(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0031153
(43) 공개일자 2025년03월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/005 (2006.01) *A61K 31/7088* (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) *C12N 15/86* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/005 (2013.01)
A61K 31/7088 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7040677
(22) 출원일자(국제) 2023년05월11일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월06일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/021905
(87) 국제공개번호 WO 2023/220287
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
63/340,823 2022년05월11일 미국(US)
63/342,324 2022년05월16일 미국(US)

(71) 출원인
더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
미국 펜실베니아 필라델피아 시빅 센터 블러바드 3401 (우: 19104)
(72) 발명자
데이비드슨 비벌리
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
데세도르 루이스
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

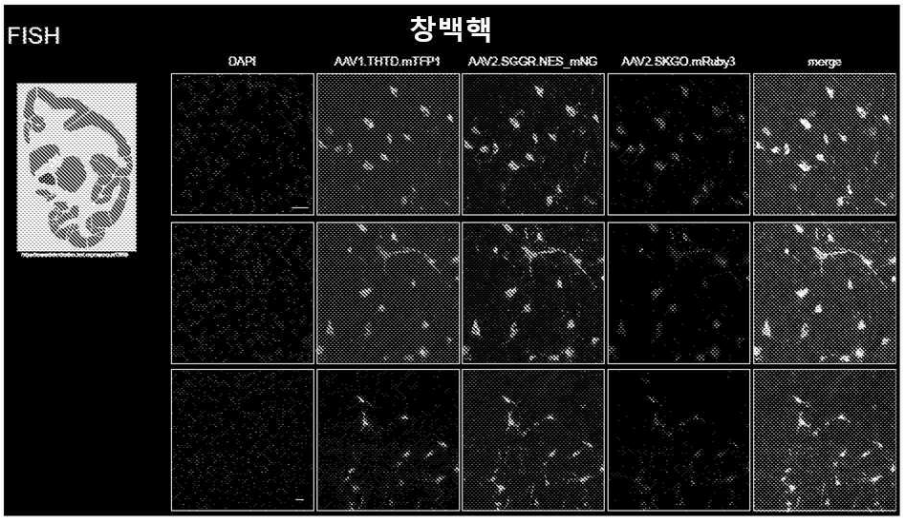
전체 청구항 수 : 총 44 항

(54) 발명의 명칭 **뇌 심부 구조를 표적화하기 위한 아데노-관련 바이러스 벡터**

(57) 요 약

본원에는 뇌의 특정 하위구조로 제제를 전달하는 표적화 펩티드를 암호화하는 서열을 함유하는 표적화 펩티드 및 벡터가 제공된다. 구체적으로, 표적화 펩티드는 변형된, 서열-특정된 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질의 성분이고, 추가로 여기서 뇌 하위구조는 창백핵, 조가비핵, 속섬유막, 미상핵, 대상핵, 흑질, 운동 피질, 뇌섬엽, 측두 피질, 시상, 해마, 지지물 및 소뇌 심부 핵일 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61P 25/28 (2018.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2750/14122 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)

(72) 발명자
랜엄 폴
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
리브 데이비드
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
카이저 메간
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아
첸 용홍
미국, 펜실베니아 19146, 필라델피아, 15 플로어, 2716 사우스 스트리트, 씨/오 더 칠드런스 호스피탈 오브 필라델피아

명 세 서

청구범위

청구항 1

변형된 AAV 캡시드(capsid) 단백질을 포함하는 바이러스 벡터(virus vector)를 별개의 장기(organ) 또는 뇌 구조에 표적화(targeting)하는 표적화 펩티드를 포함하는 변형된 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질로서, 여기서 표적화 펩티드가 3 내지 10개 아미노산 길이인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 2

제1항에 있어서, 캡시드 단백질이 서열 번호 20, 19, 및 21-24 중 어느 하나에 따른 서열을 갖는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 3

제1항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 변형된 AAV1 캡시드 단백질, 변형된 AAV2 캡시드 단백질, 또는 변형된 AAV9 캡시드 단백질인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 4

제1항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 AAV1 캡시드 단백질(서열 번호 1 참조)로부터 유래되고, 여기서 표적화 펩티드가 AAV1 캡시드 단백질의 잔기 590 뒤에 삽입되는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 5

제4항에 있어서, 표적화 펩티드에는 링커 서열(linker sequence)이 측면에 위치(flanking)하고, 여기서 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열이 2개 또는 3개 아미노산 길이인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 6

제5항에 있어서, 링커 서열이 표적화 펩티드의 N-말단 측(N-terminal side)의 SSA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AS인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 7

제6항에 있어서, 변형된 AAV1 캡시드 단백질이 서열 번호 4와 적어도 95% 동일한 서열을 갖는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 8

제1항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 AAV2 캡시드 단백질(서열 번호 2 참조)로부터 유래되고, 여기서 표적화 펩티드가 AAV2 캡시드 단백질의 잔기 587 뒤에 삽입되는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 9

제8항에 있어서, 표적화 펩티드에는 링커 서열이 측면에 위치하고, 여기서 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열이 2개 또는 3개 아미노산 길이인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 10

제9항에 있어서, 링커 서열이 표적화 펩티드의 N-말단 측의 AAA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AA인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 11

제10항에 있어서, 변형된 AAV2 캡시드 단백질이 서열 번호 5와 적어도 95% 동일한 서열을 갖는 변형된 AAV 캡시

드 단백질.

청구항 12

제1항에 있어서, 변형된 AAV 캡시드 단백질이 AAV9 캡시드 단백질(서열 번호 3 참조)로부터 유래되고, 여기서 표적화 펩티드가 AAV9 캡시드 단백질의 잔기 588 뒤에 삽입되는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 13

제12항에 있어서, 표적화 펩티드에는 링커 서열이 측면에 위치하고, 여기서 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열이 2개 또는 3개 아미노산 길이인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 14

제13항에 있어서, 링커 서열이 표적화 펩티드의 N-말단 측의 AAA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AS인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 15

제14항에 있어서, 변형된 AAV9 캡시드 단백질이 서열 번호 6과 적어도 95% 동일한 서열을 갖는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 16

제1항에 있어서, 표적 펩티드가 서열 번호 8, 10, 12, 14, 16 및 18로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열을 갖는 최대 10개 아미노산 길이의 서열을 포함하는 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 17

제16항에 있어서, 표적화 펩티드가 7개 아미노산 길이인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 별개의 뇌 구조가 창백핵(globus pallidus), 조가비핵(putamen), 속섬유막(internal capsule), 미상핵(caudate), 대상핵(claustrum), 흑질(substantia nigra), 운동 피질(motor cortex), 뇌섬엽(insula), 측두 피질(temporal cortex), 시상(thalamus), 해마(hippocampus), 지지물(subiculum) 및 소뇌 심부 핵(deep cerebellar nuclei)인 변형된 AAV 캡시드 단백질.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 변형된 캡시드 단백질을 암호화(encoding)하는 서열을 포함하는 핵산.

청구항 20

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV) 바이러스.

청구항 21

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항의 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터.

청구항 22

제21항에 있어서, 관심 핵산을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함하는 바이러스 벡터.

청구항 23

제22항에 있어서, 관심 핵산이 치료제(therapeutic agent)인 바이러스 벡터.

청구항 24

제23항에 있어서, 치료제가 단백질 또는 RNAi 분자인 바이러스 벡터.

청구항 25

제21항 내지 제24항 중 어느 한 항의 바이러스 벡터를 포함하는 세포.

청구항 26

제25항에 있어서, 세포가 포유류 세포인 세포.

청구항 27

제25항에 있어서, 세포가 인간 세포인 세포.

청구항 28

제25항에 있어서, 세포가 시험관내(in vitro)에 있는 세포.

청구항 29

제25항에 있어서, 세포가 생체내(in vivo)에 있는 세포.

청구항 30

제20항의 바이러스 벡터 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물.

청구항 31

제20항의 바이러스를 대상체(subject)에게 투여하는 것을 포함하여, 대상체의 별개의 뇌 구조에 제제(agent)를 전달하는 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 제제가 siRNA, shRNA, miRNA, 비-코딩(non-coding) RNA, lncRNA, 치료 단백질(therapeutic protein), 또는 CRISPR 시스템인 방법.

청구항 33

제31항 또는 제32항에 있어서, 투여가 중추 신경계에 대해 이루어지는 방법.

청구항 34

제33항에 있어서, 투여가 대조(cisterna magna), 뇌실내 공간(intraventricular space), 뇌실막(ependyma), 뇌실(brain ventricle), 지주막하 공간(subarachnoid space), 및/또는 척수강내 공간(intrathecal space)에 대해 이루어지는 방법.

청구항 35

제33항에 있어서, 투여가 창백핵에 대해 이루어지는 방법.

청구항 36

제31항 또는 제32항에 있어서, 투여가 전신 투여인 방법.

청구항 37

제31항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 여러 개의 바이러스 입자가 투여되는 방법.

청구항 38

제37항에 있어서, 바이러스가 킬로그램당 약 $1X10^{6}$ 내지 약 $1X10^{18}$ 벡터 게놈(vector genome)의 용량(dose)으로 투여되는 방법.

청구항 39

제37항에 있어서, 바이러스가 약 $1x10^{7}$-$1x10^{17}$, 약 $1x10^{8}$-$1x10^{16}$, 약 $1x10^{9}$-$1x10^{15}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{14}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{13}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{13}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{11}$, 약 $1x10^{11}$-$1x10^{12}$, 약 $1x10^{12}$-$x10^{13}$, 또는 약 $1x10^{13}$-$1X10^{14}$ vg/환자 kg의 용량으로 투여되는 방법.

청구항 40

제31항 내지 제39항 중 어느 한 항에 있어서, 대상체가 인간인 방법.

청구항 41

제20항의 바이러스를 포유류에 투여하는 것을 포함하여, 포유류에서 질환을 치료하는 방법.

청구항 42

제41항에 있어서, 질환이 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)인 방법.

청구항 43

제42항에 있어서, 신경퇴행성 질환이 헌팅턴병(Huntington's disease), ALS, 유전성 경련성 편마비(hereditary spastic hemiplegia), 원발성 측삭 경화증(primary lateral sclerosis), 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy), 케네디병(Kennedy's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 폴리글루타민 반복 질환(polyglutamine repeat disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)인 방법.

청구항 44

제41항에 있어서, 포유류가 인간인 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **관련 출원에 대한 참조**

[0002] 본 출원은 2022년 5월 11일에 출원된 미국 가출원 제63/340,823호 및 2022년 5월 16일에 출원된 미국 가출원 제63/342,324호에 대한 우선권을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본원에 참고로 포함된다.

[0003] **서열 목록에 대한 참조**

[0004] 본 출원은 서열 목록 XML을 담고 있으며, 이는 전자적으로 제출되었고 이의 전문이 본원에 참고로 포함된다. 2023년 5월 9일에 생성된 상기 서열 목록 XML은 CHOPP0054WO_ST26.xml로 명명되었으며 크기는 32,221바이트이다.

[0005] **1. 분야**

[0006] 본 개시내용은 일반적으로 의학 및 바이러스학 분야에 관한 것이다. 보다 특히, 이것은 분자 치료제를 뇌 심부 구조에 전달하기 위한 조성물 및 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0007] **2. 관련 기술의 설명**

[0008] 합리적 설계(rational design) 및 유도 진화(directed evolution)를 포함하여 AAV 벡터 변이체를 생성하기 위해 다양한 전략이 개발되었다. 합리적 설계 접근법은 AAV 캡시드(capsid)에 대한 지식을 활용하여, 형질도입(transduction) 효율 또는 특이성을 변경하기 위한 캡시드에 대한 표적화(targeting)된 변화, 예를 들어 형질도입 효율을 높이기 위한 캡시드 표면에서의 티로신 돌연변이를 수행한다. 그러나, 어떤 AAV 변이체도 뇌 심부 구조를 특이적으로 또는 효율적으로 표적화하지 못한다. 헌팅턴병(Huntington's Disease, HD) 및 파킨슨병(Parkinson's Disease, PD)을 포함한 질환은 주로 기존 AAV 변이체가 효과적으로 표적화할 수 없는 뇌 심부 구조에 영향을 미친다. 따라서, 뇌 심부 구조를 표적화할 수 있는 AAV 변이체가 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원에는 각각 변형된 캡시드를 포함하는 바이러스 벡터(virus vector)가 제공되며, 여기서 변형된 캡시드는 바이러스 벡터를 별개의 뇌 구조에 표적화하는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다.

과제의 해결 수단

[0010] 한 실시양태에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질을 포함하는 바이러스 벡터를 별개의 장기(organ) 또는 뇌 구조에 표적화하는 표적화 펩티드를 포함하는 변형된 아데노-관련 바이러스(AAV) 캡시드 단백질이 제공되며, 표적화 펩티드는 3 내지 10개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 변형된 AAV1 캡시드 단백질, 변형된 AAV2 캡시드 단백질, 또는 변형된 AAV9 캡시드 단백질이다.

[0011] 일부 측면에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 AAV1 캡시드 단백질(서열 번호 1 참조)로부터 유래되고, 표적화 펩티드는 AAV1 캡시드 단백질의 잔기 590 뒤에 삽입된다. 일부 측면에서, 표적화 펩티드에는 링커 서열(linker sequence)이 측면에 위치하고, 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열은 2개 또는 3개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 링커 서열은 표적화 펩티드의 N-말단 측(N-terminal side)의 SSA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AS이다. 일부 측면에서, 변형된 AAV1 캡시드 단백질은 서열 번호 4와 적어도 95% 동일한 서열을 갖는다.

[0012] 일부 측면에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 AAV2 캡시드 단백질(서열 번호 2 참조)로부터 유래되고, 표적화 펩티드는 AAV2 캡시드 단백질의 잔기 587 뒤에 삽입된다. 일부 측면에서, 표적화 펩티드에는 링커 서열이 측면에 위치하고, 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열은 2개 또는 3개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 링커 서열은 표적화 펩티드의 N-말단 측의 AAA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AA이다. 일부 측면에서, 변형된 AAV2 캡시드 단백질은 서열 번호 5와 적어도 95% 동일한 서열을 갖는다.

[0013] 일부 측면에서, 변형된 AAV 캡시드 단백질은 AAV9 캡시드 단백질(서열 번호 3 참조)로부터 유래되고, 표적화 펩티드는 AAV9 캡시드 단백질의 잔기 588 뒤에 삽입된다. 일부 측면에서, 표적화 펩티드에는 링커 서열이 측면에 위치하고, 표적화 펩티드의 각 측면 상의 링커 서열은 2개 또는 3개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, 링커 서열은 표적화 펩티드의 N-말단 측의 AAA 및 표적화 펩티드의 C-말단 측의 AS이다. 일부 측면에서, 변형된 AAV1 캡시드 단백질은 서열 번호 6과 적어도 95% 동일한 서열을 갖는다.

[0014] 일부 측면에서, 표적 펩티드는 서열 번호 7-13으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열 또는 서열 번호 8, 10, 12, 14, 16 및 18로 이루어진 그룹으로부터 선택된 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는 최대 10개 아미노산 길이의 서열을 포함한다. 일부 측면에서, 표적화 펩티드는 7개 아미노산 길이이다. 일부 측면에서, AAV 캡시드 단백질은 서열 번호 19-24 중 어느 하나의 서열을 갖는다.

[0015] 일부 측면에서, 별개의 뇌 구조는 뇌 심부 구조, 예를 들어 창백핵(globus pallidus), 조가비핵(putamen), 속섬유막(internal capsule), 미상핵(caudate), 대상핵(claustrum), 흑질(substantia nigra), 시상(thalamus), 해마(hippocampus), 지지물(subiculum) 및 소뇌 심부 핵(deep cerebellar nuclei)이다. 일부 측면에서, 별개의 뇌 구조는 운동 피질(motor cortex) 또는 측두 피질(temporal cortex)이다. 일부 측면에서, 별개의 뇌 구조는 운동 피질 및 전운동 피질(premotor cortex)의 층 V/VI 투사 뉴런이다.

[0016] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태 중 어느 하나의 변형된 캡시드 단백질을 암호화(encoding)하는 서열을 포함하는 핵산이 제공된다.

[0017] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태 중 어느 하나의 변형된 캡시드 단백질을 포함하는 재조합 아데노-관련 바이러스(rAAV)가 제공된다. 일부 측면에서, rAAV의 조합이 제공된다. 일부 측면에서, rAAV는 간 세포를 형질도입하지 않는다.

[0018] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태 중 어느 하나의 변형된 캡시드 단백질을 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터가 제공된다. 일부 측면에서, 바이러스 벡터는 관심 핵산을 암호화하는 핵산 서열을 추가로 포함한다. 일부 측면에서, 관심 핵산은 치료제(therapeutic agent)이다. 일부 측면에서, 치료제는 효소 또는 RNAi 분자이다.

[0019] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태 중 어느 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 세포가 제공된다. 일부 측면에서, 세포는 포유류 세포, 예를 들어 인간 세포이다. 일부 측면에서, 세포는 시험관내 또는 생체내 세포이다.

[0020] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태의 바이러스 벡터 및 약제학적으로 허용되는 담체를 포함하는 약제학적 조성물이 제공된다.

[0021] 한 실시양태에서, 본원에는 제제(agent)를 암호화하는 AAV 바이러스를 직접 창백핵에 투여함을 포함하여 제제를 대상체(subject)의 별개의 뇌 구조에 전달하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, AAV 바이러스는 본 실시양태의 바이러스이다.

[0022] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태의 바이러스를 대상체에게 투여함을 포함하여 제제를 대상체의 별개의 뇌 구조에 전달하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 별개의 뇌 구조는 창백핵, 조가비핵, 속섬유막, 미상핵, 대상핵, 흑질, 운동 피질, 뇌섬엽(insula), 측두 피질, 시상, 해마, 지지물 및 소뇌 심부 핵이다. 일부 측면에서, 별개의 뇌 구조는 운동 피질 및 전운동 피질의 층 V/VI 투사 뉴런이다.

[0023] 일부 측면에서, 제제는 siRNA, shRNA, miRNA, 비-코딩(non-coding) RNA, lncRNA, 치료 단백질(therapeutic protein), 또는 CRISPR 시스템이다. 일부 측면에서, 투여는 중추 신경계에 대해 이루어진다. 일부 양태에서, 투여는 대조(cisterna magna), 뇌실내 공간(intraventricular space), 뇌실막(ependyma), 뇌실(brain ventricle), 지주막하 공간(subarachnoid space), 및/또는 척수강내 공간(intrathecal space)에 대해 이루어진다. 일부 측면에서, 뇌실은 입쪽 측뇌실(rostral lateral ventricle), 및/또는 꼬리쪽 측뇌실(caudal lateral ventricle), 및/또는 우측 측뇌실(right lateral ventricle), 및/또는 좌측 측뇌실(left lateral ventricle), 및/또는 우측 입쪽 측뇌실(right rostral lateral ventricle), 및/또는 좌측 입쪽 측뇌실(left rostral lateral ventricle), 및/또는 우측 꼬리쪽 측뇌실(right caudal lateral ventricle), 및/또는 좌측 꼬리쪽 측뇌실(left caudal lateral ventricle)이다. 일부 측면에서, 투여는 전신 투여이다.

