서 발견된 인트론은 또한 본 발명에 따른 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열로서 기능할 수 있다.
- [0110] 본원에 사용된 바와 같은 "인트론 I의 일부"는 약 0.1kb 내지 약 1.7kb의 뉴클레오티드 길이를 갖는 인트론 I의 영역으로 여겨지며, 이러한 영역은 인트론 I 부분의 부재하의 FIX의 발현과 비교할 경우 플라스미드 또는 바이러스 벡터 주형에 대해 전형적으로 약 1.5배 또는 그 초과 만큼 인자 IX의 발현을 향상시킨다. 보다 특정한 부분은 인트론 I의 1.3kb 부분이다. 인자 IX 인트론 I 서열의 비제한적 예는 인트론 A로서, SEQ ID NO:13에 제시된 바와 같은 FIX 제1 인트론의 5' 부부 및 3' 부분으로 구성된 키메라이다.
- [0111] 발현 조절 요소, ITR, 폴리 A 서열, 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 길이가 다양할 수 있다. 특정 양태에서, 발현 조절 요소, ITR, 폴리A, 또는 필러 또는 스테퍼 폴리뉴클레오티드 서열은 약 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750,

750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 또는 2,000-2,500개 뉴클레오타이드 길이의 서열이다.

- [0112] 한 비제한적 구체예에 따르면, AAV 벡터는 4-1 캡시드 변이체 VP1 단백질(SEQ ID NO:4)을 포함하는 AAV 캡시드 및 형질도입된 포유동물 세포에서 이중성 유전자를 발현하기 위한 계놈을 포함한다.
- [0113] 본 벡터의 캡시드는 4-1 캡시드 변이체로부터의 VP2 및 VP3 단백질(각각 SEQ ID NO:27 및 SEQ ID NO:3)을 추가로 포함할 수 있다. 특정 비제한적 구체예에 따르면, VP1 단백질 및 VP2 단백질은 대략 1:1 (또는 일부 다른 비율)의 화학량론적 비율로 존재하며, VP3 단백질은 약 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 11:1, 12:1, 13:1, 14:1, 15:1, 16:1, 17:1, 18:1, 19:1, 20:1, 또는 일부 다른 비율의 대략적 비율로 VP1 또는 VP2, 또는 VP1과 VP2 둘 모두에 대한 비율로 존재한다.
- [0114] 일부 구체예에서, 비제한적으로, 4-1 캡시드 변이체 단백질(VP1, VP2, VP3)을 포함하는 캡시드를 갖는 것을 포함하는 AAV 벡터의 계놈은 인간 인자 IX(FIX) 단백질을 인코딩하는 이중성 핵산 서열을 포함한다. 일부 구체예에서, FIX 단백질은 야생형이며, 다른 구체예에서, FIX 단백질은 치환 돌연변이 또는 단백질의 활성을 변형시키는 기타 돌연변이를 함유한다. 일부 구체예에서, 돌연변이는 FIX 촉매 활성 및/또는 응혈원으로서의 단백질의 활성을 증가시킨다. 일부 구체예에서, FIX 단백질은 FIX 단백질의 338번 위치에 상응하는 아미노산에서 Arg의 Ala로의 치환을 갖는 Padua FIX 단백질이다. 일부 구체예에 따르면, 인간 FIX(FIX Padua 포함)를 인코딩하는 유전자는 예를 들어, CpG 디뉴클레오타이드를 감소시키거나 심지어 제거함으로써 코돈 최적화된다. 다른 유형의 코돈 최적화 또한 가능하다.
- [0115] 일부 구체예에서, AAV 벡터의 계놈은 계놈의 왼쪽 및 오른쪽 말단 (즉, 각각 5' 및 3' 말단)에 위치하는 AAV2로부터의 역방위 말단 반복부(ITR)를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, 왼쪽 ITR은 SEQ ID NO:12의 뉴클레오타이드 1-141(SEQ ID NO:13으로서 본원에 기재됨)를 포함하거나 이로 구성되며, 오른쪽 ITR은 SEQ ID NO:12로부터 뉴클레오타이드 4097-4204(SEQ ID NO:20으로서 본원에 기재됨)를 포함하거나 이로 구성된다. 각 ITR은 가변 길이의 핵산 서열에 의해 벡터 계놈에서 다른 요소로부터 분리될 수 있다.
- [0116] 기타 구체예에서, AAV 벡터의 계놈은 프로모터, 및 선택적으로 인핸서를 포함하는 발현 조절 요소를 추가로 포함한다. 일부 구체예에서, AAV 벡터 계놈은 프로모터 및 인핸서 둘 모두를 포함하며, 이는 항시성, 유도성 또는 조직 특이적일 수 있다. 일부 구체예에서, 프로모터, 또는 인핸서, 또는 이 둘 모두는 조직 특이적이다. 예시적인 구체예에 따르면, 인핸서 및 프로모터 둘 모두는 다른 특정 세포 유형과 비교하여 간세포에서 우선적으로 활성이다. 한 구체예에 따르면, 인핸서는 인간 ApoE HCR-1 인핸서의 전체 또는 일부이며, 프로모터는 인간 알파-1 안티트립신(AAT) 프로모터의 전체 또는 일부이다. 일부 구체예에서, AAV 벡터 계놈은 SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 152-472 (SEQ ID NO:14로서 본원에 기재됨)를 포함하거나 이들로 구성된 인간 ApoE HCR-1 인핸서를 포함하며, SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 482-878 (SEQ ID NO:15로서 본원에 기재됨)를 포함하거나 이들로 구성된 인간 AAT 프로모터를 포함한다. 일부 구체예에서, ApoE HCR-1 인핸서는 AAT 프로모터의 5'에 위치하고, 서열은 연속적이거나 또 다른 뉴클레오타이드 서열에 의해 분리될 수 있다. 일부 구체예에 따르면, 인핸서 및 프로모터는 인자 IX를 코딩하는 핵산 서열의 5'에 위치하며, 인자 IX 유전자의 제1 엑손에 연속하여 결합될 수 있거나, 인간 인자 IX 유전자로부터의 5' 비번역된 서열(UTR) 또는 스페이서로서 작용하는 일부 기타 서열에 의해 이들로부터 분리될 수 있다. 예시적인 비제한적 구체예에서, 5' UTR 서열은 SEQ ID NO:12의 뉴클레오타이드 879-907을 포함하거나 이들로 구성된다.
- [0117] 일부 구체예에서, 천연 발생 FIX Padua를 포함하는 FIX를 인코딩하는 유전자는 인간 인자 IX 계놈 서열에 존재하는 하나 이상의 인트론을 포함한다. 기타 구체예에서, 모든 인트론은 배제될 수 있으며, 이의 예는 SEQ ID NO:10의 핵산 서열로서 기재되며, "FIX39"에 대한 코딩 서열로서 본원에 언급된다. 존재하는 경우, 인트론은 본원에 기술된 바와 같은 스테퍼 또는 필러 서열로서 작용할 수 있다. 전체 유전자는 CpG 디뉴클레오타이드를 고갈시키거나 제거하기 위해 코돈-최적화될 수 있다.
- [0118] 특정 비제한적 구체예에서, AAV 벡터에 사용된 인간 인자 IX를 인코딩하는 유전자는 SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 908-3731을 포함하거나 이들로 구성되며, 이는 FIX Padua를 인코딩하며 CpG 디뉴클레오타이드를 제거하도록 코돈-최적화된다. 이러한 서열은 엑손 1(SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 908-995), 제1 인트론(중중 인트론 I로서 공지됨; SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 996-2433), 및 엑손 2-8(SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 2434-3731)을 포함한다.
- [0119] 특정 구체예에서, 인자 IX를 인코딩하는 유전자 뒤의 이의 3' 말단에 인간 인자 IX 유전자로부터의 3' UTR 서열 (예컨대, 비제한적으로, SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 3732-3779 및/또는 인자 IX 유전자 또는 또 다른

유전자로부터의 폴리아데닐화(폴리A) 서열이 올 수 있다. 하나의 비제한적 예에서, 폴리A 서열은 소 성장 호르몬(bGH) 유전자로부터 비롯될 수 있으며, SEQ ID NO:12로부터의 뉴클레오타이드 3820-4047을 포함하거나 이들로 구성될 수 있다. 일부 구체예에서, 3' UTR은 뉴클레오타이드의 개재 서열에 의해 폴리A 서열로부터 가변적으로 이격될 수 있다.

[0120] 일부 구체예에서, 상기 기재된 요소는 하나의 AAV 벡터 게놈으로 조합될 수 있다. 하나의 비제한적인 예에 따르면, AAV 벡터는 5'에서 3'로의 순서로 좌측 AAV ITR, ApoE HCR-1 인핸서(또는 이의 일부), hAAT 프로모터(또는 이의 일부), 인간 인자 IX 5' UTR의 일부, 인간 인자 IX Padua를 인코딩하는 핵산 (선택적으로 하나 이상의 인트론 예컨대, 인트론 I 포함), 인간 인자 IX 3' UTR의 일부, bGH로부터의 폴리A 서열(또는 이의 일부), 및 우측 AAV2 ITR을 포함하는 게놈을 가질 수 있다. 이러한 구체예 중 일부에서, 좌측 AAV2 ITR은 SEQ ID NO:13의 핵산 서열을 가지며; ApoE HCR-1 인핸서는 SEQ ID NO:14의 핵산 서열을 가지며; hAAT 프로모터는 SEQ ID NO:15의 핵산 서열을 가지며; 5' UTR은 SEQ ID NO:16의 핵산 서열을 가지며; FIX Padua를 인코딩하는 유전자(인트론 I 포함)는 SEQ ID NO:10의 핵산 서열에 의해 인코딩된 FIX 단백질을 인코딩하며; 3' UTR은 SEQ ID NO:18의 핵산 서열을 가지며; 폴리A 영역은 SEQ ID NO:19의 핵산 서열을 가지며; 우측 AAV2 ITR은 SEQ ID NO:20의 핵산 서열을 갖는다.

[0121] 특정 구체예에 따르면, AAV 벡터의 게놈은 SEQ ID NO:12의 뉴클레오타이드 1-4204 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 서열을 포함하거나 이들로 구성된다. 이들 구체예 중 일부에서, 캡시드는 4-1 VP1 캡시드 단백질 변이체(SEQ ID NO:4) 및 상응하는 VP2 및 VP2 캡시드 단백질을 포함한다. "AAV-FIX39-Padua"로서 본원에 언급된 AAV 벡터의 특정 비제한적인 구체예에서, 벡터는 4-1 캡시드 변이체 단백질(VP1, VP2, VP3)로부터 형성된 캡시드 및 SEQ ID NO:12의 뉴클레오타이드 1-4204로부터의 상응하는 핵산 서열을 포함하는 단일-가닥 게놈을 포함한다.

[0122] 본원에 사용되는 AAV "빈 캡시드"는 AAV 벡터 게놈을 함유하는 "게놈 함유 캡시드"와 대조적으로 벡터 게놈을 함유하지 않는다(따라서, 용어 "빈"). 빈 캡시드는 이들의 온전한(AAV 벡터 함유 게놈) 바이러스와 반응하는 하나 이상의 항체와 반응한다는 점에서 바이러스-유사 입자이다.

[0123] 빈 캡시드는 AAV 벡터 제조물에 포함될 수 있다. 요망되는 경우, AAV 빈 캡시드는 AAV 벡터 제조물에 첨가될 수 있거나, 본원의 방법에 따라 대상체에 별도로 투여될 수 있다.

[0124] 이론에 구속되기를 희망하지 않으면서, AAV 빈 캡시드는 AAV 벡터에 대한 항체에 결합하거나 이와 반응하여, AAV 벡터의 불활성화를 감소시키기 위한 디코이로서 기능하는 것으로 여겨진다. 이러한 디코이는 AAV 벡터에 대해 유도된 항체를 흡수하여 세포의 AAV 벡터 전이유전자 형질도입(전이유전자의 도입)을 증가시키거나 개선하고, 차례로 전사물 및/또는 인코딩된 단백질의 세포내 발현을 증가시키는 작용을 한다.

[0125] 빈 캡시드는 결정된 품질 및 이들의 정량으로 생성 및 정제될 수 있다. 예를 들어, 빈 캡시드 역가는 280nm 파장에서의 광밀도에 의한 분광광도계에 의해 측정될 수 있다 (문헌 [Sommer et al., Mol. Ther. 2003 Jan;7(1):122-8]을 기반으로 함).

[0126] 빈-AAV 또는 빈 캡시드는 종종 AAV 벡터 제조물에서 자연적으로 발견된다. 이러한 천연 혼합물이 본 발명에 따라 사용될 수 있거나, 요망되는 경우, 빈 캡시드 및/또는 벡터의 양을 증가시키거나 감소시키도록 조작될 수 있다. 예를 들어, 빈 캡시드의 양은 대상체에서 벡터-매개된 유전자 형질도입에 사용하고자 하는 AAV 벡터와 반응하는 항체의 억제 효과를 저하시킬 것으로 예상되는 양으로 임의로 조절될 수 있다. 빈 캡시드의 사용은 미국 공개 2014/0336245에 기술되어 있다.

[0127] 다양한 구체예에서, AAV 빈 캡시드는 AAV 벡터와 제형화되고/거나 대상체에 투여된다. 특정 양태에서, AAV 빈 캡시드는 적거나 동일한 양의 벡터 (예를 들어, 약 1.5 내지 100배 AAV 벡터 대 AAV 빈 캡시드, 또는 약 1:1 비율의 AAV 벡터 대 AAV 빈 캡시드)와 제형화된다. 기타 특정 양태에서, AAV 벡터는 과량의 AAV 빈 캡시드와 제형화된다 (예를 들어, AAV 벡터 대비 1배 초과인 AAV 빈 캡시드 예를 들어, AAV 벡터 대비 1.5 내지 100배 초과인 AAV 빈 캡시드). 선택적으로, 저 내지 음성 역가의 AAV NAb를 갖는 대상체는 더 적은 양의 빈 캡시드를 투여받을 수 있다 (AAV 벡터 대비 1 내지 10배 AAV 빈 캡시드, AAV 벡터 대비 2-6배의 AAV 빈 캡시드, 또는 AAV 벡터 대비 약 4-5배의 AAV 빈 캡시드).

[0128] 특정 구체예에 따르면, AAV 벡터를 포함하는 약학적 조성물은 4-1 캡시드 변이체 단백질(VP1, VP2 및 VP3)을 포함하는 것들을 포함하며, 조성물에서 AAV 벡터(즉, 벡터 게놈을 함유하는 것들)의 농도보다 높은 과량의 빈 캡시드를 포함한다. 빈 캡시드 대 AAV 벡터의 비율은 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0,

2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 대 1, 또는 일부 기타 비율일 수 있다.

[0129] 일부 구체예에서, 빈 캡시드는 AAV 벡터에 존재하는 동일한 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 다른 구체예에서, 빈 캡시드는 AAV 벡터에서 발견된 것과 상이한 아미노산 서열을 갖는 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 포함한다. 전형적으로, 필수적이지는 않지만, 빈 캡시드의 캡시드 단백질과 AAV 벡터의 캡시드가 서열이 동일하지 않은 경우, 이들은 동일한 혈청형일 것이다.

[0130] 일부 구체예에 따르면, 조성물은 AAV-FIX39-Padua로서 본원에 기술된 AAV 벡터 (또는 동일 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 것) 및 임의로 동일한 캡시드 단백질을 포함하는 과량의 빈 캡시드를 포함하며, 여기에서 빈 캡시드 대 AAV 벡터의 비율은 약 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6, 2.7, 2.8, 2.9, 3.0, 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8, 3.9, 4.0, 4.1, 4.2, 4.3, 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9, 6.0, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8, 6.9, 7.0, 7.1, 7.2, 7.3, 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9, 8.0, 8.1, 8.2, 8.3, 8.4, 8.5, 8.6, 8.7, 8.8, 8.9, 9.0, 9.1, 9.2, 9.3, 9.4, 9.5, 9.6, 9.7, 9.8, 9.9, 10 대 1, 또는 일부 다른 비율이다. 일부 구체예에서, AAV-FIX39-Padua 대 빈 캡시드의 조성물 중의 비는 약 1:5이다. 기타 구체예에서, AAV-FIX39-Padua 및 빈 캡시드를 포함하는 조성물은 중증, 중등증 또는 경증 혈우병 B를 포함하는 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에게 투여된다.

[0131] "선택 마커 유전자"는 발현되는 경우, 형질도입된 세포에서 항생제 내성(예를 들어, 카나마이신)과 같은 선택 가능한 표현형을 부여하는 유전자를 지칭한다. "리포터" 유전자는 검출가능한 신호를 제공하는 유전자이다. 리포터 유전자의 비제한적 예는 루시페라제 유전자이다.

[0132] 변형된 형태를 포함하는 핵산, 폴리뉴클레오타이드, 발현 벡터(예를 들어, 벡터 게놈), 플라스미드는 다양한 표준 클로닝, 재조합 DNA 기술을 이용하여, 세포 발현 또는 시험관내 번역을 통해 그리고 화학 합성 기술을 이용하여 제조될 수 있다. 폴리뉴클레오타이드의 순도는 시퀀싱, 겔 전기영동 및 기타 등등을 통해 측정될 수 있다. 예를 들어, 핵산은 하이브리다이제이션 또는 컴퓨터-기반 데이터베이스 스크리닝 기술을 이용하여 분리될 수 있다. 그러한 기술은 비제한적으로 하기를 포함한다: (1) 상동성 뉴클레오타이드 서열을 검출하기 위해 프로브와 게놈 DNA 또는 cDNA 라이브러리의 하이브리다이제이션; (2) 예를 들어, 발현 라이브러리를 사용하는, 공유 구조적 특징을 갖는 폴리펩티드를 검출하는 항체 스크리닝; (3) 관심 핵산 서열에 어닐링될 수 있는 프라이머를 사용하는 게놈 DNA 또는 cDNA상의 폴리머라제 연쇄 반응(PCR); (4) 관련 서열에 대한 서열 데이터베이스의 컴퓨터 검색; 및 (5) 감산된 핵산 라이브러리의 차별적 스크리닝.

[0133] 용어 "분리된"은 조성물의 수식어로서 사용될 때, 조성물이 사람의 손에 의해 제조되거나, 자연적으로 발생하는 생체내 환경으로부터 완전히 또는 적어도 부분적으로 분리되는 것을 의미한다. 일반적으로, 분리된 조성물에는 실질적으로, 대개 실제로는 관련되는 하나 이상의 물질, 예를 들어, 하나 이상의 단백질, 핵산, 지질, 탄수화물, 세포막이 존재하지 않는다. 용어 "분리된"은 사람의 손에 의해 생성된 조합물, 예를 들어, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 또는 벡터 게놈을 패키징하거나 캡시드화시키는 바이러스 입자, 및 약학적 조성물을 배제하지 않는다. 용어 "분리된"은 또한, 조성물의 대안적인 물리적 형태 예컨대, 하이브리드/키메라, 멀티머/올리고머, 변형(예를 들어, 포스포릴화, 글리코실화, 리피드화) 또는 유도체화된 형태, 또는 사람의 손에 의해 생성된 숙주 세포에서 발현된 형태를 배제하지 않는다.

[0134] 본 발명의 방법 및 용도는 분열 및/또는 비-분열 세포를 포함하는, 숙주 세포 내로의 이중성 폴리뉴클레오타이드 (전이유전자) 전달(형질도입)을 위한 수단을 제공한다. 본 발명의 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자, 방법, 용도 및 약학적 제형은 치료 방법으로서 핵산 또는 단백질을 이를 필요로 하는 대상체에 전달, 투여 또는 제공하는 방법에 추가적으로 유용하다. 이러한 방식으로, 핵산이 전사되고, 단백질은 대상체 생체내에서 생산될 수 있다. 대상체는 핵산 또는 단백질의 결핍증을 가지고 있기 때문에, 또는 대상체의 핵산 또는 단백질 생산이 치료 방법 또는 다른 방법으로서 일부 치료 효과를 부여할 수 있기 때문에, 대상체는 핵산 또는 단백질이 유익할 수 있거나 이를 필요로 할 수 있다.

[0135] 일반적으로, 재조합 렌티- 또는 파르보-바이러스 벡터(예를 들어, AAV) 서열, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자, 방법 및 용도는 불충분한 또는 바람직하지 않은 유전자 발현과 관련된 임의의 장애와 연관이 있는 하나

이상의 증상을 치료하거나 완화시키기 위해 생물학적 효과를 갖는 임의의 이중성 폴리뉴클레오티드(전이유전자)를 전달하는데 이용될 수 있다. 재조합 렌티- 또는 파르보-바이러스 벡터(예를 들어, AAV) 서열, 플라스미드, 벡터 계놈, 재조합 바이러스 입자, 방법 및 용도는 다양한 질환 상태에 대한 치료법을 제공하는데 이용될 수 있다.

[0136] 본 발명의 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV), 벡터 계놈, 및 재조합 바이러스 입자, 방법 및 용도는 유전자 질환의 치료를 허용한다. 일반적으로, 질환 상태는 하기 두 부류에 속한다: 일반적으로 효소의 결핍 상태로서, 일반적으로 열성 방식으로 유전되는 결핍 상태, 및 불균형 상태로서, 적어도 종종 우성 방식으로 유전되는 조절 또는 구조 단백질을 포함하는 불균형 상태. 결핍 상태 질환의 경우, 유전자 전달은 대체 요법을 위해 감염된 조직에 정상 유전자를 이동시킬 뿐만 아니라 안티센스 돌연변이를 이용하여 질병에 대한 동물 모델을 만드는 데 이용될 수 있다. 불균형의 질병 상태의 경우, 유전자 전달은 모델 시스템에서 질병 상태를 발생시키는데 이용될 수 있으며, 이는 이어서 질병 상태에 대항하기 위한 노력으로 이용될 수 있다. 결함을 교정하기 위해 핵산 서열의 부위-특이적 혼입의 사용이 또한 가능하다.

[0137] 질환 상태의 예시적인 예는 비제한적으로 하기를 포함한다: 혈액 응고 장애 예컨대, 혈우병 A, 혈우병 B, 지중해빈혈 및 빈혈.

[0138] 본 발명에 따르면, 본 발명의 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV), 벡터 계놈, 및 재조합 바이러스 입자를 포함하는 치료 방법 및 용도가 제공된다. 본 발명의 방법 및 용도는 유전자 발현 또는 기능, 예를 들어, 유전자 추가 또는 대체를 제공하거나 증가시키거나 자극하는 것에 광범위하게 적용 가능하다.

[0139] 한 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 용도는 (a) 예컨대, 벡터 또는 벡터 계놈에서 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX 예컨대, FIX를 인코딩하는 변형된 핵산을 제공하는 단계로서, 변형된 핵산 서열이 상기 서열의 전사를 부여하는 발현 조절 요소에 작동가능하게 연결되는 단계; 및 (b) 소정량의 변형된 핵산을 인자 IX가 포유동물에서 발현되도록 포유동물에 투여하는 단계를 포함한다.

[0140] 또 다른 구체예에서, 본 발명의 방법 또는 용도는, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산 (및 임의로 ITR, 인트론, 폴리A, 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열)을 포함하는 벡터 계놈을 포함하는 바이러스(예를 들어, AAV) 입자 또는 복수의 바이러스(예를 들어, AAV) 입자(예를 들어, 예컨대, 캡시드 변이체(예를 들어, 4-1))를 포유동물 또는 포유동물의 세포에 투여하여 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산을 포유동물 또는 포유동물의 세포에 전달 또는 이동시킴으로써, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX 서열을 인코딩하는 변형된 핵산을 포유동물 또는 포유동물의 세포에 전달하거나 이동시키는 것을 포함한다.

[0141] 본원에 기재된 본 발명의 방법 및 용도의 특정 양태에서, 핵산의 발현은 포유동물(예를 들어, 인간)에 치료학적 이점을 제공한다. 더욱 특정한 양태에서, 인자 IX의 발현은 포유동물(예를 들어, 인간) 예컨대, 혈우병 B를 갖는 포유동물에 치료학적 이점을 제공한다. 다양한 추가의 특정 양태에서, 필러/스터퍼 폴리뉴클레오티드 서열은, 감소된 수의 CpG 디뉴클레오티드를 갖는 FIX와 같은 인자 IX를 인코딩하는 변형된 핵산과 합쳐진 길이가 약 3.0kb-5.5kb, 또는 약 4.0kb-5.0kb, 또는 약 4.3kb-4.8kb의 전체 길이를 갖도록 벡터 서열에 포함된다.

[0142] 본 발명의 방법 및 용도는 임의의 치료학적 또는 유익한 효과를 유도하는 치료 방법을 포함한다. 다양한 본 발명의 방법 및 용도에서, 질환에 의해 초래된 또는 질환과 관련된 하나 이상의 유해한 (예를 들어, 신체) 증상, 장애, 질병, 질환 또는 합병증을 억제하거나, 감소시키거나 저하시키는 것을 추가로 포함한다. 혈우병과 같은 출혈 장애에 있어서, 치료 효과 또는 유익한 효과는 비제한적으로, 멍들 감소, 감소된 혈액 응고 시간, 감소된 출혈 에피소드(기간, 중증도, 빈도)를 포함한다. 예를 들어, 관절 또는 대뇌(뇌) 출혈 에피소드의 감소된 기간, 중증도 또는 빈도. 출혈 장애 예컨대, 혈우병에 있어서, 치료 효과 또는 유익한 효과는 또한, 비제한적으로, 보충 응고 인자 단백질(예를 들어, 인자 IX 단백질)의 감소된 투여량 또는 보충 응고 인자 단백질(예를 들어, 인자 IX 단백질)의 투여 감소를 포함한다.

[0143] 따라서, 치료의 치료 효과 또는 유익한 효과는 특정 대상체에 제공된 임의의 객관적 또는 주관적인 측정가능한 또는 검출가능한 개선 또는 이점이다. 치료 효과 또는 유익한 효과는 질환의 모든 또는 임의의 특정 해로운 증상, 장애, 질병 또는 합병증의 완전한 제거일 수 있으나 반드시 그럴 필요는 없다. 따라서, 단기간 또는 장기간(시간, 일, 주, 개월, 등)에 걸쳐, 질환에 의해 초래되거나 이와 관련된 유해한 증상, 장애, 질병 또는 합병증에서의 점진적인 개선 또는 부분적 감소가 있거나, 질환에 의해 초래되거나 이와 관련된 하나 이상의 유해한 증상, 장애, 질병, 또는 합병증의 악화 또는 진행의 억제, 감소, 저하, 저지, 예방, 제한 또는 제어가 있는 경우

만족스러운 임상적 종료점이 달성된다.

- [0144] 조성물 예컨대, 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV), 벡터 게놈, 및 벡터 게놈을 포함하는 재조합 바이러스 입자, 및 본 발명의 방법 및 용도가 이를 필요로 하는 대상체에 충분하거나 유효한 양으로 가해질 수 있다. "유효량" 또는 "충분한 양"은 단일 용량 또는 다수 용량으로 단독으로 또는 하나 이상의 다른 조성물(치료제, 예를 들어, 약물), 치료, 프로토콜, 또는 치료 요법제와 함께 임의의 기간(장기 또는 단기)의 검출 가능한 반응, 임의의 기간(예를 들어, 수분, 수시간, 수일, 수개월, 수년 동안, 또는 치유까지) 동안 또는 임의의 측정 가능하거나 검출 가능한 정도로 대상체에서의 예상되거나 요망되는 결과 또는 상기 대상체에 대한 이점을 제공하는 양을 나타낸다.
- [0145] 당업자는 단일 rAAV/벡터 용량의 투여가 충분한지의 여부 또는 다중 용량의 rAAV/벡터를 투여할지의 여부를 결정할 수 있다. 예를 들어, FIX 수준이 소정 수준 미만(예를 들어, 치료 이점을 제공하는 최소 수준 미만)으로 감소되는 경우, 당업자는 적절한 경우 추가 용량의 rAAV/벡터를 투여할지를 결정할 수 있다.
- [0146] 치료 효과를 달성하기 위한 용량, 예를 들어, 벡터 게놈/체중 킬로그램(vg/kg)의 용량은 비제한적으로 투여 경로, 치료 효과를 달성하는데 필요한 이중성 폴리뉴클레오티드 발현 수준, 치료되는 특정 질병, 바이러스 벡터에 대한 임의의 숙주 면역 반응, 이중성 폴리뉴클레오티드 또는 발현 생성물(단백질)에 대한 숙주 면역 반응, 및 발현된 단백질의 안정성을 포함하는 여러 인자를 기초로 하여 다양할 것이다. 당업자는 상기 언급된 인자 뿐만 아니라 다른 인자를 기초로 하여 특정 질환 또는 장애를 갖는 환자를 치료하기 위한 rAAV/벡터 게놈 용량 범위를 결정할 수 있다. 일반적으로, 용량은 치료 효과를 달성하기 위해 대상체의 체중 킬로그램 당 적어도 1×10^8 또는 그 초과, 예를 들어, 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} 또는 1×10^{14} 또는 그 초과의 벡터 게놈(vg/kg)의 범위일 것이다.
- [0147] 일부 구체예에서, 예를 들어, AAV-FIX39-Padua, 또는 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열 및 동일한 캡시드를 갖는 것을 포함하는 AAV 벡터의 치료학적 유효량은 혈우병 B 또는 인자 IX 활성의 기타 결핍을 갖는 대상체 예를 들어, 인간에 투여될 때 중증 혈우병 B를 중등증 또는 경증 혈우병 B로 전환시키거나 심지어 명백하게 질환-자유 상태로 유도하기에 충분한 양이다. 기타 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 혈우병 B를 갖는 인간 대상체가 인자 IX 대체 요법을 완전히 앞서거나 적절한 지혈을 유지하기 위해 대체 FIX가 투여되는 빈도를 감소시키기에 충분한 양이다. 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 인자 대체 요법은 혈우병 B에 대한 현재의 치료 표준이지만, 충분한 수준의 기능적 응고 인자를 생산하는데 있어서의 환자의 무능력을 고려한 경우, 재조합에 의해 생성된 인간 인자 IX의 빈번한 주입을 필요로 한다.
- [0148] 중증 혈우병 B는 종종 자발적으로(선행되는 외상없이) 대상체의 근육 또는 관절 내로의 빈번한 출혈(예를 들어, 주당 적어도 1회 또는 2회)을 특징으로 하는 것으로 일반적으로 받아들여진다. 건강한 인간에서 발견된 1% 미만의 FIX 활성은 중증 혈우병 B와 관련된다. 중등증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체는 중증 혈우병 B를 갖는 대상체보다 덜 빈번하게 예를 들어, 한 달에 약 1회로 출혈하지만, 수술, 외상 또는 치과 작업 후 정상보다 더 긴 시간 동안 출혈할 것으로 일반적으로 받아들여진다. 중등증의 질환을 갖는 인간 대상체는 종종 자발적으로 출혈하지 않는 것으로 일반적으로 받아들여진다. 정상의 1%-5% FIX 활성은 중등증 혈우병 B와 관련된다. 일반적으로, 경증 혈우병 B를 가진 인간 대상체는 출혈을 한다 하더라도 단지 수술이나 중증 외상으로 인해서만 과도하게 출혈한다. 일반적으로, 경증 혈우병은 정상 FIX 활성의 6%-40%와 관련이 있다. 일반적으로, 혈우병 B의 증상이 없는 건강한 것으로 여겨지는 개체는 정상 FIX 활성의 약 50% 내지 150%의 범위를 갖는다. 추가적인 정보는 문헌[Fijnvandraat, et al., Diagnosis and management of hemophilia, Br. Med. J., 344:36-40 (2012)]에서 찾아볼 수 있다.
- [0149] 인자 IX 활성은 당업자에게 공지된 다양한 방법으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 하나의 예시적인 비제한적 검정은 대상체로부터 획득된 혈장 샘플에서 FIX 응고 활성을 결정하기 위한 일-단계 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(APTT) 검정이다. FIX 활성은 국제 단위(IU)로 빈번하게 표현되는데, 여기에서 1IU는 정상 도너로부터의 1ml의 풀링된 혈장 중에 존재하는 FIX 응고 활성으로서 정의된다. 이러한 관례를 이용하여, 중증의 혈우병 B는 0.01 미만 IU/ml FIX 수준과 관련이 있으며, 중등증 질환은 0.02-0.05 IU/ml FIX 수준과 관련이 있으며, 경증 질환은 0.06-0.40 IU/ml FIX 수준과 관련이 있으며, 질환이 없는 것은 0.50-1.50 IU/ml FIX 수준과 관련이 있다.
- [0150] 당업자에 의해 인식되는 바와 같이, 인자 IX 변이체 예컨대, 야생형 인간 FIX와 비교하여 더 높은 촉매 활성을 갖는 천연 발생 FIX Padua 변이체는 "비-Padua" FIX와 비교하여 더 낮은 농도의 활성 단백질에서 주어진 수준의

FIX 활성(예를 들어, 1IU/ml)을 생성할 수 있다.

[0151] 특정 구체예에서, 예를 들어, AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 것을 포함하는 AAV 벡터의 치료학적 유효량은 중증, 중등증 또는 경증 혈우병 B를 갖는 대상체 예를 들어, 인간에 투여될 경우, 정상 FIX 활성의 약 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 또는 50%, 또는 그 초과인 혈장 FIX 활성을 달성하기에 충분한 양이다. 기타 구체예에서, 치료학적 유효량은 FIX 활성이 결여된 대상체에서 1% 또는 그 초과인 FIX 활성 예를 들어, 대상체에서 1.5-10%, 10-15%, 15-20%, 20-25%, 25-30% 또는 그 초과인 FIX 활성을 달성하는 양이다.

[0152] 혈우병 B를 갖는 대상체를 치료하는 것과 관련하여, 예를 들어, AAV-FIX39-Padua 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 것을 포함하는 AAV 벡터의 치료학적 유효량은 요망되는 치료학적 효과를 달성하기 위한, 대상체 체중 킬로그램 당 적어도 1×10^{10} 벡터 게놈 (vg) (vg/kg), 또는 약 1×10^{10} 내지 1×10^{11} vg/kg 대상체 체중, 또는 약 1×10^{11} 내지 1×10^{12} vg/kg 대상체 체중 (예를 들어, 약 1×10^{11} 내지 2×10^{11} vg/kg 또는 약 2×10^{11} 내지 3×10^{11} vg/kg 또는 약 3×10^{11} 내지 4×10^{11} vg/kg 또는 약 4×10^{11} 내지 5×10^{11} vg/kg 또는 약 5×10^{11} 내지 6×10^{11} vg/kg 또는 약 6×10^{11} 내지 7×10^{11} vg/kg 또는 약 7×10^{11} 내지 8×10^{11} vg/kg 또는 약 8×10^{11} 내지 9×10^{11} vg/kg 또는 약 9×10^{11} 내지 1×10^{12} vg/kg), 또는 약 1×10^{12} 내지 1×10^{13} vg/kg 대상체 체중일 수 있다. 추가적인 용량은 요망되는 치료 효과를 달성하기 위해 대상체의 체중 킬로그램 당 약 5×10^{10} 내지 1×10^{10} 벡터 게놈 (vg) (vg/kg)의 범위, 또는 약 1×10^{10} 내지 5×10^{11} vg/kg 대상체 체중의 범위, 또는 약 5×10^{11} 내지 1×10^{12} vg/kg 대상체 체중의 범위, 또는 약 1×10^{12} 내지 5×10^{13} vg/kg 대상체 체중의 범위일 수 있다. 또 다른 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 약 2.0×10^{11} vg/kg, 2.1×10^{11} vg/kg, 2.2×10^{11} vg/kg, 2.3×10^{11} vg/kg, 2.4×10^{11} vg/kg, 2.5×10^{11} vg/kg, 2.6×10^{11} vg/kg, 2.7×10^{11} vg/kg, 2.8×10^{11} vg/kg, 2.9×10^{11} vg/kg, 3.0×10^{11} vg/kg, 3.1×10^{11} vg/kg, 3.2×10^{11} vg/kg, 3.3×10^{11} vg/kg, 3.4×10^{11} vg/kg, 3.5×10^{11} vg/kg, 3.6×10^{11} vg/kg, 3.7×10^{11} vg/kg, 3.8×10^{11} vg/kg, 3.9×10^{11} vg/kg, 4.0×10^{11} vg/kg, 4.1×10^{11} vg/kg, 4.2×10^{11} vg/kg, 4.3×10^{11} vg/kg, 4.4×10^{11} vg/kg, 4.5×10^{11} vg/kg, 4.6×10^{11} vg/kg, 4.7×10^{11} vg/kg, 4.8×10^{11} vg/kg, 4.9×10^{11} vg/kg, 5.0×10^{11} vg/kg, 5.1×10^{11} vg/kg, 5.2×10^{11} vg/kg, 5.3×10^{11} vg/kg, 5.4×10^{11} vg/kg, 5.5×10^{11} vg/kg, 5.6×10^{11} vg/kg, 5.7×10^{11} vg/kg, 5.8×10^{11} vg/kg, 5.9×10^{11} vg/kg, 6.0×10^{11} vg/kg, 6.1×10^{11} vg/kg, 6.2×10^{11} vg/kg, 6.3×10^{11} vg/kg, 6.4×10^{11} vg/kg, 6.5×10^{11} vg/kg, 6.6×10^{11} vg/kg, 6.7×10^{11} vg/kg, 6.8×10^{11} vg/kg, 6.9×10^{11} vg/kg, 7.0×10^{11} vg/kg, 7.1×10^{11} vg/kg, 7.2×10^{11} vg/kg, 7.3×10^{11} vg/kg, 7.4×10^{11} vg/kg, 7.5×10^{11} vg/kg, 7.6×10^{11} vg/kg, 7.7×10^{11} vg/kg, 7.8×10^{11} vg/kg, 7.9×10^{11} vg/kg, 또는 8.0×10^{11} vg/kg, 또는 일부 기타 용량이다. 임의의 이들 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0153] 치료(예를 들어, 개선시키거나 치료 이점 또는 개선을 제공함)를 위한 "유효량" 또는 "충분한 양"의 용량은 전형적으로, 질병의 하나, 다수 또는 전부의 유해한 증상, 결과 또는 합병증, 예를 들어, 질병에 의해 야기되거나 질병과 관련된 하나 이상의 유해한 증상, 장애, 질환, 병리, 또는 합병증에 대한 반응을 측정 가능한 정도로 제공하기에 효과적이며, 질병의 진행 또는 악화를 감소시키거나, 축소시키거나, 저해하거나, 억제하거나, 제한하거나, 조절하는 것도 만족스러운 결과이다.

[0154] 유효량 또는 충분한 양은 단일 투여로 제공될 필요는 없으며, 다중 투여를 필요로 할 수 있고, 단독으로 또는 또 다른 조성물(예를 들어, 작용제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법과 조합하여 투여될 수 있으나, 반드시 그럴 필요는 없다. 예를 들어, 양은 대상체의 필요, 치료되는 질병의 유형, 상태 및 중증도 또는 치료의 부작용(존제시)에 의해 표시되는 것과 비례하여 증가될 수 있다. 또한, 유효량 또는 충분한 양은 제2 조성물(예를 들어, 또 다른 약물 또는 작용제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법 없이 단일 또는 다중 용량으로 제공되는 경우

효과적이거나 충분할 필요는 없는데, 왜냐하면 해당 대상체에서 효과적이거나 충분한 것으로 여겨지기 위해 추가 용량, 상기 용량을 초과하거나 상기 용량 너머의 양 또는 기간, 또는 추가의 조성물(예를 들어, 약물 또는 작용제), 치료, 프로토콜 또는 치료 요법이 포함될 수 있기 때문이다. 효과적인 것으로 여겨지는 양은 또한 응고 장애(예를 들어, 혈우병 A 또는 B)의 치료를 위한 또 다른 치료, 치료 요법 또는 프로토콜, 예를 들어, 재조합 응고 인자 단백질의 투여의 이용 감소를 발생시키는 양을 또한, 포함한다.