[0024] 일부 측면에서, 여러 개의 바이러스 입자가 투여된다. 일부 측면에서, 바이러스는 킬로그램당 약 $1X10^{6}$ 내지 약 $1X10^{18}$ 벡터 게놈(vector genome)의 용량(dose)으로 투여된다(vg/kg). 일부 측면에서, 바이러스는 약 $1x10^{7}$-$1x10^{17}$, 약 $1x10^{8}$-$1x10^{16}$, 약 $1x10^{9}$-$1x10^{15}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{14}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{13}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{13}$, 약 $1x10^{10}$-$1x10^{11}$, 약 $1x10^{11}$-$1x10^{12}$, 약 $1x10^{12}$-$x10^{13}$, 또는 약 $1x10^{13}$-$1X10^{14}$ vg/환자 kg의 용량으로 투여된다. 일부 측면에서, 대상체는 인간이다.

[0025] 한 실시양태에서, 본원에는 본 실시양태의 바이러스를 포유류에게 투여함을 포함하여 포유류에서 질환을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 측면에서, 질환은 신경퇴행성 질환(neurodegenerative disease)이다. 일부 측면에서, 신경퇴행성 질환은 헌팅턴병(Huntington's disease), 근위축성 측삭 경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 유전성 경련성 편마비(hereditary spastic hemiplegia), 원발성 측삭 경화증(primary lateral sclerosis), 척수성 근위축증(spinal muscular atrophy), 케네디병(Kennedy's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 폴리글루타민 반복 질환(polyglutamine repeat disease), 또는 파킨슨병(Parkinson's disease)이다. 일부 측면에서, 포유류는 인간이다.

[0026] 본 발명의 다른 목적, 특징 및 이점들은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나, 본 발명의 취지 및 범위 내에서의 다양한 변경 및 수정이 본 상세한 설명으로부터 당업계의 숙련가들에게 자명하기 때문에 본 발명의 바람직한 실시양태들을 나타내는 상세한 설명 및 구체적인 실시예들은 단지 예시로 제공되는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0027] 하기 도면들은 본 명세서의 일부를 형성하며 본 발명의 특정 측면들을 추가로 입증하기 위해 포함된다. 본 발명은 본원에 제시된 특정 실시양태에 대한 상세한 설명과 함께 이들 도면들 중 하나 이상을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1. 창백핵(주입 부위)의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단(fluorophore)에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(Fluorescent In Situ Hybridization, FISH) 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체(soma) 및 핵에 국소화된다. 대부분의 세포는 세 가지 캡시드 변이체 모두에 대해 양성이다.

도 2. 창백핵(주입 부위)의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광(epifluorescence) 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기(projection) 모두에 국소화된다. 구체적으로, FISH에 의해 mRuby3 mRNA가 창백핵 뉴런의 세포체에 존재했지만, 조직의 이러한 조각에서 단백질에 대한

양성 신호는 거의 또는 전혀 없다.

도 3. 꼬리쪽 창백핵(주입 부위)의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하는, 도 2의 이미지와는 상이한 창백핵 영역으로부터의 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다. 이 조직 절편에는 mRuby 신호가 존재한다.

도 4. 조가비핵의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체 및 핵에 국소화된다. mNeonGreen(mNG)을 발현하는 캡시드 변이체가 조가비핵에서 가장 높은 세포 전달을 보여준다.

도 5. 조가비핵의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다. FISH에 의한 mRNA와 유사하게, mNeonGreen(mNG)을 발현하는 새로운 캡시드 변이체가 세포와 돌기 모두에서 가장 양성인 신호를 보여준다.

도 6. 속섬유막 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. mTFP1 및 NeonGreen 형광의 양성 신호의 현저한 분리가 있다.

도 7. 미상핵의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체에 국소화된다.

도 8. 미상핵의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다.

도 9. 대상핵의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체에 국소화된다.

도 10. 대상핵 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 다시, 형광의 양성 신호는 세포 세포체 및 세포 돌기 모두에서 보여진다.

도 11. 흑질의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체 및 핵에 국소화된다.

도 12. 흑질의 세포 내에 mRNA를 국소화하지만 도 11의 이미지와 관련하여 상이한 영역으로부터 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체 및 핵에 국소화된다.

도 13. 흑질 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 형광의 양성 신호는 세포 세포체 및 세포 돌기 모두에서 보여진다.

도 14. 흑질 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하지만 도 13의 이미지와 관련하여 상이한 영역으로부터의 표면형광 이미지. 형광의 양성 신호는 세포 세포체 및 세포 돌기 모두에서 보여진다.

도 15. 운동 피질의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체 및 핵에 국소화된다.

도 16. 운동 피질의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다. 놀랍게도, FISH에 의해 mRNA 신호는 mTFP1 및 mNeonGreen 모두에 존재하였다; 그러나, 표면형광에 의해 나타난 바와 같이 주로 발현되는 것은 mTFP1이다.

도 17. 대상 피질(cingular cortex)에서, 새로운 캡시드 mRNA에 대한 몇 개의 양성 세포가 FISH에 의해 검출되었다. 그러나, 광범위하게 퍼진 mTFP1 양성 세포는 표면형광 현미경에 의해 검출되었다.

도 18. 측두 피질의 뇌섬엽의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체(세포질(cytoplasm) 및 핵)에 국소화된다.

도 19. 측두 피질의 뇌섬엽의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다.

도 20. 시상의 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 mRNA 신호는 이러한 세포의 세포체(세포질 및 핵)에 국소화된다.

도 21. 시상의 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다.

도 22a-d. 붉은털원숭이(rhesus macaque)의 창백핵에 전달된 상위 3개의 새로운 캡시드의 표면형광 이미지. 세 가지 모두의 발현은 조가비핵에서 높다. A) AAV1.THTD.mTFP1의 발현을 보여주는 이미지; B) AAV2.SGGR.mNeonGreen의 발현을 보여주는 이미지; C) AAV2.SKGQ.mRuby3의 발현을 보여주는 이미지; D) A-C의 병합된 이미지.

도 23a-d. 붉은털원숭이의 창백핵에 전달된 상위 3개의 새로운 캡시드의 표면형광 이미지. AAV1.THTD.mTFP1의 발현은 운동 피질에서 극히 높다. A) AAV1.THTD.mTFP1의 발현을 보여주는 이미지; B) AAV2.SGGR.mNeonGreen의 발현을 보여주는 이미지; C) AAV2.SKGQ.mRuby3의 발현을 보여주는 이미지; D) A-C의 병합된 이미지.

도 24a-d. 붉은털원숭이의 창백핵에 전달된 상위 3개의 새로운 캡시드의 표면형광 이미지. 세 가지 모두의 발현은 해마(CA1) 및 인접 지지물에 국소화된다. A) AAV1.THTD.mTFP1의 발현을 보여주는 이미지; B) AAV2.SGGR.mNeonGreen의 발현을 보여주는 이미지; C) AAV2.SKGQ.mRuby3의 발현을 보여주는 이미지; D) A-C의 병합된 이미지.

도 25. 두 번째 붉은털원숭이의 창백핵(주입 부위) 세포 내에 mRNA를 국소화하기 위한 각 특정 형광단에 대해 공초점 현미경으로 캡처한 형광 동소 보합법(FISH) 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 핵에 국소화된다.

도 26. 두 번째 붉은털원숭이의 창백핵(주입 부위) 세포 내에 각 특정 형광단으로부터의 단백질을 국소화하기 위한 표면형광 이미지. 양성 신호는 이러한 세포의 세포체 및 돌기 모두에 국소화된다.

도 27. 속섬유막/내측 창백핵에 바이러스를 주입한 마우스로부터의 뇌 및 척수의 홀 마운트(Whole mount). 마우스 번호는 왼쪽에 있으며, 이들의 ID 번호는 어떤 반구가 어떤 형광단-발현 캡시드를 제공받았는지 반영하기 위해 색별 표식(color coding)되어 있다.

도 28. 시상에 바이러스를 주입한 마우스로부터의 뇌 및 척수의 홀 마운트. 마우스 번호는 왼쪽에 있으며, 이들의 ID 번호는 어떤 반구가 어떤 형광단-발현 캡시드를 제공받았는지 반영하기 위해 색별 표식되어 있다.

도 29. 소뇌 심부 핵에 바이러스를 주입한 마우스로부터의 뇌 및 척수의 홀 마운트. 마우스 번호는 왼쪽에 있으며, ID 번호는 어떤 반구가 어떤 형광단-발현 캡시드를 제공받았는지 반영하기 위해 색별 표식되어 있다.

도 30. 좌측 속섬유막 및 내측 창백핵에 AAV2.SGGR.mNeonGreen를 주입하고 우측에 AAV2.SKGO.mRuby3을 주입한 마우스로부터의 4개의 관상 뇌 절편.

도 31. 좌측 속섬유막 및 내측 창백핵에 AAV2. SKGO.mRuby3을 주입하고 우측에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입한 마우스로부터의 3개의 관상 뇌 절편.

도 32. 좌측 시상에 AAV2.SGGR.mNeonGreen을 주입하고 우측에 AAV2.SKGO.mRuby3을 주입한 마우스로부터의 4개의 관상 뇌 절편. 소뇌 및 후뇌(hindbrain)의 단일 시상 단면(single sagittal section).

도 33. 좌측 시상에 AAV2.SKGO.mRuby3을 주입하고 우측에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입한 마우스로부터의 4개의 관상 뇌 절편. 소뇌 및 뇌간의 시상 단면은 AAV1.THTD.mTFP1에 양성인 소뇌 심부 핵의 뉴런을 보여준다.

도 34. 좌측 소뇌 심부 핵에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입하고 우측에 AAV2.SGGR.mNeonGreen을 주입한 소뇌의 시상 절편.

도 35. 좌측 소뇌 심부 핵에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입하고 우측에 AAV2.SGGR.mNeonGreen을 주입한 외측 대뇌(lateral cerebrum)의 시상 절편.

도 36. 좌측 소뇌 심부 핵에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입하고 우측에 AAV2.SGGR.mNeonGreen을 주입한 전체 뇌의 시상 절편. 대뇌 전반에 걸쳐 AAV1.THTD.mTFP1에 양성인 뉴런 및 돌기가 있다.

도 37. 좌측 소뇌 심부 핵에 AAV2.SKGO.mRuby3을 주입하고 우측에 AAV1.THTD.mTFP1을 주입한 전체 뇌의 시상 절편. 대뇌 전반에 걸쳐 AAV1.THTD.mTFP1에 양성인 뉴런 및 돌기가 있다.

도 38a-38c. 샘플링된 뇌 영역에 걸친 AAV 캡시드 변이체의 UMI 농축(enrichment)의 히트맵 도식. (도 38a) AAV 펩티드 삽입 영역에 걸친 Amplicon seq를 통해 다수의 샘플링 조직에 걸쳐 전달된 캡시드 변이체의 고유 분

자 식별자(UMI) 수를 수집할 수 있었다. A의 앰플리콘은 형질도입된 조직으로부터 회수된 캡시드 DNA로부터 생성되었다. 각 캡시드 변이체의 % 풍부도(% abundance)는 표시된 각 조직에 대해 표시된다. 형광 검증을 위해 이월된 캡시드가 표시된다. (도 38b) A에 표시된 동일한 DNA 앰플리콘-Seq UMI 수는 투입을 능가하는 농축을 계산함으로써 정규화시켰다. 가장 높게 표시되는 캡시드 후보는 투입 캡시드 풀(pool)에서의 이들의 풍부도에 비해 가장 높은 농축을 보여주는 후보이다. (도 38c) amplicon-Seq에 의해 RNA로부터 수득된 UMI 수의 % 풍부도.

도 39. 붉은털원숭이의 운동 피질 및 전운동 피질에 있는 많은 수의 피질층 V/VI 투사 뉴런에 AAV1.THTD.mTFP1을 국소화하기 위한 표면 형광 이미지.

도 40. AAV gDNA 및 단백질 발현은 붉은털원숭이의 간에서 검출 임계값 미만이었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본원에는 각각 변형된 캡시드를 포함하는 바이러스 벡터가 제공되며, 여기서 변형된 캡시드는 바이러스 벡터를 뇌 심부 구조에 표적화하는 적어도 하나의 아미노산 서열을 포함한다. 특정 실시양태에서, 뇌 구조는 창백핵, 조가비핵, 속섬유막, 미상핵, 대상핵, 흑질, 운동 피질, 뇌섬엽, 측두 피질, 시상, 해마, 지지물, 및 소뇌 심부핵이다. 특정 실시양태에서, AAV는 AAV1, AAV2, 또는 AAV9이다. 예시적인 야생형 참조 AAV1 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 1에 제공되어 있다. 예시적인 야생형 참조 AAV2 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 2에 제공되어 있다. 예시적인 야생형 참조 AAV9 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 3에 제공되어 있다. 특정 측면에서, 표적화 펩티드는 AAV1 캡시드의 위치 590, AAV2 캡시드의 위치 587, 또는 AAV9 캡시드의 위치 588에 삽입된다. 예시적인 변형된 AAV1 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 4에 제공되어 있고, 이것은 SSAX7AS로서 위치 590 뒤에 표적화 펩티드 삽입을 보여주며, 여기서 선두 SSA 및 후미 AS는 링커 서열이고 X7은 표적화 펩티드를 나타낸다. 예시적인 변형된 AAV2 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 5에 제공되어 있고, 이것은 AAAX7AA로서 위치 587 뒤에 표적화 펩티드 삽입을 보여주며, 여기서 선두 AAA 및 후미 AA는 링커 서열이고 X7은 표적화 펩티드를 나타낸다. 예시적인 변형된 AAV9 캡시드 단백질 서열은 서열 번호 6에 제공되어 있고, 이것은 AAAX7AS로서 위치 588 뒤에 표적화 펩티드 삽입을 보여주며, 여기서 선두 AAA 및 후미 AS는 링커 서열이고 X7은 표적화 펩티드를 나타낸다.

[0029] **I. 아데노-관련 바이러스(AAV) 벡터**

[0030] 아데노-관련 바이러스(AAV)는 파보바이러스과(parvoviridae)의 작은 비병원성(nonpathogenic) 바이러스이다. 현재까지, 혈청학적으로(serologically) 구별되는 수많은 AAV가 확인되었으며, 12개 이상이 인간 또는 영장류로부터 단리(isolating)되었다. AAV는 복제를 위해 헬퍼 바이러스에 의존한다는 점에서 이 계열의 다른 구성원과 구별된다.

[0031] AAV 게놈은 숙주 세포 게놈에 통합되지 않고 염색체외(extrachromosomal) 상태로 존재할 수 있고; 넓은 숙주 범위를 가지며; *시험관내에서* 및 *생체내에서* 분열 세포와 비-분열 세포를 모두 형질도입하고 형질도입된 유전자의 높은 발현 수준을 유지한다. AAV 바이러스 입자는 열에 안정하고; 용매, 세제, pH 및 온도 변화에 내성이 있으며; 컬럼 정제될 수 있고/있거나 CsCl 구배로 또는 다른 수단에 의해 농축될 수 있다. AAV 게놈은 양성- 또는 음성-센서의 단일-가닥 데옥시리보핵산(ssDNA)을 포함한다. AAV의 대략 4.7kb인 게놈은 플러스 또는 마이너스 극성의 단일 가닥 DNA의 한 세그먼트로 구성된다. 게놈의 말단은 헤어핀 구조로 접힐 수 있는 짧은 역위 말단 반복체(Inverted Terminal Repeat, ITR)이며 바이러스 DNA 복제 기점으로서 역할을 할 수 있다.

[0032] AAV "게놈"은 최종적으로 패키징(packaging)되거나 캡슐화되어 AAV 입자를 형성하는 재조합 핵산 서열을 지칭한다. AAV 입자는 종종 AAV 캡시드 단백질로 패키징된 AAV 게놈을 포함한다. 재조합 플라스미드가 재조합 벡터를 작제하거나 제조하는 데 사용되는 경우, AAV 벡터 게놈은 재조합 플라스미드의 벡터 게놈 서열에 상응하지 않는 "플라스미드"의 부분을 포함하지 않는다. 재조합 플라스미드의 이러한 비-벡터 게놈 부분을 "플라스미드 백본(plasmid backbone)"이라고 하며, 이는 플라스미드 증식 및 생산에 필요한 과정인 플라스미드의 클로닝 및 증폭에 중요하지만 그 자체가 바이러스 입자로 패키징되거나 캡슐화되지는 않는다. 따라서, AAV 벡터 "게놈"은 AAV 캡시드 단백질에 의해 패키징되거나 캡슐화된 핵산을 지칭한다.

[0033] AAV 비리온(입자)은 AAV 캡시드를 포함하는 직경이 대략 25nm인 비-외피(non-enveloped) 이십면체 입자이다. AAV 입자는 VP1, VP2 및 VP3의 세 가지 관련 캡시드 단백질로 구성된 이십면체 대칭을 포함하며, 이것은 함께 상호작용하여 캡시드를 형성한다. 대부분의 네이티브(native) AAV의 게놈은 종종 좌측 ORF 및 우측 ORF라고도 하는 두 개의 개방 판독 프레임(open reading frame, ORF)을 함유한다. 우측 ORF는 종종 캡시드 단백질 VP1, VP2 및 VP3를 암호화한다. 이러한 단백질은 종종 각각 1:1:10의 비율로 발견되지만 다양한 비율로 나타날 수 있으며 모두 우측 ORF로부터 유래된다. VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질은 선택적 스플라이싱(alternative

splicing) 및 특이한 시작 코돈(start codon)의 사용에 의해 서로 상이하다. 결손 분석(deletion analysis)에서는 선택적으로 스플라이싱된 메시지로부터 번역된 VP1의 제거 또는 변경이 감염성 입자의 수율을 감소시키는 것으로 나타났다. VP3 코딩 영역 내의 돌연변이는 단일-가닥 자손 DNA 또는 감염성 입자를 생성하지 못하게 한다. 특정 실시양태에서, AAV 입자의 게놈은 1개, 2개 또는 3개 모두의 VP1, VP2 및 VP3 폴리펩티드를 암호화한다.

[0034] 좌측 ORF는 종종 비-구조적(non-structural) Rep 단백질인 Rep 40, Rep 52, Rep 68 및 Rep 78을 암호화하며, 이는 단일-가닥 자손 게놈의 생산 외에도 복제 및 전사의 조절에 관여한다. Rep 단백질 중 2개는 인간 19번 염색체의 q 암(arm) 영역으로의 AAV 게놈의 우선적 통합과 관련이 있다. Rep68/78은 DNA 및 RNA 헬리카제 활성 뿐만 아니라 NTP 결합 활성을 갖는 것으로 나타났다. 일부 Rep 단백질은 핵 국소화 신호 뿐만 아니라 여러 잠재적 인산화(phosphorylation) 부위를 가지고 있다. 특정 실시양태에서, AAV의 게놈(예를 들어, rAAV)은 Rep 단백질의 일부 또는 전부를 암호화한다. 특정 실시양태에서, AAV의 게놈(예를 들어, rAAV)은 Rep 단백질을 암호화하지 않는다. 특정 실시양태에서, Rep 단백질 중 하나 이상은 트랜스(trans)로 전달될 수 있고, 따라서 폴리펩티드를 암호화하는 핵산을 포함하는 AAV 입자에 포함되지 않는다.

[0035] AAV 게놈의 말단은 바이러스 DNA 복제 기점으로서 역할을 하는 T자형 헤어핀 구조로 접힐 수 있는 잠재력을 갖는 짧은 역위 말단 반복체(ITR)를 포함한다. 따라서, AAV의 게놈은 단일 가닥 바이러스 DNA 게놈 측면에 위치한 하나 이상의 (예를 들어, 한 쌍의) ITR 서열을 포함한다. ITR 서열은 종종 각각 약 145개 염기의 길이를 갖는다. ITR 영역 내에서, ITR 기능의 핵심으로 여겨지는 두 가지 요소, 즉 GAGC 반복 모티프 및 말단 분해 부위(terminal resolution site (trs))가 기재되었다. 반복 모티프는 ITR이 선형 또는 헤어핀 형태일 때 Rep를 결합하는 것으로 나타났다. 이 결합은 부위- 및 가닥-특이적 방식으로 발생하는 trs에서의 절단을 위해 Rep68/78을 배치하는 것으로 생각된다. 복제에서의 역할 외에도, 이들 두 가지 요소는 바이러스 통합의 핵심인 것으로 보인다. 염색체 19 통합 유전자좌(locus) 내에 포함된 것은 인접 trs를 갖는 Rep 결합 부위이다. 이들 요소는 유전자좌 특이적 통합을 위해 기능적이고 필요한 것으로 나타났다.

[0036] 재조합 바이러스, 예를 들어 렌티- 또는 파보-바이러스(예를 들어, AAV) 벡터와 같은 벡터의 수식어로서, 뿐만 아니라 재조합 핵산 서열 및 폴리펩티드와 같은 서열의 수식어로서, "재조합(recombinant)"이라는 용어는 조성물이 일반적으로 자연에서 발생하지 않는 방식으로 조작(즉, 엔지니어링)되었음을 의미한다. AAV, 레트로바이러스 또는 렌티바이러스 벡터와 같은 재조합 벡터의 특정 예는 야생형 바이러스 게놈에 일반적으로 존재하지 않는 핵산 서열이 바이러스 게놈 내에 삽입되는 경우이다. 재조합 핵산 서열의 예는 핵산(예를 들어, 유전자)이 유전자가 바이러스 게놈 내에서 일반적으로 연관되어 있는 5', 3' 및/또는 인트론 영역을 갖거나 갖지 않고 벡터로 클로닝된 억제성(inhibitory) RNA를 암호화하는 경우이다. "재조합"이라는 용어가 폴리뉴클레오티드와 같은 서열 뿐만 아니라 바이러스 벡터와 같은 벡터와 관련하여 본원에서 항상 사용되는 것은 아니지만, 핵산 서열, 폴리뉴클레오티드, 전이유전자(transgene) 등을 포함하는 "재조합" 형태는 이러한 어떠한 누락에도 불구하고 명시적으로 포함된다.

[0037] 재조합 바이러스 "벡터"는 분자적 방법을 사용하여 바이러스로부터 야생형 게놈의 일부를 제거하고 핵산 서열과 같은 비-네이티브(non-native) 핵산으로 대체함으로써 바이러스의 야생형 게놈으로부터 유래된다. 전형적으로, 예를 들어, AAV의 경우, AAV 게놈의 하나 또는 둘 다의 역위 말단 반복체(ITR) 서열이 재조합 AAV 벡터에 유지된다. "재조합" 바이러스 벡터(예를 들어, rAAV)는 바이러스(예를 들어, AAV) 게놈과 구별되며, 이는 바이러스 게놈의 일부는 전사촉진인자(transactivator)를 암호화하는 핵산 또는 억제성 RNA를 암호화하는 핵산 또는 치료 단백질을 암호화하는 핵산과 같은 바이러스 게놈 핵산에 대한 비-네이티브 서열로 대체되기 때문이다. 따라서 이러한 비-네이티브 핵산 서열의 혼입은 바이러스 벡터를 "재조합" 벡터로 정의하며, AAV의 경우 "rAAV 벡터"로 지칭될 수 있다.

[0038] 특정 실시양태에서, AAV(예를 들어, rAAV)는 2개의 ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, AAV(예를 들어, rAAV)는 한 쌍의 ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, AAV(예를 들어, rAAV)는 기능 또는 활성을 갖는 폴리펩티드를 적어도 암호화하는 핵산 서열의 측면에 있는(즉, 각각의 5' 및 3' 말단에 있는) 한 쌍의 ITR을 포함한다.

[0039] AAV 벡터(예를 들어, rAAV 벡터)는 패키징될 수 있으며 *생체외*, *시험관내* 또는 *생체내* 세포의 후속 감염(형질도입)을 위한 "AAV 입자"로서 본원에서 지칭된다. 재조합 AAV 벡터가 AAV 입자로 캡슐화되거나 패키징되는 경우, 입자는 "rAAV 입자"라고도 할 수 있다. 특정 실시양태에서, AAV 입자는 rAAV 입자이다. rAAV 입자는 종종 rAAV 벡터 또는 이의 일부를 포함한다. rAAV 입자는 하나 이상의 rAAV 입자(예를 들어, 여러 개의 AAV 입자)일 수 있다. rAAV 입자는 전형적으로 rAAV 벡터 게놈을 캡슐화하거나 패키징하는 단백질(예를 들어, 캡시드 단백질)을

포함한다. rAAV 벡터에 대한 언급은 또한 rAAV 입자를 언급하기 위해 사용될 수 있음을 주지한다.

[0040] 임의의 적합한 AAV 입자(예를 들어, rAAV 입자)가 본원의 방법 또는 용도를 위해 사용될 수 있다. rAAV 입자, 및/또는 그 안에 포함된 게놈은 AAV의 임의의 적합한 혈청형 또는 균주로부터 유래될 수 있다. rAAV 입자 및/또는 그 안에 포함된 게놈은 AAV의 둘 이상의 혈청형 또는 균주로부터 유래될 수 있다. 따라서, rAAV는 AAV의 임의의 혈청형 또는 균주의 단백질 및/또는 핵산, 또는 이의 일부를 포함할 수 있으며, 여기서 AAV 입자는 포유류 세포의 감염 및/또는 형질도입에 적합하다. AAV 혈청형의 비제한적인 예는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 및 AAV-2i8을 포함한다.

[0041] 특정 실시양태에서, 여러 개의 rAAV 입자는 동일한 균주 또는 혈청형(또는 하위그룹 또는 변이체)의 입자 또는 이로부터 유래된 입자를 포함한다. 특정 실시양태에서, 여러 개의 rAAV 입자는 둘 이상의 상이한 rAAV 입자(예를 들어, 상이한 혈청형 및/또는 균주)의 혼합물을 포함한다.

[0042] 본원에서 사용되는 용어 "혈청형(serotype)"은 다른 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되는 캡시드를 갖는 AAV를 지칭하기 위해 사용되는 특징이다. 혈청학적 특징은 다른 AAV와 비교하여 한 AAV에 대한 항체 간의 교차-반응성(cross-reactivity) 부족에 기초하여 결정된다. 이러한 교차-반응성 차이는 통상적으로 캡시드 단백질 서열/항원 결정 인자의 차이(예를 들어, AAV 혈청형의 VP1, VP2 및/또는 VP3 서열 차이)로 인한 것이다. 캡시드 변이체를 포함한 AAV 변이체가 참조 AAV 또는 기타 AAV 혈청형과 혈청학적으로 구별되지 않을 수도 있다는 가능성에도 불구하고, 이들은 참조 또는 다른 AAV 혈청형과 비교하여 적어도 하나의 뉴클레오티드 또는 아미노산 잔기가 상이하다.

[0043] 특정 실시양태에서, 제1 혈청형 게놈에 기초한 rAAV 벡터는 벡터를 패키징하는 캡시드 단백질 중 하나 이상의 혈청형에 상응한다. 예를 들어, AAV 벡터 게놈을 포함하는 하나 이상의 AAV 핵산(예를 들어, ITRs)의 혈청형은 rAAV 입자를 포함하는 캡시드의 혈청형에 상응한다.

[0044] 특정 실시양태에서, rAAV 벡터 게놈은 벡터를 패키징하는 AAV 캡시드 단백질 중 하나 이상의 혈청형과 구별되는 AAV(예를 들어, AAV2) 혈청형 게놈에 기초할 수 있다. 예를 들어, rAAV 벡터 게놈은 AAV2 유래 핵산(예를 들어, ITRs)을 포함할 수 있는 반면, 3개의 캡시드 단백질 중 적어도 하나 이상은 상이한 혈청형, 예를 들어, AAV1, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 혈청형 또는 이들의 변이체로부터 유래된다.

[0045] 특정 실시양태에서, 참조 혈청형과 관련된 rAAV 입자 또는 이의 벡터 게놈은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 입자의 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 하위서열과 적어도 60% 이상(예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등) 동일한 서열을 포함하거나 이들로 구성된 폴리뉴클레오티드, 폴리펩티드 또는 이의 하위서열을 갖는다. 특정 실시양태에서, 참조 혈청형과 관련된 rAAV 입자 또는 이의 벡터 게놈은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, Rh10, Rh74 또는 AAV-2i8 혈청형의 캡시드 또는 ITR 서열과 적어도 60% 이상(예를 들어, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등) 동일한 서열을 포함하거나 이들로 구성된 캡시드 또는 ITR 서열을 갖는다.

[0046] 특정 실시양태에서, 본원의 방법은 rAAV1, rAAV2, rAAV3, rAAV4, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9, rAAV10, rAAV11, rAAV12, rRh10, rRh74 또는 rAAV-2i8 입자의 사용, 투여 또는 전달을 포함한다.

[0047] 특정 실시양태에서, 본원의 방법은 rAAV2 입자의 사용, 투여 또는 전달을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는 AAV2 캡시드를 포함한다. 특정 실시양태에서 rAAV2 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 상응하는 캡시드 단백질과 적어도 60%, 65%, 70%, 75% 이상 동일한, 예를 들어 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 하나 이상의 캡시드 단백질(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3)을 포함한다. 특정 실시양태에서 rAAV2 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 상응하는 캡시드 단백질과 적어도 75% 이상 동일한, 예를 들어 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 변이체이다. 일부 측면에서, AAV2 변이체의 하나 이상의 캡시드 단백질은 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 캡시드 단백질(들)과 비교하여 1, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0048] 특정 실시양태에서, rAAV9 입자는 AAV9 캡시드를 포함한다. 특정 실시양태에서 rAAV9 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV9 입자의 상응하는 캡시드 단백질과 적어도 60%, 65%, 70%, 75% 이상 동일한, 예를 들어, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 하나 이상의 캡시드 단백질(예를 들어, VP1, VP2 및/또는 VP3)을 포함한다. 특정 실시양태에서 rAAV9 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV9 입자의 상응하는 캡시드 단백질과 적어도 75% 이상 동일한, 예를 들어, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 VP1, VP2 및 VP3 캡시드 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV9 입자는 네이티브 또는 야생형 AAV9 입자의 변이체이다. 일부 측면에서, AAV9 변이체의 하나 이상의 캡시드 단백질은 네이티브 또는 야생형 AAV9 입자의 캡시드 단백질(들)과 비교하여, 2, 3, 4, 5, 5-10, 10-15, 15-20개 또는 그 이상의 아미노산 치환을 갖는다.

[0049] 특정 실시양태에서, rAAV 입자는, 이들이 하나 이상의 원하는 ITR 기능(예를 들어, DNA 복제; AAV DNA를 숙주 세포 게놈에 통합; 및/또는, 원하는 경우, 패키징을 허용하는 헤어핀 형성 능력)을 유지하는 한, 네이티브 또는 야생형 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-rh74, AAV-rh10 또는 AAV-2i8의 상응하는 ITR과 적어도 75% 이상 동일한, 예를 들어, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 한 개 또는 두 개의 ITR(예를 들어, 한 쌍의 ITR)을 포함한다.

[0050] 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는, 이들이 하나 이상의 원하는 ITR 기능(예를 들어, DNA 복제; AAV DNA를 숙주 세포 게놈에 통합; 및/또는, 원하는 경우, 패키징을 허용하는 헤어핀 형성 능력)을 유지하는 한, 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 상응하는 ITR과 적어도 75% 이상 동일한, 예를 들어, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 한 개 또는 두 개의 ITR(예를 들어, 한 쌍의 ITR)을 포함한다.

[0051] 특정 실시양태에서, rAAV9 입자는, 이들이 하나 이상의 원하는 ITR 기능(예를 들어, DNA 복제; AAV DNA를 숙주 세포 게놈에 통합; 및/또는, 원하는 경우, 패키징을 허용하는 헤어핀 형성 능력)을 유지하는 한, 네이티브 또는 야생형 AAV2 입자의 상응하는 ITR과 적어도 75% 이상 동일한, 예를 들어, 80%, 85%, 85%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.1%, 99.2%, 99.3%, 99.4%, 99.5% 등, 최대 100% 동일한 한 개 또는 두 개의 ITR(예를 들어, 한 쌍의 ITR)을 포함한다.

[0052] rAAV 입자는 임의의 적절한 수의 "GAGC" 반복을 갖는 ITR을 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서 AAV2 입자의 ITR은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10개 이상의 "GAGC" 반복을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는 3개의 "GAGC" 반복을 포함하는 ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는 4개 미만의 "GAGC" 반복을 갖는 ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자는 4개 이상의 "GAGC" 반복을 갖는 ITR을 포함한다. 특정 실시양태에서, rAAV2 입자의 ITR은 Rep 결합 부위를 포함하며, 여기서 처음 두 개의 "GAGC" 반복에서 네 번째 뉴클레오티드는 T가 아니라 C이다.

[0053] rAAV 입자로 패키징/캡슐화하기 위해 rAAV 벡터에 혼입될 수 있는 DNA의 예시적인 적절한 길이는 약 5킬로베이스(kb) 이하일 수 있다. 특정 실시양태에서, DNA의 길이는 약 5kb 미만, 약 4.5kb 미만, 약 4kb 미만, 약 3.5kb 미만, 약 3kb 미만, 또는 약 2.5kb 미만이다.

[0054] RNAi 또는 폴리펩티드의 발현을 지시하는 핵산 서열을 포함하는 rAAV 벡터는 당업계에 공지된 적절한 재조합 기법을 사용하여 생성될 수 있다(예를 들어, 참조; Sambrook *et al.*, 1989). 재조합 AAV 벡터는 전형적으로 형질도입 가능한 AAV 입자로 패키징되고 AAV 바이러스 패키징 시스템을 사용하여 증식된다. 형질도입 가능한 AAV 입자는 포유류 세포에 결합하여 진입할 수 있으며, 이어서 핵산 화물(예를 들어, 이종 유전자(heterologous gene))을 세포의 핵으로 전달할 수 있다. 따라서, 형질도입 가능한 온전한 rAAV 입자는 포유류 세포를 형질도입하도록 구성된다. 포유류 세포를 형질도입하도록 구성된 rAAV 입자는 종종 복제가 가능하지 않으며, 자가 복제를 위해 추가적인 단백질 기구(protein machinery)가 필요하다. 따라서, 포유류 세포를 형질도입하도록 구성된 rAAV 입자는 포유류 세포에 결합하여 진입하고 핵산을 세포에 전달하도록 조작되며, 여기서 전달을 위한 핵산은 종종 rAAV 게놈 내의 AAV ITR 쌍 사이에 위치한다.

[0055] 형질도입 가능한 AAV 입자를 생산하기 위한 적합한 숙주 세포는 이종성 rAAV 벡터의 수용체로서 사용될 수 있거나 사용되었던 미생물, 효모 세포, 곤충 세포, 및 포유류 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 안정한 인간 세포주인 HEK293(예를 들어, 수탁 번호 ATCC CRL1573 하에 American Type Culture Collection을 통해 쉽게 이용 가능함)으로부터의 세포가 사용될 수 있다. 특정 실시양태에서, 아데노바이러스 타입-5 DNA 단편으로 형질

전환되고 아데노바이러스 E1a 및 E1b 유전자를 발현하는 변형된 인간 배아 신장 세포주(예를 들어, HEK293)가 재조합 AAV 입자를 생성하는데 사용된다. 변형된 HEK293 세포주는 쉽게 형질감염되며, rAAV 입자를 생산할 수 있는 특히 편리한 플랫폼을 제공한다. 포유류 세포를 형질도입할 수 있는 높은 역가(titer) AAV 입자를 생성하는 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, AAV 입자는 Wright, 2008 및 Wright, 2009에 제시된 바와 같이 만들어질 수 있다.

[0056] 특정 실시양태에서, AAV 헬퍼 기능은 AAV 발현 벡터의 형질감염 전에 또는 동시에 숙주 세포를 AAV 헬퍼 작제물로 형질감염시킴으로써 숙주 세포에 도입된다. 따라서, AAV 헬퍼 작제물은 생산적인 AAV 형질도입에 필요한 누락된 AAV 기능을 보완하기 위해 AAV rep 및/또는 cap 유전자의 적어도 일시적인 발현을 제공하는데 때때로 사용된다. AAV 헬퍼 작제물은 종종 AAV ITR이 부족하며 자체적으로 복제하거나 패키징할 수 없다. 이러한 작제물은 플라스미드, 파지(phage), 트랜스포존(transposon), 코스미드(cosmid), 바이러스 또는 비리온의 형태일 수 있다. Rep 및 Cap 발현 산물을 모두 암호화하는 일반적으로 사용되는 플라스미드 pAAV/Ad 및 pIM29+45와 같은 다수의 AAV 헬퍼 작제물이 기재되었다. Rep 및/또는 Cap 발현 산물을 암호화하는 다수의 다른 벡터가 알려져 있다.

[0057] "발현 벡터"는 숙주 세포에서 발현에 필요한 필요 조절 영역을 갖는 유전자 또는 핵산 서열을 포함하는 특수 벡터이다. 발현 벡터는 적어도 세포 내 증식을 위한 복제 기점 및 임의로 추가 요소, 예를 들어 이종 핵산 서열, 발현 제어 요소(예를 들어, 프로모터, 인핸서), 인트론, ITR(들) 및 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다.

[0058] **II. 치료제**

[0059] 일부 실시양태에서, 바이러스 유전자 전달 방법은 포유류 세포 또는 표적 조직에 핵산을 도입하는 데 사용될 수 있다. 이러한 방법은 억제성 RNA, 비-코딩 RNA 및/또는 치료 단백질을 암호화하는 핵산을 배양물 또는 숙주 유기체 중의 세포에 투여하는 데 사용될 수 있다.

[0060] **A. 억제성 RNA**

[0061] "RNA 간섭(RNAi)"은 siRNA에 의해 개시되는 서열-특이적(sequence-specific) 전사후(post-transcriptional) 유전자 침묵 과정이다. RNAi 동안, siRNA는 유전자 발현의 서열-특이적 억제와 함께 표적 mRNA의 분해를 유도한다.

[0062] "억제성 RNA", "RNAi", "작은 간섭 RNA" 또는 "짧은 간섭 RNA" 또는 "siRNA" 분자, "짧은 헤어핀 RNA" 또는 "shRNA" 분자 또는 "miRNA"는 관심 핵산 서열을 표적으로 하는 뉴클레오티드의 RNA 이중체이다. 본원에서 사용되는 용어 "siRNA"는 shRNA 및 miRNA의 서브세트를 포함하는 일반적인 용어이다. "RNA 이중체"는 RNA 분자의 두 영역 사이의 상보적 쌍에 의해 형성된 구조를 지칭한다. siRNA는 siRNA의 이중 부분의 뉴클레오티드 서열이 표적 유전자의 뉴클레오티드 서열과 상보적이라는 점에서 유전자에 "표적화"된다. 특정 실시양태에서, siRNA는 헌팅틴(huntingtin)을 암호화하는 서열에 표적화된다. 일부 실시양태에서, siRNA의 이중체의 길이는 30개 염기쌍 미만이다. 일부 실시양태에서, 이중체는 29, 28, 27, 26, 25, 24, 23, 22, 21, 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개 염기쌍 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 이중체의 길이는 19 내지 25개 염기쌍 길이이다. 특정 실시양태에서, 이중체의 길이는 19 또는 21개 염기쌍 길이이다. siRNA의 RNA 이중체 부분은 헤어핀 구조의 일부일 수 있다. 이중체 부분 외에도, 헤어핀 구조는 이중체를 형성하는 두 서열 사이에 위치하는 루프 부분을 포함할 수 있다. 루프는 길이가 다양할 수 있다. 일부 실시양태에서 루프는 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 또는 25개 뉴클레오티드 길이이다. 특정 실시양태에서, 루프는 18개 뉴클레오티드 길이이다. 헤어핀 구조는 또한 3' 및/또는 5' 돌출부(overhang) 부분을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 돌출부는 0, 1, 2, 3, 4 또는 5개 뉴클레오티드 길이의 3' 및/또는 5' 돌출부이다.