[0155] 유효량 또는 충분한 양은 치료되는 각각의 대상체 및 모든 대상체, 또는 해당 그룹 또는 집단 내의 치료 대상체 대부분에서 효과적일 필요는 없다. 유효량 또는 충분한 양은 그룹 또는 전체 집단이 아니라 특정 대상체에서의 유효성 또는 충분성을 의미한다. 상기 방법에 대해 통상적인 바와 같이, 일부 대상체는 해당 치료 방법 또는 용도에 대한 더 큰 반응, 또는 해당 치료 방법 또는 용도에 대한 덜한 반응 또는 반응 없음을 나타낼 것이다.

[0156] 용어 "개선시키다"는 대상체의 질병 또는 이의 증상, 또는 기초 세포 반응에서의 검출 가능하거나 측정 가능한 개선을 의미한다. 검출 가능하거나 측정 가능한 개선은 질병, 또는 질병에 의해 야기되거나 질병과 관련된 합병증의 발생, 빈도, 중증도, 진행, 또는 기간에서의 주관적 또는 객관적 감소, 축소, 저해, 억제, 제한 또는 제어, 또는 질병의 증상 또는 기초 원인 또는 결과에서의 개선, 또는 질병의 역전을 포함한다.

[0157] 따라서, 성공적인 치료 결과는 대상체에서 질환의 하나 이상의 해로운 증상 또는 기초 원인 또는 결과, 또는 질환의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간의 감소, 축소, 억제, 저지, 제한, 제어 또는 예방의 "치료학적 효과" 또는 "이익"을 유도할 수 있다. 따라서, 질환 또는 해로운 증상의 하나 이상의 근본 원인에 영향을 미치는 치료 방법 및 용도는 유익한 것으로 간주된다. 질병 또는 이의 해로운 증상을 안정화시키는 것과 같은 악화의 감소 또는 저하는 또한 성공적인 치료 결과이다.

[0158] 따라서, 치료 유익 또는 개선은 질환, 또는 질환과 관련된 임의의 하나의, 대부분의 또는 전체 해로운 증상, 합병증, 결과 또는 근본적인 원인의 완전한 제거일 필요는 없다. 따라서, 단기간 또는 장기간(시간, 일, 주, 개월, 등)에 걸쳐 대상체 질환의 점진적 개선, 또는 질환의 발생, 빈도, 중증도, 진행 또는 기간에서 부분적 감소, 저하, 억제, 저지, 제한, 제어 또는 예방, 또는 질환의 억제 또는 역전(예를 들어, 하나 이상의 증상 또는 합병증 안정화)이 있는 경우 만족스러운 종료점이 달성된다. 질환의 잠재적 치료학적 유익 또는 개선을 제공하는 치료와 같은 방법 또는 용도의 효과는 다양한 방법 예컨대, 피딩이 형성 시간 등에 의해 확인될 수 있다.

[0159] 일부 구체예에 따르면, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에 투여될 경우, 지속된 기간 동안 FIX 활성을 특정 수준을 초과하여 발생시키기에 충분한 양이다. 이들 구체예 중 일부에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 13개월, 14개월, 15개월, 16개월, 17개월, 1.5년, 2년, 2.5년 3년, 3.5년, 4년, 4.5년, 5년, 5.5년, 6년, 6.5년, 7년, 7.5년, 8년, 8.5년, 9년, 9.5년, 10년 또는 그 초과와 지속 기간 동안 혈우병 B를 가진 인간 대상체에서 적어도 1% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속 기간 동안 적어도 5% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 10% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 15% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 20% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 25% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 30% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 35% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10

년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 40% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 다른 구체예에서, AAV 벡터의 유효량은 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 또는 17개월 또는 적어도 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9, 9.5, 10년 또는 그 초과와 지속된 기간 동안 적어도 45% 정상 FIX 활성을 발생시킨다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0160] 기타 구체예에 따르면, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 중증 또는 중등증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에 투여될 경우 적어도 6개월의 지속된 기간 동안 정상적 적어도 20%, 21%, 22%, 23%, 24%, 25%, 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 또는 45%인 FIX 활성을 유도하기에 충분한 양이다. 일부 구체예에서, AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터의 유효량은 약 5.0×10^{11} vg/kg이며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율로 동일 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 투여될 수 있다.

[0161] 예를 들어, AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터를 포함하는 치료학적 유효량의 AAV 벡터를 투여한 일부 인간 대상체에서, 벡터에 기인하는 FIX 활성이 연장된 기간 (예를 들어, 수개월 또는 수년)에 걸쳐 더 이상 충분한 것으로 간주되지 않는 수준으로 감소됨을 알 수 있다 (예를 들어, 대상체가 중등증 또는 중증 혈우병 B의 증상 및/또는 FIX 활성 특징을 나타내는 경우). 이러한 환경에서, 대상체에 초기 치료에서와 동일한 유형의 AAV 벡터가 다시 투여될 수 있다. 기타 구체예에서, 특히 대상체가 초기 벡터에 대한 면역 반응을 발달시킨 경우, 환자에 표적 세포에서 FIX를 발현하나 제1 AAV 벡터와 비교하여 덜 면역반응성인 상이한 또는 변이체 혈청형의 캡시드를 갖도록 설계된 AAV 벡터가 투여될 수 있다.

[0162] 특정 구체예에 따르면, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에 투여되는 경우, 재조합 인간 인자 IX 대체 요법에 대한 대상체의 요구를 저하시키거나 심지어 제거하여 적절한 지혈을 유지하기에 충분한 양이다. 따라서, 일부 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 적절한 지혈을 유지하기 위해 중등증 또는 중증 혈우병 B를 갖는 평균 인간 대상체가 FIX 대체 요법을 필요로 하는 빈도를 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 만큼 감소시킬 수 있다. 관련 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 적절한 지혈을 유지하기 위해 중등증 또는 중증 혈우병 B를 갖는 평균 인간 대상체가 필요로 하는 재조합 인간 인자 IX의 용량을 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 만큼 감소시킬 수 있다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0163] 기타 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 중증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에 투여하는 경우 관절 내로의 자발적 출혈을 감소시키거나 심지어 제거하기에 충분한 양이다. 따라서, 일부 구체예에서, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 중증 혈우병 B를 갖는 평균의 비처리된 인간 대상체와 비교하여, 중증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체 관절 내로의 자발적 출혈의 빈도를 약 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% 또는 100% 만큼 감소시킬 수 있다. 관절 내로의 출혈은 관절의 자기 공명 영상 또는 초음파 검사, 또는 당업자에게 익숙한 다른 기술을 사용하여 검출될 수 있다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0164] 혈우병 치료를 위한 AAV 벡터를 개발하기 위한 이전의 노력은 적어도 부분적으로 그러한 것으로 여겨지긴 하지만 종래 임상 시험에서 AAV 캡시드에 대한 강력한 면역 반응 때문에 성공적이지 못하였다. (예를 들어, 문헌 [Nathwani, et al., NEJM 2011;365(25):2357-2365; and Manno, et al., Nat Med 2006;12(3):342-347] 참조.) 진행중인 임상 시험은 본원의 AAV 벡터의 특정 구체예가 중증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체에서 높은 수준의

FIX 활성을 생성할 수 있는 반면, AAV 벡터를 투여한지 6개월 후만큼 오래 면역 반응을 최소화시키거나 없앨 수 있음이 입증되었다 (실시예 5). 따라서, 특정 구체예에 따르면, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 중증 또는 중등 증 혈우병 B를 갖는 대상체에 투여할 경우, 지혈을 유지하기에 적절한 FIX 활성을 발생시키는 반면, 상당한 기간에 걸쳐 최소의 면역 반응을 일으키거나 일으키지 않는 양이다. 특정 구체예에서, 면역 반응은 선천적 면역 반응, 체액성 면역 반응, 또는 세포성 면역 반응, 또는 심지어 세 가지 모든 유형의 면역 반응일 수 있다. 일부 구체예에서, 면역 반응은 형질도입된 세포로부터 생성된 캡시드, 벡터 게놈, 및/또는 인자 IX 단백질에 대한 것일 수 있다.

[0165] 특정 구체예에 따르면, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 혈우병 B를 갖는 대상체에서 지혈을 유지하는데 적절한 FIX 활성을 유도하는 반면, 형질도입된 세포로부터 생성된 캡시드, 게놈 및/또는 인자 IX 단백질에 대한 최소의 체액성(즉, 항체) 면역 반응을 유도하거나 전혀 유도하지 않는다. 바이러스, 또는 바이러스-유사 입자 예컨대, AAV 벡터에 대한 항체 반응은 면역학 분야의 당업자에게 익숙한 기술을 사용하여 대상체의 혈청 또는 혈장에서 항체 역가를 측정함으로써 결정될 수 있다. AAV 벡터의 임의의 구성요소 예컨대, 캡시드 단백질, 또는 벡터 게놈에 의해 인코딩되고 형질도입된 세포에서 생성된 유전자 생성물 예컨대, 인자 IX Padua (또는 기타 FIX 변이체)에 대한 항체 역가는 이러한 기술을 사용하여 측정될 수 있다. 항체 역가는 항체의 존재를 검출하는데 이용되는 특정 검정에서 항체 신호가 더 이상 검출가능하지 않기 전의 희석을 나타내는 비율로서 전형적으로 표현된다. 다양한 희석 배수 예를 들어, 2배, 5배, 10배, 또는 기타 다른 희석 배수가 이용될 수 있다. 항체의 존재에 대한 임의의 적합한 검정 예를 들어, 비제한적으로, WO 2015/006743에 기술된 바와 같은 ELISA, FACS, 또는 리포터 유전자 검정이 이용될 수 있다. 당업자의 지식에 따라 기타 검정을 사용하는 것이 또한 가능하다. 항체 역가는 AAV 벡터의 초기 투여 후 다양한 시점에서 측정될 수 있다.

[0166] 특정 구체예에서, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 혈우병 B를 갖는 대상체에 AAV 벡터를 투여한 후 1주, 2주, 3주, 4주, 5주, 6주, 7주, 8주, 3개월, 4개월, 5개월, 6개월, 7개월, 8개월, 9개월, 10개월, 11개월, 12개월, 18개월, 2년, 3년, 4년, 5년 또는 그 초과 기간에 측정할 경우, 형질도입된 세포로부터 생성된 캡시드, 게놈 및/또는 인자 IX 단백질 (예컨대, FIX Padua)에 대한 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6, 1:7, 1:8, 1:9, 1:10, 1:11, 1:12, 1:13, 1:14, 1:15, 1:20, 1:30, 1:40, 1:50, 1:60, 1:70, 1:80, 1:90, 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 또는 그 초과보다 높지 않은 항체 역가를 유도하는 반면, 혈우병 B를 갖는 대상체에서 적어도 1%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 또는 그 초과 FIX 활성을 유도한다. 하나의 예시적인 비제한적 구체예에 따르면, AAV 벡터는 중증 혈우병 B를 갖는 대상체에서 적어도 20% FIX 활성을 발생시키는 반면, 1:2, 1:3, 또는 1:4 이하인 형질도입된 세포에 의해 생성된 캡시드 및/또는 인자 IX에 대한 항체 역가를 유도하는데, 이 둘 모두는 AAV 벡터가 투여된 후 6개월 후에 일어난다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0167] 상기 언급된 바와 같이, 혈우병 B에 대한 AAV-매개된 유전자 요법을 이용한 이전의 시도는 면역억제를 초래하는 고용량의 스테로이드를 필요로 하지 않으면서 상기 요법이 상당한 기간 동안 효과적이지 못하게 하는 자체-제한 면역 반응을 촉발시켰다. 중요한 인자는 연구중인 AAV 벡터로 형질도입된 간 세포를 제거하는 세포성 면역 반응인 것으로 보인다. 이러한 효과는 대상체에서 간 손상을 암시하는 간 효소의 증가 및 캡시드-특이적 T 세포의 존재 둘 모두로부터 검출가능하였다.

[0168] 특정 구체예에서, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 혈우병 B를 갖는 대상체에서 지혈을 유지하는데 적절한 FIX 활성을 발생시키는 반면, 형질도입된 세포로부터 생성된 캡시드 및/또는 인자 IX 단백질에 대한 최소의 세포성 면역 반응을 유도하거나 전혀 유도하지 않는다. 세포성 면역 반응은 적어도 2가지 방식으로 결정될 수 있다: 캡시드 단백질 또는 인자 IX에 대해 특이적인 T 세포 활성을 검정, 및 간세포에 대한 손상을 나타내는 증가된 간 효소 수준의 존재에 대한 평가.

[0169] 일부 구체예에서, 세포성 면역 반응은 형질도입된 간 세포에 의해 생성된 캡시드 단백질 및/또는 인자 IX 단백질에 특이적인 T 세포 활성을 검정함으로써 결정된다. T 세포 반응에 대한 다양한 검정은 당업계에 공지되어 있다. 하나의 예시적인 비제한적 구체예에서, T 세포 반응은 혈우병 B를 치료하기 위한 AAV 벡터로 이전에 처리된 대상체로부터의 말초혈 단핵 세포(PBMC)를 수집함으로써 결정된다. 그 후, 세포는 벡터에 사용된 VP1 캡시드 단백질 및/또는 형질도입된 간 세포에 의해 생성된 인자 IX 단백질 예컨대, FIX Padua로부터 유래된 펩티드와 인큐베이션된다. 캡시드 단백질 또는 인자 IX 단백질을 특이적으로 인식하는 T 세포는 자극되어 사이토카인 예컨

대, 인터페론 감마 또는 또 다른 사이토카인을 방출할 것이며, 이어서 이는 ELISPOT 검정, 또는 당업자에게 익숙한 또 다른 검정을 이용하여 검출되고 정량화될 수 있다. (예를 들어, 문헌 [Manno, et al., Nat Med 2006;12(3):342-347] 참조). T 세포 반응은 대상체에 혈우병 B를 치료하기 위한 용량의 AAV 벡터를 예를 들어, 매주, 매달, 또는 일부 다른 간격을 두고 투여하기 전 및 투여한 후의 다양한 시간에 모니터링될 수 있다. 따라서, 특정 구체예에 따라, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 혈우병 B를 갖는 대상체에서 지혈을 유지하기에 적절한 FIX 활성 (예를 들어, 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 또는 그 초과)의 FIX 활성)을 발생시키는 반면, AAV 벡터가 투여된 후 매주, 매달, 또는 일부 다른 간격을 두고 측정될 경우, 또는 AAV 벡터가 투여된 후 2주, 1개월, 2개월, 3개월, 6개월, 9개월, 1년, 2년, 또는 일부 상이한 시간에서 측정될 경우, 검정된 10, 20, 30, 40, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1500, 2000 또는 그 초과를 넘지 않는 1백만 PBMC 당 스팟-형성 유닛인, ELISPOT를 사용하여 측정된 T 세포 반응을 초래한다. 일부 이들 구체예에서, ELISPOT 검정은 형질도입된 간 세포에 의해 생성된 인자 IX 단백질(FIX Padua, 또는 상이한 변이체 포함) 또는 AAV 벡터 캡시드 단백질로부터의 펩티드에 의해 자극된 인터페론 감마 (또는 일부 다른 사이토카인)를 검출하도록 설계된다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 계놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0170] 형질도입된 간세포에 대한 세포성 면역 반응의 대응물로서, 정상보다 초과하는 간 효소의 존재는 표준 방법을 이용하여 검정될 수 있다. 이론에 구속되기를 바라지 않으면서, 종래 임상 시험에서 사용된 것과 같은 특정 AAV 벡터에 특이적인 T 세포는 간 효소를 순환계로 일시적으로 방출하는 형질도입된 간세포를 공격하여 사멸시킬 수 있는 것으로 여겨진다. 예시적인 간 효소는 알라닌 아미노트랜스퍼라제(ALT), 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제(AST), 및 락테이트 데하이드로게나제(LDH)를 포함하나, 간 손상을 나타내는 다른 효소가 또한 모니터링될 수 있다. 순환계에서 이들 효소의 정상 수준은 전형적으로 상위 수준을 갖는 범위로서 전형적으로 규정되는데, 효소 수준이 상기 상위 수준 위로 상승되어 간 손상의 나타내는 것으로 간주된다. 정상 범위는 검정을 수행하는 임상 실험실에 의해 사용되는 표준에 부분적으로 의존적이다. 특정 구체예에서, 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 혈우병 B를 갖는 대상체에서 지혈을 유지하기에 적절한 FIX 활성 (예를 들어, 적어도 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 또는 그 초과)의 FIX 활성)을 발생시키는 반면, AAV 벡터의 투여 후 다양한 시간 (예를 들어, 매주 또는 매달 간격으로)에서의 처리하에 동일한 대상체로부터 추출된 다중 샘플에서 측정된 가장 높은 수준에서 또는 평균에서, 이들의 각 범위의 정상상한치(ULN) 값의 0%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 600%, 700%, 800%, 900%, 1000%, 1500%, 2000%를 초과하지 않는 ALT, AST 또는 LDH의 수준과 같은 증가된 순환 간 효소 수준을 초래한다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 계놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0171] 혈우병 B를 치료하기 위한 AAV 벡터를 사용하는 이전의 임상 시험에서, 연구자들은, 치료제가 투여된 대상체가 인자 IX 단백질을 생성하는 형질도입된 세포를 제거하는 면역 반응을 증가시키는 것을 예방하기 위해 스테로이드와 같은 면역억제 약물을 공동-투여할 필요가 있었다. 그러나, 특정 AAV 벡터로 실험적으로 처리되는 대상체에서 관찰된 약화된 면역 반응으로 인해, 면역억제 약물의 공동-투여는 필요하지 않을 수 있다. 따라서, 특정 구체예에서, AAV 벡터의 치료학적 유효량은 면역억제제 약물 (예컨대, 스테로이드 또는 기타 면역억제제)의 공동-투여(전, 동시, 또는 후)를 필요로 하지 않으면서, 중증 또는 중등증 혈우병 B를 갖는 대상체에서 적절한 지혈을 유지하기에 충분한 양이다. 그러나, 모든 대상체에서 면역 반응이 예측가능한 것은 아니기 때문에, 본원의 혈우병 B 치료 방법은 면역억제제 약물과 공동-투여되는 AAV 벡터를 포함한다. 면역억제제 약물의 공동-투여는 AAV 벡터를 혈우병 B를 갖는 대상체에 투여하기 전에, 투여와 동시에 또는 그 후에 발생할 수 있다. 일부 구체예에서, 혈우병 B를 치료하기 위한 AAV 벡터를 투여한 후 수 일, 수 주, 또는 수 개월의 기간 동안 면역억제제 약물이 대상체에 투여된다. 예시적인 면역억제 약물은 스테로이드(예를 들어, 비제한적으로, 프레드니손 또는 프레드니솔론) 및 비-스테로이드 면역억제제 예컨대, 사이클로스포린, 라파마이신 및 기타 등등을 포함한다. 충분한 면역억제를 달성하기 위해 약물 용량 및 처리 시간 경과에 필요한 것은 처리되는 각 대상체에 대한 고유한 인자에 의존적일 것이나, 투여량 및 처리 시간 결정은 당업자의 기술 내에 있다. 일부 구체예에서, 면역억제제는 1회 초과로 투여될 필요가 있을 수 있다.

[0172] 특정 구체예에 따르면, 중증 또는 중등증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체 집단에 투여되는 경우 치료학적 유효량

의 AAV 벡터는 FIX 활성의 일관된 상승을 발생시킨다. 일관성은 평균 및 표준 편차(SD)와 같은 통계적 방법 또는 당업자에게 익숙한 또 다른 통계적 기술을 사용하여 인간 대상체 집단에서 반응의 가변성을 계산함으로써 결정될 수 있다. 일부 구체예에서, 중증 또는 중등증 혈우병 B를 갖는 인간 대상체 집단에 투여될 경우 치료학적 유효량의 AAV 벡터는 투여 후 3개월, 6개월, 9개월, 12개월, 15개월, 18개월, 21개월, 또는 21개월째에 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 1-5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 2.5-7.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 5-10%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 7.5-12.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 10-15%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 12.5-17.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 15-20%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 17.5-22.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 20-25%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 22.5-27.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 25-30%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 27.5-32.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 30-35%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 32.5-37.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 35-40%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 37.5-42.5%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 40-45%의 평균 FIX 활성; 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 42.5-47.5%의 평균 FIX 활성; 또는 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 또는 1 미만의 SD를 갖는 45-50%의 평균 FIX 활성을 발생시킨다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.

[0173] 본 발명의 방법 및 용도는 요망되는 치료적, 유익한, 가산적, 상승작용적 또는 상보적 활성 또는 효과를 갖는 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료제 또는 기타 치료 요법 또는 프로토콜과 조합될 수 있다. 예시적인 조합 조성물 및 치료제는 제 2의 활성제, 예컨대, 생물제제 (단백질), 제제 및 약물을 포함한다. 그러한 생물제제 (단백질), 제제, 약물, 치료제 및 요법은 본 발명의 임의의 다른 방법 또는 용도, 예를 들어, 혈액 응고 질환에 대해 대상체를 치료하는 치료 방법 전에, 실질적으로 이와 동시에 또는 그 후에 투여되거나 수행될 수 있다.

[0174] 화합물, 제제, 약물, 치료제 또는 기타 치료 요법 또는 프로토콜이 조합 조성물로서 투여될 수 있거나, 핵산, 벡터, 재조합 벡터 (예를 들어, rAAV), 벡터 게놈 또는 재조합 바이러스 입자의 전달 또는 투여와 별도로, 예컨대, 동시에 또는 연속적으로 또는 순차적으로 (전 또는 후에) 투여될 수 있다. 따라서, 본 발명은 본 발명의 방법 또는 용도가 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 임의의 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정, 치료제 또는 조성물과 병행되는 조합을 제공한다. 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정, 치료제 또는 조성물은 본 발명의 핵산, 벡터, 재조합 벡터 (예를 들어, rAAV), 벡터 게놈 또는 재조합 바이러스 입자의 대상체로의 투여 전, 실질적으로 이와 동시에 또는 그 후에 투여되거나 수행될 수 있다.

[0175] 특정 구체예에서, 조합 조성물은 하나 이상의 면역억제제를 포함한다. 특정 구체예에서, 방법은 하나 이상의 면역억제제를 포유동물에 투여하거나 전달하는 것을 포함한다. 특정 구체예에서, 조합 조성물은 AAV-FIX 입자 및 하나 이상의 면역억제제를 포함한다. 특정 구체예에서, 방법은 AAV-FIX 입자를 포유동물에 투여하거나 전달하고 면역억제제를 포유동물에 투여하는 것을 포함한다. 당업자는 하나 이상의 면역억제제와 이러한 조합 조성물 및 면역억제제의 포유동물로의 투여의 적절한 필요성 또는 시기를 결정할 수 있다.

[0176] 또한, 본 발명의 방법 및 사용은 특히 또 다른 화합물, 제제, 약물, 치료 요법, 치료 프로토콜, 과정 또는 치료제의 감소된 필요 또는 사용을 유도하는 방법 및 사용을 포함한다. 예를 들어, 혈액 응고 질병에 대해, 본 발명의 방법 또는 용도는 대상체에서 결핍되거나 결함이 있는(비정상 또는 돌연변이체) 내인성 응고 인자를 보충하기 위한 재조합 응고 인자 단백질의 투여의 덜한 빈도 또는 감소된 용량 또는 제거가 제공된 대상체에서 존재한 경우에 치료 효과를 갖는다. 따라서, 본 발명에 따르면, 또 다른 치료 또는 요법의 필요 또는 사용을 감소시키는 방법 및 용도가 제공된다.

- [0177] 본 발명은 인간을 포함하는 포유동물 및 수의학 적용에서 유용하다. 따라서, 적합한 대상체는 포유동물, 예컨대, 인간은 물론 비-인간 포유동물을 포함한다. 용어 "대상체"는 동물, 전형적으로, 포유동물, 예컨대, 인간, 비-인간 영장류 (유인원, 긴팔원숭이, 고릴라, 침팬지, 오랑우탄, 마카크 (macaque)), 애완 동물 (개 및 고양이), 가축 (가금류, 예컨대, 닭 및 오리, 말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험용 동물 (마우스, 래트, 토끼, 기니아 피그)를 지칭한다. 인간 대상체는 태아, 신생아, 유아, 청소년 및 성인 대상체를 포함한다. 대상체는 동물 질환 모델, 예를 들어, 혈액 응고 질환의 마우스 및 기타 동물 모델 및 당업자에게 공지된 기타 질환을 포함한다.
- [0178] 치료에 적합한 대상체는 기능성 유전자 생성물(단백질)이 결핍되거나 이들을 불충분한 양으로 생성하거나 그럴 위험성이 있는 대상체, 또는 질환으로 이어질 수 있는 비정상적인 부분 기능성 또는 비-기능성 유전자 생성물(단백질)을 생성하는 대상체를 포함한다. 본 발명에 따른 치료에 적합한 대상체는 또한 질환으로 이어지는 비정상 또는 결손 (돌연변이체) 유전자 생성물 (단백질)을 갖거나 이를 생성할 위험성이 있어서 비정상 또는 결손 (돌연변이체) 유전자 생성물 (단백질)의 양, 발현 또는 기능의 감소가 질환 치료를 유도하거나 하나 이상의 증상을 감소시키거나 질환을 완화시키는 대상체를 포함한다. 따라서, 표적 대상체는 혈우병(예를 들어, 혈우병 B)과 같은 혈액 응고 인자 생성이 비정상적이거나, 불충분하거나, 결여된 대상체를 포함한다.
- [0179] 본 발명에 따른 치료에 적합한 대상체는 보충 단백질(예를 들어, 혈우병을 치료하기 위한 재조합 혈액 응고 인자 예컨대, FIX)로 이전에 또는 현재 치료된 대상체를 추가로 포함한다. 본 발명에 따른 치료에 적합한 대상체는 또한, FIX 단백질에 대해 실질적인 또는 검출가능한 면역 반응, 또는 FIX 기반 유전자 요법을 방해하거나 차단하는 FIX 단백질에 대한 억제 항체의 양에 영향을 주지 않는 대상체를 포함한다.
- [0180] 기타 구체예에서, 혈우병 B(예를 들어, 유전형)를 가지나 혈우병 B의 증상 어느 것도 아직 나타내지 않는 인간 소아 대상체는 AAV 벡터로 예방적으로 치료되어, 임의의 이러한 증상이 제1 장소에서 발생하거나 기타 구체예에서, 이들이 다른 치료가 없을 때처럼 심각해지는 것을 예방할 수 있다. 일부 구체예에서, 이러한 방식으로 예방적으로 치료된 인간 대상체는, 이들에 AAV 벡터를 투여하여 지혈을 유지하는데 적합한 FIX 활성을 생성하고 유지시켜, 혈우병 B의 하나 이상의 증상의 중증도를 예방하거나 감소시킬 때, 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18개월령 또는 그 초과이다. 이들 구체예 중 임의의 구체예에서, AAV 벡터는 AAV-FIX39-Padua, 또는 동일한 캡시드 및 이와 적어도 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일한 게놈 서열을 갖는 AAV 벡터일 수 있으며, 이는 단독으로 또는 약 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1, 7:1, 8:1, 9:1, 10:1, 또는 일부 다른 비율의 빈 캡시드 대 벡터 비율의 동일한 캡시드 유형의 빈 캡시드와 함께 약학적으로 허용되는 조성물로 대상체에 투여될 수 있다.
- [0181] 대상체로의 투여 또는 생체내 전달은 질환에 의해 초래되거나 질환과 관련된 해로운 증상, 병태, 합병증 등의 발달 전에 수행될 수 있다. 예를 들어, 스크린 (예를 들어, 유전학용)은 본 발명의 조성물, 방법 및 용도를 위한 후보로서 이러한 대상체를 확인하는데 이용될 수 있다. 따라서, 이러한 대상체는 기능성 유전자 생성물(단백질)에서 불충분한 양 또는 결핍에 대해 양성으로 스크리닝된 대상체, 또는 비정상적인 부분적 기능성 또는 비기능성 유전자 생성물(단백질)을 생성시키는 대상체를 포함한다.
- [0182] 본 발명의 방법 및 용도는 전신적, 영역적 또는 국소적, 또는 임의의 경로에 의한, 예를 들어, 주사 또는 주입에 의한 전달 및 투여를 포함한다. 이러한 전달 및 투여는 비경구, 예를 들어, 혈관내, 정맥내, 근육내, 복강내, 피내, 피하 또는 점막경유를 포함한다. 예시적인 투여 및 전달 경로는 정맥내 (i.v.), 복강내 (i.p.), 동맥내, 피하, 흉막내, 삼관내, 폐내, 공동내, 이온삼투압, 기관내, 흉강내를 포함한다.
- [0183] 대안적으로 또는 부가적으로, AAV 벡터는 간문맥을 통해 간에 전달될 수 있다. 또 다른 대안에서, 대퇴동맥내로 도입되는 카테터는 간동맥을 통해 간으로 AAV 벡터를 전달하는데 사용될 수 있다. 내시경역행담채관조영 (ERCP)과 같이 비외과적 수단이 또한, AAV 벡터를 간으로 직접 전달함으로써 혈류 및 AAV 중화 항체를 우회하는데 사용될 수 있다. 기타 관 시스템, 예컨대, 턴밀샘의 관이 또한 이미 존재하는 항-AVV 항체를 갖거나 이를 발달시키는 대상체로 AAV 벡터를 전달하기 위한 문으로서 사용될 수 있다.
- [0184] 용량은 다양할 수 있고, 치료가 유도되는 질병의 유형, 발생, 진행, 중증도, 빈도, 기간, 또는 가능성, 요망되는 임상 중점, 이전 또는 동시 치료, 대상체의 전반적 건강, 연령, 성별, 인종 또는 면역학적 능력 및 당업자에 의해 인지될 다른 인자에 좌우된다. 치료 또는 요법의 임의의 유해한 부작용, 합병증 또는 다른 위험 인자 및 대상체의 상태에 의해 나타내는 바에 따라 용량, 수, 빈도 또는 기간이 비례적으로 증가되거나 감소될 수 있다. 당업자는 치료적 또는 예방적 이점을 제공하기에 충분한 양을 제공하는데 필요한 투여량 및 시기에 영향을 미칠

수 있는 인자를 인지할 것이다.

- [0185] 본원에 기재된 바와 같은 본 발명의 방법 및 용도는 대상체가 치료에 표적화된 질환을 갖는 것으로 확인되거나, 질환의 하나 이상의 증상을 갖거나, 심지어 대상체가 질환의 하나 이상의 증상을 갖지 않더라도 본원에 기재된 바와 같이 스크리닝되고 양성으로서 확인된 후 1-2, 2-4, 4-12, 12-24 또는 24-72 시간내에 실시될 수 있다. 물론, 본 발명의 방법 및 용도는 치료에 표적화된 질환을 갖는 것으로 확인되거나, 질환의 하나 이상의 증상을 갖거나, 본원에서 기재된 바와 같이 스크리닝되고 양성으로서 확인된 후 1-7, 7-14, 14-21, 21-48 또는 그 초과일, 개월 또는 년째에 실시될 수 있다.
- [0186] 본 발명의 핵산, 벡터, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV), 벡터 게놈 및 재조합 바이러스 입자 및 기타 조성물, 제제, 약물, 생물제제(단백질)이 약학적 조성물 예를 들어, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제 내로 혼입될 수 있다. 이러한 약학적 조성물은 특히, 생체내 또는 생체외에서 대상체로의 투여 및 전달에 유용하다.
- [0187] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는"은 투여, 생체 내 전달 또는 접촉 중 하나 이상의 경로에 적합한 생물학적으로 허용되는 제형, 기체, 액체 또는 고체, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "약학적으로 허용되는" 또는 "생리학적으로 허용되는" 조성물은 생물학적으로 또는 다르게 바람직한 물질이며, 예를 들어, 상기 물질은 실질적인 바람직하지 않은 생물학적 효과를 야기시키지 않고 대상체에 투여될 수 있다. 따라서, 상기 약학적 조성물은, 예를 들어, 대상체로 바이러스 벡터 또는 바이러스 입자를 투여하는데 사용될 수 있다.
- [0188] 이러한 조성물은 약학적 투여 또는 생체 내 접촉 또는 전달과 양립되는 용매(수성 또는 비수성), 용액(수성 또는 비수성), 에멀전(예를 들어, 수중유 또는 유중수), 현탁액, 시럽, 엘릭서, 분산액 및 현탁 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 촉진 또는 지연 작용제를 포함한다. 수성 및 비수성 용매, 용액 및 현탁액은 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있다. 상기 약학적으로 허용되는 담체는 정제(코팅되거나 코팅되지 않음), 캡슐(경질 또는 연질), 마이크로비드, 분말, 과립 및 결정을 포함한다. 보조 활성 화합물(예를 들어, 보존제, 항박테리아제, 항바이러스제 및 항진균제)이 또한 조성물에 혼입될 수 있다.
- [0189] 약학적 조성물은 본원에 기재되거나 당업자에게 공지된 투여 또는 전달의 특정 경로와 양립되도록 제형화될 수 있다. 따라서, 약학적 조성물은 다양한 경로에 의한 투여에 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함한다.
- [0190] 비경구 투여에 적합한 조성물은 활성 화합물의 수성 및 비수성 용액, 현탁액 또는 에멀전을 포함하며, 여기서 제조물은 전형적으로 멸균 제조물이며, 의도된 수용자의 혈액과 등장성이 될 수 있다. 비제한적인 예시적인 예는 물, 염수, 텍스트로스, 프록토스, 에탄올, 동물성, 식물성 또는 합성 오일을 포함한다.
- [0191] 공용매 및 애쥬번트가 제형에 첨가될 수 있다. 공용매의 비제한적인 예는 하이드록실기 또는 다른 극성 기, 예를 들어, 알코올, 에컨대, 이소프로필 알코올; 글리콜, 에컨대, 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌 글리콜, 글리콜 에테르; 글리세롤; 폴리옥시에틸렌 알코올 및 폴리옥시에틸렌 지방산 에스테르를 함유한다. 애쥬번트는, 예를 들어, 계면활성제, 에컨대, 콩 레시틴 및 올레산; 소르비탄 에스테르, 예를 들어, 소르비탄 트리올레에이트; 및 폴리비닐피롤리돈을 포함한다.
- [0192] 본 발명의 조성물, 방법 및 용도에 적합한 약학적 조성물 및 전달 시스템은 당 분야에 공지되어 있다(예를 들어, [Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack PublishingCo., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack PublishingCo., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technomic PublishingCo., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; 및 Poznansky et al., Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315 참조).
- [0193] 본원에 사용된 바와 같은 "단위 투여량 형태"는 치료하고자 하는 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적당한 물리적으로 구분된 단위를 지칭하고; 각각의 단위는, 임의로, 하나 이상의 용량으로 투여되는 경우에 요망되는 효과(예를 들어, 예방 또는 치료 효과)를 생성시키도록 계산된 약학적 담체 (부형제, 희석제, 비히클 또는 충전제)와 함께 소정량을 함유한다. 단위 투여량 형태는, 예를 들어, 냉동-건조된 또는 동결건조된 상태의 조성물 또는 액체 조성물을 포함할 수 있는 앰플 및 바이알내에 있을 수 있으며; 예를 들어, 멸균 액체 담체는 생체내 투여 또는 전달 전에 첨가될 수 있다. 개별 단위 투여량 형태는 다중-용량 키트 또는 컨테이너내에 포함될 수 있다. 따라서, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 벡터 게놈, 재조합 바이러스 입자, 및 이의 약학적 조성물은 투약의 용이성 및 균일성을 위해 단일 또는 다중 단위 투여량 형태로 패키징될 수 있다.

- [0194] 본 발명은 패키징 물질 및 내포된 하나 이상의 성분들을 갖는 키트를 제공한다. 키트는 전형적으로, 성분들의 설명 또는 내포된 성분들의 시험관내, 생체내 또는 생체의 사용을 위한 설명서를 포함하는 라벨 또는 패키징 삽입물을 포함한다. 키트는 그러한 성분들, 예를 들어, 핵산, 재조합 벡터, 바이러스 (예를 들어, AAV) 벡터, 벡터 게놈 또는 바이러스 입자 및 임의로 제2 활성제, 예컨대, 또 다른 화합물, 제제, 약물 또는 조성물의 수집물을 함유할 수 있다.
- [0195] 키트는 키트의 하나 이상의 성분들을 수용한 물리적 구조물을 지칭한다. 패키징 물질은 성분들을 멸균으로 유지시킬 수 있으며, 이러한 목적을 위해 흔히 사용되는 재료 (예를 들어, 종이, 골판지, 유리, 플라스틱, 호일, 애플, 바이알, 튜브 등)로 제조될 수 있다.
- [0196] 라벨 또는 삽입물은 내포된 하나 이상의 성분들의 식별 정보, 용량, 작용 메커니즘을 포함하는 활성 구성성분(들)의 임상적 약리학, 약동학 및 약역학을 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체, 로트 번호, 제조 장소 및 날짜 즉, 유통 기한을 확인시켜주는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜를 확인시켜주는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 키트 성분이 사용될 수 있는 질환에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 방법, 용도, 또는 치료 프로토콜 또는 치료 요법에서 키트 성분들중 하나 이상을 사용하기 위한 임상의 또는 대상체를 위해 설명서를 포함할 수 있다. 설명서는 본원에 기술된 방법, 용도, 치료 프로토콜 또는 예방 또는 치료 요법중 임의의 것을 실행하기 위한 설명, 투여량, 빈도 또는 기간을 포함할 수 있다.
- [0197] 라벨 또는 삽입물은 예방 또는 치료 이점과 같이 성분이 제공할 수 있는 임의의 이점에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 잠재적인 해로운 부작용, 합병증 또는 반응에 대한 정보, 예컨대, 특정 조성물을 사용하는데 적합하지 않을 상황에 관한 대상체 또는 임상의에 대한 경고를 포함할 수 있다. 해로운 부작용 또는 합병증은 또한, 대상체가 본 조성물과 양립가능하지 않을 수 있는 하나 이상의 다른 약제를 섭취했거나, 섭취할 예정이거나, 현재 섭취 중인 경우, 또는 대상체가 조성물과 양립가능하지 않을 또 다른 치료 프로토콜 또는 치료 요법을 받았거나, 받을 예정이거나, 현재 받는 중인 경우에 발생할 수 있으며, 따라서, 설명서는 이러한 부적합에 대한 정보를 포함할 수 있다.
- [0198] 라벨 또는 삽입물은, 성분, 키트 또는 패키징 물질 (예를 들어, 박스)에 부착되거나 분리되거나, 키트 성분을 함유하는 애플, 튜브 또는 바이알에 부착된 "인쇄된 물질" 예를 들어, 종이 또는 판지를 포함한다. 라벨 또는 삽입물은 추가적으로 컴퓨터 판독가능한 매체, 예컨대, 바-코드 인쇄된 라벨, 디스크, 광학 디스크 예컨대, CD-또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 자석 테이프, 또는 전기 저장 매체, 예컨대, RAM 및 ROM, 또는 이들의 혼성체, 예컨대, 자석/광 저장 매체, FLASH 매체 또는 메모리 타입 카드를 포함할 수 있다.
- [0199] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속한 당해 기술분야의 통상의 기술을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 의미와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 방법 및 재료와 유사하거나 동일한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 이용될 수 있으나, 적합한 방법들 및 재료들이 본원에 기술되어 있다.
- [0200] 본원에 인용된 모든 출원, 공개, 특허, 및 기타 참조문헌, GenBank 인용 및 ATCC 인용은 이들의 전체가 참조로 통합된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 기준이 될 것이다.
- [0201] 본원에 개시된 특징들 모두는 임의의 조합으로 조합될 수 있다. 본 명세서에 개시된 각 특징은 동일하거나, 동등하거나, 유사한 목적으로 작용하는 대안적인 특징에 의해 대체될 수 있다. 이와 같이, 달리 명확히 명시되지 않는 한, 개시된 특징들 (예를 들어, 변형된 핵산, 벡터, 플라스미드, 재조합 벡터(예를 들어, rAAV) 서열, 벡터 게놈, 또는 재조합 바이러스 입자)은 동등하거나 유사한 부류의 특징들의 예이다.
- [0202] 본원에 사용되는 단수 형태는 문맥에서 달리 분명하게 지시되지 않는 한 복수의 대상을 포함한다. 따라서, 예를 들어, "핵산"에 대한 언급은 복수의 그러한 핵산들을 포함하며, "벡터"에 대한 언급은 복수의 그러한 벡터들을 포함하며, "바이러스" 또는 "입자"에 대한 언급은 복수의 그러한 비리온들/입자들을 포함한다.
- [0203] 본원에 사용되는 모든 수치 값 또는 수치 범위는 달리 문맥에서 분명하게 지시되지 않는 한 그러한 범위 내의 정수 및 범위 내의 값 또는 정수의 소수를 포함한다. 따라서, 예시하자면, 80% 이상의 동일성에 대한 언급은 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94% 등뿐만 아니라 81.1%, 81.2%, 81.3%, 81.4%, 81.5% 등, 82.1%, 82.2%, 82.3%, 82.4%, 82.5% 등, 및 기타 등등을 포함한다.
- [0204] 초과 (이상) 또는 미만을 갖는 정수에 대한 언급은 각각 언급된 수보다 큰 또는 작은 임의의 수를 포함한다. 따

라서, 예를 들어, 100 미만에 대한 언급은 99, 98, 97 등, 숫자 일 (1)까지 낮은 모든 수를 포함하며; 10 미만은 9, 8, 7 등등, 숫자 일 (1)까지 낮은 모든 수를 포함한다.