[0063] shRNA는 5' 측면 영역(flanking region), siRNA 영역 세그먼트, 루프 영역, 3' siRNA 영역, 및 3' 측면 영역을 포함하도록 설계된 줄기-루프(stem-loop) 구조로 구성된다. 대부분의 RNAi 발현 전략은 강력한 polIII-기반 프로모터에 의해 유도되는 짧은-헤어핀 RNA(shRNA)를 활용하였다. 많은 shRNA가 시험관내 뿐만 아니라 생체내에서 표적 서열의 효과적인 녹 다운(knock down)을 입증하였지만, 표적 유전자의 효과적인 녹 다운을 입증한 일부 shRNA는 또한 생체내 독성을 갖는 것으로 밝혀졌다.

[0064] miRNA는 전구체 줄기 루프 전사체(precursor stem loop transcript)로부터 처리되는 작은 세포 RNA(~22 nt)이다. 알려진 miRNA 줄기 루프는 관심 유전자에 특이적인 RNAi 서열을 포함하도록 변형될 수 있다. miRNA는 내인성으로(endogenously) 발현되기 때문에 miRNA 분자가 shRNA 분자보다 바람직할 수 있다. 따라서, miRNA 분자는 dsRNA-반응성 인터페론 경로를 유도할 가능성이 낮고, shRNA보다 더 효율적으로 처리되며, 80% 더 효과적으로

침묵하는 것으로 나타났다.

[0065] 최근에 발견된 대안적 접근법은 인공 miRNA(pri-miRNA 스캐폴드 셔틀링 siRNA 서열)를 RNAi 벡터로 사용하는 것이다. 인공 miRNA는 보다 자연적으로 내인성 RNAi 기질과 유사하며 (예를 들어, RNAi의 조직-특이적 발현을 허용하는) Pol-II 전사 및 (예를 들어, 다중 siRNA 서열 전달을 허용하는) 다시스트론성 전략(polycistronic strategy)에 더 적합하다. 참고로 포함된 미국 특허 제10,093,927호를 참조한다.

[0066] "shRNA"의 전사 단위는 짝을 이루지 않은 뉴클레오티드의 루프에 의해 연결된 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 서열로 구성된다. shRNA는 엑스포틴(Exportin)-5에 의해 핵 바깥으로 이동되고, 일단 세포질에 도달하면 Dicer에 의해 처리되어 기능적 siRNA를 생성한다. "miRNA" 줄기-루프는 더 큰 일차 전사체(pri-miRNA)의 일부로서 전형적으로 발현되는 짝을 이루지 않은 뉴클레오티드의 루프에 의해 연결된 센스 및 안티센스 서열로 구성되며, 이는 Drosha-DGCR8 복합체에 의해 절단되어 pre-miRNA로 알려진 중간체를 생성하고, 후속적으로 엑스포틴-5에 의해 핵 바깥으로 이동되고, 일단 세포질에 도달하면 Dicer에 의해 처리되어 기능성 siRNA를 생성한다. 본원에서 상호교환 가능하게 사용되는 "인공 miRNA" 또는 "인공 miRNA 셔틀 벡터"는 효과적인 Drosha 처리에 필요한 줄기 루프 내의 구조적 요소를 유지하면서 표적 유전자에 대한 siRNA 서열로 대체된 Drosha 및 Dicer 처리를 통해 절제된 이중체 줄기 루프의 영역(적어도 약 9-20개 뉴클레오티드)을 갖는 일차 miRNA 전사체를 지칭한다. "인공적"이라는 용어는 측면 서열(flanking sequence)(~35개 뉴클레오티드 업스트림(upstream) 및 ~40개 뉴클레오티드 다운스트림)이 siRNA의 다중 클로닝 부위 내의 제한 효소 부위에서 발생한다는 사실로부터 기인한다. 본원에서 사용되는 용어 "miRNA"는 자연적으로 발생하는 miRNA 서열 뿐만 아니라 인위적으로 생성된 miRNA 셔틀 벡터를 모두 포함한다.

[0067] siRNA는 핵산 서열에 의해 암호화될 수 있고, 핵산 서열은 또한 프로모터를 포함할 수 있다. 핵산 서열은 또한 폴리아데닐화 신호를 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 폴리아데닐화 신호는 합성 최소 폴리아데닐화 신호 또는 6개의 Ts의 서열이다.

[0068] RNAi를 설계하는 데 있어서 siRNA의 특성, 침묵 효과의 지속 가능성, 전달 시스템의 선택과 같은 몇 가지 요소를 고려해야 한다. RNAi 효과를 생성하기 위해, 유기체에 도입된 siRNA는 전형적으로 엑손 서열을 포함할 것이다. 또한, RNAi 과정은 상동성(homology)에 의존하므로, 유전자 특이성을 최대화하면서 상동성이지만 유전자-특이성(gene-specific)이 아닌 서열 간의 교차-간섭(cross-interference) 가능성을 최소화하도록 서열을 주의해서 선택해야 한다. 바람직하게는 siRNA는 siRNA의 서열과 억제하고자 하는 유전자 사이에 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 또는 심지어 100% 이상의 동일성(identity)을 나타낸다. 표적 유전자와 약 80% 미만으로 동일한 서열은 실질적으로 덜 효과적이다. 따라서, siRNA와 억제하고자 하는 유전자 사이의 상동성이 클수록, 관련이 없는 유전자의 발현이 영향을 받을 가능성은 덜해질 것이다.

[0069] 또한, siRNA의 크기는 중요한 고려 사항이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 적어도 약 19-25개 뉴클레오티드를 포함하고 유전자 발현을 조절할 수 있는 siRNA 분자에 관한 것이다. 본 발명의 맥락에서, siRNA는 바람직하게는 500, 200, 100, 50, 또는 25개 뉴클레오티드 미만의 길이이다. 보다 바람직하게는, siRNA는 약 19개 뉴클레오티드 내지 약 25개 뉴클레오티드 길이이다.

[0070] siRNA 표적은 일반적으로 폴리펩티드를 암호화하는 영역, 또는 복제, 전사, 또는 번역 또는 폴리펩티드의 발현에 중요한 다른 과정을 조절하는 폴리뉴클레오티드 영역, 또는 폴리펩티드를 암호화하는 영역과 발현을 조절하는 이에 작동가능하게 연결된 영역을 모두 포함하는 폴리뉴클레오티드를 의미한다. 세포에서 발현되는 모든 유전자는 표적화될 수 있다. 바람직하게는, 표적 유전자는 질환에 중요하거나 연구 대상으로서 특별히 관심있는 세포 활성의 진행에 관여하거나 연관된 유전자이다.

[0071] **B. 비-코딩 RNA**

[0072] cDNA 클로닝 프로젝트(cDNA cloning project) 및 게놈 타일링 어레이(genomic tiling array)에 의해 입증되는 바와 같이, 인간 게놈의 90% 이상이 전사를 거치지만 단백질을 암호화(coding)하지는 않는다. 이러한 전사 산물을 비-단백질 코딩 RNA(ncRNA)라고 한다. 리보솜 RNA, 전달 RNA, 경쟁 내인성 RNA(ceRNA), 소핵 RNA(snRNA) 및 소핵소체 RNA(snoRNA)와 같은 다양한 ncRNA 전사체는 세포 기능에 필수적이다. 유사하게, micro-RNA(miRNA), 내인성 짧은 간섭 RNA(siRNA), PIWI-상호작용 RNA(piRNA) 및 소핵소체 RNA(snoRNA)와 같은 다수의 짧은 ncRNA도 진핵 세포에서 중요한 조절 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 연구에서는 세포 유형-특이적 발현을 나타내고 세포이하(subcellular) 구획으로 국소화되는 긴 ncRNA(lncRNA) 전사체의 그룹을 입증하였다. lncRNA는 또한 세포 발달 및 분화(differentiation) 동안 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 이는 진화 과정 동

안 선택되었다는 견해를 뒷받침한다.

[0073] LncRNA는 여러 상이한 기능을 하는 것으로 보인다. 다수의 경우에, 이들은 단백질의 활성 또는 국소화를 조절하는 역할을 하거나 여러 개의 구조를 위한 조직적 프레임워크(framework)로서 역할을 하는 것으로 보인다. 다른 경우에, lncRNA는 다수의 작은 RNA를 생성하기 위해 처리되거나 다른 RNA가 처리되는 방법을 조절할 수 있다. 공개 연구 컨소시엄 GenCode(버전 #27)에 의해 생성된 데이터의 최신판은 인간 게놈에서 16,000개 미만의 lncRNA를 카탈로그화하여 거의 28,000개의 전사체를 생성하며; 다른 데이터베이스가 포함되는 경우, 40,000개 이상의 lncRNA가 알려져 있다.

[0074] 흥미롭게도, lncRNA는 특정 게놈 유전자좌에서 특정 표적 단백질의 발현에 영향을 미치고, 단백질 결합 파트너의 활성을 조절하고, 염색질-변형 복합체를 이들의 작용 부위로 지시할 수 있으며, 수많은 5'-캡핑된 작은 RNA를 생성하기 위해 전사후 처리될 수 있다. 후성유전학적 경로(epigenetic pathway)가 또한 lncRNA의 차등 발현을 조절할 수 있다.

[0075] 또한 비정상적으로 발현된 lncRNA가 정상적인 생리학적 과정 뿐만 아니라 여러 질환 상태에서도 중요한 역할을 한다는 증거가 증가하고 있다. lncRNA는 허혈증(ischaemia), 심장병, 알츠하이머병(Alzheimer's disease), 건선(psoriasis), 및 척수소뇌성 운동실조증 8형(spinocerebellar ataxia type 8)을 포함한 다양한 질환에서 잘못 조절된다. 이러한 잘못된 조절(misregulation)은 또한 유방암, 대장암, 전립선암, 간세포 암종 및 백혈병과 같은 다양한 유형의 암에서 나타났다. 여러 lncRNA, 예를 들어 gadd74 및 lncRNA-RoR5는 사이클린, 사이클린-의존성 키나제(CDK), CDK 억제제 및 p53과 같은 세포 주기 조절인자를 조절하여 세포 주기 진행에 추가적인 유연성과 견고성을 제공한다. 또한, 일부 lncRNA는 동원체(kinetochore) 형성에 필수적이며 따라서 인간 및 파리에서 유사분열(mitosis) 동안 염색체 분리에 중요한 중심절 위성 RNA(centromeric satellite RNA)와 같은 유사분열 과정에 관련된다. 또 다른 핵 lncRNA인 MA-linc1은 세포 증식 조절인자인 인접 유전자 Pura의 발현을 억제하기 위해 cis로 기능함으로써 M 상 출구(M phase exit)를 조절한다.

[0076] lncRNA는 일반적으로 확장된 개방 판독 프레임(ORF)이 없는 200개 이상의 뉴클레오티드(예를 들어, 약 200 내지 약 1200 nt, 약 2500 nt 또는 그 이상)의 전사체로서 정의되는 그룹이다. 용어 "비-코딩 RNA"(ncRNA)는 lncRNA 뿐만 아니라, 예를 들어, 약 200 nt 미만, 예를 들어 약 30 내지 200 nt의 더 짧은 전사체를 포함한다.

[0077] 따라서, 일부 실시양태에서, 예를 들어 관심있는 특정 뇌 구조로의 ncRNA의 전달은 비정상적인 RNA 발현 수준을 교정하거나 질환-유발(disease-causing) lncRNA의 수준을 조절한다. 따라서, 일부 실시양태에서, 본 발명은 rAAV를 제공하며, 여기서 바이러스 게놈은 치료용 비-코딩 RNA(ncRNA)를 암호화하도록 조작된다. 일부 실시양태에서, ncRNA는 길이가 약 200개 뉴클레오티드(nt) 또는 그 이상인 긴 비-코딩 RNA(lncRNA)이다. 일부 실시양태에서, 치료제는 약 25 nt 또는 약 30 nt 내지 약 200 nt 길이의 ncRNA이다. 일부 실시양태에서, lncRNA는 약 200 nt 내지 약 1,200 nt 길이이다. 일부 실시양태에서, lncRNA는 약 200 nt 내지 약 1,100, 약 1,000, 약 900, 약 800, 약 700, 약 600, 약 500, 약 400, 또는 약 300 nt 길이이다.

[0078] **C. CRISPR 시스템**

[0079] 유전자 편집은 살아있는 세포 내에서 표적 유전자의 변형을 허용하는 기술이다. 최근에는, CRISPR의 박테리아 면역계를 활용하여 주문형(on demand) 유전자 편집을 수행하는 것이 과학자들이 게놈 편집에 접근하는 방식에 혁명을 일으켰다. RNA 유도 DNA 엔도뉴클레아제인 CRISPR 시스템의 Cas9 단백질은 이의 가이드 RNA 서열을 변경함으로써 비교적 쉽게 새로운 부위를 표적화하도록 조작될 수 있다. 이러한 발견은 서열 특이적 유전자 편집을 기능적으로 효과적으로 만들었다.

[0080] 일반적으로, "CRISPR 시스템"은 Cas 유전자를 암호화하는 서열, tracr(trans-activating CRISPR) 서열(예를 들어, tracrRNA 또는 활성 부분 tracrRNA), tracr-mate 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "직접 반복" 및 tracrRNA-처리된 부분 직접 반복을 포함), 가이드 서열(내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서 "스페이서"라고도 함) 및/또는 CRISPR 유전자좌로부터의 기타 서열 및 전사체를 포함하여 CRISPR-관련("Cas") 유전자의 발현 또는 활성을 지시하는 데 관여하는 전사체 및 기타 요소를 총칭한다.

[0081] CRISPR/Cas 뉴클레아제 또는 CRISPR/Cas 뉴클레아제 시스템은 DNA에 서열-특이적으로 결합하는 비-코딩 RNA 분자(가이드) RNA 및 뉴클레아제 기능성(예를 들어, 2개의 뉴클레아제 도메인)을 가진 Cas 단백질(예를 들어, Cas9)을 포함한다. CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소는 유형 I, 유형 II 또는 유형 III CRISPR 시스템으로부터 유래되고, 예를 들어 *스트렙토코커스 피오게네스(Streptococcus pyogenes)*와 같은 내인성 CRISPR 시스템을 포함하는 특정 유기체로부터 유래될 수 있다.

[0082] CRISPR 시스템은 표적 부위에서의 이중 가닥 절단(double stranded break, DSB)에 이은 본원에 논의된 바와 같은 붕괴(disruption)를 유도할 수 있다. 다른 실시양태에서, "닉카제(nickase)"로 간주되는 Cas9 변이체가 표적 부위에서 단일 가닥을 닉킹(nicking)하는데 사용된다. 쌍을 이룬 닉카제를 사용하여, 예를 들어, 특이성을 개선할 수 있으며, 각각은 틈이 동시에 도입될 때 5' 돌출부가 도입되도록 한 쌍의 상이한 gRNA 표적화 서열에 의해 지시된다. 다른 실시양태에서, 촉매 비활성 Cas9는 전사 억제제(예를 들어, KRAB) 또는 활성제와 같은 이종 이펙터 도메인(heterologous effector domain)에 융합되어 유전자 발현에 영향을 미친다. 대안적으로, 촉매 비활성 Cas9을 가진 CRISPR 시스템은 리보솜 결합 단백질에 융합된 전사 억제제 또는 활성제를 추가로 포함한다.

[0083] 일부 측면에서, Cas 뉴클레아제 및 gRNA(표적 서열에 특이적인 crRNA 및 고정된 tracrRNA의 융합체 포함)가 세포 내로 도입된다. 일반적으로 gRNA의 5' 말단에 있는 표적 부위는 상보적 염기 쌍형성(base pairing)을 사용하여 Cas 뉴클레아제를 표적 부위, 예를 들어, 유전자에 표적화한다. 표적 부위는 전형적으로 NGG, 또는 NAG와 같은 프로토스페이서 인접 모티프(protospacer adjacent motif, PAM) 서열의 바로 5'의 위치에 기초하여 선택될 수 있다. 이와 관련하여, gRNA는 가이드 RNA의 처음 20, 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11 또는 10개의 뉴클레오티드를 표적 DNA 서열에 상응하도록 변형시킴으로써 목적하는 서열에 표적화된다. 일반적으로, CRISPR 시스템은 표적 서열의 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하는 요소에 의해 특징지어진다. 전형적으로, "표적 서열"은 일반적으로 가이드 서열이 상보성을 갖도록 설계된 서열을 지칭하며, 여기서 표적 서열과 가이드 서열 사이의 혼성화(hybridization)가 CRISPR 복합체의 형성을 촉진한다. 혼성화를 유발하고 CRISPR 복합체의 형성을 촉진하기에 충분한 상보성이 있는 한, 충분한 상보성이 반드시 필요한 것은 아니다.

[0084] 표적 서열은 DNA 또는 RNA 폴리뉴클레오티드와 같은 임의의 폴리뉴클레오티드를 포함할 수 있다. 표적 서열은 세포의 핵 또는 세포질에, 예를 들어 세포의 소기관 내에 위치할 수 있다. 일반적으로, 표적 서열을 포함하는 표적화된 유전자좌로의 재조합에 사용될 수 있는 서열 또는 주형(template)은 "편집 주형" 또는 "편집 폴리뉴클레오티드" 또는 "편집 서열"로 지칭된다. 일부 측면에서, 외인성 주형 폴리뉴클레오티드는 편집 주형으로 지칭될 수 있다. 일부 측면에서, 재조합은 상동 재조합이다.

[0085] 전형적으로, 내인성 CRISPR 시스템의 맥락에서, (표적 서열에 혼성화되고 하나 이상의 Cas 단백질과 복합체화된 가이드 서열을 포함하는) CRISPR 복합체의 형성은 표적 서열에서 또는 근처에서(예를 들어, 표적 서열로부터 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20, 50개 또는 그 이상의 염기쌍 내에서) 하나 또는 두 가닥의 절단을 초래한다. 야생형 tracr 서열의 전부 또는 일부(예를 들어, 야생형 tracr 서열의 약 20, 26, 32, 45, 48, 54, 63, 67, 85개 또는 그 이상의 뉴클레오티드)를 포함하거나 이들로 구성될 수 있는 tracr 서열은 또한 예를 들면 가이드 서열에 작동 가능하게 연결된 tracr mate 서열의 전부 또는 일부에 tracr 서열의 적어도 일부를 따라 혼성화에 의해 CRISPR 복합체의 일부를 형성할 수 있다. tracr 서열은 tracr mate 서열이 CRISPR 복합체의 형성에 참여하고 혼성화하기에 충분한 상보성, 예를 들어, 최적으로 정렬될 때, tracr mate 서열의 길이를 따라 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%의 서열 상보성을 갖는다.