[0205] 본원에 사용되는 모든 수치 값 또는 범위는 달리 문맥에서 분명하게 지시되지 않는 한 그러한 범위 내의 값 및 정수의 소수 및 그러한 범위 내의 정수의 소수를 포함한다. 따라서, 예시하자면, 수치 범위에 대한 언급, 예컨대, 1-10은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10뿐만 아니라, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 등, 및 기타 등등을 포함한다. 따라서, 1-50의 범위에 대한 언급은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 등, 및 50을 포함하는 50 이하 뿐만 아니라, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5 등, 2.1, 2.2, 2.3, 2.4, 2.5 등, 및 기타 등등을 포함한다.

[0206] 일련 범위에 대한 언급은 일련 내의 상이한 범위의 경계값을 합한 범위를 포함한다. 따라서, 예시하자면, 예를 들어, 1-10, 10-20, 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1,000, 1,000-1,500, 1,500-2,000, 2,000-2,500, 2,500-3,000, 3,000-3,500, 3,500-4,000, 4,000-4,500, 4,500-5,000, 5,500-6,000, 6,000-7,000, 7,000-8,000, 또는 8,000-9,000의 일련의 범위에 대한 언급은 10-50, 50-100, 100-1,000, 1,000-3,000, 2,000-4,000 등의 범위를 포함한다.

[0207] 본 발명은 일반적으로 다수의 구체에 및 양태를 기술하기 위해 긍정의 언어를 사용하여 본원에서 개시되었다. 또한, 본 발명은 특히 물질 또는 재료, 방법 단계 및 조건, 프로토콜 또는 절차와 같이 특정 주제가 전부 또는 일부 배제된 구체예를 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 특정 구체에 또는 양태에서, 재료 및/또는 방법 단계가 배제된다. 따라서, 본 발명에는 본 발명이 무엇을 포함하지 않는지에 대해 본원에 일반적으로 나타나지 않지만, 그럼에도 불구하고, 본 발명에 명확하게 배제되지 않은 양태들은 본원에서 개시된다.

[0208] 본 발명의 다수 구체예가 기술되어 있다. 그럼에도 불구하고, 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서 당업자는 다양한 용도 및 조건에 맞춰 본 발명의 다양한 변화 및 변형을 만들 수 있다.

[0209] 따라서, 하기 실시예는 예시하고자 의도된 것이며, 어떠한 방식으로 청구된 본 발명의 범위를 제한하려는 것이 아니다.

[0210] 실시예 1. 벡터 설계/제조

[0211] 338L Padua 변이체(Simioni P, et al., N Engl J Med 2009, 361:1671)를 갖는 높은 특이적 활성 인간 인자 IX 단백질을 인코딩하는 신규한 인자 IX 핵산을 설계하였다("FIX 39-Padua"; SEQ ID NO:10; 도 10). FIX39-Padua는 FIX 코딩 및 인트론 서열에서 CpG 디뉴클레오타이드가 완전히 제거된 것이다. 비교 시험을 위해, FIX19 (Mingozzi et al. Sci. Transl Med. 2013)를 제조하고 FIX Padua를 포함하고 FIX Padua로부터 발생하는 임의의 잠재적인 혼재 효과를 배제하도록 변형시켰다("FIX19-Padua"; SEQ ID NO:11; 도 11).

[0212] 플라스미드("pAAV-ApoE_hAAT-FIX39"; 11125 bp; SEQ ID NO: 12; 도 12a)를 합성하고, 표 2에 기재된 요소 및 FIX39-Padua 발현 카세트를 포함시켰다. PAAV-ApoE_hAAT-FIX39의 맵은 도 13에 도시되어 있다.

[0213] 표 2. pAAV-ApoE_hAAT-FIX39

5' AAV2 ITR	SEQ ID NO:13
인핸서 (간 조절 영역)	SEQ ID NO:14
hAAT 프로모터	SEQ ID NO:15
5' UTR	SEQ ID NO:16
FIX39-Padua CDS	SEQ ID NO:10 (도 10)
인트론 A	SEQ ID NO:17 (도 14)
3' UTR	SEQ ID NO:18
폴리 A	SEQ ID NO:19
3' AAV2 ITR	SEQ ID NO:20
람다 스테퍼	SEQ ID NO:21
F1 복제 기점	SEQ ID NO:22
카나마이신 내성	SEQ ID NO:23
pUC 복제 기점	SEQ ID NO:24

[0214]

- [0215] FIX39-Padua 코딩 서열 및 인트론 A의 서열은 SEQ ID NO:25 (도 15)에 제시되어 있다. FIX19-Padua CDS 및 동일한 조절 요소, 동일한 아데노-관련 역방위 말단 반복부(ITR) 및 pAAV-ApoE_hAAT-FIX39와 동일한 간-특이적 ApoE/hAAT 프로모터를 포함하는 플라스미드를 또한 합성하였다.
- [0216] AAV-FIX39-Padua("AAV-FIX39-Padua") 및 FIX19-Padua("AAV-FIX19-Padua") 전이유전자에 있어서, 삼중 형질감염 과정에 이어서 이중 세슘 클로라이드 구배 원심분리(Ayuso E, Met al., Gene Ther 2010, 17:503)를 이용하여 4-1 캡시드 변이체(SEQ ID NO:4)를 갖는 AAV 벡터를 제조하였다. 표준으로서 선형화된 플라스미드를 사용하여 정량적 PCR에 의해 벡터를 적정하였다. 실시예 3에 기술된 연구에 있어서, 벡터를 꼬리 정맥 주사를 위해 마우스 당 200 μ l의 최종 부피로 PBS, 5% 소르비톨, 0.001% F68로 희석하였다.
- [0217] 실시예 2. 시험관내 AAV 변이체 4-1 형질도입
- [0218] 시노물구스 원숭이 및 인간 기원으로부터의 일차 간세포를 루시퍼라제를 발현하는 4-1 변이체 캡시드(SEQ ID NO:4)로 세포 당 500 내지 62,500개 벡터 계능 범위의 4가지의 상이한 감염 다중도(MOI)로 형질도입하였다. 형질도입 후 72시간째에, 루시퍼라제 발현을 분석하였다. 도 16에 도시된 바와 같이, 비-인간 영장류 간세포에 비해 형질도입된 인간 간세포의 비율은 사용된 MOI에 따라 0.8 내지 1.5의 범위였다. 시험관내에서 생성된 이러한 데이터는 시노물구스 원숭이 및 인간 대상체에서 응고 인자 IX의 발현과 비교할 경우 생체내에서의 이전 관찰과 일관되는 것으로 보인다.
- [0219] 실시예 3. 효능 연구
- [0220] 마우스에서 AAV-FIX39-Padua 대 AAV-FIX19-Padua의 효능을 평가하기 위한 연구를 수행하였다. 1×10^{11} 또는 1×10^{12} vg/kg의 AAV-FIX39-Padua 및 AAV-FIX19-Padua를 8-10주령의 5마리 마우스 군에 주입하였다. 벡터 투여 후, 해파린 처리된 모세관을 사용하여 눈뒤 출혈에 의해 혈액을 수집하였다; 혈장을 4℃에서 10분간 9000 rpm으로 원심분리에 의해 분리하고 분석할 때까지 -80℃에서 냉동 보관하였다.
- [0221] 수집된 혈장을 사용하여 hFIX 전이유전자 발현을 평가하였다. 혈장 중 인간 FIX 수준은 ELISA 키트를 사용하여 측정하였다(Affinity Biologicals, Ancaster, ON, Canada).
- [0222] 인간 FIX의 활성 수준을 활성화된 부분 트롬보플라스틴 시간(aPTT) 검정에 의해 측정하였다. 샘플 혈장을 인간 FIX-결핍 혈장(George King Biomedical, Inc) 및 aPTT 시약(Trinity Biotech)과 1:1:1 부피-비율로 혼합하고, 이어서 37℃에서 180s 인큐베이션 기간을 통해 aPTT 검정을 수행하였다. 25mM 칼슘 클로라이드를 첨가하여 응고를 시작하였다. 응고 형성 시간은 STart4 응고 도구(Diagnostica Stago)를 사용하여 측정하였다. TBS pH 7.4 (48 μ l + 192 μ l) 중의 1:5 희석에서 시작하여 이어서 1:2 연속 희석 (120 μ l + 120 μ l)하여 George King으로부터의 풀링된 정상 혈장으로 표준 곡선을 생성하였다. 인간 표준 곡선을 사용하여 벡터 투여 후 17주에 각 샘플의 활성을 계산하였다; 2개의 미처리된 마우스 중의 활성을 또한 측정하였다. 미처리된 마우스의 FIX 활성을 평균화한 다음, 처리된 샘플로부터 감산하여 FIX Padua 단백질로 인한 여분의(즉, 인간) 활성을 계산하였다.
- [0223] 도 17에 도시된 바와 같이, AAV-FIX39-Padua 및 AAV-FIX19-Padua는 실질적으로 동등한 수준의 FIX를 발현하는 것으로 보인다.
- [0224] 벡터 투여 후 17주째에, 인간 FIX 활성을 1×10^{12} vg/kg의 벡터 용량으로 처리된 마우스에서 측정하였다. FIX19-Padua 및 FIX39-Padua 군 둘 모두에 있어서 활성-대-항원 비율은 5.2 내지 7.5의 범위이며, 평균 값은 6.4이다 (표 3).

표 3. 인간 FIX 활성 값

동물 ID	항원 (정상의 %)	활성 (정상의 %)	비율
01 – FIX19	53.9	352.7	6.5
02 – FIX19	95.6	631.8	6.6
03 – FIX19	120.6	882.3	7.3
04 – FIX19	132.9	797.1	6.0
05 – FIX19	105.2	599.7	5.7
06 – FIX39	163.1	1092.8	6.7
07 – FIX39	108.2	670.3	6.2
08 – FIX39	121.1	781.2	6.4
09 – FIX39	152.3	1147.8	7.5
10 – FIX39	134.1	702.1	5.2
평균			
	항원 (정상의 %)	활성 (정상의 %)	비율
AAV-FIX19-Padua	101.7	652.7	6.4
AAV-FIX39-Padua	135.8	878.8	6.4

이러한 결과는 두 발현 카세트 모두의 효능이 실질적으로 유사함을 암시하지만, 두 작제물을 또한 플라스미드 유체역학적 꼬리 정맥 주입의 설정하에 분석하였다. 네이키드 DNA의 생체내 투여에서 유도된 FIX 수준을 평가하기 위한 이론적 근거는 AAV 역가화, 벡터 제작, 등의 차이의 잠재적 간섭 없이 두 발현 카세트 모두를 비교하는 것이었다.

도 18에 도시된 바와 같이, 두 네이키드 발현 카세트 모두는 FIX 발현을 유도하는데 있어서 동등한 효능이 있으며, 이는 AAV 설정에서 획득된 데이터를 확인시켜준다. 이러한 결과는 FIX19-Padua 및 FIX39-Padua 발현 카세트가 유사한 효능을 가짐을 나타낸다.

*실시예 4. AAV-FIX39-Padua 유전자 요법

AAV-FIX39-Padua의 단일 IV 주입의 안전성과 동역학을 결정하기 위해 임상 연구를 수행하고 있다. 사용된 AAV 4-1 캡시드 변이체는 양호한 안전성 및 효능, 벡터 주입 3개월 후 1×10^{12} vg/kg으로 ~35%의 NHP 중의 지속적인 FIX 활성 수준을 달성하는 능력을 갖는 것으로 전임상 연구에서 입증되었으며; AAV 4-1 캡시드 변이체에 대한 중화 항체(Ab)를 교차 반응시키는 것은 AAV8보다 약 10% 덜 흔하다. 연구 설계는 표 4에 제공되어 있다.

[0232] 표 4. AAV-FIX39-Padua 임상 연구 설계

AAVFIX39-Padua 의 안전성 및 내구성	기준으로부터의 생체 신호, 실험실 값 및 임상 평가 (출혈 횟수 및 QoL 포함)가 임상적으로 유의함
AAVFIX39-Padua 의 운동성	피크에서의 전이유전자 FIX 활성 수준 및 항원 수준
정상-상태	
투약	시작, 중간 및 최고 투여량 집단은 각각 2-5 명의 대상체를 포함할 것임
설계	공개-라벨, 비-무작위, 용량 확대
참가국	미국 및 잠재적으로, 유럽, 일본 및 캐나다
샘플 크기	15 명 이하의 대상체
적격성	연구에 적절한 연령: 18 세 이상
	연구에 적절한 성별: 남성
	건강한 지원자 허용: 아니요
포함 기준	정보에 입각하여 동의하고 연구 요구사항을 준수할 수 있음
	혈우병 B(≤ 2 IU/dL 또는 $\leq 2\%$ 내인성 인자 IX) 진단이 확인된 18 세 이상의 남성
	인자 IX 생성물에 50 일 이상의 노출일 동안 수용
	인자 IX 주입의 일회적 치료 또는 예방적 인자 IX 주입을 필요로 하는 연간 평균 최소 4 회 출혈 사건
	중앙 실험실에서 평가한 측정가능한 인자 IX 억제제는 없으며, 인자 IX 단백질에 대한 억제제의 과거력이 없음
	3 연속 샘플이 백터 서열에 대해 음성이 될 때까지 신뢰할 수 있는 배리어 피임 사용에 동의함
제외 기준	활성 B형 또는 C형 감염의 증거
	현재 B형 또는 C형 감염에 대한 항바이러스 요법중인 자
	현재한 잠재적 간 질환을 갖는 자
	CD4 카운트가 200/mm ³ 이하인 HIV-1 또는 HIV-2 의 혈청학적 증거*를 가짐(*HIV+이며, 200/mm ³ 초과와 CD4 카운트 및 검출불가능한 바이러스 로드를 갖는 안정한 대상체는 참여 자격이 있음)
	4-1 변이체 AAV 캡시드(SEQ ID NO:4)와 반응성인 검출가능한 항체를 가짐

[0233]

	지난 52 주 이내에 유전자 전이 시험 또는 지난 12 주 이내에 임상 약물 시험에 참여
	학습 평가를 수행할 수 없거나 따르지 못함
선별 방문	적격성 평가
	AAV NAb 역가는 주요 선별 실패이다(전화 선별을 위한 CHOP 의 AAV NAb 역가 프로토콜로 대상체가 조화하는 것을 강력 추천)
0 일째 방문	FIX 생성물 증분 회수 후 백터 주입
후속 방문 (~17 회 방문)	안전성 및 운동 평가
연구 마지막 방문(52 주째)	최종 안전성 평가

[0234]

[0235] 실시예 5. 임상 결과

[0236] 혈우병 B를 갖는 4명의 대상체에 AAV-FIX39-Padua 백터를 단일 IV 주입 투여하였다. 각각 23세 및 18세의 첫 번

제 두 대상체는 간 질환에 대한 병력이 없으며, 47세의 세 번째 대상체는 HCV 감염 병력은 있으나 자발적으로 치료되었다. 모두 4명의 대상체를 신규한 AAV 캡시드에 대한 중화 항체에 대해 스크리닝하였으며 음성인 것으로 밝혀졌다.

- [0237] 대상체 정맥내로 ~1시간의 기간에 걸쳐 5×10^{11} vg/kg의 AAV-FIX39-Padua 벡터를 주입하였다. 각 대상체에 투여된 총 AAV-FIX39-Padua 벡터는 도 20-23에 도시되어 있으며, 이는 지시된 양의 AAV 빈 캡시드와 조합되었다.
- [0238] 도 19-23은 0일에 투여된 AAV-FIX39-Padua 벡터로의 연구 결과를 보여준다. 결과는 연구 평가 기간 전반에 걸쳐 증가된 FIX 활성에 의해 반영되는 바와 같이, 모두 4명의 대상체에서 증가된 인자 IX 생산을 보여준다.
- [0239] 0일부터 약 3일까지의 FIX 활성의 초기 증가는 100 IU/Kg AlprolixTM 또는 BeneFIXTM의 투여로 인한 것이며, 이들은 약 82시간의 대략적 반감기를 갖는 재조합 FIX-Fc 융합 단백질이다. AAV-FIX39 Padua 벡터에 기인하는 인자 IX 활성은 AAV 벡터 주입 후 약 6-8일에 시작된다.
- [0240] 도 19에 요약되고, 도 20, 21a, 22a 및 23a에 각 개별 대상체에 대해 도시된 바와 같이, 인자 IX 활성은 대상체 4명 모두에 대한 183, 102, 69 및 50일 평가 전반에 걸쳐 점차적으로 증가하고 안정적인 것으로 나타났다. 이들 데이터는 5×10^{11} vg/kg의 AAV-FIX39-Padua 벡터 단일 주입이 현저하고 지속된 인자 IX 생산 및 활성을 발생시켜 혈우병 B 환자에게 지혈을 제공하는 의미 있고 유익한 혈액 응고 활성을 제공함을 나타낸다.
- [0241] 도 19, 20a, 21a, 22a 및 23a에 도시된 바와 같이, 인자 IX 활성 수준은 주입 후 183, 102, 69 및 50일에서 대상체 1-4에 있어서 각각 정상의 28%, 41%, 26% 및 33%이었다. 대상체 #3은 벡터 주입 후 2일째에 의심되는 발목 출혈에 대해 연장된 반감기 생성물로 스스로 처리하고; 이를 제외하고는 평가 기간 동안 인자를 주입하지 않았으며 출혈도 없었다.
- [0242] 면역억제제(스테로이드)는 어떠한 대상체에도 투여하지 않았다. 또한, 일반적으로, 정상의 상한치를 초과하는 트랜스아미나제의 지속적인 상승은 없었으며, 이는 치료의 부작용이 없음을 나타낸다 (도 20b, 21b, 22b 및 23).
- [0243] ELISPOT를 사용하여 4명 모두의 대상체에서 AAV 및 FIX에 대한 T 세포 반응을 모니터링하였으며, 반응을 전혀 보이지 않거나 매우 낮은 반응을 보였다. 주목할 것은, 인자 IX 수준이 플래토 수준으로 증가하는 시간 경과는 현재까지 상당히 일관되었다 (도 19). 항원 수준에서의 완만한 변동은, 인자 IX Padua 변이체의 특이적 활성에서의 8배 증가를 고려할 때 활성 수준에서의 더 큰 이동으로 이어진다.
- [0244] 공개된 데이터(Nathwani et al., N Engl J Med. 371(21):1994-2004 (2014))는 야생형 인자 IX를 발현하는 AAV8 벡터가 주입된 혈우병 B를 갖는 남성에서 인자 IX의 장기간 발현을 보여주었다. 그러나, 발현 수준은 가장 낮은 용량(2×10^{11} 벡터 게놈 [vg]/kg 체중)에서 정상의 1.4%-2.2% 내지 가장 높은 용량(2×10^{12} vg/kg)에서 2.9-7.2%의 낮은 범위였다. 또한, 가장 높은 용량으로 주입된 4/6명의 대상체는 가장 높은 용량과 관련된 트랜스아미나제 증가를 감소시키기 위해 면역억제제(프레드니솔론) 과정을 필요로 한다 (그러나, 2×10^{11} 또는 6×10^{11} vg/kg의 더 낮은 용량에서는 관찰되지 않음). 혈우병 환자의 자연 병력 연구로부터의 데이터는 ~12% FIX의 순환 수준이 연간 자발적 관절 출혈 수를 0으로 감소시키는데 필요함을 시사한다 (den Uijl et al., Haemophilia 17(1):41-4 (2011)).
- [0245] 이들은 높은 특이적 활성 인자 IX 전이유전자를 발현하는 신규한 생물공학처리된 AAV 캡시드를 사용한 첫 번째 임상 결과이다. 대상체 1-4에서 관찰된 정상의 28%, 41%, 26% 및 33%의 인자 IX 활성 수준은 공개된 데이터를 기반으로 하여 종래 연구에서 관찰된 것보다 순환 인자 IX 수준이 실질적으로 더 크며, 연간 자발적 관절 출혈 수를 0으로 감소시키는데 필요한 순환 인자 IX 수준을 초과한다.
- [0246] 게다가, 본 연구에서 관찰된 실질적인 인자 IX 활성 수준은 벡터 주입부터 재조합 인자 IX 사용 없이 그리고, 면역억제제(스테로이드) 사용 없이 달성되었다. 이들 결과는 낮은 용량의 AAV 벡터 투여에서 높은 수준의 응고 인자 발현을 유도할 수 있어 면역억제제를 필요로 하지 않는 AAV-FIX의 발달을 보여준다 - 간-유도 유전자 요법에 대한 중요한 목적. 이러한 연구에서 관찰된 인자 IX 활성 수준은 연구 기간에 걸쳐 유지되었다.
- [0247] 실시예 6. AAV-FIX39-Padua 벡터의 감소된 면역원성
- [0248] 현재 Phase I/II 연구에서, 5×10^{11} vg/kg의 AAV-FIX39-Padua를 투여한 4명의 대상체를 입증된 인터페론 감마 (IFN- γ) 효소 결합 면역스팟(Enzyme Linked Immunospot:ELISPOT) 검정을 이용하여 AAV 벡터에 대한 잠재적 면

역 반응에 대해 모니터링하였다. 매주 혈액 추출로부터 분리된 정제된 PBMC를 인터페론 감마 ELISPOT 검정을 통해 평가하였다. 24-25개 펩티드를 각각 함유하는 6개의 AAV 캡시드 펩티드 풀을 삼중으로 2e5 세포와 인큐베이션하였다. IFN- γ 에 대한 바이오티닐화된 항체 이어서 비색 현상을 이용하여 T 세포 반응을 검출하고 백만 세포당 스팟-형성 유닛(SFU)으로서 보고하였다. 각 시점에서 가장 높은 반응 풀은 SFU/백만 세포로 표시하였다. 확실성을 위해 역사적으로 사용된 컷오프는 >50 SFU 및 3배 배경(청색선)이다. 대상체 840-003-001, 840-001-002, 840-001-004, 및 840-001-005(흑색으로 표시)는 각각 26, 14, 11 및 8주만큼 멀리 떨어져있다. 1e12 vg/kg의 AAV8-FIX19 벡터를 투여받은 2명의 대상체 CP-16 및 PT17, 및 2e12 vg/kg의 AAV8-FIX19를 투여받은 1명의 대상체에서 이전 실험으로부터의 ELISPOT 결과는 적색으로 표시하였다.

[0249]

양성 T 세포 반응에 대한 기준으로서 역사적으로 허용되는 >50 SFU 값 및 3배 배경(배지) 조정을 사용한 경우, 주입 후 26주까지 멀리 떨어져 있는 3명의 대상체에서는 반응이 전혀 없거나 거의 없었다(도 24a). 이는 FIX 전이유전자 카세트를 3명의 대상체에 전달하는데 코돈 최적화된 AAV8 벡터를 사용한 본 발명자들의 군에 의한 이전에 공개되지 않은 연구와 완전히 대조적이며, 여기에서 강력한 IFN- γ T 세포 반응이 2주 시점만큼이나 빨리 관찰되었다(도 24b). AAV-2(Manno et al., 2006 Nat Med) 및 AAV-8 자가-상보적 벡터(Nathwani et al., 2011 NEJM)를 사용한 기타 이전에 공개된 연구는 또한 AAV 캡시드에 대한 초기 T 세포 반응의 증거를 마찬가지로 보여주었다. 중요하게는, 본 시험에서 전이유전자 생성물에 대한 반응은 관찰되지 않았다.

[0250]

AAV 캡시드 T 세포 에피토프를 제시하는 형질도입된 간세포에 대한 T-세포 매개된 면역 반응의 활성화는 전이유전자 발현의 단명하는 최종 손실을 나타내는 대상체에서 역할을 할 수 있는 것으로 가정된다. 따라서, AAV-FIX39-Padua 벡터의 감소된 면역원성 프로파일은 전체 효능에 대한 유망한 개선을 나타낸다.

도면

도면1

Rh74 VP1 아미노산 서열 (SEQ ID NO:1)

```
MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLDKGEPV
NAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQAKKRVLEPLGL
VESPVKTAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPAGPSGLGS
GTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSG
GSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTI
ANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQ
MLRTGNNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNN
MSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFP
SSGVLMMFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALP
GMVWQNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPADPPTTFNQAKLASFIT
QYSTGQVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL
```

도면2

Rh74 VP2 아미노산 서열 (SEQ ID NO:2):

```
TAPGKKRPVEPSPQRSPTSSTGIGKKGGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPAGPSGLSGTMAA
GGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTND
NTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRDPWQRLINNNWGRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTKTIANNLT
STIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFSPQMLRTG
NNFEFSYNFEDVPPHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQA
KNWLPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSSGVL
MFGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPGMVW
QNRDVYLGQPIWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQILIKNTVPADPPTTFNQAKLASFITQYSTG
QVSVEIEWELQKENSkrwnPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL
```

도면3

Rh74 VP3 아미노산 서열 (SEQ ID NO:3):

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGS
TNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIAN
NLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSSFYCLEYFPSQML
RTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSOLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMS
AQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSS
GVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNSQGALPG
MVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPPTTFNQAKLASFITQ
YSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면4

4-1 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:4)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQKQDNGRGLVLPGYKYLGPFNGLD
61 KGEPVNAADAAALEHDKAYDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLGLVESPVKTAPGKKRPVEPSQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDS
181 ESVPDPQPIGEPPA~~APSGVGPNT~~TMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQ
301 RLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGKTIANNTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV GRSSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHQSOLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHKDDEERFFPSS
541 GVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADP
661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

4-1 변이체 : VP2 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:27)

TAPGKKRPVEPSQRSPDSSTGIGKKGQPAKKRLNFGQTGDSESVDPQPIGEPPA~~APSGVGPNT~~
MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSOLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMAT
HKDDEERFFPSSGVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP
IVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP
TTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPI
GTRYLTRNL

4-1 변이체 VP3 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:3)

MAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRVITSTRTWALPTYNNHLYKQISNGTS
GGSTNDNTYFGYSTPWGYFDFNRFHCHFSRWDQRLINNNWGFRPKRLNFKLFNIQVKEVTQNEG
TKTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSAHQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSSFYCL
EYFPSQMLRTGNNFEFSYNFEDVPFHSSYAHQSOLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLF
SQAGPNNMSAQAKNWLPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMAT
HKDDEERFFPSSGVLMTGKQGAGKDNVDYSSVMLTSEEEIKTTNPVATEQYGVVADNLQQQNAAP
IVGAVNSQGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTPVPADPP
TTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTEGTYSEPRPI
GTRYLTRNL

도면5

15-1 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:5)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQRQDNGRGLVLPGYRYLGPFGNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEFQERLQEDTSFGGNLGRAVFQ
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQQRSPDSSTGIGKKGQQPARKRLNFGQTGDS
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWHCDSTWLGDRV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRFHCHFSRWDQ
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSEYQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGNNFEFSYNFED
 421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGPNNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHRDDEERFFPSS
 541 GVLMFGRQGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYGVVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGFGLKHPPPQILIKNTVPADP
 661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKSTNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면6

15-2 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:6)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWWDLKPGAPKPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFGNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQQRSPDSSTGI GKRGGQPPARK RLNFGQTGDS
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSRWDQ
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED
 421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHR DDEERFFPSS
 541 GVLMFGRQGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPADP
 661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면7

15-3/15-5 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열 (SEQ ID NO:7)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIR EWWDLKPGAPKPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFGNGLD
 61 KGEPVNAADAAALEHDRAVDQQLQAGDNPYLRYNHADADEF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
 121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSQQRSPDSSTGI GKRGGQPPAKK RLNFGQTGDS
 181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
 241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSRWDQ
 301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
 361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED
 421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW
 481 LPGPCYRQQRVSTTLSQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSLVPNGVAMATHR DDEERFFPSS
 541 GVLMFGRQGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
 601 QGALPGMVWQNRDVYLQGGPIWAKIPHTDGNFHPSPMLMGGF GLKHPPPQIL IKNTVPADP
 661 PTTFNQAKLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPE IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
 721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면8

15-4 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO:8)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAP KPKANQQRQD NGRGLVLPGY RYLGPFNGLD
61 KGEPVNAADAAALEHDRA YDQQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSP QRSPDSSTGI GKRQQPAKK RLNFGQTGDS
181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGA PMADNNEGAD GVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGST NDNTYFGYST PWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNE GTRTIANNLT STIQVFTDSE YQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAV GRSSFYCLEY FPSQMLRTGN NFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSR TQSTGGTAGT QQLLFSQAGP NNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATK YHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS
541 GVLMMFGKQGAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRT TNPVATEQYG VVADNLQQQN AAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGN FHPSPLMGGF GLKHPPQIL IKNTPVPADP
661 PTTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQ KENSKRWNP E IQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면9

15-6 변이체 VP1 캡시드 아미노산 서열(SEQ ID NO:9)

1 MAADGYLPDWLEDNLSEGIREWDLKPGAPKPKANQQRQDNGRGLVLPGY RYLGPFNGLD
61 KGEPVNAADAAALEHDRA YDQQLQAGDNPY LRYNHADA EF QERLQEDTSF GGNLGRAVFQ
121 AKKRVLEPLGLVESPVRTAPGKKRPVEPSPQRSPDSSTGIGKKGQPAKK RLNFGQTGDS
181 ESVPDPQPIGEPPAAPSGVGPNTMAAGGGAPMADNNEGADGVGSSSGNWH CDSTWLGDRV
241 ITTSTRTWALPTYNNHLYRQISNGTSGGSTNDNTYFGYSTPWGYFDNRF HCHFSPRDWQ
301 RLINNNWGFPRKRLNFKLFNIQVKEVTQNEGTRTIANNLTSTIQVFTDSE YQLPYVLGSA
361 HQGCLPPFPADVFMIPQYGYLTLNNGSQAVGRSSFYCLEYFPSQMLRTGN NFEFSYNFED
421 VPFHSSYAHSQSLDRLMNPLIDQYLYLSRTQSTGGTAGTQQLLFSQAGP NNMSAQAKNW
481 LPGPCYRQQRVSTTSLQNNNSNFAWTGATKYHLNGRDSL V NPGVAMATHR DDEERFFPSS
541 GVLMMFGRQAGRDNDVYSSVMLTSEEEIRTTNPVATEQYGVVADNLQQQN AAPIVGAVNS
601 QGALPGMVWQNRDVYLQGPWAKIPHTDGNFHPSPLMGGFGLKHPPQIL IKNTPVPADP
661 PTTFNQARLASFITQYSTGQVSVEIEWELQKENS KRWNPEIQYTSNYYKS TNVDFAVNTE
721 GTYSEPRPIGTRYLTRNL

도면10

FIX39 핵산 서열(SEQ ID NO:10)

ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTA
CCTGCTGTCTGCTGAATGTACAGTTTTCTTGATCATGAAAATGCCAACAAAATCTGAATAGACC
AAAGAGGTATAACTCTGGCAAGCTTGAAGAGTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGG
AAGAGAAAGTGCAGCTTTGAGGAAGCCAGAGAAGTGTGAAAATACAGAGAGAACAACTGAATT
TTGGAAGCAGTATGTGGATGGTGATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGGAGCTGTA
AAGATGATATCAACAGCTATGAATGTTGGTGCCCTTTGGATTGAGGGGAAAAACTGTGAGCTTG
ATGTGACCTGTAATATCAAGAATGGCAGGTGTGAGCAATTTTGCAAGAATTCTGCTGATAACAAA
GTGGTCTGTAGCTGCACTGAGGGATATAGGCTGGCTGAAAACCAGAAGAGCTGTGAACCTGCAGT
GCCTTTTCCCTGTGGGAGAGTGTCTGTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTT
TCCTGATGTAGATTATGTGAATAGCACTGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCAC
ACAGAGCTTCAATGACTTACCAGGGTGGTAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGGCAGTTCCCT
GGCAGGTAGTGCTCAATGGAAGAGTGGATGCCCTTTGTGGAGGTTCAATTGTAATGAGAAAGTGG
ATTGTGACTGCAGCCCACTGTGTGAAACTGGAGTCAAGATTACTGTGGTGGCTGGAGAGCACAA
TATTGAGGAAACTGAGCACACTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATTATCCCCCACCACAAC
ACAATGCTGCTATCAACAAGTACAACCATGACATTGCCCTCCTGGAAGTGGATGAACCCCTGGTCT
TGAACAGCTATGTGACACCCATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACACCAACATCTTCTGAAATTTG
GGTCTGGATATGTGTCTGGCTGGGGCAGGGTGTTCATAAAGGCAGGTCTGCCCTGGTATTGCAGT
ATTTGAGGGTGCCTCTGGTGGATAGAGCAACCTGCTTGCTGAGCACCAAGTTTACAATCTACAACA
ATATGTTCTGTGCAGGGTCCATGAAGGTGGTAGAGACAGCTGCCAGGGAGATTCTGGGGGTCCC
CATGTGACTGAGGTGGAGGGAACCAGCTTCCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGAGGAGTGTGC
TATGAAGGGAAAGTATGGGATCTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAAGTGAATTAAGGAGAAAA
CCAAGCTGACTTGA

도면11

FIX19 핵산 서열 (SEQ ID NO:11)

ATGCAGCGCGTGAACATGATCATGGCCGAGAGCCCTGGCCTGATTACCATCTGCCTGTTAGGATAT
CTACTCAGTGCTGAATGTACAGTTTTTCTTGATCATGAAAACGCCAACAAAATCCTGAACCGGCCC
AAGCGGTACAACCTCAGGCAAGCTGGAAGAGTTTCGTGCAGGGCAACCTGGAACGGGAGTGCATGG
AAGAGAAGTGCAGCTTCGAGGAAGCCCGGGAGGTGTTTCGAGAACACCGAGCGGACCACCGAGTT
CTGGAAGCAGTACGTGGACGGCGACCAGTGCAGTCAAAACCCCTGCCTGAACGGCGGCAGCTGCA
AGGACGATATCAACAGCTACGAGTGTGTTGCCCTTCGGCTTCGAGGGCAAGAACTGCGAGCTG
GACGTGACCTGCAACATCAAGAACGGCCGCTGCGAGCAGTTCTGCAAGAACAGCGCCGACAACAA
GGTGGTGTGCTCATGCACTGAGGGCTACCGGCTGGCCGAGAACCAGAAGAGCTGCGAGCCCGCCG
TGCCCTTCCCTGCGGCAGAGTGTCCGTGAGCCAGACCAGCAAGCTGACCAGGGCCGAGGCCGTG
TTCCCTGACGTGGACTACGTGAACTCAACCGAGGCCGAGACAATCCTGGACAACATCACCCAGAG
CACCCAGTCTTCAACGACTTCACCCGGGTGGTGGGCGGCGAGGACGCCAAGCCCGGCCAGTTCC
CTTGGCAGGTGGTGTGCTGAACGGCAAGGTGGACGCCTTCTGCGGCGGCTCAATCGTGAACGAGAAG
TGGATCGTGACAGCCGCCACTGCGTGGAGACAGGCGTGAAGATCACCGTGGTGGCCGGCGAACA
CAATATCGAGGAAACCGAGCACACCGAGCAGAAACGGAACGTGATCCGGATTATCCCCACCACA
ACTACAACGCCGCCATCAACAAGTACAACCACGATATCGCCCTGCTGGAACCTGGACGAGCCTCTG
GTGCTGAATTCATACGTGACCCCCATCTGTATCGCCGACAAAGAGTACACCAACATCTTTCTGAAG
TTCGGCAGCGGCTACGTGTCCGGCTGGGGCAGGGTGTTCACAAAGGGCCGACGCGCCCTGGTGCT
GCAGTACCTGCGGGTGCCCCCTGGTGGACAGAGCCACCTGCCTGCGGTCAACCAAGTTCACCATCTA
CAACAACATGTTCTGCGCCGGCTTCCACGAGGGCGGCAGGGACAGCTGCCAGGGCGACAGCGGCG
GACCCACGTGACCGAGGTGGAGGGCACAGCTTTCTGACCGGCATCATCTCATGGGGCGAGGAA
TGCGCCATGAAGGGCAAGTACGGAATCTACACTAAGGTGTCAAGATACGTGAACTGGATCAAAGA
GAAAACCAAGCTGACCTGA

도면 12aa

pAAV-ApoE_hAAT-FIX39 (SEQ ID NO:12)

```

LOCUS      FIX39                      11125 bp    DNA        circular UNA
DEFINITION AKA FIX39 Step 4.
ACCESSION  urn.local...e-3um3omk
VERSION    urn.local...e-3um3omk
KEYWORDS
SOURCE
ORGANISM
FEATURES             Location/Qualifiers
     repeat_region   1..141
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">Pla
                     sMapper</a>"
                     /Transferred_From="LAAV-2 ITR"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="AAV2 ITR"
     enhancer        152..472
                     /created_by="User"
                     /modified_by="User"
                     /Transferred_From="ApoE HCR-1"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="ApoE HCR-1"
     promoter        482..878
                     /vntifkey=21
                     /ApEinfo_fwdcolor="#ffff00"
                     /ApEinfo_revcolor="#0080ff"
                     /Transferred_From="hAAT Promoter"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hAAT Promoter"
     5'UTR           879..907
                     /created_by="User"
                     /label="FIX 5'UTR"
     CDS              order(908..995,2434..3731)
                     /created_by="User"
                     /Transferred_From="hFIX CDS"
                     /Transferred_Similarity="79.22%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hFIX CDS"
     intron           996..2433
                     /created_by="User"
                     /Transferred_From="hFIX Intron"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /modified_by="User"
                     /label="hFIX Intron"
     3'UTR           3732..3779
                     /created_by="User"
                     /label="hF9 3' UTR"
     Terminator       3820..4047
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">Pla
                     sMapper</a>"
                     /Transferred_From="bGH_PA term"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="bGH_PA term"
     repeat_region   complement(4097..4204)
                     /modified_by="User"
                     /label="AAV2 ITR"
     misc_feature     4219..8579
                     /modified_by="User"
                     /label="Lambda Stuffer"
     Gene             complement(8491..8580)
                     /Imported_from="<a
                     href="http://wishart.biology.ualberta.ca/PlasMapper">Pla
                     sMapper</a>"
                     /Transferred_From="cosN"
                     /Transferred_Similarity="100.00%"
                     /label="cosN"
     rep_origin       8680..8986
                     /modified_by="User"
                     /label="F1 Ori"

```

도면12ab

```

misc._marker      9284..10096
                   /modified_by="User"
                   /label="Kan R"
rep_origin         complement(10453..11120)
                   /modified_by="User"
                   /label="pUC Ori"
ORIGIN
1  cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaa gggggcgctc
61  gggcgacctt tggtcgccc gctcagtg gcgagcgagc gcgcagagag ggaagtggcca
121 actccatcac taggggttcc tgcggcctag taggtccaga ggcacacagg agtttctggg
181 ctccacctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatcctcc agcagctgtt tgtgtgctgc
241 ctctgaagtc cacactgaac aaacttcagc ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt
301 gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctcgctctg tgaccttgga gctggggcag
361 aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgacct cttggaattt
421 cgttgagagc gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgtgagag ggttaccggg
481 ggaatctgct accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct
541 aagtgttact ctcccagaga ctgtctgact caccgccccc cctccacctt ggacacagga
601 cgtgtgtggt tctgagccag gtacaatgac tcctttcggt aagtgcagtg gaagctgtac
661 actgcccagg caaagcgctc ggcgagcgta ggcgggcgac tcagatccca gccagtgagc
721 ttagcccctg ttgctctctc cgataactgg ggtgaccttg gttaatatte accagcagcc
781 tcccccggtt cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg cccctgtctcc
841 tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgtctagc
901 aaaggttatg acagaggtga acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg
961 cctgctgggc tactctgctg ctgctgaatg tacaggtttg tttctctttt tataatacat
1021 tgagtatgct tgctctttag atatgaaat atctgattct gtctctttca ctataatttg
1081 attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggg ttggtaaagta
1141 ctgggtctct ttcagctagg tttctctctt cttcactttt aaaactaaat agatggacaa
1201 tgccttatgt gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagbt cagtatttgg tcatgttaatt
1261 cctgttaaaa aacagtcact tccttggttt aaaaaaatta aaagtgggaa aacaaaagaaa
1321 tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa
1381 atcaaatgtg gaacacaaaag cacaaacagt ggccttattt acacaaaaag ctgtatttta
1441 agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtgaaggag gtgtgtctct aattttttaa
1501 attatatact ttcaatttaa agttttagtt aaaacataaa gattaacctt tcatatagcaa
1561 gctgttagtt atccacaaag cttttcatgg attagaaaa aatcattttg tctctatctc
1621 aaacatcttg gagtgtatat ttggggaaac acaatactca gttgagttcc ctaggggaga
1681 aaagcaagct taagaattga ccaaaagagt aggaagttag ctattgcaac atatatcact
1741 ttgttttttc acaactacag tgactttatt tatttcccag aggaagggcat acaggggaaga
1801 aattatccca ttgggacaaa cagcatgttc tcacagtaag cacttatcac acttacttgt
1861 caactttcta gaatacaaat tagtagctga cagtaaccagg atcagggggtg ccaaccctaa
1921 gcaccccacg aaagctgact ggcctgtggt tcccactccc agacatgatg tcagctgtga
1981 aatccacctc cctggaccat aattaggtct ctgttcttca ggagacattt gttcaaatgc
2041 atttgggcaa ccatattctg aaaaacagcc agccagggtg atggatcact ttgcaaatgc
2101 cctcaatgag ctattttcaa gtgatgacaa agtgtaaggt taagggctca tttgagaact
2161 ttctttttca tccaagttaa attcaaatat gattagaaat ctgacctttt attactggaa
2221 ttctcttgac taaaagttaa attgaatttt aatttctaaa tctccatgtg tatacagtac
2281 tgtgggaaca tcacagattt tggctccatg ccttaagagc aaatttggct tcagattatt
2341 tggattaaaa acaagaactt tcttaagaga tgtaaaaatt tcatgatgtt tttctttttg
2401 ctaaaaacta agaattattc ttttacattt cagtttttct tgatcatgaa aatgccaaac
2461 aaattctgaa tagaccaaa ggtatatact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaaatacaga gagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggaatggtgat caatgtgaga
2641 gcaatccctg ctggaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttggg
2701 gtccctttgg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtggctgtg agctgcactg
2821 agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct tttccctgtg
2881 ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc tttcctgatg
2941 tagattatgt gaatagcact gaggctgaga caatccttga caatatcact cagagcacac
3001 agagcttcaa tgacttcacc aggggtggtg gaggggagga tgccaaagct gggcagttcc
3061 cctggcaggt agtgctcaat ggaaaagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaaatg
3121 agaagtggat tgtgactgca gcccaactgt tggaaaactg agtcaagatt actgtgtgtg
3181 ctggagagca caatatttag gaaactgagc acactgagca gaagaggaat gtgatcagga
3241 ttatccccc ccaactac aatgctgcta tcaacaagta caaccatgac attgccctcc
3301 tggaaactgga tgaacccctg gtcttgaaca gctatgtgac acccatctgt attgctgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg
3421 tgttccataa aggcagggtc gccctgggat tgcagtattt gagggtgcct ctggtggata
3481 gagcaacctg cttgctgagc accaagttaa caatctacaa caatatgttc tgtgcagggt
3541 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg ggttccccat gtgactgagg
3601 tggagggaa cagcttccct actgggatta tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg
3661 gaaagtatgt gatctacaca aaagtatcca gatattgtaa ctggattaa gaaaaacca
3721 agctgacttg atgaaaagat gatttccaag gtttaattcat tggaaattga aattaacaga
3781 gatctagagc tgaattcctg cagccagggg gatcagcctc tactgtgcct tctagtggc
3841 agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc cttccttgac cctggaaggt gccactcccc
3901 ctgtccttct ctaataaaaat gaggaatttg catcacattg tctgagtagg tgtcattcta
3961 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc
4021 atgctggggg tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga
4081 gatccactag ggccgcagga acccctagtg atggagtgg ccactccctc tctgcgcgt
4141 cgctcgctca ctgaggccgc ccgggctttg cccggcgccg ctcagtgagc gacgagcgcg

```

도면 12ac

```

4201 gcagctgcct gcaggggcag cttgaaggaa atactaaggc aaaggtactg caagtgcctg
4261 caacattcgc ttatgcggat tattgccgta gtgccgcgac gccgggggca agatgcagag
4321 attgccatgg ttacaggccgt gcggttgata ttgccaaaac agagctgtgg gggagagtgg
4381 tcgagaaga gtgcggaaga tgcaaaaggcg tcggctattc aaggatgccca gcaagcgcag
4441 cataatcgcg tgtgacgatg ctaatoccaa accctaccca accacactgg tcacgcactg
4501 ttaagcgcgt gtatgacgct ctggtggtgc aatgccacaa agaagagtca atcgacagca
4561 acatttttga ttccggtcaca cgttagcagc atgattgccca cggatggcaa catattaacg
4621 gcatgatatt gacttattga ataaaattgg gtaaatttga ctcaacgatg ggtaatttcg
4681 ctggttgggg tagtgagatg aaaagaggcg gcgcttacta ccgattcccg ctagtgggtc
4741 acttcgacgt atcgtctgga actccaacca tcgcaggcag agaggtctcg aaaatgcaat
4801 cccgaaacag ttccgcaggta atagttagag cctgcataac ggtttcggga ttttttatat
4861 ctgcacaaca ggtgaagagca ttgagtcgat aatcgtgaag agtcggcgag cctgggttagc
4921 cagtgctcct ttccgttggtg tgaattaaagc gaataccgga agcagaaccg gatcaccaaa
4981 ttggttacagg cgtcatcgcc gccacgcaac agcacaaccc aaactgagcc gtacgcaactg
5041 tctgtcctga attcattagt aatagttacg ctgcggcctt ttacacatga ccttcgtgaa
5101 agcgggtggc gctaacaacc tectgcggtt ttgcccggtc atatcgggtca
5161 cgaacaaatc tgattactaa acacagtagc ctggatttgt tctatcagta atcgacctta
5221 ttccataatta aacagagcaa atccccttat tgggggtaag acatgaagat gccagaaaaa
5281 catgacctgt ttgcccgcct tctcgcgcca aaggaaacag gcacggggcg aatccttgcg
5341 ttgtcaatgg cgtacacttcg cggcagatat aatggcggtg cgtttacaaa aacagtaatc
5401 gacgcaacga tgtgcgcat tatcgccatg ttcatctcgt acccttctcg cttcgccgga
5461 ctaagttagc atctcgctta tataacgagc gtgtttatcg gctacatcgg tactgactcg
5521 attggttcgc ttatcaaacg cttcgctgct aaaaagccg gagtagaaga ttgtagaaat
5581 caataatcaa cgtaaggcgt tectcgatg gctggcggtg tcggagggaa ctgataacgg
5641 acgtcagaaa accagaaatc atggttatga cgtcatttga ggcggagagc tatttactga
5701 ttactccgat caccctcgca aacttgtcac gctaaaccca aaactcaaat caacaggcgc
5761 cggagcctac cccgttggtg ggatgcctac cgcaagcagc ttggcctgaa
5821 agacttctct ccgaaaaatc aggcagctgt ggcattgcag cagattaaagg agcgtggcgc
5881 ttactcactg attgatcggt gtgatatcgg tcaggcaatc gaccgttgca gccaatatcg
5941 ggcgttcaact cggggcgctg gttatgggtc aattcgagcat aaggctgaca gctcgattgc
6001 aaaattcaaa gaacggggcg gaacgggtcag agagattgat gtatgacgag agtcacccgcg
6061 attatctcgg ctctgggttat ctgcatcctc gtctgcctgt catgggctgt taatcattac
6121 cgtgataaag cacttaccta caaagcccag cgcgacaaaa atgccaagaga actgaagctg
6181 gcgaacgcgg caattactga catgcagatg cgtcagcgtg atgttgctgc gctcgatgca
6241 aaatacacga aggaagttagc tgatgctaaa gctgaaaatg atgctctcgc tgatgatgtt
6301 gccgctgggt gtcctcggtt gcacatcaaa gcagtcgtct agtcagtgcg tgaagccacc
6361 accgctcccg gcgtggataa tgcagcctcc ccccgactgg cagacaccgc tgaacgggat
6421 tatttcaccc tcagagagag gctgatcact atgcaaaaaa actcgggaag aaccagaaag
6481 tatattaatg agcagtcgag atagagttgc ccatatcgat gggcaactca tgcaatttat
6541 gtgagcaata cacacgcgct tccagcggag tataaatgcc taaagtaata aaaccgagca
6601 atccatttac gaattgttgc tgggtttctg ttttaacaa attttctcgc ccgccacaaa
6661 ttttggctgc atcgacagtt ttcttctgcc caattccaga acggaagaaa tgatgggtga
6721 tgggtttcctt tgggtcact gctgcgggtt tgttttgaa agtaaacgct tgttgagcac
6781 atcctgtaat aagcaggccc agcgcagtag cagtagcat ttttttcagt gttttattcc
6841 cgatgctttt tgaagttcgc agaatcgtat gtgtagaaaa ttaacaaaac cctaaacaat
6901 gagttgaaat ttcatattgt taatatttat taatgtatgt cagggtgcag gaatcgtcat
6961 tgtattcccg gattaaatcat gtccacagcc ctgacgggga acttctctgc gggagtgctc
7021 gggaaataat aaaacgagtc acacagggtt tagcgcgtac acgtattgca ttatgccaac
7081 gccccggtgc tgacacggaa gaaacccgac gttatgattt agcgtggaaa gatttgtgta
7141 gtgttctgaa tgctctcagt aaatagtaat gaattatcaa aggtatagta atatcttta
7201 tgttcatgga tatttgtaac ccatcggaaa actcctgctt tagcaagatt ttccctgtat
7261 tgctgaaatg tgattttctc tgatttcaac ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg
7321 tttcttgaga atttaacatt tacaaccttt ttaagtcctt ttattaacac ggtgttatcg
7381 ttttctaaca cgtatgtaat attatctgtg gctagatagt aaatataatg tgagacgttg
7441 tgacgtttta gttcagaata aaacaattca cagtctaaat cttttcgcac ttgatcgaat
7501 atttctttaa aaatggcaac ctgagccatt ggtaaaaact tccatgtgat acgaggggcg
7561 gtatgttgca ttatcgtttt tatcgtttca atctgggtcg accctctgtg gttttgttga
7621 tgatttatgt caaatattag gaatgttttc acttaatagt attgggttcg taacaaagtg
7681 cggctcctgc ggcattcttg agggaaatca aaccgacaga tgtatgtaag gccacggtgc
7741 tcaaatcttc atacagaag atttgaagta atattttaac cgtatagatga agagcaagcg
7801 catggagcga caaaatgaat aaagaacaat ctgctgatga tccctccgtg gatctgattc
7861 gtgtaaaaaa tatgcttaat agcaccattt ctatgagtta ccttgatgtt gtaattgcac
7921 gtatagaaca taaggtgtct ctggaagcat tcagagcaat tgaggcagcg ttggtgaagc
7981 acgataataa tatgaaggat tatccctgg tggttgactg atcaccataa ctgctaatca
8041 ttcaaaactat ttatgtctgt acagagccaa cagcgagtct gtcactgtca ggaagtggtg
8101 aaaactgcaa ctcaattact gcaatgcccc cgtaatgaag tgaatttaca atatcgtcct
8161 gttcggaggg aagaacgcgg gatgttcatt cttcatcact ttaatttgat gtatatgtct
8221 tcttttctga cgttagcttc cgacggcagg cttcaatgac ccaggctgag aaattcccg
8281 accctttttg ctcaagagcg atgttaattt gttcaatcat ttgggttagga aagcggatgt
8341 tgccgggttg ttgtctgcgg gttctgttct tcgttgacat gaggttgccc cgtattcagt
8401 gtcgctgatt tgtattgtct gaagttgttt ttaagttaa ttgatgcaga tcaattataa
8461 cgatacctgc gtcataattg attatttgac gtggtttgat ggcctccacg caggttgta
8521 tatgtagatg ataactatta tcaactttac ggtcctttcc ggtgatccga caggttaacg
8581 ggcggcgacc tgccctgatg ggtattttct ccttacgcat ctgtgcggta ttccacaccg
8641 caaacgctca agcaaccata gtacgcgccc tbtacggcg cattaaagcg ggcgggtgtg
8701 gtggttacgc cgcagctgac cgtacactt gccagcctt tagcccccgc tctttctcgt
8761 ttcttccctt cctttctcgc cacttctgce ggccttcccc gtcaggctct aaatcggggg

```

도면 12ad

```

8821 ctcccttttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg accccaaaaa acttgatttg
8881 ggtgatgggtt cactagtggt gccatcgccc tgatagacgg tttttcgccc tttgacgttg
8941 gagtccacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaaact caactctatc
9001 tcgggctatt cttttgattt agacctgcag gcatgcaagc ttggcactgg ccgtcgtttt
9061 acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgcttg cagcacatcc
9121 ccttttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgccac gatcgccctt cccaacagtt
9181 gcgcagcctg aatggcgaaat gcgattttatt caacaaagcc gcggtcccggt caagtacgag
9241 taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac tcatcgagca
9301 tcaaatgaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatttt tgaaaaagcc
9361 gtttctgtaa tgaaggagaa aactcacga ggcagttcca taggatggca agatcctggt
9421 atcgggtctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc cctcgtcaa
9481 aaataaggtt atcaagtga aaatcacat gagtgcgac tgaatccggt gagaatggca
9541 aaagcttatg cattttcttc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa
9601 aatcactcgc atcaacccaa ccgttatcca ttctgtgatt cgctgagcgc agacgaaata
9661 cgcgatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca
9721 ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttcta at ccttggaaatg
9781 ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcata atcaggagta cggataaaat
9841 gcttgatggt cggaaagagg ataaaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg
9901 taacatcatt ggcaacgcta cctttgccat gtttcagaaa caactctggc gcactgggct
9961 tcccatacaa tcgatagatt gtgcacactg attgcccgcac attatcgca gcccatttat
10021 acccatataa atcagcatcc atggtggaat ttaatcgcg cttcgagcaa gacgtttccc
10081 gttgaatatg gtcdataaca ccccttgat tactgtttat gtaagcagac agttttattg
10141 ttcatgatga tataatttta tcttggtcaa tgtaacatca gagattttga gacacaacgt
10201 ggctttgttg aataaatcga acttttgctg agttgaagga tcagatcacg catcttcccg
10261 acaacgcaga ccgttccgtg gcaaaagcaaa agttcaaat caccaactgg tccacctaca
10321 acaagctct catcaaccgt ggctccctca cttctggct ggatgatggg gcgattcagg
10381 cctgggatga gtcagcaaca ctttcttcac gaggcagacc tctcgacgga gttccactga
10441 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta
10501 atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggatcaa
10561 gagctaccaa ctctttttcc gaagtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact
10621 gttcttctag tgtagccgta gtttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgcctaca
10681 tacctcgtct tgctaactct gttaccagtg gctgctgcca gtggcgataa gtctgtctct
10741 accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg
10801 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag
10861 cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa aggcggacag gtatccggta
10921 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgctggtat
10981 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg
11041 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cctttttacg gttcctggcc
11101 ttttgctggc cttttgctca catgt

```


도면 12ba

phFIX39v2 (SEQ ID NO:26)

LOCUS phFIX39v2 11199 bp DNA circular UNA

FEATURES Location/Qualifiers
 repeat_region 1..141
 /label="AAV2 ITR"
 enhancer 152..472
 /label="ApoE HCR-1"
 promoter 482..878
 /label="hAAT Promoter"
 CDS order(908..995,2434..3731)
 /label="hFIX CDS"
 intron 996..2433
 /label="hFIX Intron"
 3'UTR 3732..3779
 /label="hF9 3' UTR"
 Terminator 3820..4047
 /label="bGH PA term"
 repeat_region complement(4097..4237)
 /label="AAV2 ITR"
 misc_feature 4248..8713
 /label="Eukaryotic Stuffer"
 rep_origin 8754..9060
 /label="F1 Ori"
 CDS complement(9355..10170)
 /label="Kanamycin resistance"
 rep_origin complement(10527..11194)
 /label="pUC Ori"

ORIGIN

```

1  cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc cggggcaaaag cccgggcgctc
61  gggcgacctt tggtcgcccg gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca
121 actccatcac taggggttcc tgccgcctag taggctcaga ggcacacagg agtttctggg
181 ctcacccctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatccctcc agcagctggt tgtgtgctgc
241 ctctgaagtc cacctgaac aaacttcagc ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt
301 gcaagcagca aacagcaaac acacagccct ccctgcctgc tgaccttgga gctggggcag
361 aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgaccc cttggaattt
421 cgggtggagag gagcagaggt tgcctcggcg tggtttaggt agtgtgagag gggtagccgg
481 ggatcttgct accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct
541 aagtgggtact ctcccagaga ctgtctgact cagccacccc cctccacctt ggacacagga
601 cgctgtggtt tctgagccag gtacaatgac tcctttcggt aagtgcagtg gaagctgtac
661 actgcccagg caaagcgctc gggcagcgta ggcgggcgac tcagatccca gccagtggac
721 ttagcccttg tttgctcctc cgataactgg ggtgaccttg gttaatattc accagcagcc
781 tcccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatcgggac gaggacaggg cctgtctctc
841 tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgtctag
901 aaaggttatg cagaggggtga acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg
961 cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggtttg tttccttttt tataatacat
1021 tgagtatgct tgcccttttag atatagaaat atctgattct gtcttcttca ctaaattttg
1081 attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggg ttggttaagta
1141 ctgggttcttt gttagctagg ttttctctct cttcactttt aaaactaaat agatggacaa
1201 tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt
1261 cctgttaaaa aacagtcata tccttggttt aaaaaaatta aaagtgggaa aacaaaagaa
1321 tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa
1381 atcaaatggy gaaacaaaaa cacaaacagt ggccttattt acacaaaaag tctgatttta
1441 agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aattttttta
1501 attatatatc ttcaatttaa agtttttagtt aaaacataaa gattaacctt tcattagcaa

```


도면 12bb

```

2101 cctcaatgag ctattttcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggtcoa tttgagaact
2161 ttcttttttca tccaaagtaa attcaaatat gattagaaat ctgacctttt attactggaa
2221 ttctctttgac taaaagttaa attgaatttt aatctctaaa tctccatgtg tatacagtac
2281 tgtgggaaca tcacagattt tggctccatg ccctaaagag aaattggcct tcagattatt
2341 tggattaaaa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg
2401 ctaaaactaa agaatttatt ttttacattt cagtttttct tgatcatgaa aatgccaaca
2461 aaattctgaa tagaccaaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga
2521 atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg
2581 aaaatcacaga gagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggaatgtgat caatgtgaga
2641 gcaatccctg cttgaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttggt
2701 gtcccttttg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg
2761 gcaggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtggctctgt agctgcactg
2821 agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct ttccctgtg
2881 ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc ttctctgatg
2941 tagattatgt gaatgcact gaggtgtaga caatcctga caatcacact cagagcacac
3001 agagcttcaa tgacttcacc aggttggtag gggggaggga tgcgaagcct gggcagttcc
3061 cctggcaggt agtgctcaat ggaagagtg atgccttttg tggaggttca attgtataatg
3121 agaagtgtgat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtgg
3181 ctggagagca caatattgag gaaactgagc acactgagca gaagaggaat gtgatcagga
3241 ttatccccc ccaacaactac aatgctgcta tcaacaagta caaccatgac attgcctccc
3301 tggaaactgga tggaacccctg gtcttgaaac gctatgtgac acccatctgt attgctgata
3361 aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg
3421 tgttccataa aggcaggtct gccctggtat tgcagtattt gaggtgtcct ctgggtggata
3481 gagcaacctg ctgtctgagc accaagtta caatctacaa caatagtctc tgtgcaggtg
3541 tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg ggtcctccat gtgactgagg
3601 tggagggaa cagcttctct actgggatta tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg
3661 gaaagtatgc gatctacaca aaagtatcca gatattgtga ctggattaaq gagaaaacca
3721 agctgacttg atgaagatg gatttccaaq gtaattcat tgggaattgaa aattaacaga
3781 gatctagagc tgaattctct cagccagggg gatcagcctc tactgtgcct tctagtgtcc
3841 agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc ctctcttgac cctgggaaggt gccactccca
3901 ctgtccttcc ctaataaaat gaggaatttg catcacattg tctgagtagg tgcattctc
3961 ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggaggga ttgggaagac aatagcaggc
4021 atgctggggg tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga
4081 gatccactag ggcgcagga acccctagtg atggaggttg ccaactccctc tctgctgctc
4141 cgctcgctca ctgaggccgg gcgaccaaag gtgcgccgac gccggggttt tgcggggggc
4201 gcctcagtg ggcagcgagc gcgcagctgc ctgcaggggc ccatgggcag atgcaccacc
4261 tgtctcagtg caaagccctg ctaagtagg ctggctcataa gccatgtgt ctggctgtaa
4321 ctcccaattg ttgtcagcat caataaaact tggccaacac tgttatatac tggattatgt
4381 agttacaact gaacatattt gtttaagcaa ttggaattaa gaattcacat gcaatgatat
4441 cagggctcct cctctctggt tagtgtattg gggggaaatt ggacatctct cagctcagta
4501 ggctagttag gccaggatgg atgacatcca cagccctgg gcagagagat tatgatgtag
4561 ctagtctgac tcttgacaaa gacttgcttc ctggagcttc tactacttct tgggtggatgg
4621 ctaagaaata tggttgtgtt cttttaagtc tgaagagcat tatttttgoc aaccctgac
4681 caaacatcct tgccaaggaa aaggcctaaa atatatgtgc atttaaagat attacaaact
4741 acttggtttt ggaatgtttg gcctttcagg atcatagcta tcaaaatatt agctattttg
4801 ggtatgagat gtctgcttgg tcaaggacaa gttcttaag acatcatggt ggggaataat
4861 ggggaaaatg ggaaggctta tgctctgagt aagacatctg agttatcata tgtcaaacat
4921 ttttgttagt catagtctaa tgggagcctg tttccctct ttaatataca ttcatatctg
4981 aatttatgct cttcatgtac aatgcccagc cagaacaaca gctcttacc ttgtgttttc
5041 ttccctaact ttaactccaa tgaaccatt acctgccatt tcagtaaaac cattattctc
5101 cctacttacc cacccaagtt gtacaataaa gagtgtttgc tctactcat atacaaagca
5161 aattcatttg tttgtgatgt acagcttgct atgcccacag atgtggtttg cctagtctct
5221 tgctctaggt catttgactg ggaacagatg ggaatgctac ttgtgttttt aatggttaac
5281 tagtcattga aatgcatttc atcaataaat cttagaggat aattgtttaa atgtctgtcc
5341 agactagctt tgtagagcca ggtgcccatt cacatgtcac cttcttattt ctcttaattg
5401 aattttttat atctgagata ggaataatag agggcttttt caagtgaaga tattaactata
5461 gtctaaagac cttagtgtta catctctggc ctaaggaaa aacaagttct ggttcataca
5521 tataataact ttgcatgtta tctgccactg agatgtgtcc taatccaaca gaaaggattg
5581 aatctctgta gctaggtgta cagggcaaga gctgtacagg gaacctttaa agatagcttc
5641 aggcacaaagc tgaggaaagt ggaaggagac tggggaaaat gtaagacat tttaaagatt
5701 ttcttttaggt caaaaataga ataagaaata gaccatttcc ctggacattt tctgtaggtt
5761 aatactgtta actatttgta aatgcatatg ctacaactta atatgtctgc tttgtgagtt
5821 tagcattgtc tctctgtcat tccagaaatg aaatggcaaa tacattttaa tcagaactaa

```

도면 12bc

```

5881 aaaggggaac aggggtataaa ggctcaattt agtcacatca tttcccttcc tcacccaccc
5941 cctttaaac agatgtttgc caatgcatta acaatgcaga tgtttccctga aagaaagtgt
6001 agtaactcaa gcagacacct tttttctttt tcaagcagaa agactatga gatggtggtt
6061 gtgggtgttc tgggaggag aagatataaa tgatacacat ttttccaat catttcatga
6121 cctcactgca cacttatagt tattgtacct gttgtctttt tgctgtcaag cctagctaaag
6181 atcatttgga atgttcaaga tcaactatca atgcatgtgc acacatacac atgcacatat
6241 gttcactccc tttttcatcc acatgaacta agattactga tgtgtacaga ttcaaaagcac
6301 ttttattctt ttccaaaggc aagaagctga gctactttcc agaatagtgt tgaagacccc
6361 tgtcactact ctgcattgtt tctccacac cactcccatc cagttcctta tgaatgggta
6421 ctgggttttc aaaatatgag ataaattgag tgtataaaag tcatttttag acaaaatgaa
6481 acaggaatg aaagaaacca gaatctctcc tcatttgtgg atgggcccag tccaccatgt
6541 catggttaat ctgcaggagg gaaatactag atttgattgc agatcagact gcagcaaac
6601 tgtctgtact aaggcatcaa gagaaagcaa gcaacagctg ggggttcagt ggtgaaaca
6661 ttatatatct agcttttgaat tatgaatatc tgttttagcg tgtcacctag aaaaagtggt
6721 ttcaaaatgc tgatgtctca taagaacctt tctctcaga gttgtttctt ttatctttca
6781 aattagccag ggtgggaaat aaagtgtatc ctgtgtgaag aaatctcaca aagaagaaca
6841 tagagagtcc actttcatct ggagtaatga acagattgaa caaactagaa atgggttagtc
6901 tgttaaagaa aagggttagg tgagctgttt gcaagagcca caagggaaag gggaagacaa
6961 ctctcttttg gacttaaggg tgaagtgtgc aagcaggcaa gaccattctg acctccatta
7021 agaaagccct ttccaaccaa caaccactgg gttgttact caggttgggc agcattggga
7081 gcaaatgttg attgacaaa tgtttgtcag aatgttgac ttaagagact gttctgtcac
7141 tggggacagc agcagctaga tagcccatc caggagagg gcatttgttc acctggccag
7201 agatcagagc aggcctaggg actgctggga tctgtccag ctttgagacc ctacagagcc
7261 atgttccact agcaggtatc ctttctgagg tcaactctat ttcttacctt attccagggc
7321 tttcacctca gcttgccagg ctggagccaa gggccaaggc agcctcactt tgttggctat
7381 ggtagcttcc caggagcccc ctatggttca ggaacagctc tgcctgcccc atcctgtttg
7441 ctacctcata aagccaaagg cactggtggg ccaggccagc ttctaaagtc acacaagggt
7501 agaaggttcc tgacaggaag ggcttgaggc caatggaagg aggtacttca gtttccctcc
7561 agatgcccag tgatgggctc agagctcctt gagaacttgg gaaaggaagc aggggtctctg
7621 aagaaatact tcaggagttag aaagaggaag cttagagggtt aaatgcacta cacaggaaca
7681 gaaatgagtt tttcttagag ttagtatatg tctagagggt tagtaaaact aaacaagtcct
7741 tgaattgcat acagccactt agggaaagaa tgaaaacctt tgaatatttag tgaaaaaagg
7801 gaaactgcac cccctgtatt actagatagc tttcatcaac agctcaaaac agacagattt
7861 ttatagggtt actgtgtgca ctttaataca agggcagtggt ttcaagaacta gtcagggtcct
7921 gaaaaggatt taccaaatgt tgagtgtgcc ctctagtgtt cactctccc agctttcttc
7981 ctataaaggc ggatcaaggc acttgcttac aactggaaact gaaatctcc aagtggaaact
8041 agacattgag atggagaaaa tattcattgt ccaactgtaat tatgcaagga atatccagtt
8101 gagataatgg acttgctctc tatctaataa taccagggtc caatgggtca ctgctttgtc
8161 cactttgccc aaaattcaag cacagctaaag ttgatatttt aggaacaaag cagcttacta
8221 tccagccaga ggggagttaga atatggttaa gagagagtggt aaagaatgaa tgagccctgc
8281 tattcctcac tgcctggatg gctataagca cagcccttat ggaggcctta ggtcttgcct
8341 cataatatcc cagtttgaaa aggggttgaa aagacctcct agaaaaatca gtagttttcc
8401 tcttttgagt aacatgtagc aaaaaaatt tcatcatgta ggtacaggga acacctaatt
8461 aactattaat ctcaaggagt caagccagtg tgtttcttaa tgtatctgct gtatcccat
8521 gaagcaaat ttgccatcag agaaactgac tcatggggaa aaaatccaag gacctcaaat
8581 ccccaaaaga agccattcct cagatttgcc taagcttaag cttccctgtc tctcattgtg
8641 tgttgctttc aatgcagtta cataaatggc ttttttgttt atgcaccaa aacactaatt
8701 catctgcaaa gctatagggt aaagcaacca tagtatgcac cctgctagct ggcgcattaa
8761 gcgcggcggt tgtgtgtgtt acgcgcagcg tgaccgctac acttgccagc gccttagcgc
8821 ccgctccttt ccgtttcttc ccttcccttc tgcgccagtt ccgcggcttt ccccgtaag
8881 ctctaaatcg ggggctccct ttagggttcc gatttagtgc tttaaggcac ctgcagccca
8941 aaaaacttga ttgggtgat ggttcacgta gtgggcccac gccctgatag acgggttttcc
9001 gccctttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttccaa actggaacaa
9061 cactcaactc tatctcgggc tattcttttg atttagacct gcaggcatgc aagcttggca
9121 ctggccgtcg ttttacaacg tctgacttgg gaaaacctg gcgttaccca acttaatcgc
9181 cttgcagcac atcccccttt ccgcagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcgc
9241 ctttcccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgcgatt tattcaacaa agccgcgctc
9301 ccgtcaagtc agcgtaatgc tctgccagt ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa
9361 aaactcatcg agcatcaaat gaaactgcaa tttattcata tcaggattat caataccata
9421 tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaaacta ccgaggcagt tccataggat
9481 ggcaagatcc tggtatcggt ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatc aacctattaa
9541 tttccctcg tcaaaaaata gtttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc
9601 cggtgagaat ggcacaaagct tatgcatttc tttccagact tgttcaacag gccagccatt

```

도면 12bd

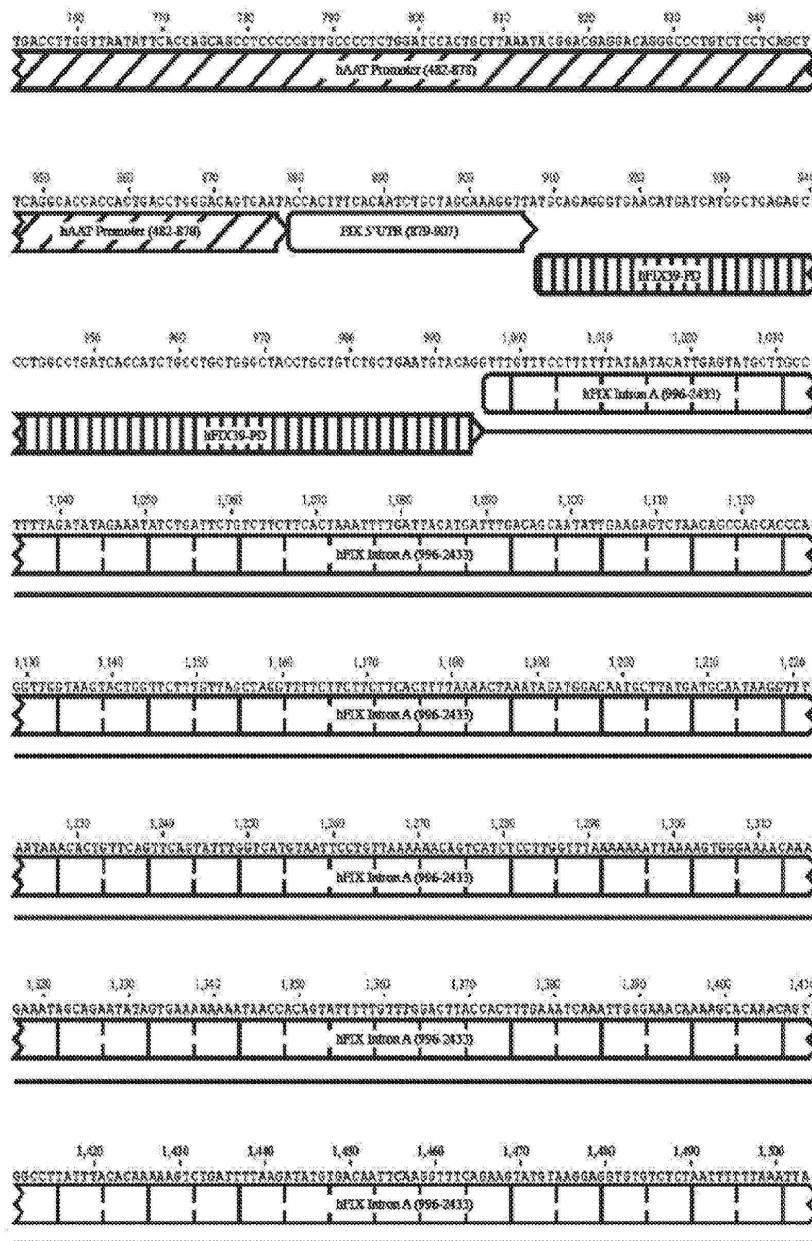
```

9661 acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaaccggtta ttcattcgtg attgcgcctg
9721 agcgagacga aatcacgcat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa
9781 ccggcgccagg aacactgccca gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc
9841 taataacctgg aatgctgttt tcccggggat cgcagtgggtg agtaacctg catcatcagg
9901 agtacggata aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct
9961 gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc
10021 tggcgcatcg ggtttccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc
10081 gcgagcccat ttatacccat ataatacagc atccatgttg gaatttaatc gcggcttcga
10141 gcaagacggt tcccgttgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc
10201 agacagtttt attgttcatg atgatatttt tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt
10261 ttgagacaca acgtggcttt gtgtaataaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat
10321 caccgatctt cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaaag caaaagtcca aaatcaccaa
10381 ctggtccacc tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggctcc ctcactttct ggtgggatga
10441 tggggcgatt caggcctggt atgagtcagc aacaccttct tcacgaggca gacctctga
10501 cggagttcca ctgagcgta gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatctt
10561 tttttctgag cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgctacca gcgggtggttt
10621 gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc
10681 agataccaaa tactgttctt ctagttagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg
10741 tagcacccgc tacatacctc gctctgctaa tctgtttacc agtggctgct gccagtggcg
10801 ataagtcgtg tcttacggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggg
10861 cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttgga gcgaacgacc tacacgaac
10921 tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tccgaaggag agaaaggcgg
10981 acaggtatcc ggtaaaggc agggtcggaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg
11041 gaaacgcctg gtatctttat agtcctgtcg ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat
11101 ttttgtgatg ctgctcaggg gggcgagacc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt
11161 tacggttctt ggccttttgc tggccttttg ctacatgt