[0086] CRISPR 시스템의 하나 이상의 요소의 발현을 유도하는 하나 이상의 벡터가 세포에 도입되어 CRISPR 시스템의 요소의 발현이 하나 이상의 표적 부위에서 CRISPR 복합체의 형성을 지시하도록 할 수 있다. 성분은 또한 단백질 및/또는 RNA로서 세포에 전달될 수 있다. 예를 들어, Cas 효소, tracr-mate 서열에 연결된 가이드 서열, 및 tracr 서열은 각각 별도의 벡터에서 별도의 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. Cas 효소는 본원에 개시된 바와 같이, 키메라 표적 유전자(chimeric target gene) 미니유전자(minigene)로서 또는 키메라 미니유전자 전사촉진인자에 대한 표적 유전자로서, 조절된 대체 스플라이싱 이벤트의 제어하에 있는 표적 유전자일 수 있다. gRNA는 구성적 프로모터(constitutive promoter)의 제어하에 있을 수 있다.

[0087] 대안적으로, 동일하거나 상이한 조절 요소로부터 발현된 두 개 이상의 요소가 단일 벡터로 결합될 수 있으며, 하나 이상의 추가 벡터가 제1 벡터에 포함되지 않은 CRISPR 시스템의 임의의 성분을 제공할 수 있다. 벡터는 하나 이상의 삽입 부위, 예를 들어 제한 엔도뉴클레아제 인식 서열("클로닝 부위"라고도 함)을 포함할 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 삽입 부위는 하나 이상의 벡터의 하나 이상의 서열 요소의 업스트림 및/또는 다운스트림에 위치한다. 여러 상이한 가이드 서열이 사용되는 경우, 단일 발현 작제물을 사용하여 세포 내의 여러 상이한 상응하는 표적 서열에 대한 CRISPR 활성을 표적화할 수 있다.

[0088] 벡터는 Cas 단백질과 같은 CRISPR 효소를 암호화하는 효소-코딩 서열에 작동 가능하게 연결된 조절 요소를 포함할 수 있다. Cas 단백질의 비-제한적인 예는 Cas1, Cas1B, Cas2, Cas3, Cas4, Cas5, Cas6, Cas7, Cas8, Cas9 (또한 Csn1 및 Csx12로도 알려짐), Cas10, Csy1, Csy2, Csy3, Cse1, Cse2, Csc1, Csc2, Csa5, Csn2, Csm2, Csm3, Csm4, Csm5, Csm6, Cmr1, Cmr3, Cmr4, Cmr5, Cmr6, Csb1, Csb2, Csb3, Csx17, Csx14, Csx10, Csx16,

CsaX, Csx3, Csx1, Csx15, Csf1, Csf2, Csf3, Csf4, 이의 상동체, 또는 이의 변형된 버전을 포함한다. 이러한 효소는 알려져 있으며; 예를 들어, *스트렙토코커스 피오게네스(S. pyogenes)* Cas9 단백질의 아미노산 서열은 SwissProt 데이터베이스에서 수탁 번호 Q99ZW2로 찾을 수 있다.

[0089] CRISPR 효소는 (예를 들어, *스트렙토코커스 피오게네스(S. pyogenes)* 또는 *스트렙토코커스 뉴모니아(S. pneumonia)*로부터의) Cas9일 수 있다. CRISPR 효소는 표적 서열의 위치에서, 예를 들어 표적 서열 내에서 및/또는 표적 서열의 보체 내에서 하나 또는 두 가닥 모두의 절단을 지시할 수 있다. 벡터는 돌연변이된 CRISPR 효소가 표적 서열을 포함하는 표적 폴리뉴클레오티드의 하나 또는 두 가닥 모두를 절단하는 능력이 부족하도록 상응하는 야생형 효소에 대해 돌연변이된 CRISPR 효소를 암호화할 수 있다. 예를 들어, 스트렙토코커스 피오게네스(S. pyogenes)로부터의 Cas9의 RuvC I 촉매 도메인에서 아스파르테이트-알라닌 치환(D10A)은 Cas9를 두 가닥 모두를 절단하는 뉴클레아제에서 닉카제(단일 가닥 절단)로 전환시킨다. 일부 실시양태에서, Cas9 닉카제는 가이드 서열(들), 예를 들어, DNA 표적의 센스 및 안티센스 가닥을 각각 표적화하는 두 개의 가이드 서열과 조합하여 사용될 수 있다. 이러한 조합은 두 가닥을 모두 닉킹하여 NHEJ 또는 HDR을 유도하는 데 사용될 수 있다.

[0090] 일부 실시양태에서, CRISPR 효소를 암호화하는 효소 코딩 서열은 진핵 세포와 같은 특정 세포에서의 발현을 위해 코돈 최적화된다. 진핵 세포는 인간, 마우스, 랫트, 토끼, 개 또는 비인간 영장류를 포함하지만 이에 제한되지 않는 포유류와 같은 특정 유기체의, 세포이거나 이로부터 유래된 세포일 수 있다. 일반적으로, 코돈 최적화는 네이티브 서열의 적어도 하나의 코돈을 네이티브 아미노산 서열을 유지하면서 해당 숙주 세포의 유전자에서 더 자주 또는 가장 빈번하게 사용되는 코돈으로 대체함으로써 관심 숙주 세포에서의 발현을 향상시키기 위해 핵산 서열을 변형하는 과정을 지칭한다. 다양한 종이 특정 아미노산의 특정 코돈에 대해 특정 편향을 나타낸다. 코돈 편향(codon bias, 유기체 간 코돈 사용의 차이)은 종종 메신저 RNA(mRNA)의 번역 효율성과 상관관계가 있으며, 이는 무엇보다도 번역되는 코돈의 특성 및 특정 전달 RNA(tRNA) 분자의 이용 가능성에 의존하는 것으로 믿어진다. 세포에서 선택된 tRNA의 우세는 일반적으로 펩티드 합성에 가장 자주 사용되는 코돈의 반영이다. 따라서, 유전자는 코돈 최적화에 기반하여 주어진 유기체에서 최적의 유전자 발현을 위해 맞춤화될 수 있다.

[0091] 일반적으로, 가이드 서열은 표적 폴리뉴클레오티드 서열이 표적 서열과 혼성화하고 표적 서열에 대한 CRISPR 복합체의 서열-특이적 결합을 지시하기에 충분한 상보성을 갖는 임의의 폴리뉴클레오티드 서열이다. 일부 실시양태에서, 적절한 정렬 알고리즘을 사용하여 최적으로 정렬될 때, 가이드 서열과 이의 상응하는 표적 서열 간의 상보성의 정도는 대략 50%, 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97.5%, 99%, 또는 그 이상이다.

[0092] 최적의 정렬은 서열을 정렬하기 위한 임의의 적절한 알고리즘을 사용하여 결정될 수 있으며, 이의 비-제한적인 예는 Smith-Waterman 알고리즘, Needleman-Wunsch 알고리즘, Burrows-Wheeler Transform에 기반한 알고리즘(예를 들어, Burrows Wheeler Aligner), Clustal W, Clustal X, BLAT, Novoalign(Novocraft Technologies, ELAND (Illumina, San Diego, Calif.), SOAP(soap.genomics.org.cn에서 이용 가능) 및 Maq(maq.sourceforge.net에서 이용 가능)를 포함한다.

[0093] CRISPR 효소는 하나 이상의 이종 단백질 도메인을 포함하는 융합 단백질의 일부일 수 있다. CRISPR 효소 융합 단백질은 임의의 추가의 단백질 서열, 및 임의로 임의의 두 도메인 사이의 링커 서열을 포함할 수 있다. CRISPR 효소에 융합될 수 있는 단백질 도메인의 예는, 제한 없이, 에피토프 태그(epitope tag), 리포터 유전자 서열, 및 다음 활성 중 하나 이상을 갖는 단백질 도메인을 포함한다: 메틸라제 활성, 데메틸라제 활성, 전사 활성화 활성, 전사 억제 활성, 전사 방출 인자 활성, 히스톤 변형 활성, RNA 절단 활성 및 핵산 결합 활성. 에피토프 태그의 비-제한적인 예는 히스티딘(histidine, His) 태그, V5 태그, FLAG 태그, 인플루엔자 헤마글루티닌(HA) 태그, Myc 태그, VSV-G 태그, 및 티오레독신(Trx) 태그를 포함한다. 리포터 유전자의 예는 글루타티온-5-트랜스퍼라제(GST), 호스래디쉬 퍼옥시다제(HRP), 클로람페니콜 아세틸트랜스퍼라제(CAT), 베타 갈락토시다제, 베타-글루쿠로니다제, 루시페라제, 녹색 형광 단백질(GFP), HcRed, DsRed, 시안 형광 단백질(CFP), 황색 형광 단백질(YFP), 및 청색 형광 단백질(BFP)을 포함한 자가형광 단백질을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. CRISPR 효소는 말토스 결합 단백질(MBP), S-태그, Lex A DNA 결합 도메인(DBD) 융합, GAL4A DNA 결합 도메인 융합 및 단순 헤르페스 바이러스(HSV) BP16 단백질 융합을 포함하지만 이에 제한되지 않는, DNA 분자에 결합하거나 다른 세포 분자와 결합하는 단백질 또는 단백질 단편을 암호화하는 유전자 서열에 융합될 수 있다. CRISPR 효소를 포함하는 융합 단백질의 일부를 형성할 수 있는 추가 도메인은 본원에 참고로 포함된 미국 제20110059502호에 기재되어 있다.

[0094] **D. 치료 단백질**

[0095] 일부 실시양태는 재조합 단백질 및 폴리펩티드의 발현에 관한 것이다. 이러한 단백질은 신경보호

(neuroprotective) 단백질, 예를 들어 항-세포사멸 단백질, 항-산화 효소(예를 들어, 슈퍼옥사이드 디스뮤타제(SOD) 계열에 속하는 것들), 신경영양/신경보호 인자, 또는 항염증성 단백질일 수 있다. 치료 단백질은 Birc1a (NAIP), Birc2 (c-IAP1/HIAP-2), Birc3 (cIAP-2/HIAP-1), Birc4 (XIAP), Birc5 (survivin), Birc6 (apollon), Birc7 (livin), Birc8 (TsIAP); Bcl-2 계열의 구성원: Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w, Mcl-1, Bcl-2L10, BFL-1; Jun-상호작용 단백질(JIP)로 알려진 c-Jun N-말단 키나제(JNK)의 내인성 억제제, JIP-1, JIP-2, JIP-3, JIP-4; SOD1, SOD2; 카탈라제; 퍼옥시레독신-1, 퍼옥시레독신-2, 글루타티온 퍼옥시다제 1 (Gpx1), Gpx2, Gpx3, 또는 Gpx4; NGF, BDNF, CNTF, GDNF, 성장/분화 인자-15 (GDF-15), 에리트로포이에틴 또는 혈관 내피 성장 인자 (VEGF); 인터루킨-10 (IL-10); 글루타티온 S-트랜스퍼라제, 아넥신-1 (ANXA1), NF-κB의 억제제 (IκB); USH1, USH1G (a.k.a. SANS), CIB2 (칼슘 및 인테그린 결합 단백질 2), ATOH-1, ACTG1, ATP2B2, CDH23 (cadherin 23), CLDN14, CLRN1, COCH, COL11A2, DFNA5, DFNB31, DFNB59, ESPN, EYA4, GJB2, GJB3, GJB6, KCNQ4, LHFPL5, MT-RNR1, MT-TS1, MYO1A, MYO6, MYO7A (myosin 7a), MYO15A, OTOF, PCDH15 (프로토카데닌 15), PDZD7, POU3F4, SLC26A4, STRC, TECTA, TMC1, TMC2, TMIE, TMPRSS3, TRIOBP, USH1C, VLGR1, WFS1, ACTG1, ADCY1, ATOFf1, ATP6V1B1, BDNF, BDP1, BSND, DATSPER2, CABP2, CD 164, CDC 14 A, CDH23, CEACAM16, CHD7, CCDC50, CIB2, CLDN14, CLIC5, CLPP, CLRN1, COCH, COL2A1, COL4A3, COL4A4, COL4A5, COL9A 1, COL9A2, COL1 1 A1, COL1 1 A2, CRYM, DCDC2, DFNA5, DFNB31, DFNB59, DIAPH1, EDN3, EDNRB, ELMOD3, EMOD3, EPS8, EPS8L2, ESPN, ESRRB, EYA1, EYA4, FAM65B, FOXI1, GIPC3, GJB2, GJB3, GJB6, GPR98, GRHL2, GPSM2, GRXCR1 , GRXCR2, HARS2, HGF, HOMER2, HSD17B4, ILDR1, KARS, KCNE1, KCNJ10, KCNQ1, KCNQ4, KITLG, LARS2, LHFPL5, LOXHD1, LRTOMT, MARVELD2, MCM2, MET, MIR183, MIRN96, MITF, MSRB3, MT-RNR1, MT-TS 1, MYH14, Y1 9, MYO15A, MYOIA, MYO3A, MYO6, MYO7A, NARS2, NDP, NF2, NT3, OSBPL2, OTOA, OTOF, OTOG, OTOGL, P2RX2, PAX3, PCDH15, PDZD7, PJVK, PNPT1, POLR1D, POLR1C, POU3F4, POU4F3, PRPS 1, PTPRQ, RDX, S1PR2, SANS, SEMA3E, SERPINB6, SLC17A8, SLC22A4, SLC26A4, SLC26A5, SIX1, SIX5, S MAC/DIABLO, SNAI2, SOX 10, STRC, SYNE4, TBC 1 D24, TCOF1, TECTA, TIMM8A, TJP2, TNC, TMC1, TMC2, TMIE, TMEM 132E, TMPRSS3, TRPN, TRIOBP, TSPEAR, USH1 C, USH1 G, USH2A, USH2D, VLGR1, WFS1, WHRN, 또는 XIAP일 수 있다.

[0096] 본 출원이 "변형된 단백질" 또는 "변형된 폴리펩티드"의 기능 또는 활성을 언급할 때, 당업계의 통상의 숙련가는 이것이 예를 들어, 변형되지 않은 단백질 또는 폴리펩티드에 비해 추가적인 이점을 갖는 단백질 또는 폴리펩티드를 포함한다는 것을 이해할 것이다. "변형된 단백질"에 관한 실시양태는 "변형된 폴리펩티드"에 대해 구현될 수 있고, 그 반대의 경우도 마찬가지인 것으로 구체적으로 고려된다.

[0097] 재조합 단백질은 아미노산의 결실 및/또는 치환을 가질 수 있고; 따라서, 결실을 갖는 단백질, 치환을 갖는 단백질, 및 결실과 치환을 갖는 단백질이 변형된 단백질이다. 일부 실시양태에서, 이들 단백질은 예를 들어 융합 단백질 또는 링커를 갖는 단백질과 같이 삽입 또는 첨가된 아미노산을 추가로 포함할 수 있다. "변형된 결실 단백질"은 네이티브 단백질의 하나 이상의 잔기가 없지만, 네이티브 단백질의 특이성 및/또는 활성을 가질 수 있다. "변형된 결실 단백질"은 또한 감소된 면역원성 또는 항원성을 가질 수 있다. 변형된 결실 단백질의 예는 적어도 하나의 항원성 영역, 즉 변형된 단백질이 투여되는 유기체와 같은 특정 유기체에서 항원성인 것으로 결정된 단백질의 영역으로부터 결실된 아미노산 잔기를 갖는 것이다.

[0098] 치환 또는 대체 변이체는 전형적으로 단백질 내의 하나 이상의 부위에서 하나의 아미노산을 다른 아미노산으로 교체하는 것을 포함하고, 폴리펩티드의 하나 이상의 특성, 특히 이의 이펙터 기능 및/또는 생체이용률을 조절하도록 설계될 수 있다. 치환은 보존적일 수 있거나 그렇지 않을 수 있으며, 즉, 하나의 아미노산이 유사한 형태 및 전하를 가진 것으로 대체된다. 보존적 치환은 당업계에 잘 알려져 있으며, 예를 들어, 알라닌에서 세린으로; 아르기닌에서 리신으로; 아스파라긴에서 글루타민 또는 히스티딘으로; 아스파르테이트에서 글루타메이트로; 시스테인에서 세린으로; 글루타민에서 아스파라긴으로; 글루타메이트에서 아스파르테이트로; 글리신에서 프롤린으로; 히스티딘에서 아스파라긴 또는 글루타민으로; 이소류신에서 류신 또는 발린으로; 류신에서 발린 또는 이소류신으로; 리신에서 아르기닌으로; 메티오닌에서 류신 또는 이소류신으로; 페닐알라닌에서 티로신, 류신, 또는 메티오닌으로; 세린에서 트레오닌으로; 트레오닌에서 세린으로; 트립토판에서 티로신으로; 티로신에서 트립토판 또는 페닐알라닌으로; 및 발린에서 이소류신 또는 류신으로의 변화를 포함한다.

[0099] 결실 또는 치환 외에도, 변형된 단백질은 잔기의 삽입을 가질 수 있으며, 이는 전형적으로 폴리펩티드 내에 적어도 하나의 잔기의 첨가를 수반한다. 이것은 표적화 펩티드 또는 폴리펩티드 또는 단순히 단일 잔기의 삽입을 포함할 수 있다. 융합 단백질이라고 불리는 말단 첨가(terminal addition)는 아래에서 논의된다.

[0100] "생물학적으로 기능적으로 동등한"이라는 용어는 당업계에서 잘 이해되며 본원에서 추가로 상세하게 정의된다.

따라서, 단백질의 생물학적 활성이 유지되는 한, 대조 폴리펩티드의 아미노산과 동일하거나 기능적으로 동등한 아미노산의 약 70% 내지 약 80%, 또는 약 81% 내지 약 90%, 또는 심지어 약 91% 내지 약 99%를 갖는 서열이 포함된다. 재조합 단백질은 특정 측면에서 이의 네이티브 단백질과 생물학적으로 기능적으로 동등할 수 있다.

[0101] 아미노산 및 핵산 서열은 추가의 잔기, 예를 들어 추가의 N- 또는 C-말단 아미노산 또는 5' 또는 3' 서열을 포함할 수 있지만, 서열이 단백질 발현이 관련되는 생물학적 단백질 활성의 유지를 포함하여 상기 제시된 기준을 충족하는 한, 여전히 본원에 개시된 서열 중 하나에 기재된 바와 같은 것으로 또한 이해될 것이다. 말단 서열의 첨가는 특히, 예를 들어, 코딩 영역의 5' 또는 3' 부분의 측면에 있는 다양한 비-코딩 서열을 포함하거나, 유전자 내에서 발생하는 것으로 알려진 다양한 내부 서열, 즉, 인트론을 포함할 수 있는 핵산 서열에 적용된다.

[0102] 본원에 사용된 바와 같이, 단백질 또는 펩티드는 일반적으로 유전자로부터 번역된 전체-길이 서열까지 약 200개 이상의 아미노산의 단백질; 약 100개 이상의 아미노산의 폴리펩티드; 및/또는 약 3 내지 약 100개 아미노산의 펩티드를 지칭하지만, 이에 제한되지 않는다. 편의상, 용어 "단백질", "폴리펩티드" 및 "펩티드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다.