```

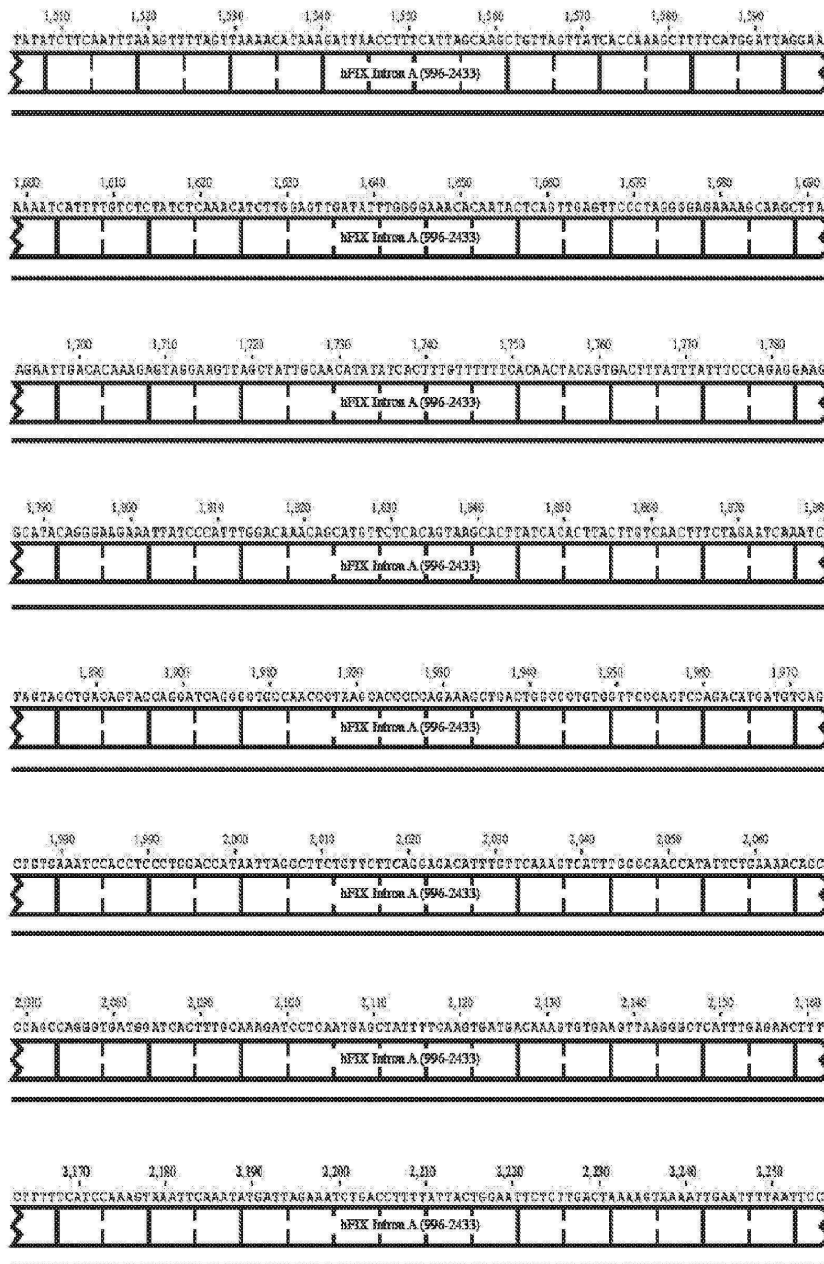

도면 13b

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



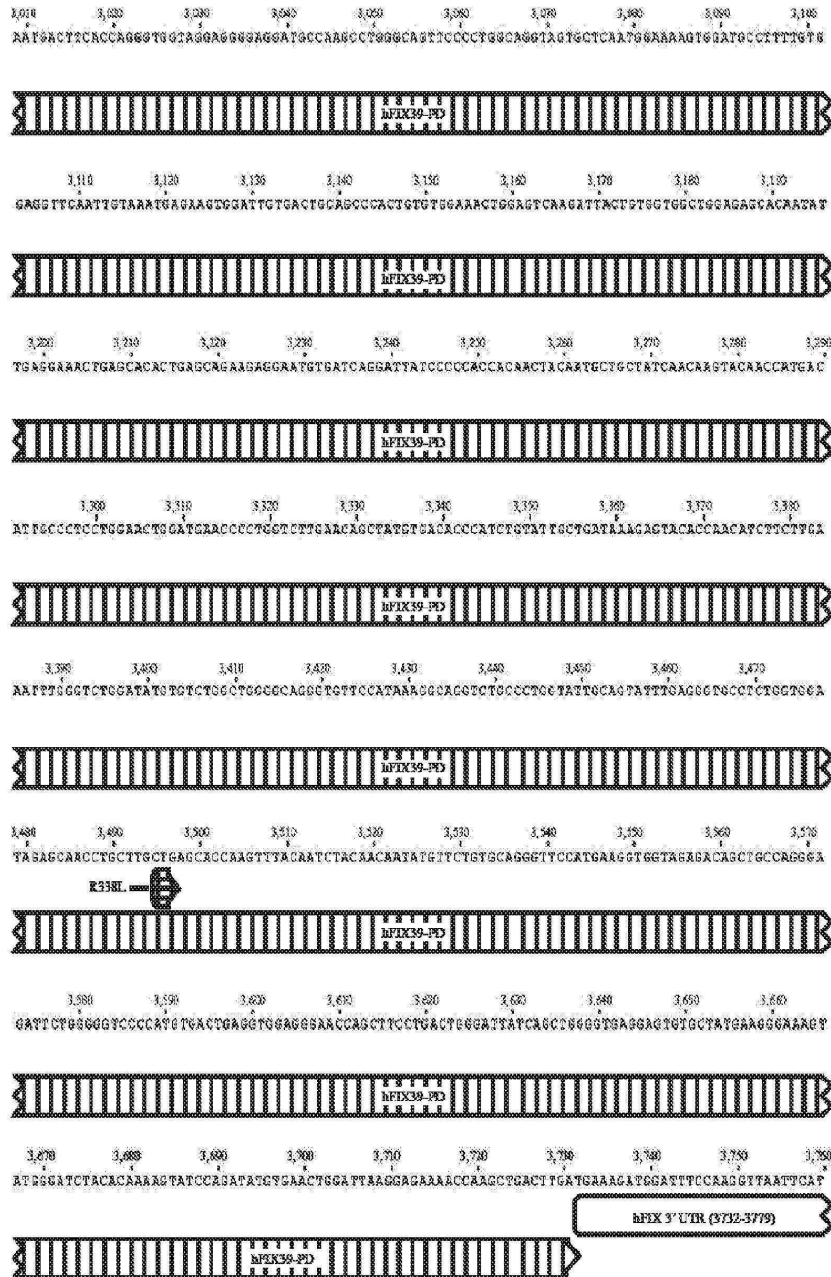
도면13c

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



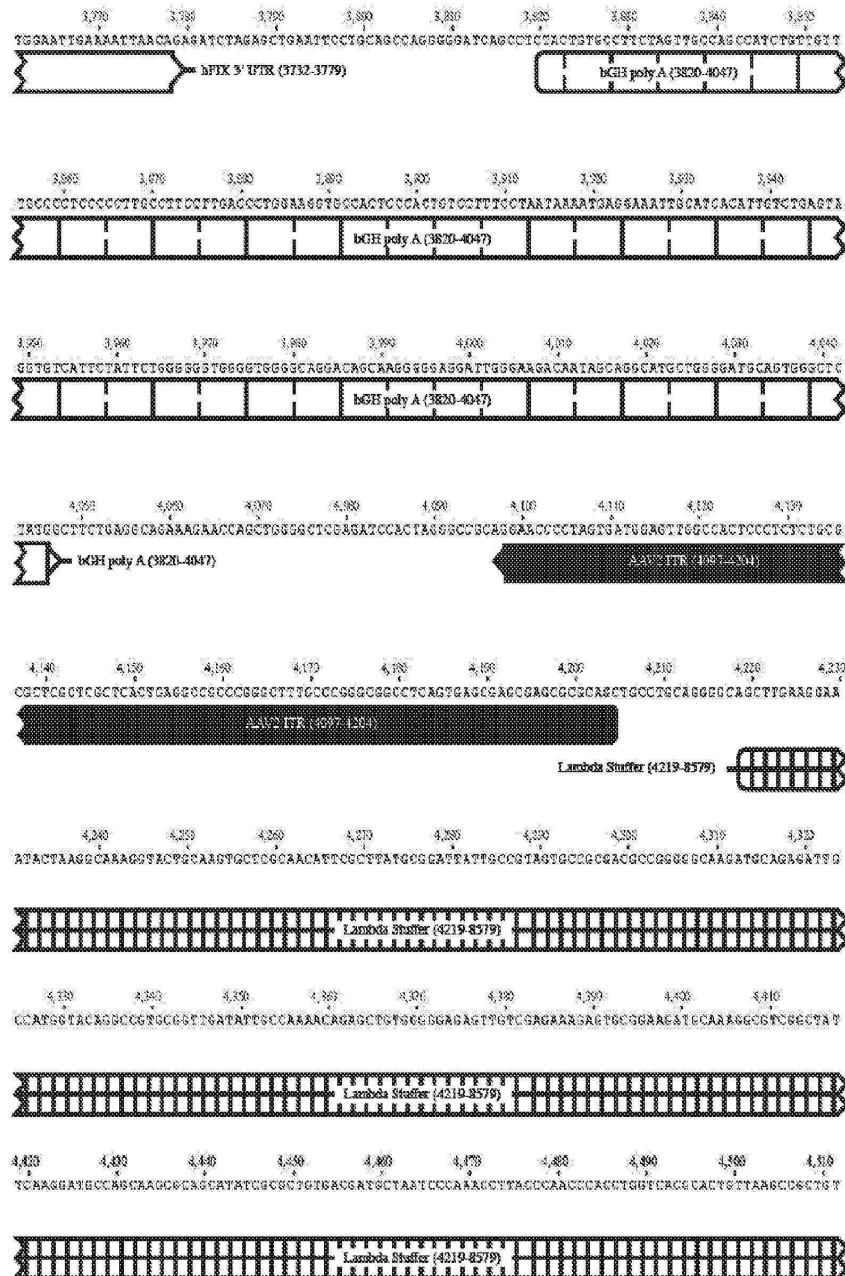
도면13e

pAAV-ApoE hAAT-FIX3



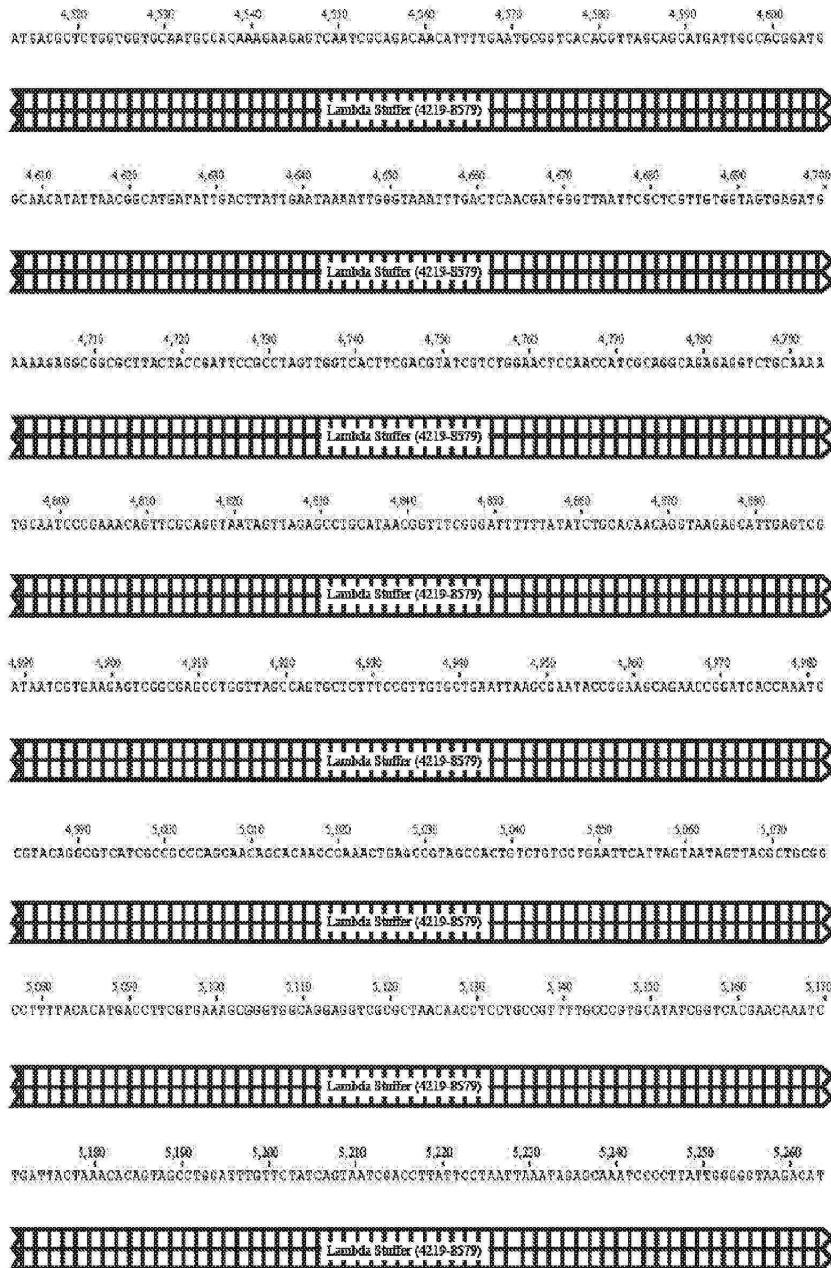
도면13f

pAAV-ApoE haAT-FIX3



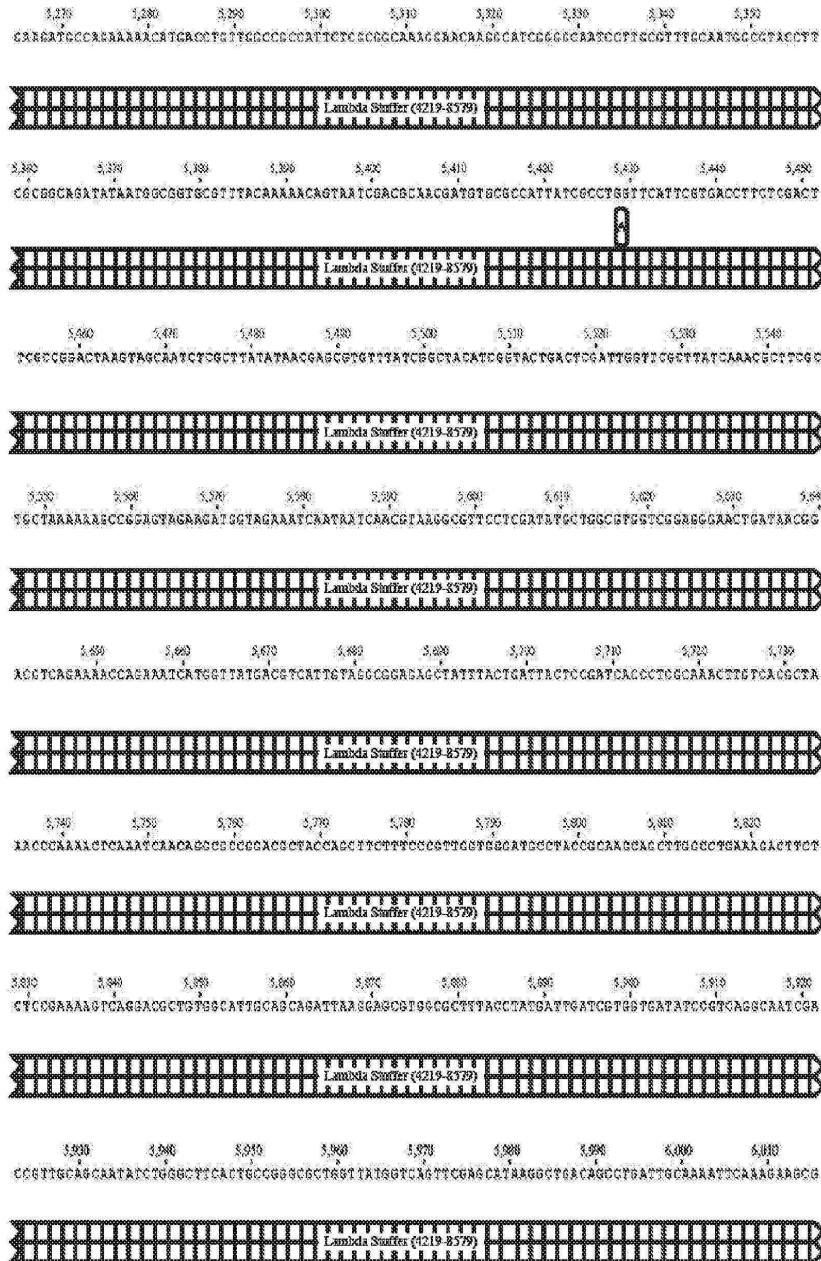
도면 13g

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



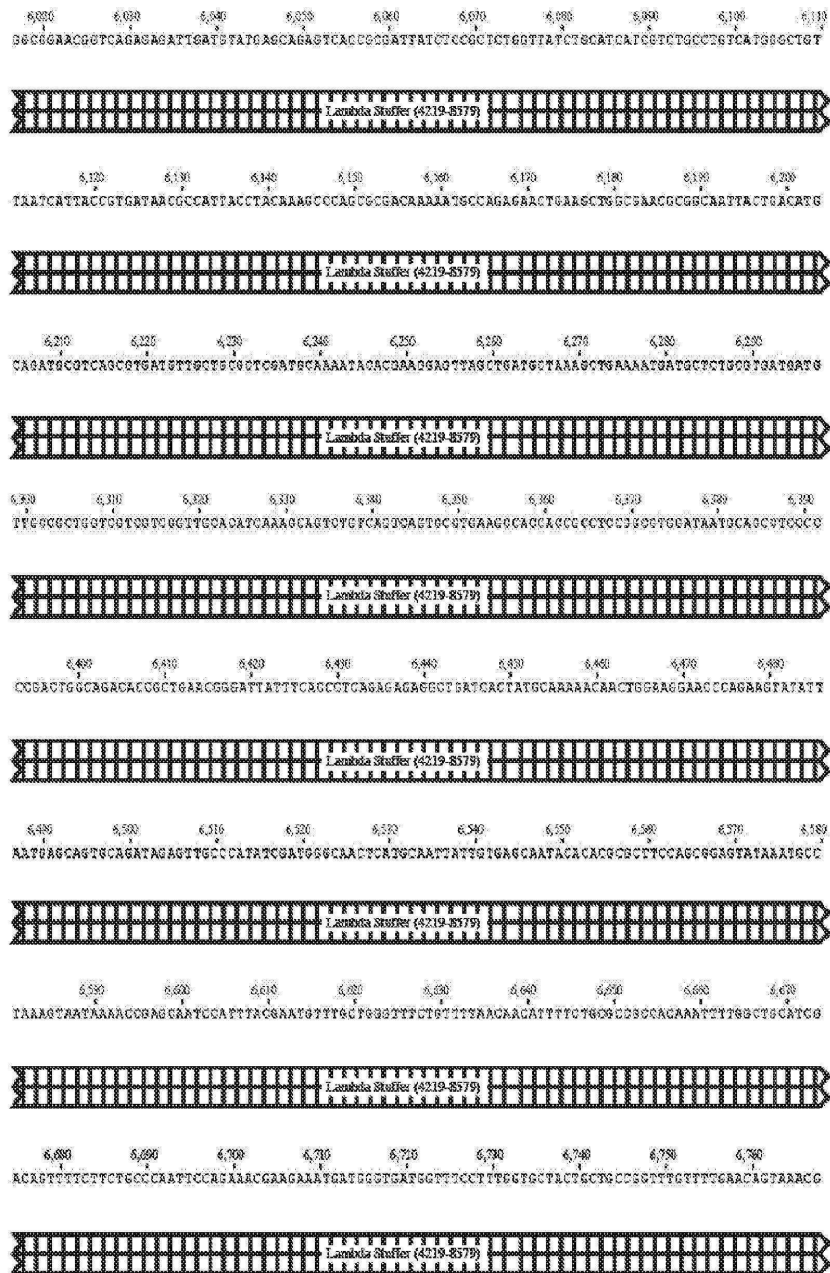
도면 13h

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



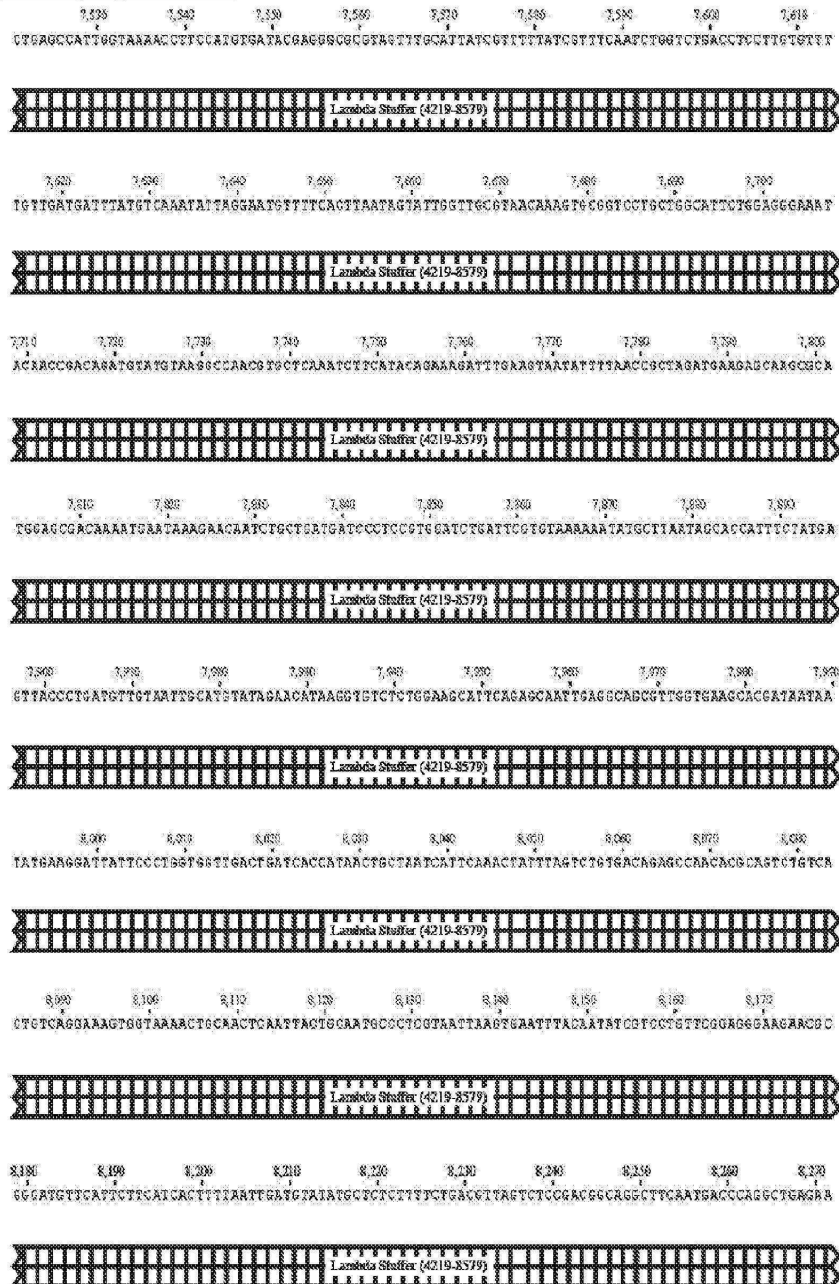
도면 13i

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



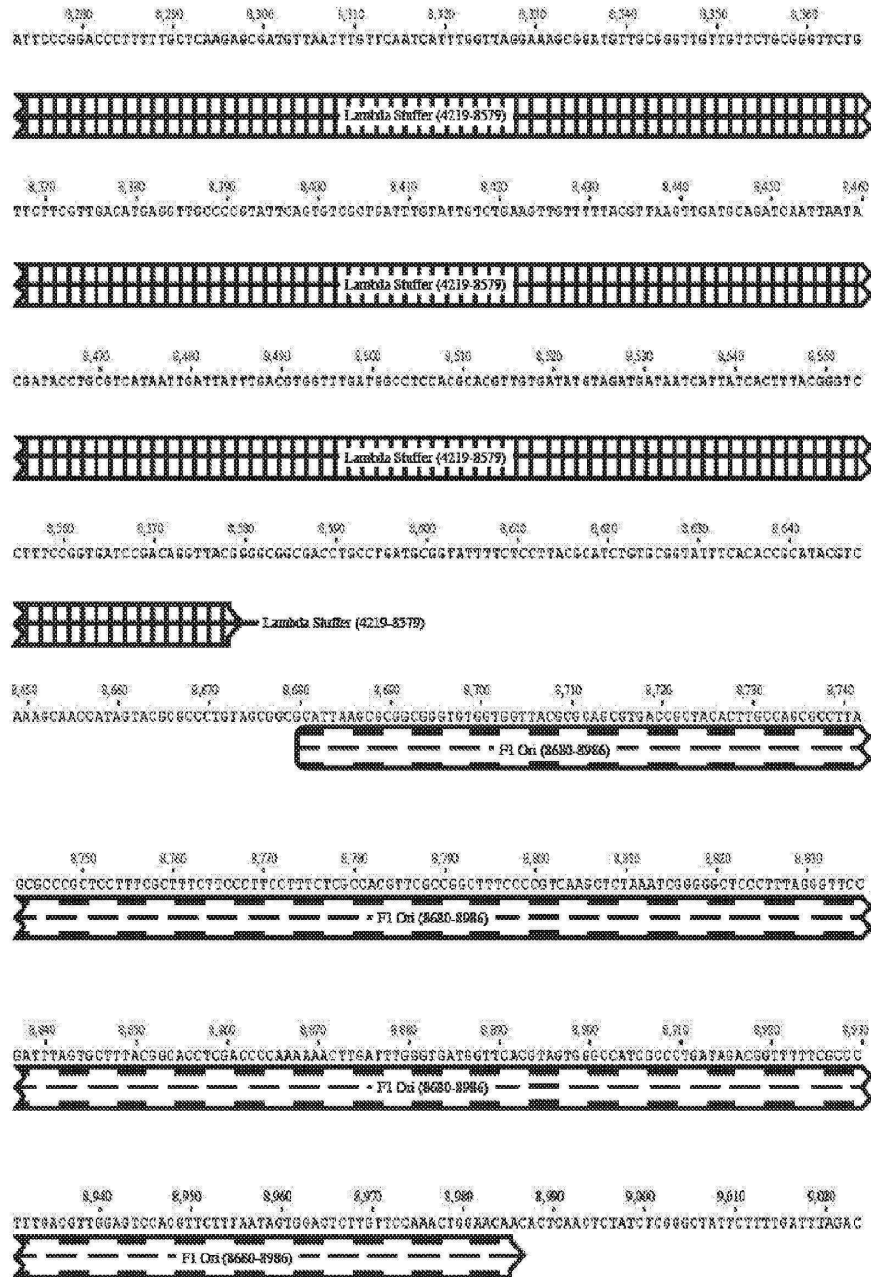
도면 13k

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



도면131

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3



도면 13m

pAAV-ApoE_hAAT-FIX3

8,036 8,040 8,050 8,060 8,070 8,080 8,090 8,100
 CTGGCAAGGCTGTCAGAGCTTGGCACTGGCCCTGCTGTCTTCTACCAAGCTCTGTGACTGAGGAAAGCCCTGGCGGTAGCTCAAGTTTATCTCCCTTTCAGGACAGT

9,120 9,130 9,140 9,150 9,160 9,170 9,180 9,190 9,200 9,210
 CCCCCCTTCCGACGCTCCGCTATTAATACGACACGCGCCGCAACCTATCCCGCTTCGCAACGCTTCCGACGCGCTCAATGCGCAATGCGCAATTTATCTCA

A
 0.220 0.230 0.240 0.250 0.260 0.270 0.280 0.290 0.300
 ACCAAGCGGCGGGTCCGTCGAATGACGGTAATGCCTFCCGAGTGTTACAACCAATTAACTATTGTGATTAGAAAACACTCATCAGACATCAAA

KRM K (9284-10096)

2,130 2,220 2,310 2,340 2,350 2,360 2,370 2,380 2,390 2,400
 GAACTGCAATTTTATCTCATTCAGGAGTTATCATATCCATATTTTGTGAAAAGCCCTTTCTCTGTAATGTAAGAGAGAAATCTCCGAGGACAGTTCCCA

San N (9284-10096)

5,310 5,320 5,330 5,340 5,350 5,360 5,370 5,380 5,390
 TAGGATGGCAAGATCTCTGTTACGGTCTGGCGCTTCGGACCTCTGTCACATCTCAATACACACATTAATTTCCCTGCTCAAAATATAGGTTATCT

Xan R (9284-10986)

5,500 5,510 5,520 5,530 5,540 5,550 5,560 5,570 5,580
 AGTCGAAATCTCCGATCACTGCGCTGAATCCCGGTGACGAATGSCAAAGCTTATGCATTCTTTTCCGAACTTCTTTCACACGCCGAGGCATATC

Sam R (9284-10096)

5' 250 500 750 1000 1250 1500 1750 2000 2250 2500
GCTCGTCTCATCAAAATGACATGCAATCAACCAACCGGTATTCATTCGCGAATTCGGCCTGACCGGAGAGCAAAATTCGGCAATCCCTGTTAAAGAGGCAC

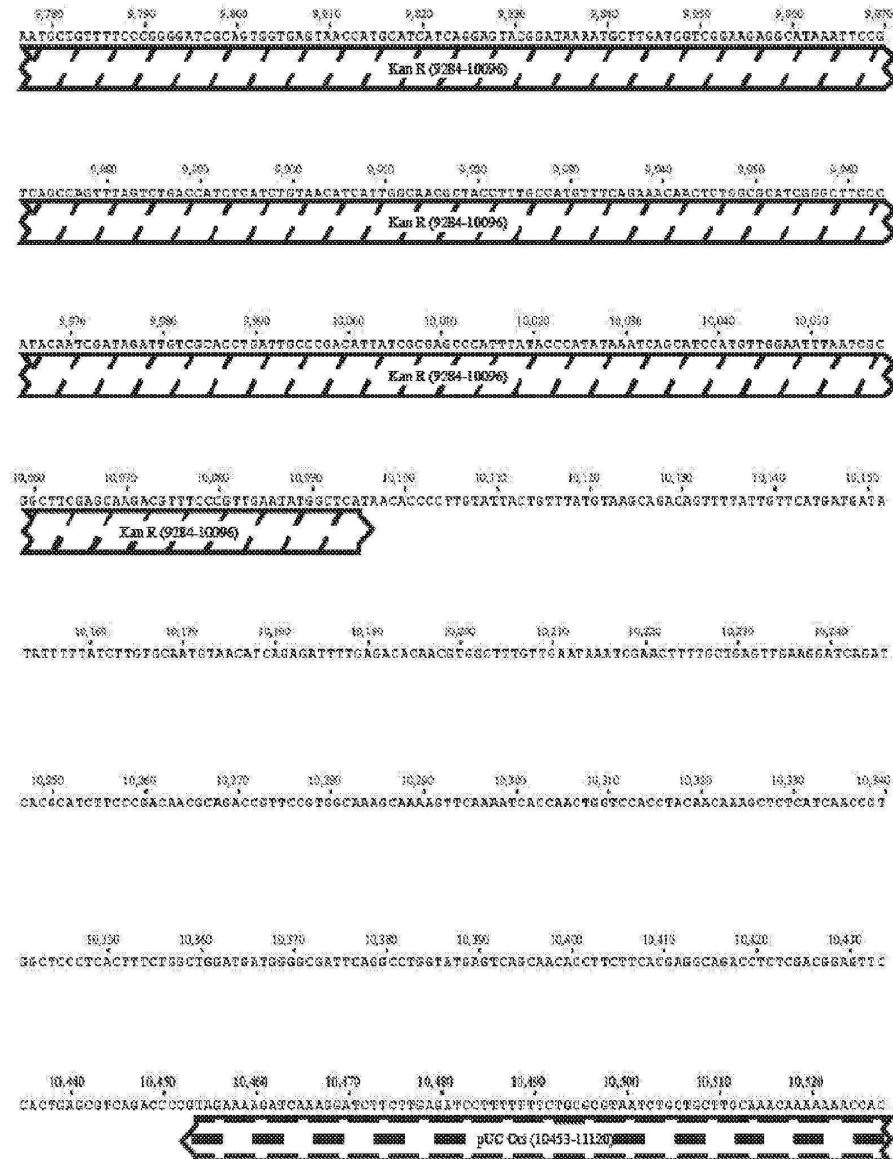
K 308 E (9284-10096)

9,692 9,700 9,710 9,720 9,730 9,740 9,750 9,760 9,770
 ATTACGAACCGGAATCGAATGCGACGGCGAGGAGACATGCCAAGCCGATCAACATATTTTCACCGGAATCGAGGATATTTCTCTATATACCTGG

San R (9284-10026)

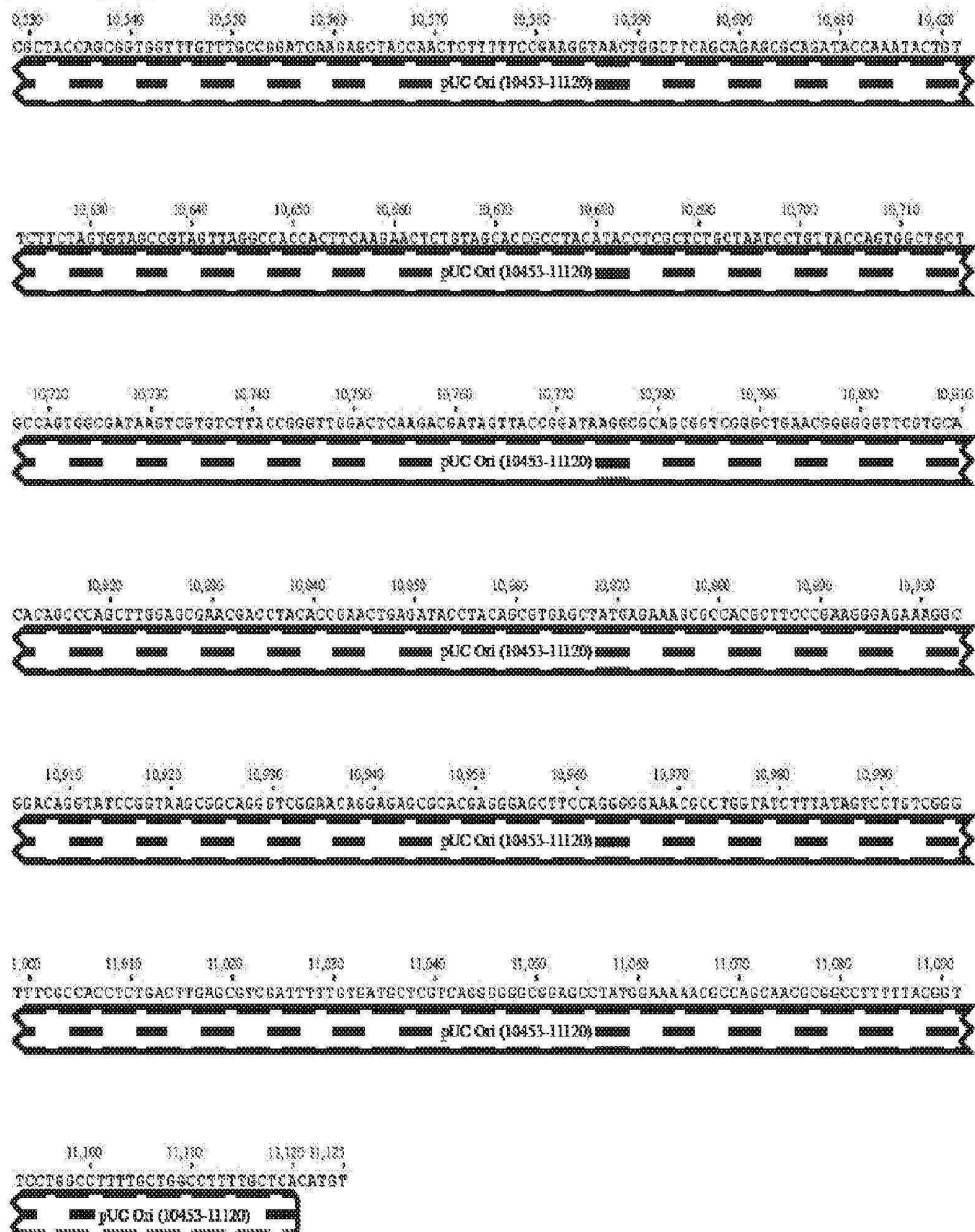
도면13n

pAAV-ApoE hAAT-FIX3



도면13o

pAAV-ApoE hAAT-FIX3



도면14

인트론 A 핵산 서열 (SEQ ID NO:17):

GTTTGTTCCTTTTTATAATACATTGAGTATGCTTGCCTTTTAGATATAGAAATATCTGATTCTGTC
TTCTTCACTAAATTTTGATTACATGATTTGACAGCAATATTGAAGAGTCTAACAGCCAGCACCCAG
GTTGGTAAGTACTGGTCTTTTGTAGCTAGGTTTTCTTCTTCACTTTTAAACTAAATAGATGG
ACAATGCTTATGATGCAATAAGGTTTAATAAACACTGTTCAAGTTCAGTATTTGGTCATGTAATTCCT
GTTAAAAAACAGTCATCTCCTTGGTTTAAAAAATTAAAAAGTGGGAAAAACAAAGAAATAGCAGAA
TATAGTGAAAAAATAAACCACAGTATTTTGTTTGGACTTACCCTTTGAAATCAAATTGGGAAA
CAAAAGCACAAACAGTGGCCTTATTTACACAAAAAGTCTGATTTTAAGATATGTGACAATTCAG
GTTTCAGAAGTATGTAAGGAGGTGTGTCTCTAATTTTTTAAATTATATATCTTCAATTTAAAGTTTT
AGTTAAACATAAAGATTAACTTTTCATTAGCAAGCTGTTAGTTATCACCAAAGCTTTTCATGGAT
TAGGAAAAAATCATTTTGTCTCTATCTCAAACATCTTGGAGTTGATATTTGGGGAAAAACAATACT
CAGTTGAGTTCCCTAGGGGAGAAAAAGCAAGCTTAAGAATTGACACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTA
TTGCAACATATATCACTTTGTTTTCACAACACTACAGTGACTTTATTTATTTCCAGAGGAAGGCAT
ACAGGGAAGAAATTATCCCATTTGGACAAACAGCATGTTCTCACAGTAAGCACTTATCACACTTAC
TTGTCAACTTTCTAGAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAGGATCAGGGGTGCCAACCTAAGC
ACCCCCAGAAAGCTGACTGGCCCTGTGGTTCCCACTCCAGACATGATGTCAGCTGTGAAATCCACC
TCCCTGGACCATAATTAGGCTTCTGTCTTCAGGAGACATTTGTTCAAAGTCATTTGGGCAACCATA
TTCTGAAAAACAGCCAGCCAGGGTGATGGATCACTTTGCAAAGATCCTCAATGAGCTATTTTCAAG
TGATGACAAAGTGTGAAGTTAAGGGCTCATTTGAGAACTTTCTTTTTCATCCAAAGTAAATTCAA
TATGATTAGAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTCTCTTGAATAAAAGTAAATTTGAATTTTAATT
CCTAAATCTCCATGTGTATACAGTACTGTGGGAACATCACAGATTTTGGCTCCATGCCCTAAAGAG
AAATTGGCTTTTCAGATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTTCTTAAGAGATGTAAAAATTTTCATGA
TGTTTCTTTTTTGCTAAACATAAAGAATTATCTTTTACATTTTCAG