[0103] 본원에서 사용되는 바와 같이, "아미노산 잔기"는 임의의 자연 발생 아미노산, 임의의 아미노산 유도체, 또는 당업계에 알려진 임의의 아미노산 모방체(mimic)를 지칭한다. 특정 실시양태에서, 단백질 또는 펩티드의 잔기는 아미노산 잔기의 서열을 차단하는 임의의 비-아미노산 없이 순차적이다. 다른 실시양태에서, 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티(moiety)를 포함할 수 있다. 특정 실시양태에서, 단백질 또는 펩티드의 잔기의 서열은 하나 이상의 비-아미노산 모이어티에 의해 차단될 수 있다.

[0104] 따라서, 용어 "단백질 또는 펩티드"는 자연 발생 단백질에서 발견되는 20개의 공통 아미노산 중 적어도 하나, 또는 적어도 하나의 변형된 또는 특이한 아미노산을 포함하는 아미노산 서열을 포함한다.

[0105] 본 발명의 특정 실시양태는 융합 단백질에 관한 것이다. 이들 분자는 N- 또는 C-말단에서 이종 도메인에 연결된 치료 단백질을 가질 수 있다. 예를 들어, 융합은 또한 이종 숙주에서 단백질의 재조합 발현을 허용하기 위해 다른 종으로부터의 리더 서열을 사용할 수 있다. 또 다른 유용한 융합은 단백질 친화성 태그(affinity tag), 예를 들어 혈청 알부민 친화성 태그 또는 6개의 히스티딘 잔기, 또는 융합 단백질의 정제를 용이하게 하기 위해 바람직하게는 절단 가능한 항체 에피토프와 같은 면역학적으로 활성인 도메인의 첨가를 포함한다. 비-제한적 친화성 태그는 폴리히스티딘, 키틴 결합 단백질(CBP), 말토스 결합 단백질(MBP) 및 글루타티온-S-트랜스퍼라제(GST)를 포함한다.

[0106] 융합 단백질을 생성하는 방법은 당업계의 숙련들에게 잘 알려져 있다. 이러한 단백질은, 예를 들어, 완전한 융합 단백질의 *de novo* 합성에 의해, 또는 이종 도메인을 암호화하는 DNA 서열의 부착에 이은 온전한 융합 단백질의 발현에 의해 생산될 수 있다.

[0107] 부모 단백질의 기능적 활성을 회복하는 융합 단백질의 생산은 탠덤(tandem)으로 연결된 폴리펩티드 사이에 스플라이싱된 펩티드 링커를 암호화하는 가교 DNA 세그먼트와 유전자를 연결함으로써 촉진될 수 있다. 링커는 생성된 융합 단백질의 적절한 접힘을 허용하기에 충분한 길이일 것이다.

[0108] 전이유전자의 발현은 전이유전자의 자연적 프로모터(즉, 형질전환 코딩 서열을 갖는 자연적으로 발견되는 프로모터)에 의해 지시될 수 있거나, 또는 전이유전자의 발현은 이종 프로모터(예를 들어, CMV 프로모터, Espin 프로모터, PCDH15 프로모터, PTPRQ 프로모터 및 TMHS(LHFPL5) 프로모터)에 의해 지시될 수 있다. 예를 들어, 본원에 기재된 전이유전자 중 어느 것은 이의 천연 프로모터와 함께 사용될 수 있다. 대안적으로, 본원에 기재된 전이유전자 중 어느 것은 이종 프로모터와 함께 사용될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, 이종 프로모터는 해당 서열의 발현을 자연적으로 지시하지 않는(즉, 자연에서 해당 서열과 함께 발견되지 않는) 프로모터를 지칭한다. 본원에 표시된 전이유전자 중 어느 것의 발현을 지시하는데 사용될 수 있는 대표적인 이종 프로모터는, 예를 들어, CMV 프로모터, CBA 프로모터, CASI 프로모터, P 프로모터, 및 EF-1 프로모터, 알파9 니코틴 수용체 프로모터, 프레스틴 프로모터, Gfil 프로모터, 및 Vglut3 프로모터를 포함한다. 또한, 상기 언급된 전이유전자 중 하나의 발현을 자연적으로 지시하는 프로모터(예를 들어, KCNQ4 프로모터, Myo7a 프로모터, Myo6 프로모터 또는 Atohl 프로모터)가 전이유전자의 발현을 지시하기 위한 이종 프로모터로서 사용될 수 있다. 다른 실시양태에서, 프로모터는 Espin 프로모터, PCDH15 프로모터, PTPRQ 프로모터 및 TMHS(LHFPL5) 프로모터이다.

[0109] **III. 치료 및 투여의 방법**

[0110] 바이러스 벡터는 일부 측면에서 환자에게 직접 투여될 수 있거나(*생체내*), 또는 이들은 *시험관내* 또는 *생체외에서* 세포를 처리하는데 사용된 다음 환자에게 투여될 수 있다. 용어 "벡터"는 작은 캐리어 핵산 분자, 플라스미

드, 바이러스(예를 들어, AAV 벡터, 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터), 또는 핵산의 삽입 또는 혼입에 의해 조작될 수 있는 다른 비히클(vehicle)을 지칭한다. 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터는 핵산 서열을 세포 내로 도입/전달하는데 사용될 수 있어, 그 안의 핵산 서열이 전사되고, 단백질을 암호화하는 경우, 후속적으로 세포에 의해 번역된다.

[0111] 임의의 적합한 세포 또는 포유류는 본원에 기재된 방법 또는 용도에 의해 투여 또는 처리될 수 있다. 전형적으로, 본원에 기재된 방법을 필요로 하는 포유류는 질환 상태와 연관된 이상하거나 비정상적인 단백질을 가지고 있거나 발현하는 것으로 의심된다. 대안적으로, 포유류 수용자는 유전자 대체 요법을 받아들일 수 있는 상태를 가질 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "유전자 대체 요법"은 치료제를 암호화하는 외인성 유전 물질을 수용자에게 투여하고, 투여된 유전 물질을 원 위치에서(in situ) 후속적으로 발현시키는 것을 지칭한다. 따라서, "유전자 대체 요법을 받아들일 수 있는 상태"라는 문구는 유전 질환(즉, 하나 이상의 유전자 결함에 기인하는 질환 상태), 후천적 병리학(즉, 선천적 결함에 기인하지 않는 병리학적 상태), 암 및 예방(prophylactic) 과정(즉, 질환 또는 원치 않는 의학적 상태의 예방)과 같은 상태를 포함한다. 따라서, 본원에서 사용되는 용어 "치료제"는 포유류 수용자에게 유익한 효과를 갖는 임의의 제제 또는 물질을 지칭한다. 따라서, "치료제"는 핵산 또는 단백질 성분을 갖는 치료적 및 예방적 분자 모두를 포함한다.

[0112] 포유류의 비-제한적인 예는 인간, 비인간 영장류(예를 들어, 유인원, 긴팔 원숭이, 침팬지, 오랑우탄, 원숭이, 짧은 꼬리 원숭이 등), 가축(예를 들어, 개 및 고양이), 농장 동물(예를 들어, 말, 소, 염소, 양, 돼지) 및 실험 동물(예를 들어, 마우스, 랫트, 토끼, 기니피그)를 포함한다. 특정 실시양태에서, 포유류는 인간이다. 특정 실시양태에서 포유류는 비-설치류 포유류(예를 들어, 인간, 돼지, 염소, 양, 말, 개 등)이다. 특정 실시양태에서, 비-설치류 포유류는 인간이다. 포유류는 모든 연령 또는 모든 발달 단계(예를 들어, 성인, 청소년, 소아, 유아 또는 자궁 내 포유류)에 있을 수 있다. 포유류는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 특정 실시양태에서, 포유류는 동물 질환 모델, 예를 들어, 질환 상태와 연관된 이상하거나 비정상적인 단백질을 가지고 있거나 발현하는 동물 모델, 또는 질환 상태를 유발하는 단백질의 불충분한 발현을 갖는 동물 모델일 수 있다.

[0113] 본원에 기재된 방법 또는 조성물에 의해 치료되는 포유류(대상체)는 성인(18세 이상) 및 소아(18세 미만)를 포함한다. 성인은 노인을 포함한다. 대표적인 성인은 50세 이상이다. 소아의 연령은 1-2세 또는 2-4세, 4-6세, 6-18세, 8-10세, 10-12세, 12-15세, 및 15-18세이다. 소아는 또한 유아도 포함한다. 영아는 전형적으로 생후 1-12개월이다.

[0114] 특정 실시양태에서, 방법은 본원에 제시된 바와 같이 포유류에게 여러 개의 바이러스 입자를 투여하는 것을 포함하며, 여기서 신경-퇴행성 질환과 같은 질환 상태의 하나 이상의 증상의 중증도, 빈도, 진행 또는 발병 시간은 감소하거나, 줄거나, 예방되거나, 억제되거나 또는 지연된다. 특정 실시양태에서, 방법은 신경퇴행성 질환과 같은 질환 상태의 부작용을 치료하기 위해 포유류에게 여러 개의 바이러스 입자를 투여하는 것을 포함한다. 특정 실시양태에서, 방법은 여러 개의 바이러스 입자를 포유류에게 투여하여 신경퇴행성 질환과 같은 질환 상태의 악화, 또는 진행, 또는 역전 및 부작용을 안정화, 지연 또는 예방하는 것을 포함한다.

[0115] 특정 실시양태에서, 방법은 여러 개의 바이러스 입자를 포유류의 중추 신경계 또는 본원에 기재된 바와 같은 이의 일부에 투여하는 것을 포함하고, 신경행성 질환과 같은 질환 상태의 하나 이상의 증상의 중증도, 빈도, 진행 또는 발병 시간은 적어도 약 5 내지 약 10일, 약 10일 내지 약 25일, 약 25일 내지 약 50일, 또는 약 50일 내지 약 100일까지 감소하거나, 줄거나, 예방되거나, 억제되거나 또는 지연된다.

[0116] 특정 실시양태에서, 증상 또는 부작용은 초기 단계, 중간 또는 후기 단계 증상; 행동, 성격 또는 언어 증상; 삼킴, 움직임, 발작, 떨림 또는 안절부절 못하는 증상; 운동 실조증; 및/또는 기억력, 조직화 능력과 같은 인지 증상을 포함한다.

[0117] **IV. 약제학적 조성물**

[0118] 본원에서 사용되는 용어 "약제학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는"은 하나 이상의 투여 경로, *생체 내* 전달 또는 접촉에 적합한 생물학적으로 허용되는 조성물, 제형, 액체 또는 고체, 또는 이들의 혼합물을 의미한다. "약제학적으로 허용되는" 또는 "생리학적으로 허용되는" 조성물은 생물학적으로 또는 달리 바람직하지 않지 않은 물질이며, 예를 들어, 물질은 실질적으로 바람직하지 않은 생물학적 효과를 일으키지 않고 대상체에게 투여될 수 있다. 이러한 조성물, "약제학적으로 허용되는" 및 "생리학적으로 허용되는" 제형 및 조성물은 멸균될 수 있다. 이러한 약제학적 제형 및 조성물은, 예를 들어 바이러스 입자를 대상체에게 투여하는 데 사용될 수 있다.

[0119] 이러한 제형 및 조성물은 약제학적 투여 또는 *생체내* 접촉 또는 전달과 상용성인(compatible), 용매(수성 또는 비수성), 용액(수성 또는 비수성), 에멀젼(예를 들어, 수중유 또는 유중수), 현탁액, 시럽, 엘릭서, 분산 및 현탁 매질, 코팅, 등장성 및 흡수 촉진제 또는 지연제를 포함한다. 수성 및 비수성 용매, 용액 및 현탁액은 현탁제 및 증점제를 포함할 수 있다. 보조 활성 화합물(예를 들어, 방부제, 항균제, 항바이러스제 및 항진균제)가 또한 제형 및 조성물에 혼입될 수 있다.

[0120] 약제학적 조성물은 전형적으로 약제학적으로 허용되는 부형제(excipient)를 함유한다. 이러한 부형제는 조성물을 제공받는 개체에게 해로운 항체의 생성을 자체로 유도하지 않으며 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 임의의 약제학적 제제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 부형제는 소르비톨(sorbitol), Tween80 및 액체, 예를 들어 물, 염수, 글리세롤 및 에탄올을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 무기산 염, 예를 들어 하이드로클로라이드, 하이드로브로마이드, 포스페이트, 설페이트(sulfate) 등; 및 유기산의 염, 예를 들어 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등이 그 안에 포함될 수 있다. 또한, 계면활성제, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 이러한 비히클에 존재할 수 있다.

[0121] 약제학적 조성물은 본원에 제시된 바와 같이 또는 당업계의 숙련가에게 공지된 바와 같이, 투여 또는 전달의 특정 경로와 상용성이도록 제형화될 수 있다. 따라서, 약제학적 조성물은 다양한 경로에 의한 투여 또는 전달에 적합한 담체, 희석제, 또는 부형제를 포함한다.

[0122] 바이러스 입자의 주사 또는 주입에 적합한 약제학적 형태는 임의로 리포솜에 캡슐화된, 멸균 주사 가능한 또는 주입 가능한 용액 또는 분산액의 즉석 제조에 적합한 멸균 수성 용액 또는 분산액을 포함할 수 있다. 모든 경우에, 궁극적인 형태는 멸균 유체여야 하며 제조, 사용 및 보관 조건하에서 안정해야 한다. 액체 담체 또는 비히클은, 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 식물유, 무독성 글리세릴 에스테르, 및 이들의 적합한 혼합물을 포함하는 용매 또는 액체 분산 매질일 수 있다. 적절한 유동성은, 예를 들어, 리포솜의 형성에 의해, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지에 의해, 또는 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 등장화제(isotonic agent), 예를 들어, 당, 완충액 또는 염(예를 들어, 염화나트륨)이 포함될 수 있다. 주사 가능한 조성물의 장기간의 흡수는 흡수를 지연시키는 제제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에 사용함으로써 초래될 수 있다.

[0123] 바이러스 입자의 용액 또는 현탁액은 임의로 다음 성분 중 하나 이상을 포함할 수 있다: 멸균 희석제, 예를 들어 주사용수, 염수 용액, 예를 들어 인산염 완충 염수(phosphate buffered saline ,PBS), 인공 CSF, 계면활성제, 고정유, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 글리세린, 또는 다른 합성 용매; 항균제 및 항진균제, 예를 들어 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 아스코르브산 등; 항산화제, 예를 들어 아스코르브산 또는 중아황산나트륨; 킬레이트제, 예를 들어 에틸렌디아민테트라아세트산; 완충제, 예를 들어 아세테이트, 시트레이트 또는 포스페이트 및 장성(tonicity)의 조절을 위한 제제, 예를 들어 염화나트륨 또는 덱스트로스(dextrose).

[0124] 본 발명의 조성물, 방법 및 용도에 적합한 약제학적 제형, 조성물 및 전달 시스템은 당업계에 공지되어 있다(예를 들어, 참조; Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2003) 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA; The Merck Index (1996) 12th ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ; Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms (1993), Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa.; Ansel and Stoklosa, Pharmaceutical Calculations (2001) 11th ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD; and Poznansky *et al.*, Drug Delivery Systems (1980), R. L. Juliano, ed., Oxford, N.Y., pp. 253-315).

[0125] 바이러스 입자 및 이의 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 투여 단위 형태로 제형화될 수 있다. 본원에서 사용되는 바와 같은 투여 단위 형태는 치료하고자 하는 개체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하며; 각 단위는 필요한 약제학적 담체와 공동으로 원하는 치료 효과를 생성하기 위해 계산된 미리 결정된 양의 활성 화합물을 함유한다. 투여 단위 형태는 원하는 효과(들)를 생성하는 데 필요하다고 믿어지는 바이러스 입자의 수에 의존한다. 필요한 양은 단일 용량으로 제형화될 수 있거나, 또는 다중 투여 단위로 제형화될 수 있다. 용량은 적절한 바이러스 입자 농도로 조절될 수 있고, 임의로 항염증제(anti-inflammatory agent)와 조합되고, 사용을 위해 패키징될 수 있다.

[0126] 한 실시양태에서, 약제학적 조성물은 치료적 유효량, 즉 해당 질환 상태의 증상 또는 부작용을 감소시키거나 개

선하기에 충분한 양 또는 원하는 이익을 부여하기에 충분한 양을 제공할 충분한 유전 물질을 포함할 것이다.

[0127] 본원에서 사용되는 바와 같은 "단위 투여 형태(unit dosage form)"는 치료하고자 하는 대상체에 대한 단일 투여량으로서 적합한 물리적 이산 단위를 지칭하며; 각 단위는 임의로 약제학적 담체(부형제, 희석제, 비히클 또는 충전제)와 공동으로, 하나 이상의 용량으로 투여될 때, 원하는 효과(예를 들어, 예방적 또는 치료적 효과)를 생성하도록 계산된 미리 결정된 양을 함유한다. 단위 투여 형태는, 예를 들어, 앰플 및 바이알 내에 있을 수 있으며, 이들은 액체 조성물, 또는 동결-건조 또는 동결건조된 상태의 조성물을 포함할 수 있고; 예를 들어, 멸균 액체 담체는 *생체내* 투여 또는 전달 전에 첨가될 수 있다. 개별 단위 투여 형태는 다중 용량 키트 또는 용기에 포함될 수 있다. 따라서, 예를 들어, 바이러스 입자 및 이의 약제학적 조성물은 투여의 용이성 및 투여량의 균일성을 위해 단일 또는 다중 단위 투여 형태로 패키징될 수 있다.

[0128] 바이러스 입자를 함유하는 제형은 전형적으로 유효량을 함유하며, 유효량은 당업계의 숙련가에 의해 용이하게 결정된다. 바이러스 입자는 전형적으로 조성물의 약 1% 내지 약 95%(w/w)의 범위일 수 있거나, 적합한 경우 더 높을 수 있다. 투여되는 양은 치료를 위해 고려되는 포유류 또는 인간 대상체의 연령, 체중 및 신체 상태와 같은 요인에 따라 좌우된다. 유효 투여량은 용량 반응 곡선을 확립하는 일상적인 시험을 통해 당업계의 통상의 숙련가에 의해 확립될 수 있다.

[0129] **V. 정의**

[0130] 용어 "폴리뉴클레오티드", "핵산" 및 "전이유전자"는 데옥시리보핵산(DNA) 및 리보핵산(RNA) 및 이들의 중합체를 포함하는 모든 형태의 핵산, 올리고뉴클레오티드를 지칭하기 위해 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 폴리뉴클레오티드는 게놈 DNA, cDNA 및 안티센스 DNA, 스플라이싱된 또는 비스플라이싱된 mRNA, rRNA, tRNA 및 억제성 DNA 또는 RNA(RNAi, 예를 들어 작은 또는 짧은 헤어핀 (sh)RNA, 마이크로RNA(miRNA), 작은 또는 짧은 간섭 (si)RNA, 트랜스-스플라이싱 RNA 또는 안티센스 RNA)를 포함한다. 폴리뉴클레오티드는 자연 발생, 합성, 및 의도적으로 변형된 또는 변경된 폴리뉴클레오티드(예를 들어, 변이체 핵산)를 포함할 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 단일 가닥, 이중 가닥 또는 삼중, 선형 또는 원형일 수 있으며, 임의의 적절한 길이일 수 있다. 폴리뉴클레오티드를 논의하는 데 있어서, 특정 폴리뉴클레오티드의 서열 또는 구조는 서열을 5'에서 3' 방향으로 제공하는 관례에 따라 본원에 기재될 수 있다.

[0131] 폴리펩티드를 암호화하는 핵산은 종종 폴리펩티드를 암호화하는 개방 판독 프레임을 포함한다. 달리 지시되지 않는 한, 특정 핵산 서열은 또한 축퇴 코돈 치환(degenerate codon substitution)을 포함한다.

[0132] 핵산은 개방 판독 프레임에 작동 가능하게 연결된 하나 이상의 발현 제어 또는 조절 요소를 포함할 수 있으며, 여기서 하나 이상의 조절 요소는 포유류 세포에서 개방 판독 프레임에 의해 암호화된 폴리펩티드의 전사 및 번역을 지시하도록 구성된다. 발현 제어/조절 요소의 비제한적인 예는 전사 개시 서열(예를 들어, 프로모터, 인핸서, TATA 박스 등), 번역 개시 서열, mRNA 안정성 서열, 폴리 A 서열, 분비 서열 등을 포함한다. 발현 제어/조절 요소는 임의의 적합한 유기체의 게놈으로부터 수득될 수 있다.

[0133] "프로모터"는 RNA 중합효소 및 적절한 전사에 필요한 다른 인자에 대한 인식을 제공함으로써 코딩 서열의 발현을 지시 및/또는 제어하는, 통상적으로 코딩 서열의 업스트림(5')에 있는 뉴클레오티드 서열을 지칭한다. pol II 프로모터는 TATA-박스 및 임의로 전사 개시의 부위를 지정하는 역할을 하는 다른 서열로 구성된 짧은 DNA 서열인 최소 프로모터(minimal promoter)를 포함하며, 이에 발현 제어를 위해 조절 요소가 추가된다. 유형 1 pol III 프로모터는 전사 시작 부위의 다운스트림에 있는 3개의 시스-작용 서열 요소를 포함한다: a) 5' 서열 요소(A 블록); b) 중간 서열 요소(I 블록); c) 3' 서열 요소(C 블록). 유형 2 pol III 프로모터는 전사 시작 부위의 다운스트림에 있는 두 개의 필수 시스-작용 서열 요소를 포함한다: a) A 박스(5' 서열 요소); 및 b) B 박스(3' 서열 요소). 타입 3 pol III 프로모터는 종래의 TATA 박스, 근위 서열 요소 (proximal sequence element, PSE) 및 원위 서열 요소(distal sequence element, DSE)와 같은 전이 시작 부위의 업스트림에 있는 여러 시스-작용 프로모터 요소를 포함한다.

[0134] "인핸서"는 전사 활성을 자극할 수 있는 DNA 서열이며 발현의 수준 또는 조직 특이성을 향상시키는 프로모터의 선천적 요소 또는 이종 요소일 수 있다. 이는 어느 하나의 방향(5'->3' 또는 3'->5')으로 작동할 수 있으며, 프로모터의 업스트림 또는 다운스트림에 위치할 때에도 기능할 수 있다.

[0135] 프로모터 및/또는 인핸서는 이의 전부가 네이티브 유전자로부터 유래될 수 있거나, 자연에서 발견되는 상이한 요소들로부터 유래된 상이한 요소로 구성될 수 있거나, 심지어 합성 DNA 세그먼트로 구성될 수 있다. 프로모터 또는 인핸서는 자극, 생리적 또는 발달 조건에 반응하여 전사 개시의 효과를 조절/제어하는 단백질 인자의 결합

에 관여하는 DNA 서열을 포함할 수 있다.

[0136] 프로모터의 비제한적인 예는 SV40 초기 프로모터, 마우스 유방 종양 바이러스 LTR 프로모터; 아데노바이러스 주요 후기 프로모터(Ad MLP); 단순 헤르페스 바이러스(HSV) 프로모터, 시토메갈로바이러스(CMV) 프로모터, 예를 들어 CMV 즉시 조기 프로모터 영역(CMVIE), 라우스 육종 바이러스(RSV) 프로모터, pol II 프로모터, pol III 프로모터, 합성 프로모터, 하이브리드 프로모터 등을 포함한다. 또한, 비-바이러스 유전자로부터 유래된 서열, 예를 들어 뮤린 메탈로티오네인 유전자도 본원에서 사용될 것이다. 예시적인 구성적 프로모터는 특정 구성적 또는 "하우스키핑(housekeeping)" 기능을 암호화하는 다음의 유전자에 대한 프로모터를 포함한다: 하이포크산틴 포스포리보실 트랜스퍼라제(HPRT), 디하이드로폴레이트 리덕타제(DHFR), 아데노신 데아미나제, 포스포글리세롤 키나제(PGK), 피루베이트 키나제, 포스포글리세롤 뮤타제, 액틴 프로모터, U6, 및 당업계의 숙련가들에게 알려진 기타 구성적 프로모터. 또한, 많은 바이러스 프로모터가 진핵 세포에서 구성적으로 기능한다. 이들은 다른 많은 것들 중에서 다음을 포함한다: SV40의 초기 및 후기 프로모터; 몰로니 백혈병 바이러스 및 기타 레트로바이러스의 긴 말단 반복체(LTR); 및 단순 헤르페스 바이러스의 티미딘 키나제 프로모터. 따라서, 상기 언급된 구성적 프로모터 중 어느 것을 사용하여 이종성 유전자 삽입체의 전사를 제어할 수 있다.

[0137] "전이유전자"는 세포 또는 유기체에 의도되거나 도입된 핵산 서열/폴리뉴클레오티드를 편리하게 지칭하기 위해 본원에서 사용된다. 전이유전자는 억제성 RNA 또는 폴리펩티드 또는 단백질을 암호화하는 유전자와 같은 임의의 핵산을 포함하며, 일반적으로 자연 발생 AAV 게놈 서열에 대해 이종성이다.

[0138] 용어 "형질도입하다(transduce)"는 벡터(예를 들어, 바이러스 입자)에 의해 세포 또는 숙주 유기체에 핵산 서열을 도입하는 것을 지칭한다. 따라서 바이러스 입자에 의해 세포 내로 전이유전자를 도입하는 것을 세포의 "형질도입(transduction)"이라고 지칭할 수 있다. 전이유전자는 형질도입된 세포의 게놈 핵산에 통합될 수 있거나 통합되지 않을 수 있다. 도입된 전이유전자가 수용자 세포 또는 유기체의 핵산(게놈 DNA)에 통합되면, 이것은 그 세포 또는 유기체에서 안정적으로 유지될 수 있고, 더 나아가 수용자 세포 또는 유기체의 자손 세포 또는 유기체에 의해 전달되거나 유전될 수 있다. 마지막으로, 도입된 전이유전자는 수용자 세포 또는 숙주 유기체에서 염색체외에 또는 일시적으로만 존재할 수 있다. 따라서 "형질도입된 세포"는 형질도입에 의해 전이유전자가 도입된 세포이다. 따라서, "형질도입된" 세포는 전이유전자가 도입된 세포 또는 그 자손이다. 형질도입된 세포는 증식될 수 있고, 전이유전자는 전사될 수 있으며, 암호화된 억제성 RNA 또는 단백질을 발현할 수 있다. 유전자 요법 용도 및 방법의 경우, 형질도입된 세포는 포유류에 있을 수 있다.

[0139] 유도성 프로모터의 제어하에 있는 전이유전자는 유도제의 존재하에서만 또는 더 큰 정도로 발현된다(예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터의 제어하에서의 전사는 특정 금속 이온의 존재하에서 크게 증가한다). 유도성 프로모터는 이들의 유도 인자가 결합될 때 전사를 자극하는 반응 요소(responsive element, RE)를 포함한다. 예를 들어, 혈청 인자, 스테로이드 호르몬, 레티노산 및 사이클릭 AMP에 대한 RE가 있다. 유도성 반응을 수득하기 위해 특정 RE를 함유하는 프로모터를 선택할 수 있으며, 일부 경우에는, RE 자체가 상이한 프로모터에 부착될 수 있으며, 이에 따라 재조합 유전자에 유도성을 부여할 수 있다. 따라서, 적합한 프로모터(구성적 대 유도성; 강 대 약)를 선택함으로써, 유전자 변형 세포에서 폴리펩티드의 존재 및 발현 수준을 모두 제어할 수 있다. 폴리펩티드를 암호화하는 유전자가 유도성 프로모터의 제어하에 있는 경우, *원 위치에서의* 폴리펩티드의 전달은 유전자 변형 세포를 *원 위치에서* 폴리펩티드의 전사를 허용하는 조건에 노출시킴으로써, 예를 들어, 제제의 전사를 제어하는 유도성 프로모터의 특정 유도제의 복강내 주사에 의해 유도된다. 예를 들어, 메탈로티오네인 프로모터의 제어하에 있는 유전자에 의해 암호화된 폴리펩티드의 유전자 변형 세포에 의한 *원 위치에서의* 발현은 유전자 변형 세포를 적절한(즉, 유도성) 금속 이온을 함유하는 용액과 접촉시킴으로써 향상된다.

[0140] 핵산/전이유전자는 또 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. RNAi 또는 폴리펩티드를 암호화하는 핵산/전이유전자, 또는 폴리펩티드의 발현을 지시하는 핵산은 유도성 프로모터, 또는 암호화된 폴리펩티드의 전사를 제어하기 위한 조직-특이적 프로모터를 포함할 수 있다. 발현 제어 요소에 작동 가능하게 연결된 핵산은 또한 발현 카세트(expression cassette)로 지칭될 수 있다.

[0141] 특정 실시양태에서, 세포-유형-특이적 또는 유도성 프로모터, 인핸서 등이 본원에 기재된 방법 및 용도에 사용된다. 세포-유형-특이적 프로모터의 비제한적인 예는 TMC1, TMC2, Espin, PCDH15, PTPRQ, TMHS(LHFPL5), MYO1A로부터의 유전자로부터 단리된 것들을 포함한다. 유도성 프로모터의 비제한적인 예는 엑디손, 테트라사이클린, 저산소 및 IFN에 대한 DNA 반응 요소를 포함한다.

[0142] 특정 실시양태에서, 발현 제어 요소는 CMV 인핸서를 포함한다. 특정 실시양태에서, 발현 제어 요소는 베타 액틴 프로모터를 포함한다. 특정 실시양태에서, 발현 제어 요소는 치킨 베타 액틴 프로모터를 포함한다. 특정 실시양

태에서, 발현 제어 요소는 CMV 인핸서 및 치킨 베타 액틴 프로모터를 포함한다.

[0143] 본원에서 사용되는 용어 "변형하다(modify)" 또는 "변이체(variant)" 및 이의 문법적 변형은 핵산, 폴리펩티드 또는 이의 하위서열이 참조 서열로부터 벗어난 것을 의미한다. 따라서 변형된 및 변이체 서열은 참조 서열보다 실질적으로 동일하거나, 더 크거나 더 적은 발현, 활성 또는 기능을 가질 수 있지만, 적어도 참조 서열의 부분적인 활성 또는 기능을 유지할 수 있다. 특정 유형의 변이체는 돌연변이 단백질(mutant protein)이며, 이는 돌연변이, 예를 들어 미스센스(missense) 또는 넌센스(nonsense) 돌연변이를 가진 유전자에 의해 암호화되는 단백질을 지칭한다.

[0144] "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드" 변이체는 야생형에 비해 유전적으로 변경된 변형된 서열을 지칭한다. 서열은 암호화된 단백질 서열을 변경하지 않고 유전적으로 변형될 수 있다. 대안적으로, 서열은 변이체 단백질을 암호화하기 위해 유전적으로 변형될 수 있다. 핵산 또는 폴리뉴클레오티드 변이체는 또한 야생형 단백질 서열과 같은 참조 서열에 대해 적어도 부분적인 서열 동일성을 여전히 유지하는 단백질을 암호화하도록 코돈 변형되고 또한 변이체 단백질을 암호화하도록 코돈 변형된 조합 서열을 지칭할 수 있다. 예를 들어, 이러한 핵산 변이체의 일부 코돈은 이에 의해 암호화된 단백질의 아미노산을 변경하지 않고 변할 것이며, 핵산 변이체의 일부 코돈이 변하여 결국 이에 의해 암호화된 단백질의 아미노산을 변화시킬 것이다.

[0145] 용어 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호교환 가능하게 사용된다. 본원에 개시된 "핵산" 또는 "폴리뉴클레오티드" 또는 "전이유전자"에 의해 암호화된 "폴리펩티드"는, 폴리펩티드가 어느 정도의 기능 또는 활성을 유지하는 한, 자연적으로 발생하는 야생형 및 기능성 다형성 단백질, 이의 기능적 하위서열(단편), 및 이의 서열 변이체와 같이, 부분 또는 전체-길이 네이티브 서열을 포함한다. 따라서, 본 발명의 방법 및 용도에 있어서, 핵산 서열에 의해 암호화된 이러한 폴리펩티드는 결함이 있거나, 치료된 포유류에서 이의 활성, 기능 또는 발현이 불충분하거나, 부족하거나 부재하는 내인성 단백질과 동일할 필요는 없다.

[0146] 변형의 비제한적인 예는 하나 이상의 뉴클레오티드 또는 아미노산 치환(예를 들어, 약 1 내지 약 3, 약 3 내지 약 5, 약 5 내지 약 10, 약 10 내지 약 15, 약 15 내지 약 20, 약 20 내지 약 25, 약 25 내지 약 30, 약 30 내지 약 40, 약 40 내지 약 50, 약 50 내지 약 100, 약 100 내지 약 150, 약 150 내지 약 200, 약 200 내지 약 250, 약 250 내지 약 500, 약 500 내지 약 750, 약 750 내지 약 1000개 또는 그 이상의 뉴클레오티드 또는 잔기)을 포함한다.

[0147] 아미노산 변형의 예는 보존적 아미노산 치환 또는 결실이다. 특정 실시양태에서, 변형된 또는 변이체 서열은 변형되지 않은 서열(예를 들어, 야생형 서열)의 기능 또는 활성의 적어도 일부를 유지한다.

[0148] 아미노산 변형의 또 다른 예는 바이러스 입자의 캡시드 단백질에 도입된 표적화 펩티드이다. 재조합 바이러스 벡터를 중추 신경계, 예를 들어 별개의 뇌 영역에 표적화하는 펩티드가 확인되었다.

[0149] 이렇게 변형된 재조합 바이러스는 또 다른 유형의 조직(예를 들어, 간 조직)보다 한 유형의 조직(예를 들어, CNS 조직)에 우선적으로 결합할 수 있다. 특정 실시양태에서, 변형된 캡시드 단백질을 지닌 재조합 바이러스는 필적하는 변형되지 않은 캡시드 단백질보다 높은 수준으로 결합함으로써 뇌 혈관 상피 조직을 "표적화"할 수 있다. 예를 들어, 변형된 캡시드 단백질을 갖는 재조합 바이러스는 변형되지 않은 재조합 바이러스보다 50% 내지 100% 더 높은 수준으로 뇌 혈관 상피 조직에 결합할 수 있다.

[0150] "핵산 단편(nucleic acid fragment)"은 주어진 핵산 분자의 일부이다. 대부분의 유기체에서 데옥시리보핵산(DNA)은 유전 물질인 반면 리보핵산(RNA)은 DNA에 포함된 정보를 단백질로 전달하는 데 관여한다. 개시된 뉴클레오티드 서열 및 단백질 또는 이에 의해 암호화된 부분-길이 단백질의 단편 및 변이체도 본 발명에 의해 포함된다. "단편" 또는 "부분"은 폴리펩티드 또는 단백질을 암호화하는 뉴클레오티드 서열 또는 이의 아미노산 서열의 전체 길이 또는 전체 길이보다 작은 것을 의미한다. 특정 실시양태에서, 단편 또는 부분은 생물학적으로 기능적이다(즉, 야생형의 활성 또는 기능의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%를 유지함).

[0151] 분자의 "변이체"는 네이티브 분자의 서열과 실질적으로 유사한 서열이다. 뉴클레오티드 서열의 경우, 변이체는 유전 암호의 축퇴 때문에 네이티브 단백질의 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 서열을 포함한다. 이와 같이 자연적으로 발생하는 대립유전자 변이체는 분자 생물학 기법, 예를 들어, 중합효소 연쇄 반응(PCR) 및 혼성화 기법을 사용하여 확인할 수 있다. 변이체 뉴클레오티드 서열은 또한 합성적으로 유래된 뉴클레오티드 서열, 예를 들어, 네이티브 단백질을 암호화하는, 예를 들어, 부위-지정 돌연변이 유발(site-directed mutagenesis)을 사용하여 생성된 것들 뿐만 아니라 아미노산 치환을 갖는 폴리펩티드를 암호화하는 것들을 포함한다. 일반적으

로, 본 발명의 뉴클레오티드 서열 변이체는 네이티브(내인성) 뉴클레오티드 서열과 적어도 40%, 50%, 60% 내지 70%, 예를 들어, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78% 내지 79%, 일반적으로 적어도 80%, 예를 들어, 81%-84%, 적어도 85%, 예를 들어, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 내지 98% 서열 동일성을 가질 것이다. 특정 실시양태에서, 변이체는 생물학적으로 기능적이다(즉, 야생형의 활성 또는 기능의 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 99% 또는 100%를 유지함).

[0152] 특정 핵산 서열의 "보존적 변이(conservative variations)"는 동일하거나 본질적으로 동일한 아미노산 서열을 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. 유전 암호의 축퇴 때문에, 다수의 기능적으로 동일한 핵산이 주어진 폴리펩티드를 암호화한다. 예를 들어, 코돈 CGT, CGC, CGA, CGG, AGA 및 AGG는 모두 아미노산 아르기닌을 암호화한다. 따라서, 아르기닌이 코돈에 의해 특정되는 모든 위치에서, 코돈은 암호화된 단백질을 변경하지 않으면서 기재된 상응하는 코돈 중 어느 것으로 변경될 수 있다. 이러한 핵산 변이는 "침묵 변이(silent variations)"이며, 이는 "보존적으로 변형된 변이(conservatively modified variations)"의 일종이다. 폴리펩티드를 암호화하는 본원에 기재된 모든 핵산 서열은 달리 주지되는 경우를 제외하고는 모든 가능한 침묵 변이를 또한 기술한다. 당업계의 숙련가는 핵산 내의 각 코돈(통상적으로 메티오닌에 대한 유일한 코돈인 ATG 제외)이 표준 기술에 의해 기능적으로 동일한 분자를 수득하도록 변형될 수 있음을 인식할 것이다. 따라서, 폴리펩티드를 암호화하는 핵산의 각각의 "침묵 변이"는 각각의 기재된 서열에 내재되어 있다.

[0153] 폴리뉴클레오티드 서열의 "실질적 동일성(substantial identity)"이라는 용어는 폴리뉴클레오티드가 표준 파라미터를 사용하여 기재된 정렬 프로그램 중 하나를 사용한 참조 서열과 비교하여 적어도 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 또는 79%, 또는 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 또는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94%, 또는 심지어 적어도 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함하는 것을 의미한다. 당업계의 숙련가는 이러한 값들이 코돈 축퇴, 아미노산 유사성, 판독 프레임 위치결정 등을 고려함으로써 두 개의 뉴클레오티드 서열에 의해 암호화된 단백질의 상응하는 동일성을 결정하기 위해 적절하게 조정될 수 있음을 인식할 것이다. 이러한 목적을 위한 아미노산 서열의 실질적 동일성은 통상으로 적어도 70%, 적어도 80%, 90%, 또는 심지어 적어도 95%의 서열 동일성을 의미한다.