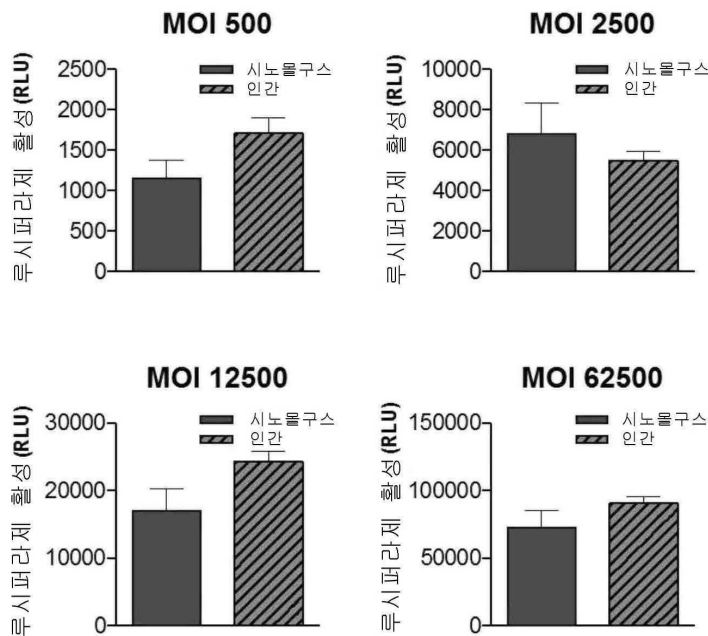
도면15

인트론 A를 포함하는 FIX39 핵산 서열 (인트론 A는 밑줄침) (SEQ ID NO:25)

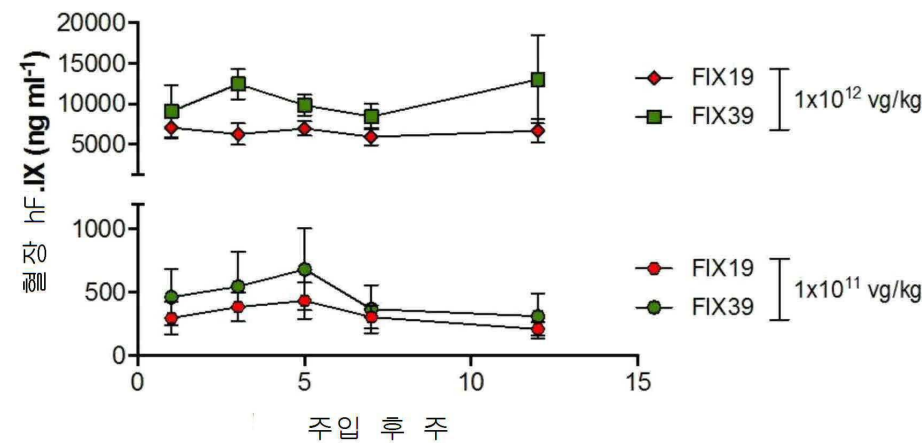
ATGCAGAGGGTGAACATGATCATGGCTGAGAGCCCTGGCCTGATCACCATCTGCCTGCTGGGCTAC
CTGCTGTCTGCTGAATGTCACGGTTTGTTCCTTTTTATAATACATTGAGTATGCTTGCCTTTTGA
TATAGAAATATCTGATTCTGCTTCTTCTCACTAAATTTTGATTACATGATTGACAGCAATATTGAAG
AGTCTAACAGCCAGCAGCCAGGTGGTAACTAGTGGTCTTGTAGCTAGGTTTTCTTCTTCTTCA
CTTTTAAACTAAATAGATGGACAATGCTTATGATGCAATAAGGTTTAATAAACACTGTTCAAGTTC
AGTATTTGGTCATGTAATTCCTGTGTAACAAACAGTCACTCCTTGGTTTAAAAAATTAAAAAGTGG
GAAAAACAAAGAAATAGCAGAATATAGTGAAAAAATAAACCACAGTATTTTGTTTGGACTTACC
ACTTTGAAATCAAATTGGGAAACAAAGCACAAACAGTGGCCTTATTTACACAAAAAGTCTGATT
TAAGATATGTGACAATTCAGGTTTCAGAAGTATGTAAGGAGGTGTGTCTCTAATTTTTTAAATT
ATATATCTTCAATTTAAAGTTTTAGTTAAAAACATAAAGATTAACTTTTCATTAGCAAGCTGTTAGTT
ATCACCAAAGCTTTTCATGGATTAGGAAAAATCATTTTGTCTCTATCTCAAACATCTTGGAGTTG
ATATTTGGGGAACACAATACTCAGTTGAGTTCCCTAGGGGAGAAAAAGCAAGCTTAAGAATTGAC
ACAAAGAGTAGGAAGTTAGCTATTGCAACATATATCACTTTGTTTTCACAACACTACAGTGACTTT
ATTTATTTCCAGAGGAAGGCATACAGGGAAGAAATATCCCATTTGGACAAACAGCATGTTCTCA
CAGTAAGCACTTATCACACTTACTTGTCAACTTTCTAGAATCAAATCTAGTAGCTGACAGTACCAG
GATCAGGGGTGCCAACCTAAGCACCCAGAAAGCTGACTGGCCCTGTGGTTCCCACTCCAGAC
ATGATGTCAGCTGTGAAATCCACCTCCCTGGACCATAATTAGGCTTCTGTCTTCAGGAGACATTT
GTTCAAAGTCATTTGGGCAACCATATTTCTGAAAAACAGCCAGCCAGGGTGATGGATCACTTTGCAA
AGATCCTCAATGAGCTATTTTCAAGTGATGACAAAGTGAAGTTAAGGGCTCATTTGAGAACTTT
CTTTTTCATCCAAAGTAAATCAAAATATGATTAGAAATCTGACCTTTTATTACTGGAATTTCTTGA
CTAAAAGTAAATTTGAATTTTAATTCCTAAATCTCCATGTGTATACAGTACTGTGGGAACATCACA
GATTTTGGCTCCATGCCCTAAAGAGAAATTGGCTTTTCAGATTATTTGGATTAAAAACAAAGACTTT
CTTAAGAGATGTAAATTTTCATGATGTTTTCTTTTTTGCTAAACATAAAGAATTATCTTTTACAT
TTCAGTTTTTCTGATCATGAAATGCCAACAAATTTCTGAATAGACCAAAGAGGTATAACTCTGG
CAAGCTTGAAGAGTTGTACAGGGGAATCTGGAGAGAGAGTGTATGGAAGAGAAGTGCAGCTTTG
AGGAAGCCAGAGAAGTGTTTGAAAATACAGAGAGAGAACAAGTGAATTTTGAAGCAGTATGTGGAT
GGTGATCAATGTGAGAGCAATCCCTGCTTGAATGGGGGAGCTGTAAAGATGATATCAACAGCTA
TGAATGTTGGTGTCCCTTGGATTGAGGGGAAAAACTGTGAGCTTGATGTGACCTGTAATATCAA
GAATGGCAGGTGTGAGCAATTTTGAAGAATTTCTGCTGATAACAAAGTGGTCTGTAGCTGCACTGA
GGGATATAGGCTGGCTGAAAAACAGAAGAGCTGTGAACCTGCAGTGCCTTTTCCCTGTGGGAGAG
TGTCTGTGAGCCAAACCAGCAAGCTGACTAGGGCTGAAGCAGTCTTTCCTGATGTAGATTATGTGA
ATAGACTGAGGCTGAGACAATCCTTGACAATATCACTCAGAGCACACAGAGCTTCAATGACTTC
ACCAGGTGGTAGGAGGGGAGGATGCCAAGCCTGGGCAAGTTCCTTGGCAGGTAGTGCTCAATGG
AAAAGTGGATGCCTTTTGTGGAGGTTCAATTGTAATGAGAAGTGGATTGTGACTGCAGCCCACTG
TGTGGAACCTGGAGTCAAGATTACTGTGGTGGCTGGAGAGCACAATATTGAGGAACTGAGCACA
CTGAGCAGAAGAGGAATGTGATCAGGATTATCCCCACCACAACATAAGTCTGCTATCAACAAG
TACAACCATGACATTGCCCTCTGGAACTGGATGAACCCCTGGTCTTGAACAGCTATGTGACACCC
ATCTGTATTGCTGATAAAGAGTACACCAACATCTTCTGAAATTTGGGTCTGGATATGTGTCTGGCT
GGGGCAGGGTGTTCATAAAGGCAGGTCTGCCCTGGTATTGTCAGTATTTGAGGGTGCCTCTGGTGG
ATAGACCAACTGCTGTGCTGAGCACCAAGTTTACAATCTACAACAATATGTTCTGTGCAAGGTTCC
ATGAAGGTGGTAGAGACAGCTGCCAGGGAGATTCTGGGGTCCCATGTGACTGAGGTGGAGGGA
ACCAGCTTCTGACTGGGATTATCAGCTGGGGTGAGGAGTGTGCTATGAAGGGAAGTATGGGAT
CTACACAAAAGTATCCAGATATGTGAAGTGAATTAAAGAGAAAACCAAGCTGACTTGA

도면16

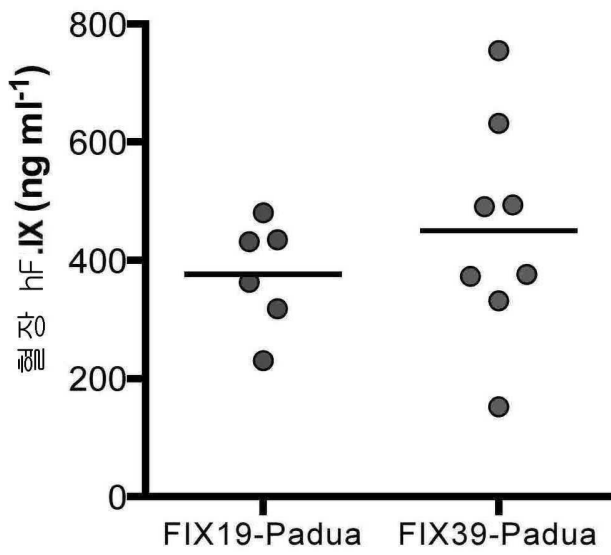
시험관 내 환경에서 분석된 VVA-4-1 변이체 캡시드(SEQ ID NO:4)의
형질도입 효율



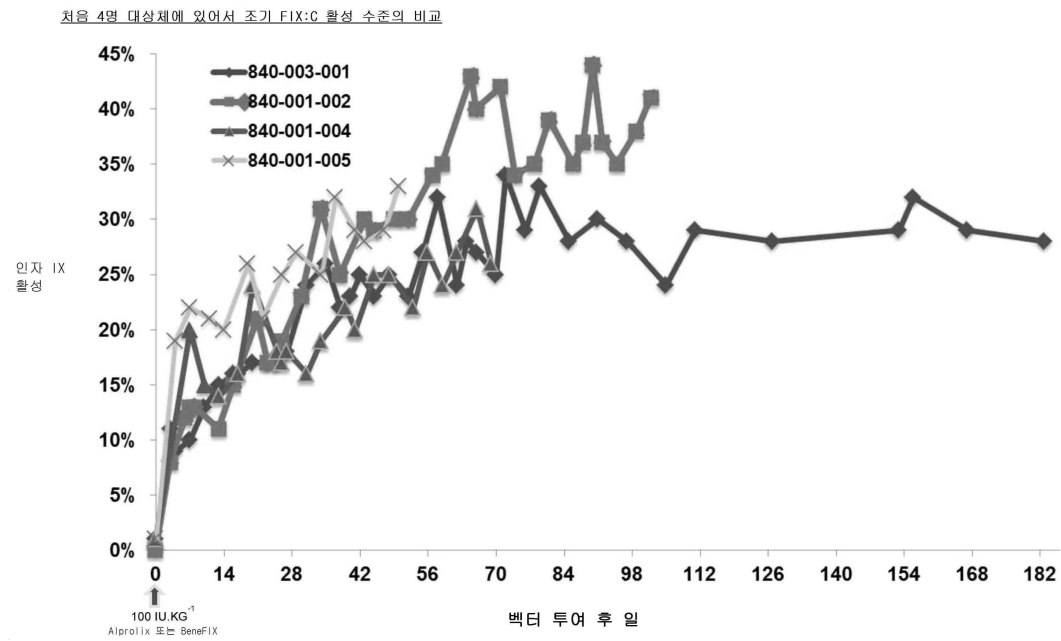
도면17



도면18

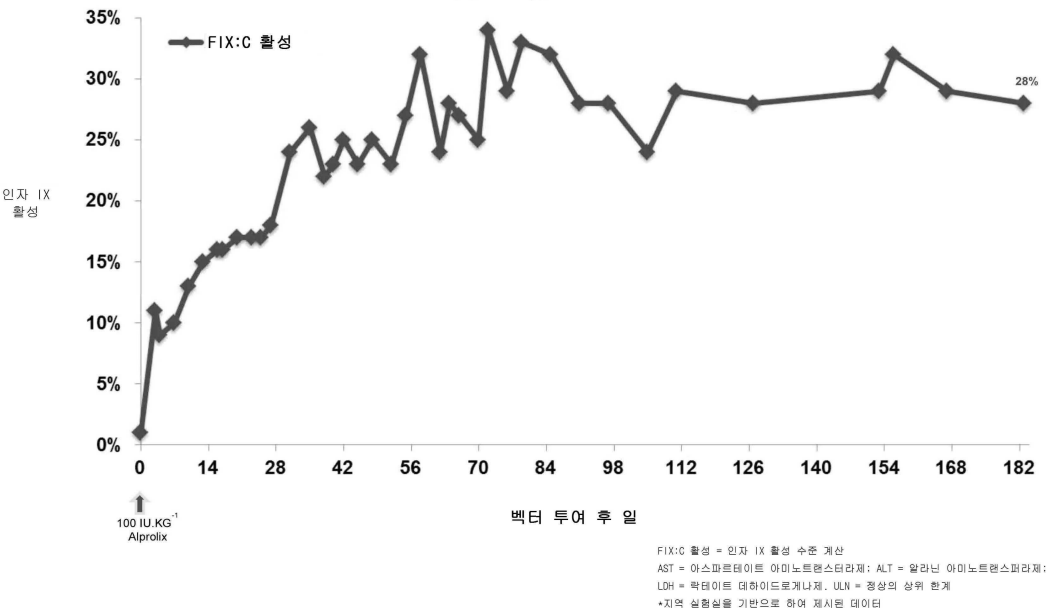


도면19



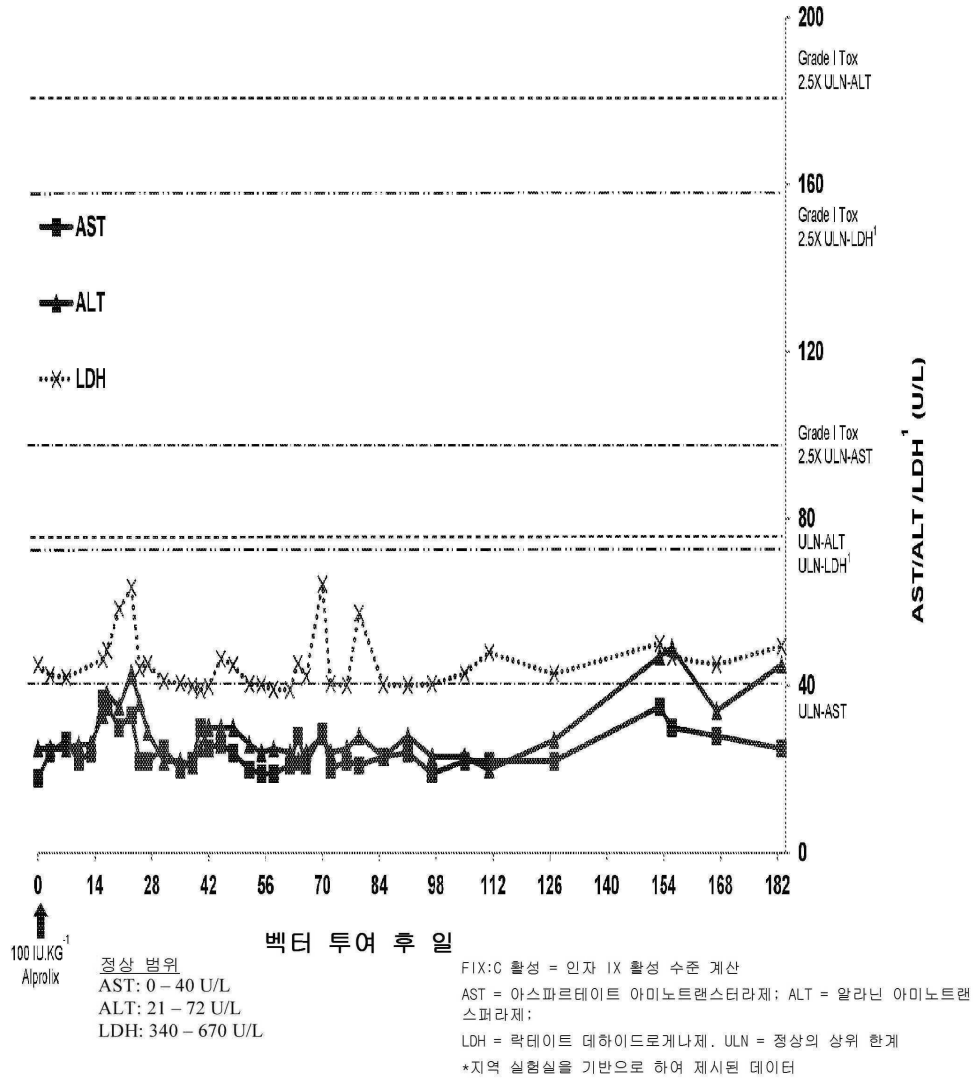
도면20a

AAV-FIX39-Padua: 1st 처리 일 183 FIX:C 활성 수준 28%
마지막 Alprolix 주입 후부터 183일에 처리 1 [5x10¹¹ vg/kg]
용량: 4.08x10¹³ vg AAV-FIX39-Padua + 2.01x10¹⁴ cp 빈 캡시드 [1:5]



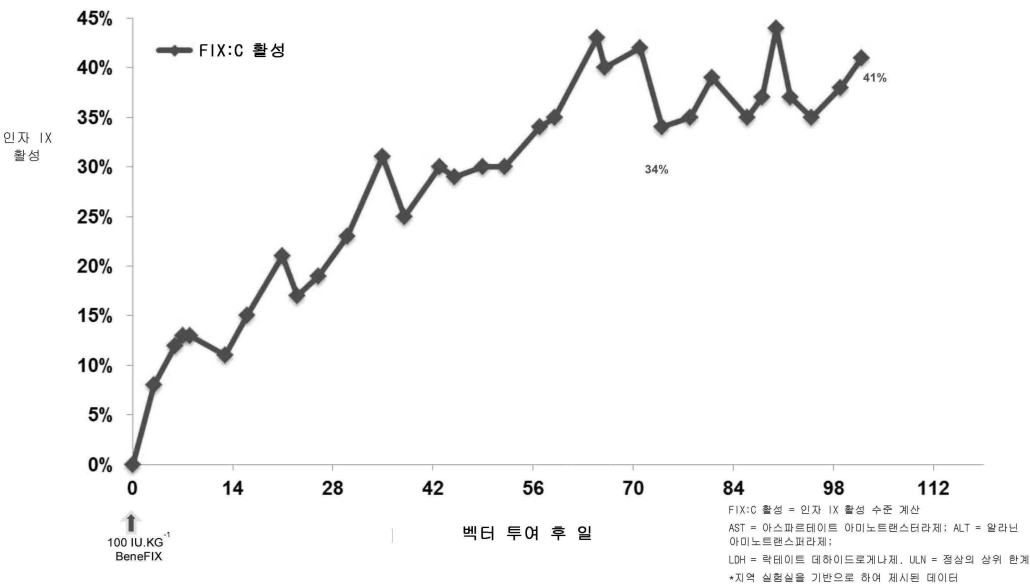
도면20b

AAV-FIX39-Padua: 1st 처리 일 183 간 기능
 마지막 Alprolix 주입 후부터 183일에 처리 1 [5×10^{11} vg/kg]
 4.08×10^{13} vg AAV-FIX39-Padua + 2.01×10^{14} cp 빈 캡시드 [1:5]



도면21a

AAV-FIX39-Padua: 2nd 처리 일 102 FIX:C 활성 수준 41%
마지막 BeneFIX 주입 후부터 102일에 처리 2 [5x10¹¹ vg/kg]
용량: 2.84x10¹³ vg AAV-FIX39-Padua + 1.39x10¹⁴ cp 빈 캡시드[1:5]

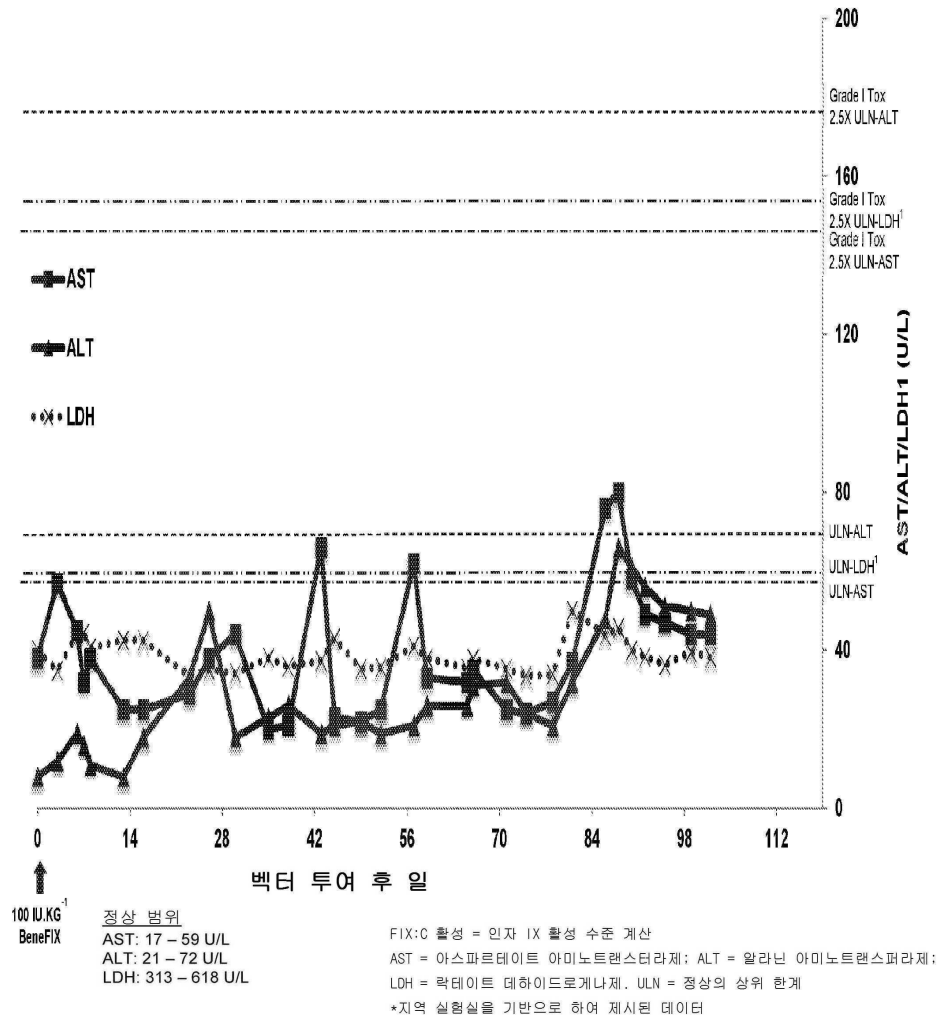


도면21b

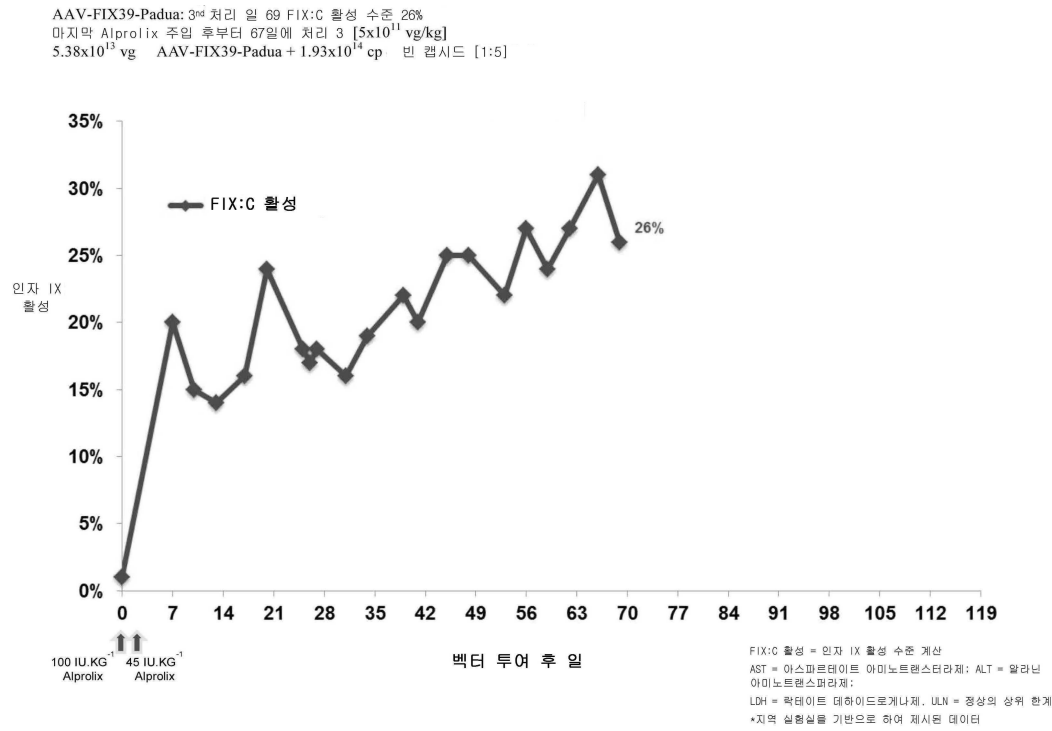
AAV-FIX39-Padua: 2nd 처리 일 102 간 기능

마지막 BeneFIX 주입 후부터 102일에 처리 2 [5×10^{11} vg/kg]

2.84×10^{13} vg AAV-FIX39-Padua + 1.39×10^{14} cp 빈 캡시드 [1:5]

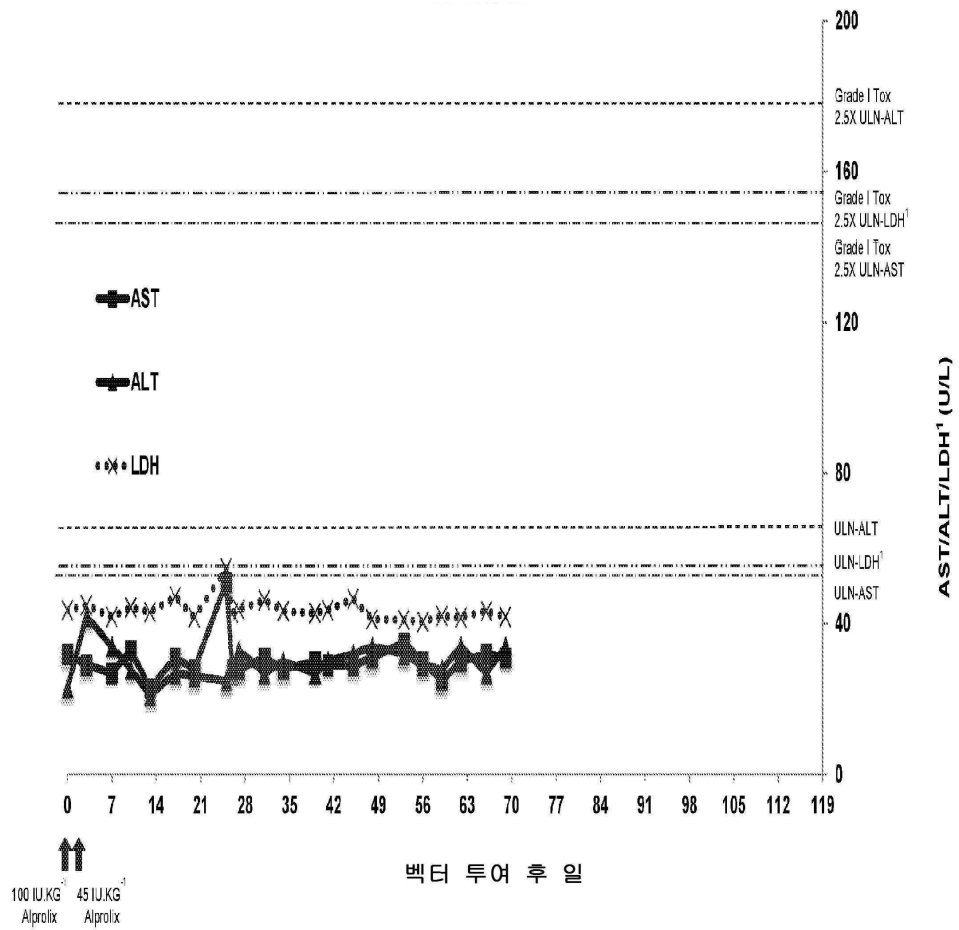


도면22a



도면22b

AAV-FIX39-Padua: 3rd 처리 일 69 간 기능
 마지막 Alprolix 주입 후부터 67일에 처리 3 [5×10^{11} vg/kg]
 5.38×10^{13} vg AAV-FIX39-Padua + 1.93×10^{14} cp 빈 캡시드 [1:5]



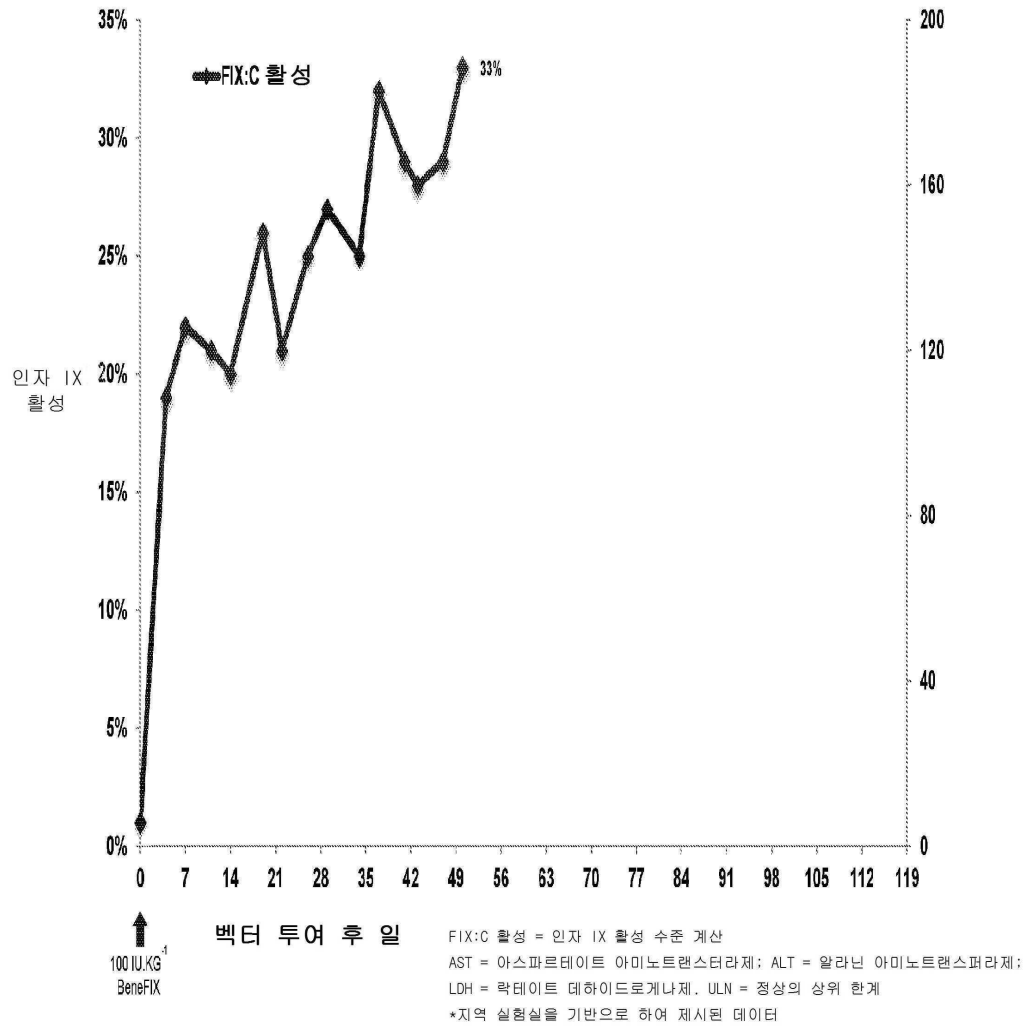
백터 투여 후 일

정상 범위
 AST: 17 – 59 U/L
 ALT: 21 – 72 U/L
 LDH: 313 – 618 U/L

FIX:C 활성 = 인자 IX 활성 수준 계산
 AST = 아스파르테이트 아미노트랜스퍼라제; ALT = 알라닌 아미노트랜스퍼라제;
 LDH = 락테이트 데하이드로게나제, ULN = 정상 상위 한계
 *지역 실험실을 기반으로 하여 제시된 데이터

도면23a

AAV-FIX39-Padua: 4th 처리 일 50 FIX:C 활성 수준 33%
 마지막 BeneFIX 주입 후부터 50일에 처리 4 [5×10^{11} vg/kg]
 5.57×10^{13} vg AAV-FIX39-Padua + 2.22×10^{14} cp 빈 캡시드 [1:4]

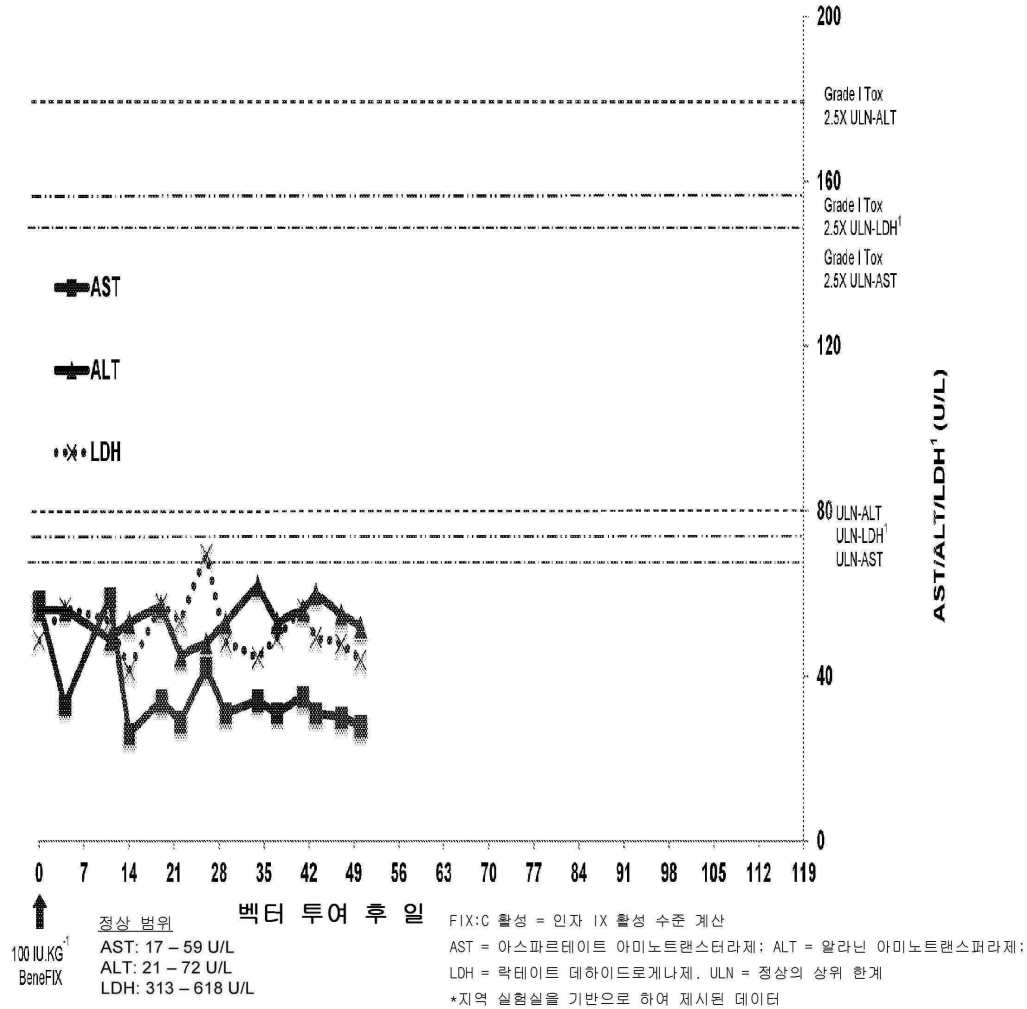


도면23b

AAV-FIX39-Padua: 4th 처리 일 50 간 기능

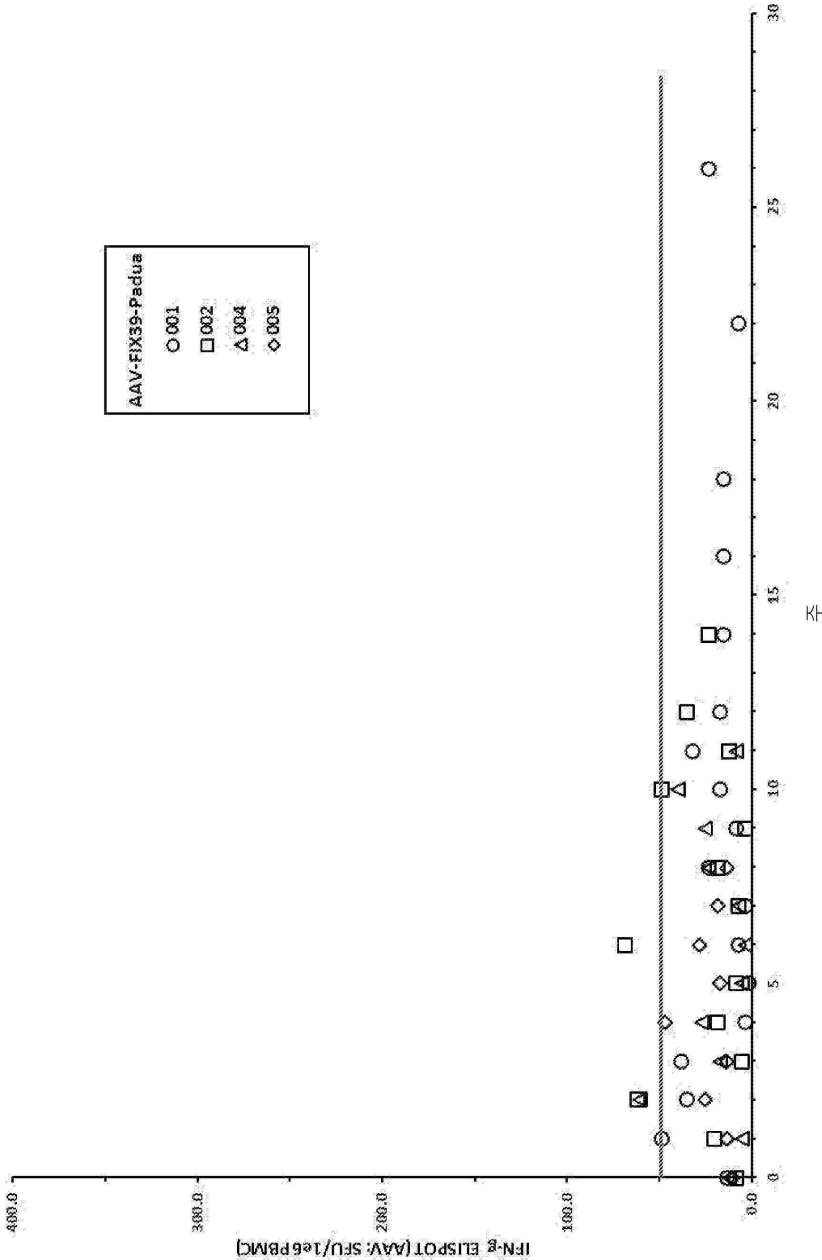
마지막 BeneFIX 주입 후부터 50일에 처리 4 [5×10^{11} vg/kg]

5.57×10^{13} vg AAV-FIX39-Padua + 2.22×10^{14} cp 빈 캡시드 [1:4]

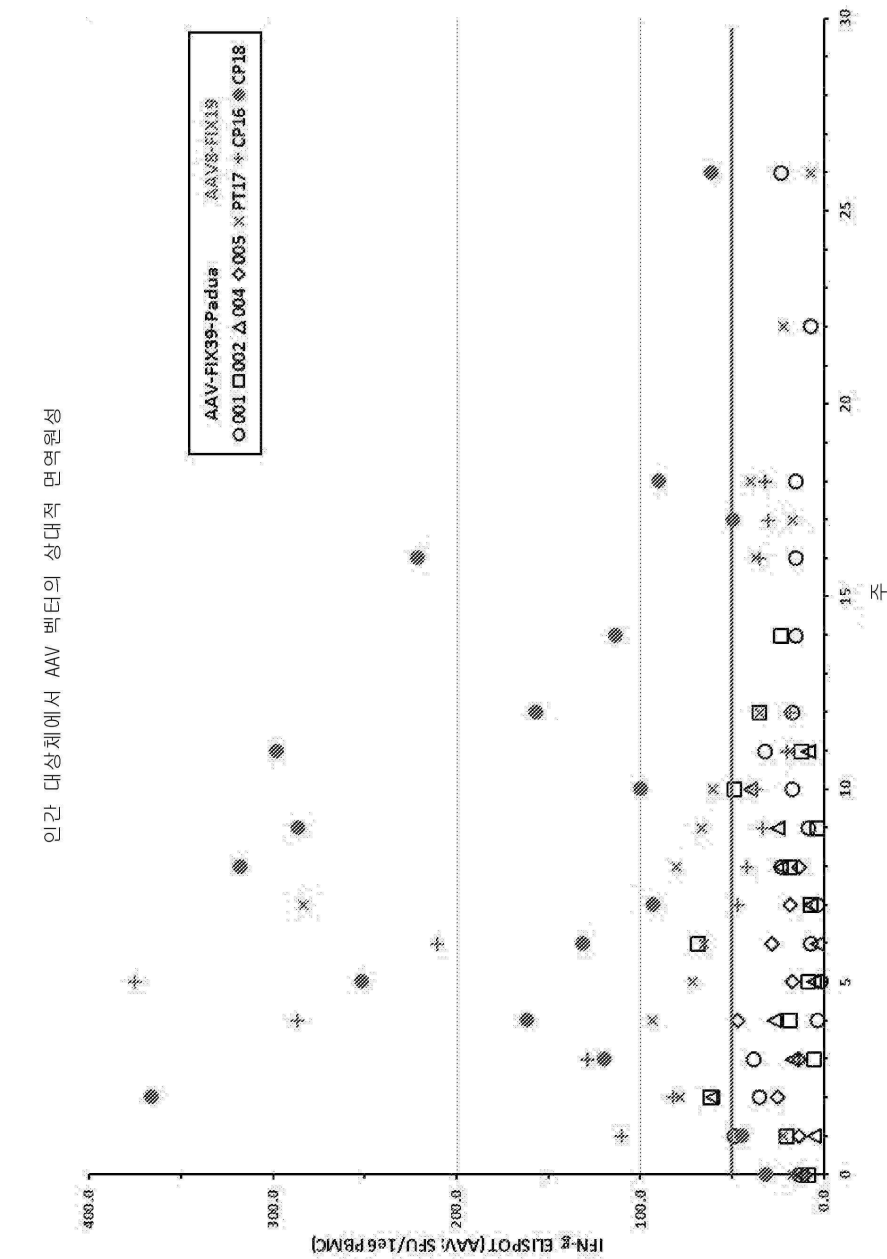


도면24a

인간 대상체에서 AAV-FIX39-Padua의 저 면역원성 프로파일



도면24b



서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> THE CHILDREN'S HOSPITAL OF PHILADELPHIA
- HIGH, Katherine A.
- ANGUELA, Xavier
- <120> Modified Factor IX, and Compositions, Methods and Uses for Gene Transfer to Cells, Organs and Tissues

<130> 074659-0447746
 <140> To Be Assigned
 <141> 2016-06-23
 <150> 62/183,599
 <151> 2015-06-23
 <150> 62/315,453
 <151> 2016-03-30
 <150> 62/338,315
 <151> 2016-05-18
 <150> 62/348,781
 <151> 2016-06-10
 <150> 62/349,572
 <151> 2016-06-13

<160> 27
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 738
 <212> PRT
 <213> Adeno-associated Virus
 <400> 1

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

100	105	110	
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro			
115	120	125	
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Lys Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg			
130	135	140	
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile			
145	150	155	160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln			
165	170	175	
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro			
180	185	190	
Pro Ala Gly Pro Ser Gly Leu Gly Ser Gly Thr Met Ala Ala Gly Gly			
195	200	205	
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser			
210	215	220	
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val			
225	230	235	240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His			
245	250	255	
Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp			
260	265	270	
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn			
275	280	285	
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn			
290	295	300	
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn			
305	310	315	320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Lys Thr Ile Ala			
325	330	335	
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln			
340	345	350	

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

 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430

 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu
 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495

 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560

 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
610 615 620

Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
625 630 635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
645 650 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
675 680 685

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

<210> 2

<211> 601

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 2

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

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

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320
 Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met

 325 330 335
 Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln
 340 345 350
 Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp
 355 360 365
 Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn
 370 375 380
 Pro Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe

 385 390 395 400
 Pro Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp
 405 410 415
 Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys
 420 425 430
 Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn
 435 440 445
 Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln

 450 455 460
 Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln
 465 470 475 480
 Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro
 485 490 495
 Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile
 500 505 510
 Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn

 515 520 525
 Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
 530 535 540
 Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp
 545 550 555 560

Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val
 565 570 575
 Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile
 580 585 590
 Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu
 595 600
 <210> 3
 <211> 535
 <212> PRT
 <213> Adeno-associated Virus
 <400> 3
 Met Ala Ala Gly Gly Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala
 1 5 10 15
 Asp Gly Val Gly Ser Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp
 20 25 30
 Leu Gly Asp Arg Val Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro
 35 40 45
 Thr Tyr Asn Asn His Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly
 50 55 60
 Gly Ser Thr Asn Asp Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly
 65 70 75 80
 Tyr Phe Asp Phe Asn Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp
 85 90 95
 Gln Arg Leu Ile Asn Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn
 100 105 110
 Phe Lys Leu Phe Asn Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly
 115 120 125
 Thr Lys Thr Ile Ala Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr
 130 135 140
 Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly
 145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240

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

245 250 255

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

260 265 270

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

275 280 285

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

290 295 300

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

305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415
Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro

420 425 430
Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile

435 440 445
Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala

450 455 460
Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val

465 470 475 480
Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro

485 490 495
Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe

500 505 510
Ala Val Asn Thr Glu Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr

515 520 525
Arg Tyr Leu Thr Arg Asn Leu

530 535

<210> 4

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 4

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

1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro

20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Lys Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro

35 40 45
Gly Tyr Lys Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

50 55 60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Lys Ala Tyr Asp

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

 130 135 140
 Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile
 145 150 155 160
 Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln
 165 170 175
 Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro
 180 185 190
 Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

 195 200 205
 Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser
 210 215 220
 Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val
 225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
 245 250 255
 Leu Tyr Lys Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320

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

325 330 335

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

340 345 350

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

355 360 365

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

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410 415

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

420 425 430

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

435 440 445

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

450 455 460

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

465 470 475 480

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

485 490 495

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

500 505 510

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

515 520 525

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

530 535 540

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

545 550 555 560

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

565 570 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala

580 585 590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val

595 600 605
Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile

610 615 620
Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe

625 630 635 640
Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val

645 650 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe

660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

675 680 685
Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr

690 695 700
Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu

705 710 715 720
Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

725 730 735
Asn Leu

<210> 5

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 5

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

1 5 10 15

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

20	25	30
Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro		
35	40	45
Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro		
50	55	60
Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp		
65	70	75
80		
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala		
85	90	95
Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly		
100	105	110
Asn Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
115	120	125
Leu Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile		
145	150	155
160		
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Arg Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
165	170	175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
180	185	190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly		
195	200	205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser		
210	215	220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val		
225	230	235
240		
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His		
245	250	255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp		
260	265	270

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

 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350

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

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

 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr

515 520 525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540

Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
565 570 575
Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
580 585 590
Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
595 600 605

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

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

Asn Leu

<210> 6

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 6

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205

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

210 215 220

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

225 230 235 240
 Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His

 245 250 255
 Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
 260 265 270
 Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn
 275 280 285
 Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn
 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn

 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe
 355 360 365
 Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

 370 375 380
 Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
 385 390 395 400
 Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
 405 410 415
 Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
 420 425 430
 Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

 435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460
 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480

Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525
 His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
 530 535 540
 Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
 545 550 555 560
 Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr
 565 570 575
 Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala
 580 585 590
 Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln Gly Ala Leu Pro Gly Met Val
 595 600 605
 Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile
 610 615 620
 Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe
 625 630 635 640
 Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val
 645 650 655
 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 665 670
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 680 685
 Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 695 700
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
 705 710 715 720
 Gly Thr Tyr Ser Glu Pro Arg Pro Ile Gly Thr Arg Tyr Leu Thr Arg

	725	730	735
Asn Leu			
<210> 7			
<211> 738			
<212> PRT			
<213> Adeno-associated Virus			
<400> 7			
Met	Ala	Ala	Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1	5	10	15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro			
	20	25	30
Lys	Ala	Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro	
	35	40	45
Gly	Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro		
	50	55	60
Val	Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp		
65	70	75	80
Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala			
	85	90	95
Asp	Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly		
	100	105	110
Asn	Leu Gly Arg Ala Val Phe Gln Ala Lys Lys Arg Val Leu Glu Pro		
	115	120	125
Leu	Gly Leu Val Glu Ser Pro Val Arg Thr Ala Pro Gly Lys Lys Arg		
	130	135	140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile			
145	150	155	160
Gly	Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln		
	165	170	175
Thr	Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro		
	180	185	190

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

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

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

Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His
245 250 255

Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp
260 265 270

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

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

Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
305 310 315 320

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

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

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

Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn
370 375 380

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

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

Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430

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

435 440 445
 Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
 450 455 460

 Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
 465 470 475 480
 Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
 485 490 495
 Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His
 500 505 510
 Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
 515 520 525

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

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

 Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe
 660 665 670
 Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu
 675 680 685

Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr
 690 695 700
 Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val Asp Phe Ala Val Asn Thr Glu
 705 710 715 720

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

<210> 8

<211> 738

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 8

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

35 40 45
 Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro
 50 55 60
 Val Asn Ala Ala Asp Ala Ala Ala Leu Glu His Asp Arg Ala Tyr Asp
 65 70 75 80
 Gln Gln Leu Gln Ala Gly Asp Asn Pro Tyr Leu Arg Tyr Asn His Ala
 85 90 95
 Asp Ala Glu Phe Gln Glu Arg Leu Gln Glu Asp Thr Ser Phe Gly Gly

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

145 150 155 160
 Gly Lys Arg Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

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

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

 290 295 300
 Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn
 305 310 315 320
 Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala
 325 330 335
 Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln
 340 345 350
 Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe

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

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

645 650 655
Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn Gln Ala Arg Leu Ala Ser Phe
660 665 670
Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu

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

<210> 9

<211> 738

<212>

> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 9

Met Ala Ala Asp Gly Tyr Leu Pro Asp Trp Leu Glu Asp Asn Leu Ser
1 5 10 15
Glu Gly Ile Arg Glu Trp Trp Asp Leu Lys Pro Gly Ala Pro Lys Pro
20 25 30
Lys Ala Asn Gln Gln Arg Gln Asp Asn Gly Arg Gly Leu Val Leu Pro
35 40 45
Gly Tyr Arg Tyr Leu Gly Pro Phe Asn Gly Leu Asp Lys Gly Glu Pro

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

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

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

130 135 140
Pro Val Glu Pro Ser Pro Gln Arg Ser Pro Asp Ser Ser Thr Gly Ile

145 150 155 160
Gly Lys Lys Gly Gln Gln Pro Ala Lys Lys Arg Leu Asn Phe Gly Gln

165 170 175
Thr Gly Asp Ser Glu Ser Val Pro Asp Pro Gln Pro Ile Gly Glu Pro

180 185 190
Pro Ala Ala Pro Ser Gly Val Gly Pro Asn Thr Met Ala Ala Gly Gly

195 200 205
Gly Ala Pro Met Ala Asp Asn Asn Glu Gly Ala Asp Gly Val Gly Ser

210 215 220
Ser Ser Gly Asn Trp His Cys Asp Ser Thr Trp Leu Gly Asp Arg Val

225 230 235 240
Ile Thr Thr Ser Thr Arg Thr Trp Ala Leu Pro Thr Tyr Asn Asn His

245 250 255
Leu Tyr Arg Gln Ile Ser Asn Gly Thr Ser Gly Gly Ser Thr Asn Asp

260 265 270
Asn Thr Tyr Phe Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Gly Tyr Phe Asp Phe Asn

275 280 285
Arg Phe His Cys His Phe Ser Pro Arg Asp Trp Gln Arg Leu Ile Asn

290 295 300
Asn Asn Trp Gly Phe Arg Pro Lys Arg Leu Asn Phe Lys Leu Phe Asn

305 310 315 320
Ile Gln Val Lys Glu Val Thr Gln Asn Glu Gly Thr Arg Thr Ile Ala

325 330 335
Asn Asn Leu Thr Ser Thr Ile Gln Val Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln

340 345 350
Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe

355 360 365
Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn

370 375 380
Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr
385 390 395 400
Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr
405 410 415
Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser
420 425 430
Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu

435 440 445
Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu
450 455 460
Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp
465 470 475 480
Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser
485 490 495
Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His

500 505 510
Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn Pro Gly Val Ala Met Ala Thr
515 520 525
His Arg Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe Pro Ser Ser Gly Val Leu Met
530 535 540
Phe Gly Arg Gln Gly Ala Gly Arg Asp Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val
545 550 555 560
Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Arg Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr

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

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

610 615 620

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

625 630 635 640

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

645 650 655

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

660 665 670

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

675 680 685

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

690 695 700

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

705 710 715 720

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

725 730 735

Asn Leu

<210> 10

<211> 1386

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 10

atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg 60

ggctacctgc tgtctgctga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaatgc caacaaaatt 120

ctgaatagac caaagaggta taactctggc aagcttgaag agtttgtaca ggggaatctg 180

gagagagagt gtatggaaga gaatgcagc tttgaggaag ccagagaagt gtttgaaaat 240

acagagagaa caactgaatt ttggaagcag tatgtggatg gtgatcaatg tgagagcaat 300

ccctgcttga atggggggag ctgtaaagat gatataca gctatgaatg ttggtgtccc 360

tttggatttg aggggaaaaa ctgtgagctt gatgtgacct gtaatatcaa gaatggcagg 420

tgtgagcaat ttgcaagaa ttctgctgat aacaaagtgg tctgtagctg cactgagggg 480

tataggctgg ctgaaaacca gaagagctgt gaacctgcag tgccttttcc ctgtgggaga 540
 gtgtctgtga gccaaaccag caagctgact agggctgaag cagtctttcc tgatgtatag 600
 tatgtgaata gcaactgagcg tgagacaatc cttgacaata tcactcagag cacacagagc 660
 ttcaatgact tcaccagggt ggtaggaggg gaggatgcca agcctgggca gttcccttgg 720
 caggtagtgc tcaatggaaa agtggatgcc ttttgtggag gttcaattgt aaatgagaag 780
 tggattgtga ctgcagccca ctgtgtggaa actggagtca agattactgt ggtggctgga 840
 gagcacaata ttgaggaaac tgagcacact gagcagaaga ggaatgtgat caggattatc 900

ccccaccaca actacaatgc tgctatcaac aagtacaacc atgacattgc cctcctggaa 960
 ctggatgaac ccctggcttt gaacagctat gtgacacca tctgtattgc tgataaagag 1020
 tacaccaaca tcttcttgaa atttgggtct ggatatgtgt ctggctgggg cagggtgttc 1080
 cataaaggca ggtctgccct ggtattgcag tatgtgaggg tgcctctggt ggatagagca 1140
 acctgcttgc tgagcaccaa gtttacaatc tacaacaata tgttctgtgc agggttccat 1200
 gaaggtggta gagacagctg ccaggagat tctgggggtc cccatgtgac tgaggtggag 1260
 ggaaccagct tctgactgg gattatcagc tggggtgagg agtgtgctat gaagggaag 1320

tatgggatct acacaaaagt atccagatat gtgaactgga ttaaggagaa aaccaagctg 1380
 acttga 1386

<210> 11

<211> 1386

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 11

atgcagcgcg tgaacatgat catggccgag agccctggcc tgattacat ctgcctgtta 60
 ggatacttac tcagtgtga atgtacagtt tttcttgatc atgaaaacgc caacaaaatc 120
 ctgaaccggc ccaagcggta caactcaggc aagctggaag agttcgtgca gggcaacctg 180
 gaacgggagt gcatggaaga gaagtgcagc ttcgaggaag cccgggaggt gttcgagaac 240

accgagcgga ccaccagtt ctggaagcag tacgtggacg gcgaccagtg cgagtcaaac 300
 ccctgcctga acggcggcag ctgcaaggac gatataca gctacgagt ctggtgcccc 360
 ttcggcttcg agggcaagaa ctgcgagctg gacgtgacct gcaacatcaa gaacggccgc 420
 tgcgagcagt tctgcaagaa cagcggcgac aacaaggtgg tgtgctcatg cactgagggc 480
 taccggctgg ccgagaacca gaagagctgc gagcccccg tgcctttccc ctgcggcaga 540
 gtgtccgtga gccagaccag caagctgacc agggccgagg ccgtgttccc tgacgtggac 600

tacgtgaact caaccgaggc cgagacaatc ctggacaaca tcacccagag caccagtc	660
ttcaacgact tcacccgggt ggtgggcggc gaggacgcca agcccggcca gttcccttgg	720
caggtgggtgc tgaacggcaa ggtggacgcc ttctgcggcg gctcaatcgt gaacgagaag	780
tggatcgtga cagccgcca ctgcgtggag acaggcgtga agatcacctt ggtggccggc	840
gaacacaata tcgaggaaac cgagcacacc gagcagaaac ggaacgtgat ccggattatc	900
ccccaccaca actacaacgc cgccatcaac aagtacaacc acgatatcgc cctgctggaa	960
ctggacgagc ctctggtgct gaattcatac gtgaccccca tctglatcgc cgacaagag	1020
taccaaca tctttctgaa gttcggcagc ggctacgtgt ccggctgggg cagggtgttc	1080
cacaagggcc gcagcgccct ggtgctgcag tacctgcggg tgcccctggt ggacagagcc	1140
acctgcctgc ggtcaacaa gttcacatc tacaacaaca tgttctgcgc cggcttcac	1200
gaggcgccga gggacagctg ccagggcgac agcggcggac ccacgtgac cgaggtggag	1260
ggcaccagct ttctgaccgg catcatctca tggggcgagg aatgcgcat gaaggcaag	1320
tacggaatct acactaaggt gtcaagatac gtgaactgga tcaaagagaa aaccaagctg	1380
acctga	1386
<210> 12	
<211> 11125	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated Virus	
<400> 12	
cctgcaggca gctgcgcgt ctctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc	60
gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc tgcggcctag taggtcaga ggcacacagg agtttctggg	180
ctcacctgc ccccttcaa cccctcagtt cccatctcc agcagctgtt tgtgtgctgc	240
ctctgaagtc cacactgaa aaacttcagc ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt	300
gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctgcctgc tgaccttga gctggggcag	360
aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgacc cttggaattt	420
cggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgtgagag gggtaaccgg	480
ggatcttgc accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct	540
aagtgtact ctcccagaga ctgtctgact cagccaccc cctccacctt ggacacagga	600
cgctgtggtt tctgagccag gtacaatgac tcttttcggt aagtgcagtg gaagctgtac	660
actgcccagg caaagcgtcc gggcagcgtg ggcgggcgac tcagatcca gccagtggac	720

ttagccctg tttgctctc cgataactgg ggtgacctg gttaatattc accagcagcc	780
tccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg ccctgtctcc	840
tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgctagc	900
aaaggttatg cagaggggtga acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg	960
cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggtttg tttccttttt tataatacat	1020
tgagtatgct tgccttttag atataaaaat atctgattct gtcttcttca ctaaattttg	1080
attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccaggg ttggtaaagta	1140
ctggttcttt gttagctagg ttttcttctt cttcactttt aaaactaaat agatggacaa	1200
tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt	1260
cctgttaaaa aacagtcac tcccttggtt aaaaaaatta aaagtgggaa aacaaagaaa	1320
tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa	1380
atcaaattgg gaacaaaaag cacaacagc ggcccttattt acacaaaaag tctgatttta	1440
agatatgtga caattcaagg tttcagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aattttttaa	1500
attatataat ttcaatttaa agtttttagt aaaaacataaa gattaacctt tcattagcaa	1560
gctgttagtt atcaccaag cttttcatgg attaggaaaa aatcattttg tctctatctc	1620
aaacatcttg gatttgatat ttgggggaaac acaatactca gttgagttcc ctaggggaga	1680
aaagcaagct taagaattga cacaagagt aggaagttag ctattgcaac atatatcact	1740
ttgttttttc acaactacag tgactttatt tatttcccag aggaagcat acagggaaga	1800
aattatccca ttggacaaa cagcatgttc tcacagtaag cacttatcac acttacttgt	1860
caactttcta gaatcaaatc tagtagctga cagtaccagg atcaggggtg ccaaccctaa	1920
gcacccccag aaagctgact ggccctgtgg ttccactcc agacatgatg tcagctgtga	1980
aateccactc cctggacat aattagctt ctgttcttca ggagacattt gttcaaagtc	2040
atttgggcaa ccatattctg aaaacagccc agccaggtg atggatcact ttgcaaagat	2100
cctcaatgag ctattttcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggtca ttgagaact	2160
ttctttttca tccaaagtaa attcaaatat gattagaaat ctgacctttt attactggaa	2220
ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aattcctaaa tctccatgtg tatacagtac	2280
tgtgggaaca tcacagattt tggctccatg ccctaaagag aaattggctt tcagattatt	2340
tggattaaaa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg	2400
ctaaaactaa agaattattc ttttacattt cagtttttct tgatcatgaa aatgccaaca	2460

aaattctgaa tagaccaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga	2520
atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg	2580
aaaatacaga gagaacaact gaatttttga agcagtatgt ggatggatgat caatgtgaga	2640
gcaatccctg ctigaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttgg	2700
gtcccttttg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg	2760
gcagggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtgggtctgt agctgcactg	2820
agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtgcct tttccctgtg	2880
ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc tttcctgatg	2940
tagattatgt gaatagcact gaggttgaga caatccttga caatatcact cagagcacac	3000
agagcttcaa tgacttcacc aggggtggtag gaggggagga tgccaagcct gggcagttcc	3060
cctggcaggt agtgcctaat ggaaaagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaaatg	3120
agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtgg	3180
ctggagagca caatattgag gaaactgagc aactgagca gaagaggaat gtgatcagga	3240
ttatccccc ccacaactac aatgctgcta tcaacaagta caaccatgac attgccctcc	3300
tggaactgga tgaaccctg gtcttgaaca gctatgtgac acccatctgt attgctgata	3360
aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg	3420
tgttcataa aggcaggtct gccctggat tgacagtatt gaggtgcct ctggtggata	3480
gagcaacctg ctgtctgagc accaagttaa caatctacaa caatatgttc tgtgcagggt	3540
tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg gggccccat gtgactgagg	3600
tggagggaac cagcttctctg actgggattia tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg	3660
gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatatgtgaa ctggattaag gagaaaacca	3720
agctgacttg atgaaagatg gatttccaag gttaatcat tggaattgaa aattaacaga	3780
gatctagagc tgaattcctg cagccagggg gatcagcctc tactgtgcct tctagtggc	3840
agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc ctctcttgac cctggaaggt gccactccca	3900
ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcacattg tctgagtagg tgtcattcta	3960
ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc	4020
atgctgggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga	4080
gatccactag ggccgcagga acccctagt atggagtgg ccaactccctc tctgcgcgct	4140
cgctcgctca ctgaggccgc ccgggctttg cccgggcggc ctgagtgagc gagcgagcgc	4200

gcagctgcct gcaggggcag cttgaaggaa atactaaggc aaaggtactg caagtgctcg 4260
caacattcgc ttatgcggat tattgccgta gtgccgcgac gccgggggca agatgcagag 4320
attgccatgg tacaggccgt gcggttgata ttgccaaaac agagctgtgg gggagagtgg 4380
tcgagaaaga gtgcggaaga tgcaaaggcg tcggctattc aaggatgcca gcaagcgag 4440
catatcgcg tgtgacgat ctaatcccaa accttaccba acccacctgg tcacgcactg 4500
ttaagccgct gtatgacgct ctgggtggtgc aatgccacaa agaagagtca atcgagaca 4560
acattttgaa tgcggtcaca cgttagcagc atgattgcca cgatggcaa catattaacg 4620

gcatgatatt gacttattga ataaaattgg gttaaattga ctcaacgatg ggttaattcg 4680
ctcgttgtgg tagtgagatg aaaagaggcg gcgcttacta ccgattccgc ctagtgtgtc 4740
acttcgacgt atcgtctgga actccaacca tcgcaggcag agaggtctgc aaaatgcaat 4800
cccgaacag ttcgcaggta atagttagag cctgcataac ggtttcgga tttttatat 4860
ctgcacaaca ggtaagagca ttgagtcgat aatcgtgaag agtcggcgag cctggttagc 4920
cagtgtcttt tccgttgtgc tgaattaagc gaataccgga agcagaaccg gatcaccaaa 4980
tgcgtacagg cgtcatcgcc gccagcaac agcacaaccc aaactgagcc gtagccactg 5040

tctgtcctga attcattagt aatagttacg ctgcggcctt ttacacatga cttcgtgaa 5100
agcgggtggc aggaggtcgc gctaacaacc tctgcccgtt ttgcccgtgc atacggtea 5160
cgaacaaatc tgattactaa acacagtagc ctggatttgt tctatcagta atcgacctta 5220
ttcctaatta aatagagcaa atccccttat tgggggtaag acatgaagat gccagaaaaa 5280
catgacctgt tggccgcat tctcgggca aaggaacaag gcatcggggc aatccttgcg 5340
tttgcaatgg cgtaccttcg cggcagatat aatggcggtg cgtttacaaa aacagtaatc 5400
gacgcaacga tgtgcgccat tatgcctag ttattcgtg accttctga cttcgccgga 5460

ctaagtagca atctcgctta tataacgagc gtgtttatcg gctacatcg tactgactcg 5520
attggttcgc ttatcaaacg cttcgtctgt aaaaaagccg gtagagaaga tggtagaat 5580
caataatcaa cgtaaggcgt tctcgcgata gctggcgtgg tcggagggaa ctgataacgg 5640
acgtcagaaa accagaaatc atggttatga cgtcattgta ggcgagagc tatttactga 5700
ttactccgat caccctcgca aacttgtcac gctaaacca aaactcaat caacaggcgc 5760
cggacgtac cagcttcttt cccgttggtg ggatgcctac cgcaagcagc ttggcctgaa 5820
agacttctct ccgaaaagtc aggacgtgt ggcatcgag cagattaagg agcgtggcgc 5880

tttacctatg attgatcgtg gtgatatccg tcaggcaatc gaccgttgca gcaatatctg 5940
ggcttactg cgggcgctg gttatggtca gttcgagcat aaggtgaca gcctgattgc 6000
aaaattcaaa gaagcgggcg gaacggtcag agagattgat gtatgagcag agtcaccgcg 6060

attatctccg ctctggttat ctgcatcatc gctgcctgt catgggctgt taatcattac 6120
cgtgataacg ccattaccta caaagcccag cgcgacaaaa atgccagaga actgaagctg 6180
gcgaacgcgg caattactga catgcagatg cgtcagcgtg atgttgctgc gctcgaatga 6240
aaatacacga aggagtttagc tgatgctaaa gctgaaaatg atgctctgcg tgatgatgtt 6300

gccgctggtc gtcgtcggtt gcacatcaaa gcagtctgtc agtcagtgcg tgaagccacc 6360
accgcctccg gcgtggataa tgcagcctcc ccccgactgg cagacaccgc tgaacgggat 6420
tatttcacc ttagagagag gctgatcact atgcaaaaac aactggaagg aaccagaag 6480
tatattaatg agcagtgcag atagagttgc ccatatcgat gggcaactca tgcaattatt 6540
gtgagcaata cacacgcgt tccagcggag tataaatgcc taaagtaata aaaccgagca 6600
atccatttac gaatgtttgc tgggtttctg ttttaacaac atttctgcg ccgccacaaa 6660
ttttggctgc atcgacagtt ttcttctgcc caattccaga aacgaagaaa tgatgggtga 6720

tggtttccct tgggtgctact gctgccggtt tgttttgaac agtaaacgtc tgttgagcac 6780
atcctgtaat aagcagggcc agcgcagtag cgagtagcat tttttcatg gtgttattcc 6840
cgatgctttt tgaagtctgc agaatcgat gtgtagaaaa ttaacaaaac ctaaacaaat 6900
gagttgaaat ttcatattgt taatatttat taatgtatgt caggtgcgat gaatcgtcat 6960
tgtattcccg gattaactat gtccacagcc ctgacgggga acttctctgc gggagtgtcc 7020
gggaataatt aaaacgatgc acacaggggt tagcgcgtac acgtattgca ttatgccaac 7080
gccccggtgc tgacacggaa gaaaccggac gttatgattt agcgtggaaa gatttgtgta 7140

gtgttctgaa tgctctcagt aaatagtaat gaattatcaa aggtatagta atattcttta 7200
tgttcatgga tatttgtaac ccatcggaac actcctgctt tagcaagatt ttccctgtat 7260
tgctgaaatg tgatttctct tgatttcaac ctatcatagg acgtttctat aagatgcgtg 7320
tttcttgaga atttaacatt tacaaccttt ttaagtcctt ttattaacac ggtgttatcg 7380
ttttctaaca cgatgtgaat attatctgtg gctagatagt aaatataatg tgagacgttg 7440
tgacgtttta gttcagaata aaacaattca cagtctaaat cttttcgac ttgatcgaat 7500
atttctttaa aaatggcaac ctgagccatt ggtaaaacct tccatgtgat acgagggcgc 7560

glagtttgca ttatcgtttt tatcgtttca atctggctcg acctccttgt gttttgtga 7620
tgatttatgt caaatattag gaatgttttc acttaatagt attggttgcg taacaaagtg 7680
cggctctgct ggcatcttgg agggaaatac aaccgacaga tgatgtgaag gccaacgtgc 7740
tcaaattctc atacagaaag atttgaagta atattttaac cgctagatga agagcaagcg 7800
catggagcga caaatgaat aaagaacaat ctgctgatga tccctcgtg gatctgattc 7860
gtgtaaaaaa tatgcttaat agcaccattt ctatgagtta cctgatgtt gtaattgcat 7920

gtatagaaca taaggtgtct ctggaagcat tcagagcaat tgaggcagcg ttggtgaagc	7980
acgataataa tatgaaggat tattccctgg tggttgactg atcaccataa ctgctaataca	8040
ttcaaaactat ttagtctgtg acagagccaa cacgcagtct gtcactgtca ggaaagtgg	8100
aaaactgcaa ctcaattact gcaatgccct cgtaatgaag tgaatttaca atatcgtcct	8160
gttcggaggg aagaacgcgg gatgttcatt cttcatcact ttttaattgat gtatatgctc	8220
tcttttctga cgtagtctc cgacggcagg cttcaatgac ccaggctgag aaattcccgg	8280
accctttttg ctcaagagcg atgttaattt gttcaatcat ttggttagga aagcggtgt	8340
tgcgggttgt tgttctgcgg gttctgttct tcgttgacat gaggttgccc cgtattcagt	8400
gtcgtctgatt tgiattgtct gaagttgttt ttacgttaag ttgatgcaga tcaattaata	8460
cgataacctgc gtcataattg attatttgac gtggtttgat ggccctccacg cacgttgtga	8520
tatgtagatg ataataatta tcactttacg ggctctttcc ggtgatccga caggttacgg	8580
ggcggcgacc tgctgatgc ggtattttct cttacgcat ctgtcggta tttcacaccg	8640
catacgtcaa agcaaccata gtacgcgcc tgtagcggcg cattaagcgc ggcgggtgtg	8700
gtggttacgc gcagcgtgac cgctacactt gccagcgct tagcgccgc tcctttcgt	8760
ttcttccctt ctttctcgc cacgttcgcc ggctttcccc gtcaagctct aaatcggggg	8820
ctccctttag ggttccgatt tagtgcttta cggcacctcg acccaaaaa acttgatttg	8880
ggtgatggtt cacgtagtgg gccatcgccc tgatagacgg ttttctgccc ttgacgttg	8940
gagtcacgt tctttaatag tggactcttg ttccaaactg gaacaacact caactctatc	9000
tcgggtatatt cttttgattt agacctgcag gcatgcaagc ttggcactgg cgtcgtttt	9060
acaacgtcgt gactgggaaa accctggcgt tacccaactt aatcgcttg cagcacatcc	9120
ccctttcgcc agctggcgta atagcgaaga ggcccgacc gatcgccctt cccaacagtt	9180
gcgcagcctg aatggcgaat gcgatttatt caacaaagcc gccgtcccgt caagtcagcg	9240
taatgctctg ccagtgttac aaccaattaa ccaattctga ttagaaaaac tcatcgagca	9300
tcaaataaaa ctgcaattta ttcatatcag gattatcaat accatatattt tgaaaaagcc	9360
gtttctgtaa tgaaggagaa aactcaccga ggcagttcca taggatggca agatcctggt	9420
atcggctctgc gattccgact cgtccaacat caatacaacc tattaatttc ccctcgtcaa	9480
aaataaggtt atcaagttag aaatcacat gagtgacgac tgaatccggt gagaatggca	9540
aaagcttatg catttcttcc cagacttggt caacaggcca gccattacgc tcgtcatcaa	9600
aatcactcgc atcaacaaa ccgttattca ttctgtgattg gcctgagcg agacgaaata	9660

cgcatcgct gttaaaagga caattacaaa caggaatcga atgcaaccgg cgcaggaaca 9720
 ctgccagcgc atcaacaata ttttcacctg aatcaggata ttcttctaata acctggaatg 9780
 ctgttttccc ggggatcgca gtggtgagta accatgcata atcaggagta cggataaaat 9840
 gcttgatggt cggaagaggc ataaattccg tcagccagtt tagtctgacc atctcatctg 9900
 taacatcatt ggcaacgcta cttttgcat gtttcagaaa caactctggc gcatcgggct 9960
 tccatacaa tcgatagatt gtgcacctg attgcccgc attatcgca gccatttat 10020
 accatataa atcagcatcc atgttgaat ttaatcgcg cttcgagcaa gacgtttccc 10080

 gtgaaatg gtcataaca cccctgtat tactgtttat gtaagcagac agttttattg 10140
 ttcatgatga tatattttta tcttgtgcaa tgtaacatca gagattttga gacacaacgt 10200
 ggctttgttg aataaatcga acttttctg agttgaagga tcagatcacg catcttccc 10260
 acaacgcaga ccgttcgta gcaaaagaaa agttcaaaat caccaactgg tccacctaca 10320
 acaaagctct catcaacgt ggctccctca ctttctggct ggatgatggg gcgattcagg 10380
 cctggtatga gtcagcaaca ctttcttcac gaggcagacc tctcgacgga gttccactga 10440
 gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag atcctttttt tctgcgcgta 10500

 atctgctgct tgcaaaaaa aaaaccaccg ctaccagcgg tggtttggtt gccggtacaa 10560
 gagctaccaa ctctttttcc gaagtaact ggcttcagca gagcgcagat accaaatact 10620
 gtcttcttag ttagccgta gttaggccac cacttcaaga actctgtagc accgctaca 10680
 tacctcgtc tgctaactct gttaccagt gctgctgcca gtggcgataa gtcgtgtctt 10740
 accgggttg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc agcggtcggg ctgaacgggg 10800
 ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca ccgaactgag atacctacag 10860
 cgtgagctat gagaaagcgc cacgttccc gaaggagaa aggcggacag gtatccggt 10920

 agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc cagggggaaa cgcctggtat 10980
 ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc gtcgattttt gtgatgctcg 11040
 tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg cttttttacg gttcctggcc 11100
 ttttctggc cttttgctca catgt 11125

 <210> 13
 <211> 141
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated Virus
 <400> 13
 cctgcaggca gctgcgcgt cgctcgtca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc 60

gggcgacctt tggtcgccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca	120
actccatcac taggggttcc t	141
<210> 14	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated Virus	
<400> 14	
aggctcagag gcacacagga gtttctgggc tcaccctgcc cccttccaac ccctcagttc	60
ccatcctcca gcagctgttt gtgtgctgcc tctgaagtcc aactgaaca aacttcagcc	120
tactcatgtc cctaaaatgg gcaaacattg caagcagcaa acagcaaaca cacagccctc	180
cctgcctgct gaccttggag ctggggcaga ggtcagagac ctctctgggc ccatgccacc	240
tccaacatcc actcgacccc ttggaatttc ggtggagagg agcagaggtt gtcctggcgt	300
ggttttaggta gtgtgagagg g	321
<210> 15	
<211> 397	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated Virus	
<400> 15	
gatcttgcta ccagtggaac agccactaag gattctgcag tgagagcaga gggccagcta	60
agtgggtactc tccagagac tgtctgactc acgccacccc ctccaccttg gacacaggac	120
gctgtggttt ctgagccagg tacaatgact cctttcggta agtgcagtgg aagctgtaca	180
ctgcccaggc aaagcgtccg ggcagcgtag gcgggcgact cagatccag ccagtggact	240
tagccctgt ttgtctctcc gataactggg gtgaccttgg ttaattattca ccagcgcct	300
ccccgttgc ccctctggat ccaactgcta aatacggacg aggacagggc cctgtctcct	360
cagcttcagg caccaccact gacctgggac agtgaat	397
<210> 16	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated Virus	
<400> 16	
accactttca caatctgcta gcaaaggtt	29
<210> 17	

<211> 1438

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 17

gtttgtttcc tttttataa tacattgagt atgcttgccct tttagatata gaaatatctg	60
attctgtctt cttcactaaa ttttgattac atgatttgac agcaatattg aagagtctaa	120
cagccagcac ccaggttggc aagtactggc tctttgttag ctaggttttc ttcttcttca	180
cttttaaac taaatagatg gacaatgctt atgatgcaat aaggtttaac aaacactgtt	240
cagttcagta ttigtcatg taattcctgt taaaaaacag tcctctcctt ggtttaaaaa	300
aattaaaagt gggaaaacaa agaaatagca gaatatagtg aaaaaaata accacagtat	360
ttttgtttgg acttaccact ttgaaatcaa attgggaaac aaaagcacia acagtggcct	420
tatttacaca aaaagtctga ttttaagata tgtgacaatt caaggtttca gaagtatgta	480
aggagggtgtg tctctaattt tttaaattat atatcttcaa tttaaagttt tagttaaaac	540
ataaagatta acctttcatt agcaagctgt tagttatcac caaagctttt catggattag	600
gaaaaaatca ttttgtctct atctcaacaa tcttgagatt gatatttggg gaaacacaat	660
actcagttga gttccctagg ggagaaaagc aagcttaaga attgacacaa agagtaggaa	720
gttagctatt gcaacatata tcactttgtt ttttcacaac tacagtgact ttatttattt	780
cccagaggaa ggcatacagg gaagaaatta tcccatttgg acaaacagca tgttctcaca	840
gtaagcactt atcacactta cttgtcaact ttctagaatc aaatctagta gctgacagta	900
ccaggatcag gggtgccaac cctaagcacc ccagaaaagc tgactggccc tgtggttccc	960
actccagaca tgatgtcagc tgtgaaatcc acctccctgg accataatta ggcttctgtt	1020
cttcaggaga catttgttca aagtcatttg ggcaaccata ttctgaaaac agcccagcca	1080
gggtgatgga tcactttgca aagatcctca atgagctatt ttcaagtgat gacaaagtgt	1140
gaagttaagg gctcatttga gaactttctt ttctatccaa agtaaattca aatatgatta	1200
gaaatctgac cttttattac tggaattctc ttgactaaaa gtaaaattga attttaattc	1260
ctaaatctcc atgtgtatag agtactgtgg gaacatcaca gattttggct ccatgccta	1320
aagagaaatt ggctttcaga ttatttggat taaaaacaaa gactttctta agagatgtaa	1380
aattttcatg atgttttctt ttttgctaaa actaaagaat tattctttta catttcag	1438

<210> 18

<211> 48

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 18

tgaaagatgg atttccaagg ttaattcatt ggaattgaaa attaacag 48

<210> 19

<211> 228

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 19

ctactgtgcc ttctagttgc cagccatctg ttgtttgccc ctcccccttg ccttccttga 60

ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcacatt 120

gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc aagggggagg 180

attgggaaga caatagcagg catgctgggg atgcagtggg ctctatgg 228

<210> 20

<211> 108

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 20

aggaaccctt agtgatggag ttggccactc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg 60

ccgcccgggc ttgcccggg cggcctcagt gagcgagcga gcgcgcag 108

<210> 21

<211> 3631

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 21

agcttgaagg aaatactaag gcaaaggtag tgcaagtgtc cgcaacattc gcttatgcgg 60

attattgccg tagtgccgag acgccggggg caagatgcag agattgcat ggtacaggcc 120

gtgcggttga tattgcaaaa acagagctgt gggggagagt tgtcgagaaa gagtgcggaa 180

gatgcaaagg cgtcggttat tcaaggatgc cagcaagcgc agcatatcgc gctgtgacga 240

tgctaatacc aaaccttacc caaccacct ggtcacgcac tgttaagccg ctgtatgacg 300

ctctggtggt gcaatgccac aaagaagagt caatcgaga caacattttg aatgcggtca 360

cacgttagca gcatgattgc cacggatggc aacatattaa cggcatgata ttgacttatt 420

gaataaaatt gggtaaattt gactcaacga tgggttaatt cgctcgttgt ggtagtgaga 480

tgaaaagagg cggcgcttac taccgattcc gcctagttag tcaactcgac gtatcgtctg	540
gaactccaac catcgcaggc agagaggtct gcaaaatgca atcccgaac agttcgcagg	600
taatagttag agcctgcata acggtttcgg gatTTTTTat atctgcacaa caggtaagag	660
cattgagtcg ataatcgtga agagtcggcg agcctggta gccagtgtc tttccgttgt	720
gctgaattaa gcgaataccg gaagcagaac cggatcacca aatgcgtaca ggcgtcatcg	780
ccgccagca acagcacaa ccaaaactgag ccgtagccac tgtctgtcct gaattcatta	840
glaatagtta cgctcgggcc ttttacacat gaccttcgtg aaagcgggtg gcaggaggtc	900
gcgctaacaa cctcctgccg ttttccccgt gcatatcggc cacgaacaaa tctgattact	960
aaacacagta gcctggattt gttctatcag taatcgacct tattcctaata taaatagagc	1020
aaatccctt attgggggta agacatgaag atgccagaaa aacatgacct gttggccgcc	1080
attctcgcgg caaaggaaca aggcacgcgg gcaatccttg cgtttgcaat ggcgtacctt	1140
cgcggcagat ataatggcgg tgcgtttaca aaaacagtaa tcgacgcaac gatgtgcgcc	1200
attatcgct agttcattcg tgaccttctc gacttcgccg gactaagtag caatctcgt	1260
tataaacga gcgtgttat cggctacatc ggtactgact cgattggttc gcttatcaaa	1320
cgcttcgctg ctaaaaaagc cggagtagaa gatggtagaa atcaataatc aacgtaaggc	1380
gttctcgat atgctggcgt ggtcggaggg aactgataac ggacgtcaga aaaccagaaa	1440
tcatggttat gacgtcattg taggcggaga gctatttact gattactccg atcacctcg	1500
caaactgtc acgctaaacc caaaactcaa atcaacaggc gccggacgt accagcttct	1560
ttcccgttgg tgggatgcct accgcaagca gcttggcctg aaagacttct ctccgaaaag	1620
tcaggacgt gtggcattgc agcagattaa ggagcgtggc gctttaccta tgattgatcg	1680
tggatgatc cgtcaggcaa tcgaccgtt cagcaatatc tgggcttcac tgccgggcgc	1740
tggttatggt cagttcgagc ataaggctga cagcctgatt gcaaaattca aagaagcggg	1800
cggaacggtc agagagattg atgtatgagc agagtcaccg cgattatctc cgctctggtt	1860
atctgcata tctctgctt gtcattgggt gttaatcatt accgtgataa cgccattacc	1920
tacaaagccc agcgcgacaa aaatgccaga gaactgaagc tggcgaacgc ggcaattact	1980
gacatgcaga tgcgtcagcg tgatgttgct gcgtcgtatg caaaatacac gaaggagtta	2040
gctgatgcta aagctgaaaa tgatgctctg cgtgatgatg ttgccgttgg tcgtcgtcgg	2100
ttgcacatca aagcagctcg tcagtcagtg cgtgaagcca ccaccgctc cggcgtggat	2160
aatgcagcct cccccgact ggcagacacc gctgaacggg attatttcac cctcagagag	2220

aggctgatca ctatgcaaaa acaactggaa ggaacccaga agtatattaa tgagcagtcg 2280
 agatagagtt gcccatatcg atgggcaact catgcaatta ttgtgagcaa tacacacgcg 2340
 ctccagcgg agtataaatg cctaaagtaa taaaaccgag caatccattt acgaatgttt 2400
 gctgggtttc tgitttaaca acattttctg cgccgccaca aattttggct gcatcgacag 2460
 ttttcttctg cccaattcca gaaacgaaga aatgatgggt gatggtttcc ttgggtgcta 2520
 ctgctgccgg ttgttttga acagtaaacg tctgttgagc acatcctgta ataagcaggg 2580
 ccagcgcagt agcgagtagc atttttttca tgggtgttatt cccgatgctt ttgaagttc 2640

gcagaatcgt atgtgtagaa aattaaacaa accctaaaca atgagttgaa atttcatatt 2700
 gtaaatattt attaatgtat gtcaggtcg atgaatcgtc attgtattcc cggattaact 2760
 atgtccacag cctgacggg gaacttctct gcgggagtg cgggaataa ttaaacgat 2820
 gcacacaggg tttagcgcgt acacgtattg cattatgcca acgccccggt gctgacacgg 2880
 aagaaaccgg acgttatgat ttagcgtgga aagatttggt tagtgttctg aatgctctca 2940
 glaaatagta atgaattatc aaaggtatag taatatcttt tatgttcatt gatatttgta 3000
 acccatcgga aaactcctgc tttagcaaga tttccctgt attgtgaaa tgtgatttct 3060

cttgatttca acctatcata ggacgtttct ataagatgcg tgtttcttga gaatttaaca 3120
 tttaaacct ttttaagtc ttttattaac acggtgttat cgttttctaa cacgatgtga 3180
 atattatctg tggttagata gtaaatataa tgtgagacgt tgtgacgttt tagttcagaa 3240
 taaaacaatt cacagtctaa atcttttcgc acttgatcga atatttcttt aaaaatggca 3300
 acctgagcca ttggtaaaac ctccatgtg atacgagggc gcgtagtttg cattatcgtt 3360
 tttatcgttt caatctggtc tgacctcctt gtgttttggt gatgatttat gtcaaatatt 3420
 aggaatgttt tcaacttaata gtattggttg cgtaacaaag tgcggtcctg ctggcattct 3480

ggagggaaat acaaccgaca gatgtatgta aggccaacgt gctcaaatct tcatacagaa 3540
 agatttgaag taatatatta accgtagat gaagagcaag cgcatggagc gacaaaatga 3600
 ataaagaaca atctgctgat gatccctccg t 3631

<210> 22
 <211> 307
 <212> DNA
 <213> Adeno-associated Virus
 <400> 22

gcattaagcg cggcgggtgt ggtggttacg cgcagcgtga ccgctacact tgccagcgcc 60
 ttagcggccg ctcttttcgc tttcttcct tcctttctcg ccacgttcgc cggctttccc 120

cgtaagctc taaatcgggg gctcccttta gggttccgat ttagtgcttt acggcacctc 180

gaccccaaaa aacttgattt gggatgatgt tcacgtagt ggccatcgcc ctgatagacg 240

gtttttcgcc ctttgacgtt ggagtcacg tttttaata gtggactctt gttccaaact 300

ggaacaa 307

<210> 23

<211> 813

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 23

gaaaaactca tcgagcatca aatgaaactg caatttattc atatcaggat tatcaatacc 60

atatttttga aaaagccgtt tctgtaatga aggagaaaaac tcaccgaggc agttccatag 120

gatggcaaga tcttggtatc ggtctgcgat tccgactcgt ccaacatcaa tacaacctat 180

taatttcccc tcgtcaaaaa taagttatc aagtgagaaa tcaccatgag tgacgactga 240

atccggtgag aatggcaaaa gcttatgcat tttttccag acttggtcaa caggccagcc 300

attacgctcg tcatcaaaat cactcgcatc aaccaaaccg ttattcattc gtgattgcgc 360

ctgagcgaga cgaataacgc gatcgtgtt aaaaggacaa ttacaaacag gaatcgaatg 420

caaccggcgc aggaacactg ccagcgcac cacaatat tccctgaat caggatattc 480

ttctaatacc tggaatgctg ttttccggg gatcgagtg gtgagtaacc atgcatcatc 540

aggagtacgg ataaaatgct tgatggtcgg aagaggcata aattccgtca gccagtttag 600

tctgaccatc tcatctgtaa catcattggc aacgtacct ttgcatgtt tcagaaacaa 660

ctctggcgca tcgggcttcc catacaatcg atagattgtc gcacctgatt gcccacatt 720

atcgcgagcc catttatacc catataaatc agcatccatg ttggaattta atcgcggtt 780

cgagcaagac gtttccgtt gaatatggct cat 813

<210> 24

<211> 668

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 24

gtagaaaaga tcaaaggatc ttcttgagat cctttttttc tgcgcgtaat ctgctgcttg 60

caaacaaaaa aaccaccgt accagcgtg gtttgtttgc cggatcaaga gctaccaact 120

ctttttccga aggttaactgg cttcagcaga ggcagatac caaatactgt tcttctagt 180

tagccgtagt taggccacca cttcaagaac tctgtagcac cgcctacata cctcgctctg	240
ctaactctgt taccagtggc tgctgccagt ggcgataagt cgtgtcttac cgggttggac	300
tcaagacgat agttaccgga taaggcgcag cggtcgggct gaacggggggg ttcgtgcaca	360
cagcccagct tggagcgaac gacctacacc gaactgagat acctacagcg tgagctatga	420
gaaagcgcca cgcttcccga agggagaaag gcggacaggt atccggtaag cggcagggtc	480
ggaacaggag agcgcacgag ggagcttcca gggggaaacg cctggtatct ttatagtcct	540
gtcgggtttc gccacctctg acttgagcgt cgatttttgt gatgctcgtc aggggggcgg	600
agcctatgga aaaacgccag caacgcggcc tttttacggt tcttggcctt ttgtggcct	660
tttgctca	668
<210> 25	
<211> 2824	
<212> DNA	
<213> Adeno-associated Virus	
<400> 25	
atgcagaggg tgaacatgat catggctgag agccctggcc tgatcaccat ctgcctgctg	60
ggctacctgc tgtctgctga atgtacaggt ttgtttcctt tttataata cattgagtat	120
gcttgccttt tagatataga aatatctgat tctgtcttct tactaaatt ttgattacat	180
gatttgacag caatattgaa gagtctaaca gccagcacc aggttggtaa gtactggttc	240
tttgtagct aggttttctt cttcttcact tttaaaacta aatagatgga caatgcttat	300
gatgcaataa ggtttaataa acactgttca gttcagtatt tggcatgta attcctgtta	360
aaaaacagtc atctccttgg tttaaaaaaa ttaaaagtgg gaaaacaaag aaatagcaga	420
atatagttaa aaaaaataac cacagtattt ttgtttggac ttaccacttt gaaatcaaat	480
tgggaacaaa aagcacaaac agtggcctta ttacacaaa aagcttgatt ttaagatatg	540
tgacaattca aggtttcaga agtatgtaag gaggtgtgtc tctaattttt taaattatat	600
atcttcaatt taaagtttta gttaaaacat aaagattaac ctttcattag caagctgtta	660
gttatcacca aagcttttca tggattagga aaaaatcatt ttgtctctat ctcaaacatc	720
ttggagtga tatttgggga aacacaatac tcagttgagt tccctagggg agaaaagcaa	780
gcttaagaat tgacacaaag agtaggaagt tagctattgc aacatatac actttgtttt	840
ttcacaacta cagtgacttt atttatttcc cagaggaagg catacaggga agaaattatc	900
ccatttggac aaacagcatg ttctcacagt aagcattat cacacttact tgtcaacttt	960
ctagaatcaa atctagtagc tgacagtacc aggatcaggg gtgccaaccc taagcacccc	1020

cagaaagctg actggccctg tggttccac tccagacatg atgtcagctg tgaatccac	1080
ctccctggac cataattagg cttctgttct tcaggagaca tttgttcaa gtcatttggg	1140
caaccatatt ctgaaaacag cccagccagg gtgatggatc actttgcaa gacctcaat	1200
gagctatatt caagtatga caaagtgtga agttaagggc tcatttgaga actttctttt	1260
tcacccaaag taaattcaa tatgattaga aatctgacct tttattactg gaattctctt	1320
gactaaaagt aaaattgaat tttaatcct aatctccat gtgtatacag tactgtggga	1380
acatcacaga ttttggctcc atgccctaaa gagaaattgg ctttcagatt atttggatta	1440
aaaacaaaga ctttcttaag agatgtaaaa ttttcagat gttttctttt ttgctaaaac	1500
taaagaatta ttcttttaca tttcagtttt tcttgatcat gaaaatgcc acaaatctt	1560
gaatagacca aagaggtata actctggcaa gcttgaagag tttgtacagg ggaatctgga	1620
gagagagtgt atggaagaga agtgcagctt tgaggaagcc agagaagtgt ttgaaaatac	1680
agagagaaca actgaatttt ggaagcagta tttggatggt gatcaatgtg agagcaatcc	1740
ctgcttgaat ggggggagct gtaaagatga tatcaacagc tatgaatgtt ggtgtccctt	1800
tggatttgag gggaaaaact gtgagcttga tgtgacctgt aatatcaaga atggcaggtg	1860
tgagcaattt tgcaagaatt ctgctgataa caaagtggtc tgtagctgca ctgagggata	1920
taggctggct gaaaaccaga agagctgtga acctgcagtg ccttttcctt gtgggagagt	1980
gtctgtgagc caaaccagca agctgactag ggctgaagca gtctttcctg atgtagatta	2040
tgtgaatagc actgaggctg agacaatcct tgacaatc actcagagca cacagagctt	2100
caatgacttc accaggggtg taggagggga ggatgccaag cctgggcagt tcccctggca	2160
ggtagtgctc aatggaaaag tggatgcctt tttggagggt tcaattgtaa atgagaagtg	2220
gattgtgact gcagcccact gtgtggaaac tggagtcaag attactgtgg tggctggaga	2280
gcacaatatt gaggaaactg agcacactga gcagaagagg aatgtgatca ggattatccc	2340
ccaccacaac tacaatgctg ctatcaacaa gtacaacct gacattgccc tcttggaaact	2400
ggatgaaccc ctggtcttga acagctatgt gacacccatc tgtattgctg ataaagagta	2460
caccaacatc ttcttgaat ttgggtcttg atatgtgtct ggctggggca ggggtgtcca	2520
taaaggcagg tctgccctgg tattgcagta tttgagggtg cctctggtgg atagagcaac	2580
ctgcttgcgt agcaccaagt ttacaatcta caacaatatg ttctgtgcag ggttccatga	2640
aggtggtaga gacagctgcc agggagattc tgggggtccc catgtgactg aggtggaggg	2700
aaccagcttc ctgactggga ttatcagctg gggtagaggag tgtgctatga agggaaagta	2760
tgggatctac acaaaagtat ccagatatgt gaactggatt aaggagaaaa ccaagctgac	2820
ttga	2824

<210> 26

<211> 10659

<212> DNA

<213> Adeno-associated Virus

<400> 26

```

cctgcaggca gctgcgcgct cgctcgctca ctgaggccgc ccgggcaaag cccgggcgtc      60
gggcgacctt tggtcgcccc gcctcagtga gcgagcgagc gcgcagagag ggagtggcca      120
actccatcac taggggttcc tgcggcctag taggctcaga ggcacacagg agtttctggg      180

ctcacctgc ccccttccaa cccctcagtt cccatcctcc agcagctgtt tgtgtgctgc      240
ctctgaagtc cacctgaac aaacttcagc ctactcatgt ccctaaaatg ggcaaacatt      300
gcaagcagca aacagcaaac acacagccct cctgcctgc tgaccttgga gctggggcag      360
aggtcagaga cctctctggg cccatgccac ctccaacatc cactcgaccc cttggaattt      420
cgggtggagag gagcagaggt tgtcctggcg tggtttaggt agtgtgagag gggtagccgg      480
ggatcttgct accagtggaa cagccactaa ggattctgca gtgagagcag agggccagct      540
aagtggtaact ctcccagaga ctgtctgact cagccacccc cctccacctt ggacacagga      600

cgctgtgggt tctgagccag gtacaatgac tcctttcggg aagtgcagtg gaagctgtac      660
actgcccagg caaagcgctc gggcagcgta ggcgggcgac tcagatccca gccagtggac      720
ttagcccttg tttgctcctc cgataactgg ggtgaccttg gttaatatc accagcagcc      780
tccccgttg cccctctgga tccactgctt aaatacggac gaggacaggg cctgtctcc      840
tcagcttcag gcaccaccac tgacctggga cagtgaatac cactttcaca atctgctagc      900
aaaggttatg cagaggggtg acatgatcat ggctgagagc cctggcctga tcaccatctg      960
cctgctgggc tacctgctgt ctgctgaatg tacaggttg tttccttttt tataatacat      1020

tgagtatgct tgcttttag atatagaaat atctgattct gtcttcttca ctaaattttg      1080
attacatgat ttgacagcaa tattgaagag tctaacagcc agcaccagg ttggtaaagta      1140
ctggttcttt gttagctagg ttttcttctt cttcactttt aaaactaaat agatggacaa      1200
tgcttatgat gcaataaggt ttaataaaca ctgttcagtt cagtatttgg tcatgtaatt      1260
cctgttaaaa aacagtcatc tccttggttt aaaaaaatta aaagtgggaa aacaaagaaa      1320
tagcagaata tagtgaaaaa aaataaccac agtatttttg tttggactta ccactttgaa      1380
atcaaattgg gaaacaaaag cacaacagc ggcccttattt acacaaaaag tctgatttta      1440

agatatgtga caattcaagg ttccagaagt atgtaaggag gtgtgtctct aattttttaa      1500
attatatatc ttcaatttaa agtttttagt aaaacataaa gattaacctt tcattagcaa      1560

```

cctcaatgag ctatittcaa gtgatgacaa agtgtgaagt taagggtca ttgagaact	1620
ttctttttca tccaaagtaa attcaaata gattagaaat ctgacctttt attactggaa	1680
ttctcttgac taaaagtaaa attgaatttt aattcctaaa tctccatgtg tatacagtac	1740
tgtgggaaca tcacagattt tggctccatg ccctaaagag aaattggctt tcagattatt	1800
tggattaaaa acaaagactt tcttaagaga tgtaaaattt tcatgatgtt ttcttttttg	1860
ctaaaaactaa agaattattc ttttacattt cagtttttct tgatcatgaa aatgccaaca	1920
aaattctgaa tagaccaaag aggtataact ctggcaagct tgaagagttt gtacagggga	1980
atctggagag agagtgtatg gaagagaagt gcagctttga ggaagccaga gaagtgtttg	2040
aaaatacaga gagaacaact gaattttgga agcagtatgt ggatgggtgat caatgtgaga	2100
gcaatccctg ctigaatggg gggagctgta aagatgatat caacagctat gaatgttggt	2160
gtcccttttg atttgagggg aaaaactgtg agcttgatgt gacctgtaat atcaagaatg	2220
gcagggtgtga gcaattttgc aagaattctg ctgataacaa agtgggtctgt agctgcactg	2280
agggatatag gctggctgaa aaccagaaga gctgtgaacc tgcagtcctt ttccctgtg	2340
ggagagtgtc tgtgagccaa accagcaagc tgactagggc tgaagcagtc ttccctgatg	2400
tagattatgt gaatagcact gaggttgaga caatccttga caatatcact cagagcacac	2460
agagcttcaa tgacttcacc aggggtggtag gaggggagga tgccaagcct gggcagttcc	2520
cctggcagggt agtgcctaat ggaaaagtgg atgccttttg tggaggttca attgtaaatg	2580
agaagtggat tgtgactgca gccactgtg tggaaactgg agtcaagatt actgtggtgg	2640
ctggagagca caatattgag gaaactgagc aactgagca gaagaggaat gtgatcagga	2700
ttatcccca ccacaactac aatgctgcta tcaacaagta caacatgac attgccctcc	2760
tggaactgga tgaaccctg gtcttgaaca gctatgtgac acccatctgt attgctgata	2820
aagagtacac caacatcttc ttgaaatttg ggtctggata tgtgtctggc tggggcaggg	2880
tgttcataa aggcaggctc gccctggat tgcagtattt gaggtgcct ctggtggata	2940
gagcaacctg ctgtctgagc accaagttaa caatctacaa caatatgttc tgtgcagggt	3000
tccatgaagg tggtagagac agctgccagg gagattctgg gggccccat gtgactgagg	3060
tggagggaac cagcttcctg actgggatta tcagctgggg tgaggagtgt gctatgaagg	3120
gaaagtatgg gatctacaca aaagtatcca gatatgtgaa ctggattaag gagaaaacca	3180
agctgacttg atgaaagatg gatttccaag gttaatcat tggaattgaa aattaacaga	3240
gatctagagc tgaattcctg cagccagggg gatcagcctc tactgtgcct tctagtggc	3300
agccatctgt tgtttgcccc tcccccttgc ctctcttgac cctggaaggt gccactccca	3360
ctgtcctttc ctaataaaat gaggaaattg catcacattg tctgagtagg tgtcattcta	3420

ttctgggggg tggggtgggg caggacagca agggggagga ttgggaagac aatagcaggc	3480
atgctgggga tgcagtgggc tctatggctt ctgaggcaga aagaaccagc tggggctcga	3540
gattccactag ggccgcagga acccctagtg atggagtgg ccactccctc tetgcccgt	3600
cgctcgtca ctgaggccgg gcgaccaaag gtcgcccac gcccggtt tggcgggcg	3660
gcctcagtga gcgagcagc gcgcagctgc ctgcaggggc ccatgggcag atgcaccacc	3720
tgtctcagt caaagccctg cctaagtagg ctggtcataa gaccatgtgt ctggctgtaa	3780
ctccaattga ttgtcagcat caataaaact tggccaacac tgttatatac tggattgat	3840
agttacaact gaacatatct gtttaagcaa ttggaattaa gaattcacat gcaatgatat	3900
cagggtcctt ctctctggt tagtgtattg gggggaaatt ggacatctct cagctcagta	3960
ggctagttag gccaggatgg atgacatcca cagcccctgg gcagagagat tatgatgtag	4020
ctagtctgac tctgacaaa gacttgcttc ctggagcttc tactacttct tgggtgatgg	4080
ctaagaaata tggttgtgtt ctttaagtc tgaagagcat tatttttgcc aaccctgac	4140
caaacatcct tgccaaggaa aaggcctaaa atatatgtc atttaaagat attacaaact	4200
acttggtttt ggaatgtttg gcctttcagg atcatagcta tcaaaatatt agctatttgg	4260
ggtatgagat gtctgcttgg tcaaggacaa gtctttaag acatcatgtt ggggaataat	4320
ggggaaaatg ggaaggctta tgctctgagt aagacatctg agttatcatc tgtcaaacat	4380
ttttgttagt catagtctaa tgggagcctg tttccctct ttaatatata ttcacatctg	4440
aatttatgct cttcattgac aatgccagcc cagaacaaca gctcttacc tttggtttc	4500
ttcctaacct ttaactcaa tgtaaccatt acctgccatt tcagtaaac cattattctc	4560
cctacttacc cacccaagtt gtacaataaa gagtgtttgc tctcactcat atacaaagca	4620
aattcatttg tttgtgatgt acagcttgc atgccacag atgtggttg cctagtcctt	4680
tgctctaggt catttgactg ggaacagatg ggatgctcac tttggtttt aatggttaac	4740
tagtcattga aatgcatttc atcaataat cttagaggat aattgtttta atgtctgtcc	4800
agactagctt tgtagagcca ggtgccatta cacatgtcac cttcttattt ctcttaattg	4860
aatttttatt atctgagata ggaataatag agggcttttt caagtgaaga tattactata	4920
gtctaaagac cttagtgtaa catcctggcc cctaaggaaa aacaagttct ggttcataca	4980
tataataact ttgcatgtta tctgccactg agatgtgtcc taatccaaca gaaaggattg	5040
aatctctgta gctagggtga cagggaaga gctgtacagg gaacctttta agatagcttc	5100
aggccaaagc tgaggaaagt ggatggagac tggggaaaat gctaagacat tttaaagatt	5160

tctcttaggt caaaaataga ataagaaata gaccatttcc ctggacattt tctgtaggtt	5220
aatactgtta actattggta aatgcataatg ctacaactta atatgtctgc tttgtgagtt	5280
tagcattgtc tecttgtcat tccagaaatg aaatggcaaa tacatttaaa tcagaactaa	5340
aaaggggaac agggatataaa ggctcaattt agtcacatca tttcccttcc tcacccaccc	5400
cctttaaac agatgtttgc caatgcatta acaatgcaga tgtttctga aagaaagttt	5460
agtaactcaa gcagacacct tattttcttt tcaagcagaa aagactatga gatggtggtt	5520
gtggttggtc tgggaggag aagatataaa tgataacat tatttcaat catttcatga	5580
cctcactgca cacttatagt tattgtacct gttgtctttt tgctgtcaag cctagctaag	5640
atcatttggga atgttcaaga tcactcatac atgcatgtgc acacatacac atgcacatat	5700
gttactccc tatttcatcc acatgaacta agattactga tgtgtacaga ttcaaagcac	5760
ttttattctt ttccaaaggc aagaagctga gctacttcc agaatagtgt tgaaagaccc	5820
tgtcatactt ctgcattgtt tctccacac cactccatc cagtccctta tgaatggtta	5880
ctggttttca aaaatatgag ataaattgag tgtataaaag tcatttttag acaaaatgaa	5940
acaggaaatg aaagaaacca gaatctctcc tcatttgtgg atgggccagc tccaccatgt	6000
catggttaat ctgcaggag gaaatactag atttgattgc agatcagact gcagcaaacc	6060
tgctgtgact aaggcatcaa gagaaagcaa gcaacagctg gggcttcagt ggtgaaaaca	6120
ttatatatct agctttgaaa tatgaaatac tgtttagcag tgtcacctag aaaagagtgt	6180
ttcaaaatgc tgatgttca taagaacctt tctcttcaga gttgtttctt ttatctttca	6240
aattagccag ggtgggaaat aaagtatca cttggtgaag aaatctcaca aagaagaaca	6300
tagagagttc actttcatct ggagtaatga acagattgaa caaactagaa atggttagtc	6360
tgtaaagaa aaggtgtagg tgagctgttt gcaagagcca caagggaag gggaagacaa	6420
cttctttgtg gacttaaggg tgaaagtgtc aagcaggcaa gaccattctg acctcatta	6480
agaaagccct ttccaacaa caaccactgg gttggttact cagggtgggc agcattggga	6540
gcaaagtgtt attgaacaaa tgtttgtcag aattgttgac ttaaagagct gttctgtcac	6600
tggggacagc agcagctaga tagcccatc caggagagg gcatttgttc acctggccag	6660
agatcagagc aggctaaggg actgctggga tctgtccag ctttgagacc ctacagagcc	6720
atgttacct agcaggtatc cttctgagg tcactctcat ttcttacctt attcagggc	6780
tttacctca gcttgccagg ctggagccaa gggccaaggc agcctcacct tgttggtat	6840
ggtagcttcc caggagcccc ctatggttca ggaacagctc tgcctgcccc atcctgtttg	6900

ctacctccta aagccaaagg cactggtggg ccaggccagc ttctaaagtc acacaaggtt	6960
agaaggttcc tgacaggaag ggcttgaggc caatggaagg aggtacttca gtttcctcc	7020
agatgcccgag tgatgggctc agagctcctt gagaacttgg gaaaggaagc aggggtctctg	7080
aagaaatact tcaggagtag aaagaggaag cttagagggtt aaatgacta cacaggaaca	7140
gaaatgagtt tttcttagag ttagtatatg tctagagggtg tagtaacta aaacaagttc	7200
tgaattgcat acagccactt aggggaagaaa tgaaaacctt tgaatattag tgaaaaaagg	7260
gaaactgcaa cccctgtatt actagatagc ttcatcaac agctcaaac agacagattt	7320
ttataggttt actgtgtgca ctttaataca agggcagtgg ttcagaacta gtcaggctct	7380
gaaaaggatt taccaaatgt tgagtgtgcc ctctagtgtt cacacttccc agctttcttc	7440
ctataaaggt ggatcaaggc acttgcttac aactggaact gaaatcctcc aagtggaaact	7500
agacattgag atggagaaaa tattcattgt ccactgtaat tatgcaagga atatccagtt	7560
gagataatgg acttgccctt tatctaataa taccaggct caatgggtca ctgctttgtc	7620
cactttgcc aaaattcaag cacagctaag ttgatatatt aggacaaagg cagcttacta	7680
tccagccaga ggggagtaga atatggttaa gagagagtgg aaagaatgaa tgagccctgc	7740
tattctcac tgcttgatg gctataagca cagcccttat ggaggcctta ggtcttgctt	7800
cataatattc cagtttgaaa aggggttgaa aagacctcct agaaaaatca gtagtttttc	7860
tcttttgagt aacatgtagc aaaaaaatt tcatcatgta ggtacaggga acacctaat	7920
aactattaat ctcaaggagt caagccagtg tgtttcctaa tgtatctgct gtatcccat	7980
gaagcaaatt ttgccatcag agaaactgac tcatggggaa aaaatccaag gacctcaat	8040
cacaaaaaga agccattcct cagatttgcc taagcttaag cttccctgtc tctattgtg	8100
tgttgctttc aatgcagtta cataaatggc tttttgttt atgcacaaa aacactaatt	8160
catctgcaaa gctataggtc aaagcaacca tagtatgcac cctgctagct ggcgcattaa	8220
gcgcggcggg tgtggtggtt acgcgcagcg tgaccgtac acttgccagc gccttagcgc	8280
cgctccttt cgctttcttc ctttccttc tcgccagt tgcggcttt ccccgtaag	8340
ctctaaatcg ggggctccct ttaggttcc gatttagtgc tttacggcac ctgacccca	8400
aaaaacttga ttgggtgat ggttcacgta gtgggccatc gccctgatag acggtttttc	8460
gcccttgac gttggagtcc acgttcttta atagtggact cttgttcaa actggaacaa	8520
cactcaactc taictcgggc tattcttttg atttagacct gcaggcatgc aagcttgga	8580
ctggccgtcg ttttacaacg tcgtgactgg gaaaaccctg gcgttaccca acttaatcg	8640
cttgccagc atccccctt cgccagctgg cgtaatagcg aagaggcccg caccgatcg	8700
ccttccaac agttgcgcag cctgaatggc gaatgcgatt tattcaaca agccgccgtc	8760

ccgtcaagtc agcgtaatgc tctgccagtg ttacaaccaa ttaaccaatt ctgattagaa	8820
aaactcatcg agcatcaaat gaaactgcaa ttatttcata tcaggattat caataccata	8880
tttttgaaaa agccgtttct gtaatgaagg agaaaactca ccgaggcagt tccataggat	8940
ggcaagatcc tggatatcggc ctgcgattcc gactcgtcca acatcaatac aacctattaa	9000
tttccctcgc tcaaaaataa ggttatcaag tgagaaatca ccatgagtga cgactgaatc	9060
cggtgagaat ggcaaaagct tatgcatttc ttccagact tgttcaacag gccagccatt	9120
acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac caaacgtta ttcatcgtg attgcgcctg	9180
agcgagacga aatacgcgat cgctgttaaa aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa	9240
ccggcgcagg aacactgcc a gcgcatcaac aatattttca cctgaatcag gatattcttc	9300
taatacctgg aatgctgttt tcccggggat cgcagtggtg agtaacctg catcatcagg	9360
agtacggata aaatgcttga tggtcggaag aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct	9420
gaccatctca tctgtaacat cattggcaac gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc	9480
tggcgcacgc ggcttcccat acaatcgata gattgtcgca cctgattgcc cgacattatc	9540
gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc atccatgttg gaatttaac gcggcttcga	9600
gcaagacgtt tcccggtgaa tatggctcat aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc	9660
agacagtttt attgttcattg atgatataat ttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt	9720
ttgagacaca acgtggcttt gttgaataaa tcgaactttt gctgagttga aggatcagat	9780
cacgcatctt cccgacaacg cagaccgttc cgtggcaaag caaaagttca aaatcaccaa	9840
ctggtccacc tacaacaaag ctctcatcaa ccgtggctcc ctcaactttct ggctggatga	9900
tggggcgatt caggccctgg atgagtcagc aacaccttct tcacgaggca gacctctcga	9960
cggagttcca ctgagcgtca gaccccgtag aaaagatcaa aggatcttct tgagatcctt	10020
tttttctgcg cgtaatctgc tgcttgcaaa caaaaaaacc accgtacca gcggtggttt	10080
gtttgccgga tcaagagcta ccaactcttt ttccgaaggt aactggcttc agcagagcgc	10140
agataccaaa tactgttctt ctagtgtagc cgtagttagg ccaccacttc aagaactctg	10200
tagcaccgcc tacatactc gctctgctaa tctgttacc agtggctgct gccagtggcg	10260
ataagtcgtg tcttaccggg ttggactcaa gacgatagtt accggataag gcgcagcggc	10320
cgggctgaac ggggggttcg tgcacacagc ccagcttggg gcgaacgacc tacaccgaac	10380
tgagatacct acagcgtgag ctatgagaaa gcgccacgct tcccgaaggg agaaaggcgg	10440
acaggtatcc ggtaagcggc agggctcgaa caggagagcg cacgaggag cttccagggg	10500
gaaacgcctg gtatctttat agtctgtcgc ggtttcgcca cctctgactt gagcgtcgat	10560
tttttgatg ctctgcaggg gggcggagcc tatggaaaaa cgccagcaac gcggcctttt	10620

tacgggttcct ggccttttgc tggccttttg ctcacatgt

10659

<210> 27

<211> 601

<212> PRT

<213> Adeno-associated Virus

<400> 27

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

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

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

100 105 110

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

115 120 125

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

130 135 140

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

145 150 155 160

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

165 170 175

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

180 185 190

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

195 200 205
 Phe Thr Asp Ser Glu Tyr Gln Leu Pro Tyr Val Leu Gly Ser Ala His
 210 215 220
 Gln Gly Cys Leu Pro Pro Phe Pro Ala Asp Val Phe Met Ile Pro Gln
 225 230 235 240
 Tyr Gly Tyr Leu Thr Leu Asn Asn Gly Ser Gln Ala Val Gly Arg Ser

 245 250 255
 Ser Phe Tyr Cys Leu Glu Tyr Phe Pro Ser Gln Met Leu Arg Thr Gly
 260 265 270
 Asn Asn Phe Glu Phe Ser Tyr Asn Phe Glu Asp Val Pro Phe His Ser
 275 280 285
 Ser Tyr Ala His Ser Gln Ser Leu Asp Arg Leu Met Asn Pro Leu Ile
 290 295 300
 Asp Gln Tyr Leu Tyr Tyr Leu Ser Arg Thr Gln Ser Thr Gly Gly Thr

 305 310 315 320
 Ala Gly Thr Gln Gln Leu Leu Phe Ser Gln Ala Gly Pro Asn Asn Met
 325 330 335
 Ser Ala Gln Ala Lys Asn Trp Leu Pro Gly Pro Cys Tyr Arg Gln Gln
 340 345 350
 Arg Val Ser Thr Thr Leu Ser Gln Asn Asn Asn Ser Asn Phe Ala Trp
 355 360 365
 Thr Gly Ala Thr Lys Tyr His Leu Asn Gly Arg Asp Ser Leu Val Asn

 370 375 380
 Pro Gly Val Ala Met Ala Thr His Lys Asp Asp Glu Glu Arg Phe Phe
 385 390 395 400
 Pro Ser Ser Gly Val Leu Met Phe Gly Lys Gln Gly Ala Gly Lys Asp
 405 410 415
 Asn Val Asp Tyr Ser Ser Val Met Leu Thr Ser Glu Glu Glu Ile Lys
 420 425 430
 Thr Thr Asn Pro Val Ala Thr Glu Gln Tyr Gly Val Val Ala Asp Asn

 435 440 445

Leu Gln Gln Gln Asn Ala Ala Pro Ile Val Gly Ala Val Asn Ser Gln
 450 455 460
 Gly Ala Leu Pro Gly Met Val Trp Gln Asn Arg Asp Val Tyr Leu Gln
 465 470 475 480
 Gly Pro Ile Trp Ala Lys Ile Pro His Thr Asp Gly Asn Phe His Pro
 485 490 495
 Ser Pro Leu Met Gly Gly Phe Gly Leu Lys His Pro Pro Pro Gln Ile

 500 505 510
 Leu Ile Lys Asn Thr Pro Val Pro Ala Asp Pro Pro Thr Thr Phe Asn
 515 520 525
 Gln Ala Lys Leu Ala Ser Phe Ile Thr Gln Tyr Ser Thr Gly Gln Val
 530 535 540
 Ser Val Glu Ile Glu Trp Glu Leu Gln Lys Glu Asn Ser Lys Arg Trp
 545 550 555 560
 Asn Pro Glu Ile Gln Tyr Thr Ser Asn Tyr Tyr Lys Ser Thr Asn Val

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