[0154] 폴리펩티드의 맥락에서 "실질적 동일성"이라는 용어는 폴리펩티드가 지정된 비교 창에 대해 참조 서열과 적어도 70, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 또는 79%, 또는 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 또는 89%, 또는 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 또는 94%, 또는 심지어 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 서열 동일성을 갖는 서열을 포함함을 나타낸다. 두 개의 폴리펩티드 서열이 동일하다는 것은 하나의 폴리펩티드가 제2 폴리펩티드에 대해 생성된 항체와 면역학적으로 반응성임을 나타낸다. 따라서, 폴리펩티드는 예를 들어 두 개의 펩티드가 보존적 치환에 의해서만 상이한 경우 제2 폴리펩티드와 동일하다.

[0155] "기계감각(mechanosensation)"은 기계적 자극에 대한 반응을 의미한다. 촉각, 청각, 및 기계적 자극을 신경 신호로 변환하는 예의 균형. 기계감각 입력은 "기계전달(mechanotransduction)"이라는 과정을 통해 기계적 자극에 대한 반응으로 변환된다.

[0156] "질환"이란 세포, 조직 또는 장기의 정상적인 기능을 손상시키거나 방해하는 임의의 상태 또는 장애를 의미한다. 질환의 예는 예를 들어 대상체의 내이에서 발현되는 기계감각 전달(mechanosensory transduction)에서 기능하는 단백질의 기능 상실을 특징으로 하는 유전 질환을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 질환은 어셔 증후군(Usher Syndrome)(예를 들어, USH1) 또는 연령-관련 청력 손실이다. 한 실시양태에서, 질환은 유전적 결함, 예를 들어 TMC1, TMC2, MY07A, USCH1 C, CDH23, PCDH15, SANS, CIB2, USH2A, VLGR1, WHKN, CLRN1, PDZD7, USH1C(예를 들어, 하모닌-a, b, 또는 c)의 결함과 관련된 청각 장애이다.

[0157] "치료하다" 및 "치료"라는 용어는 치료적 치료 및 예방적 또는 방지적(preventative) 조치를 모두 지칭하며, 여기서 목적은 장애의 발달, 진행 또는 악화와 같은 원치않는 생리적 변화 또는 장애를 예방, 억제, 감소 또는 저하시키는 것이다. 본 발명의 목적을 위해, 유익하거나 원하는 임상 결과는 증상의 완화, 질환 범위의 감소, 질환의 증상 또는 부작용의 안정화(즉, 악화되거나 진행되지 않음), 질환 진행의 지연 또는 둔화, 질환 상태의 개선 또는 완화, 및 관해(부분적 또는 전체적), 검출 가능한지 검출 가능하지 않은지 여부를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. "치료"는 또한 치료를 받지 않을 경우 예상 생존율과 비교하여 생존율이 연장되는 것을 의미할 수 있다. 치료를 필요로 하는 사람에는 이미 상태 또는 장애가 있는 사람 뿐만 아니라 (예를 들어, 유전자 분석에 의해 결정된 바와 같이) 소인이 있는 사람이 포함된다.

[0158] 본원에서 사용된 바와 같이, 명시된 성분의 관점에서 "본질적으로 포함하지 않는(essentially free)"은 명시된

성분 중 어느 것도 목적을 갖고 조성물로 제형화되지 않았고/않았거나 단지 오염물질로서 또는 미량으로 존재한다는 의미로 본원에서 사용된다. 따라서 조성물의 임의의 의도하지 않은 오염으로 인한 명시된 성분의 총량은 0.05% 미만, 바람직하게는 0.01% 미만이다. 명시된 성분의 양을 표준 분석 방법으로 검출할 수 없는 조성물이 가장 바람직하다.

[0159] 본원에 명세서에서 사용되는 바와 같이, "a" 또는 "an"은 하나 이상을 의미할 수 있다. 본원에 청구항(들)에서 사용되는 바와 같이, "포함하는"이라는 단어와 함께 사용될 때, 단어 "a" 또는 "an"은 하나 또는 하나 이상을 의미할 수 있다.

[0160] 청구항에서 "또는"이라는 용어의 사용은, 대안 만을 지칭하는 것으로 명시적으로 표시되지 않거나 대안이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하는 것으로 사용되지만, 본 개시내용은 단지 대안 및 "및/또는"을 지칭하는 정의를 지지한다. 본원에서 사용되는 바와 같이, "또 다른"은 적어도 두 번째 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

[0161] 본 출원 전반에 걸쳐, "약"이라는 용어는 값이 장치에 대한 내재적 오차 변화량, 값을 결정하는 데 사용된 방법의 내재적 변화량, 연구 대상체 간에 존재하는 변화량, 또는 명시된 값의 10% 이내의 값을 포함한다는 것을 나타내기 위해 사용된다.

[0162] **VI. 키트**

[0163] 본 발명은 포장재 및 그 안의 하나 이상의 성분을 갖는 키트를 제공한다. 키트는 전형적으로 성분에 대한 설명 또는 그 안의 성분의 *시험관내*, *생체내* 또는 *생체외* 사용에 대한 지침을 포함하는 라벨 또는 포장 삽입물을 포함한다. 키트는 이러한 성분, 예를 들어 핵산, 재조합 벡터 및/또는 바이러스 입자의 집합을 함유할 수 있다.

[0164] 키트는 키트의 하나 이상의 성분을 수용하는 물리적 구조를 지칭한다. 포장재는 성분을 멸균 상태로 유지할 수 있으며, 이러한 목적으로 통상적으로 사용되는 재료(예를 들어, 종이, 골판지, 유리, 플라스틱, 호일, 앰플, 바이알, 튜브 등)로 만들어질 수 있다.

[0165] 라벨 또는 삽입물은 그 안의 하나 이상의 성분, 투여량, 작용 기전, 약동학 및 약력학을 포함한 활성 성분(들)의 임상 약리학의 식별 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체, 로트 번호, 제조 위치 및 날짜, 유통 기한을 식별하는 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 제조업체 정보, 로트 번호, 제조업체 위치 및 날짜를 식별하는 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 성분 중 하나 이상을 사용하기 위한 임상의 또는 대상체에 대한 지침을 포함할 수 있다. 지침은 투여 양, 빈도 또는 기간, 및 본원에 기재된 방법, 용도, 치료 프로토콜 또는 예방적 또는 치료적 요법 중 어느 것을 실행하기 위한 지침을 포함할 수 있다.

[0166] 라벨 또는 삽입물은 성분이 제공할 수 있는 임의의 이점, 예를 들어 예방적 또는 치료적 이점에 대한 정보를 포함할 수 있다. 라벨 또는 삽입물은 잠재적인 부작용, 합병증 또는 반응에 대한 정보, 예를 들어 특정 조성물을 사용하는 것이 적절하지 않은 상황에 관한 대상체 또는 임상의에 대한 경고를 포함할 수 있다. 대상체가 조성물과 비상용성(incompatible)일 수 있는 하나 이상의 다른 약물을 복용했거나, 복용할 것이거나, 복용 중이거나, 또는 대상체가 조성물과 비상용성일 수 있는 다른 치료 프로토콜 또는 치료 요법을 받았거나, 받을 것이거나, 최근 받고 있는 경우, 부작용 또는 합병증이 또한 발생할 수 있으며, 따라서 지침은 이러한 비상용성에 관한 정보를 포함할 수 있다.

[0167] 라벨 또는 삽입물은 별도로 또는 성분, 키트 또는 포장재(예를 들어, 상자)에 부착된, 또는 키트 성분을 담고 있는 앰플, 튜브 또는 바이알에 부착된 "인쇄물", 예를 들어 종이 또는 판지를 포함한다. 라벨 또는 삽입물은 컴퓨터 판독 가능 매체, 예를 들어 바코드로 인쇄된 라벨, 디스크, 광 디스크, 예를 들어 CD- 또는 DVD-ROM/RAM, DVD, MP3, 또는 전기 저장 매체, 예를 들어 RAM 및 ROM 또는 이들의 하이브리드, 예를 들어 자기/광학 저장 매체, 플래시 메모리, 하이브리드 및 메모리 유형 카드를 추가로 포함할 수 있다.

[0168] **VII. 실시예**

[0169] 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 실시양태를 입증하기 위해 포함된다. 하기 실시예에 개시된 기술들은 본 발명의 실시에서 잘 기능하는 것으로 발명자에 의해 발견된 기술을 나타내고, 따라서 이의 실시를 위한 바람직한 모드를 구성하는 것으로 간주될 수 있음이 당업계의 숙련가들에 의해 인식되어야 한다. 그러나, 당업계의 숙련가들은, 본 개시내용에 비추어, 개시되는 특정 실시양태에서 많은 변경이 이루어질 수 있고, 발명의 취지 및 범

위를 벗어나지 않으면서 여전히 같거나 유사한 결과를 수득할 수 있다는 것을 인식해야 한다.

[0170] **실시예 1 - 창백핵으로의 치료적 전달**

[0171] 펩티드-변형된 AAV 캡시드 변이체의 라이브러리는 각각 AAV1 캡시드의 위치 590, AAV2 캡시드의 위치 587 및 AAV9 캡시드의 위치 588에 무작위 표적 펩티드 서열을 삽입함으로써 AAV1, AAV2 및 AAV9으로의 무작위 펩티드의 삽입에 의해 생성하였다. 이러한 라이브러리를 창백핵에 주입 후 뇌 심부 구조 및 대뇌 피질을 광범위하게 형질도입하는 변이체에 대해 붉은털원숭이에서 스크리닝하였다(도 38a-38c). 2마리의 추가 붉은털원숭이에 대한 형광 실험에서 추가 검증을 위해 6개의 변이체(표 1)를 선택하였다. 적어도 5개의 캡시드 변이체가 HD 및 PD에 영향을 미치는 뇌 심부 구조를 형질도입하였다. AAV1.THTD.mTFP1의 형질도입은 미상핵/조가비핵에서 널리 퍼져 있었다. AAV1.THTD.mTFP1은 또한 다수의 피질 층 V/VI 투사 뉴런을 형질도입하였으며(도 39), 이는 HD에서 매우 취약하였다. 이러한 AAV 캡시드는 HD 및 PD에 대한 다양한 치료 페이로드를 패키징하는 데 사용될 수 있다. 이러한 변이체에 대한 간 형질도입은 검출 한계 미만이었다(도 40) (AAV-BLD010은 AAV1.THTD.mTFP1이고; AAV-BLD011은 AAV2.SGGR.NES_mNG이고; AAV-BLD012는 AAV2.SKGQ.mRuby3이다).

[0172] **표 1.** 캡시드 표적화 펩티드.

[0173]

혈청형	DNA	펩티드
AAV1	TCTAGTGGGGATTCGACGAAG (서열 번호 7)	SSGDSTK (서열 번호 8)
AAV1	ACGCATACTGATCATACGCGT (서열 번호 9)	THTDDTR (서열 번호 10)
AAV2	TCTAAGGGGCAGGGGACGGGG (서열 번호 11)	SKGQGTG (서열 번호 12)
AAV2	TCGGGGGGGAGGTATGCGGAG (서열 번호 13)	SGGRYAE (서열 번호 14)
AAV9	TCTTTGGGTAGTACTAAGGTG (서열 번호 15)	SLGSTKV (서열 번호 16)
AAV9	AAGATGTTGAGTGTTGTTAAT (서열 번호 17)	KMLSVVN (서열 번호 18)

[0174] 선택된 변이체를 추가로 분석하기 위해, THTDDTR 표적화 펩티드(서열 번호 20)를 갖는 AAV1 변이체를 mTFP1 발현 카세트(AAV1.THTD.mTFP1)로 패키징하고, SGGRYAE 표적화 펩티드(서열 번호 22)를 갖는 AAV2 변이체를 mNeonGreen 발현 카세트(AAV2.SGGR.NES_mNG)로 패키징하고, SKGQGTG 표적화 펩티드(서열 번호 21)를 갖는 AAV2 변이체를 mRuby3 발현 카세트(AAV2. SKGQ.mRuby3)로 패키징하고, KMLSVVN 표적화 펩티드(서열 번호 24)를 갖는 AAV9 변이체를 Halo-태그 발현 카세트(AAV9KMLS.Halo-tag)로 패키징하고, SLGSTKV 표적화 펩티드(서열 번호 23)를 갖는 AAV9 변이체를 mBFP2 발현 카세트(AAV9SLGS.mBFP2)로 패키징하였다.

[0175] 두 마리의 성체 붉은털원숭이에게 창백핵에서 특정 캡시드 변이체의 7.5E10 총 vg의 용량을 주사하였다. 창백핵으로 전달 후 각 캡시드의 생체 분포 및 트래픽킹 특성을 결정하기 위해 이미징 연구(Imaging study)를 수행하였다. 10um z-stacks 조직의 FISH 이미지를 사용하여 이들의 각각의 변이체 캡시드에 특이적인 각 형광단으로부터의 mRNA를 국소화하였다(도 1, 4, 7, 9, 11, 12, 15, 17, 18, 20, 및 25). 표면형광 이미지를 사용하여 이들의 각각의 변이체 캡시드에 특이적인 각 형광단으로부터의 단백질을 국소화하였다(도 2, 3, 5, 6, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 19, 21-24 및 26).

[0176] **실시예 2 - 창백핵 벡터의 마우스 주사**

[0177] 3마리의 마우스는 지정된 해부학적 구조의 각 반구에 상이한 바이러스의 주사를 제공받았다: 표 2에 표시된 시상, 속섬유막/중간 창백핵(IC/MGP) 또는 소뇌 심부 핵(DCN). 상이한 바이러스는 다음과 같다: RVC1023, pmAAV2.SGGR.NeonGreen; RVC1024, pmAAV2.SKGO.mRuby; 및 RVC1025, pmAAV1.THTD.mTFP. 마우스를 주사후 22일에 해부하고, 표면형광 현미경으로 평가하였다(도 27-37).

[0178] **표 2.** 창백핵 벡터의 마우스 주사 패러다임.

마우스 ID	ROA	좌	우	vg/반구
4279	시상	NeonGreen	mRuby	5.00E+09
4280	시상	mRuby	TFP	5.00E+09
4281	시상	TFP	NeonGreen	5.00E+09
4282	IC/MGP	NeonGreen	mRuby	4.00E+09
4285	IC/MGP	mRuby	TFP	4.00E+09
4292	IC/MGP	TFP	NeonGreen	4.00E+09
4293	IC/MGP	mRuby	TFP	4.00E+09
A16	DCN	NeonGreen	mRuby	4.00E+09
A17	DCN	mRuby	TFP	4.00E+09
A18	DCN	TFP	NeonGreen	4.00E+09

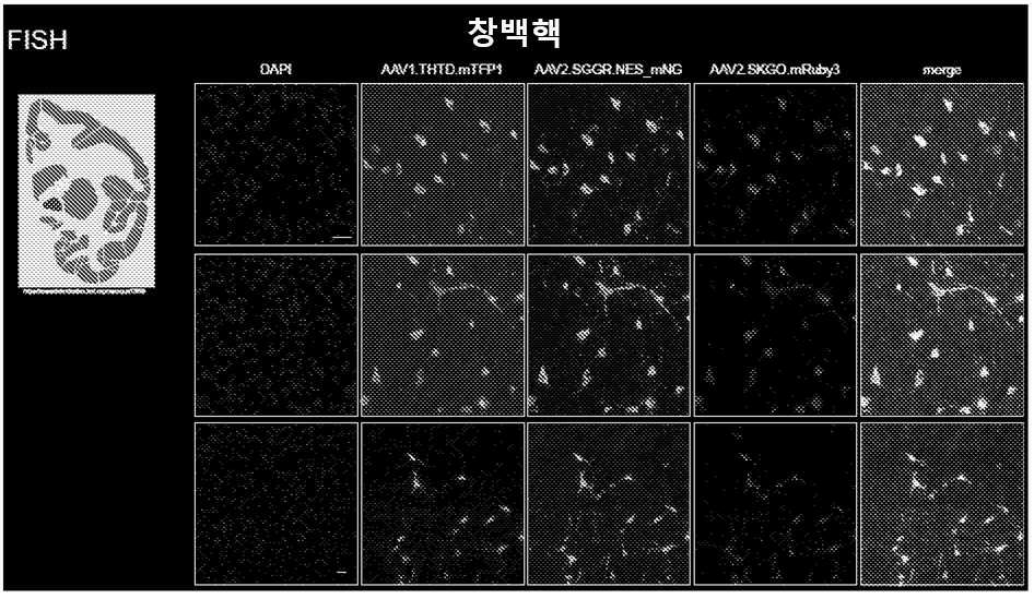
[0179]

[0180] * * *

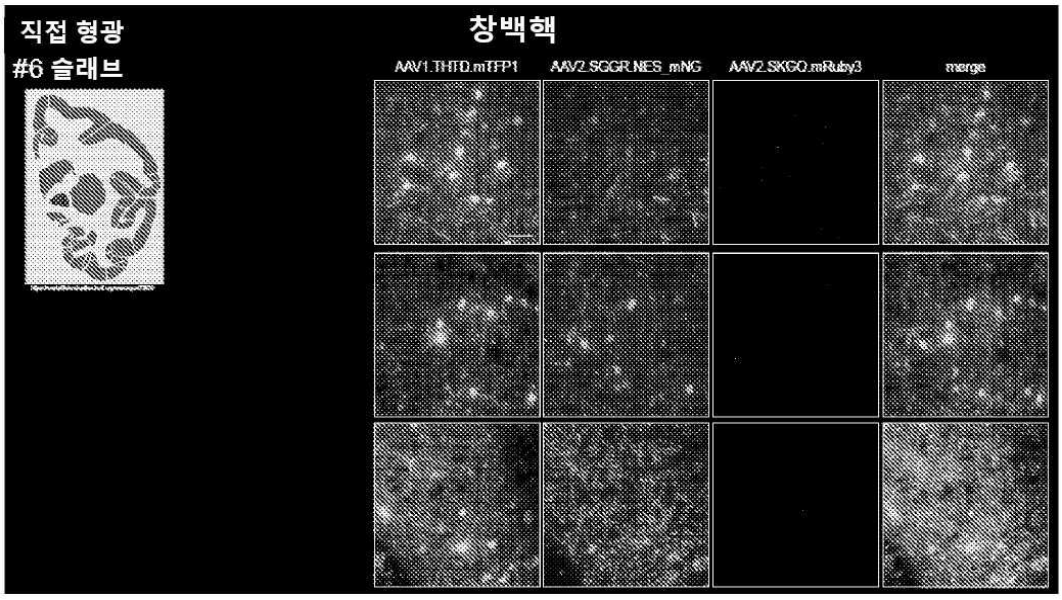
[0181] 본원에 개시되고 청구되는 모든 방법들은, 본 개시내용에 비추어, 과도한 실험 없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 조성물 및 방법이 바람직한 실시양태의 측면에서 기재되었지만, 본 발명의 개념, 취지 및 범위를 벗어나지 않으면서 본원에 기재된 방법 및 단계 또는 방법의 단계들의 순서에 변형이 적용될 수 있음이 당업계의 숙련가들에게는 명백할 것이다. 보다 구체적으로는, 화학적으로 및 생리학적으로 모두 관련되는 특정 제제가 본원에 기재된 제제를 대체할 수 있지만 동일하거나 유사한 결과가 달성될 것임이 명백할 것이다. 당업계의 숙련가들에게 명백한 이러한 모든 유사한 대체 및 변경은 첨부된 특허청구범위에 의해 정의된 바와 같은 본 발명의 취지, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

도면

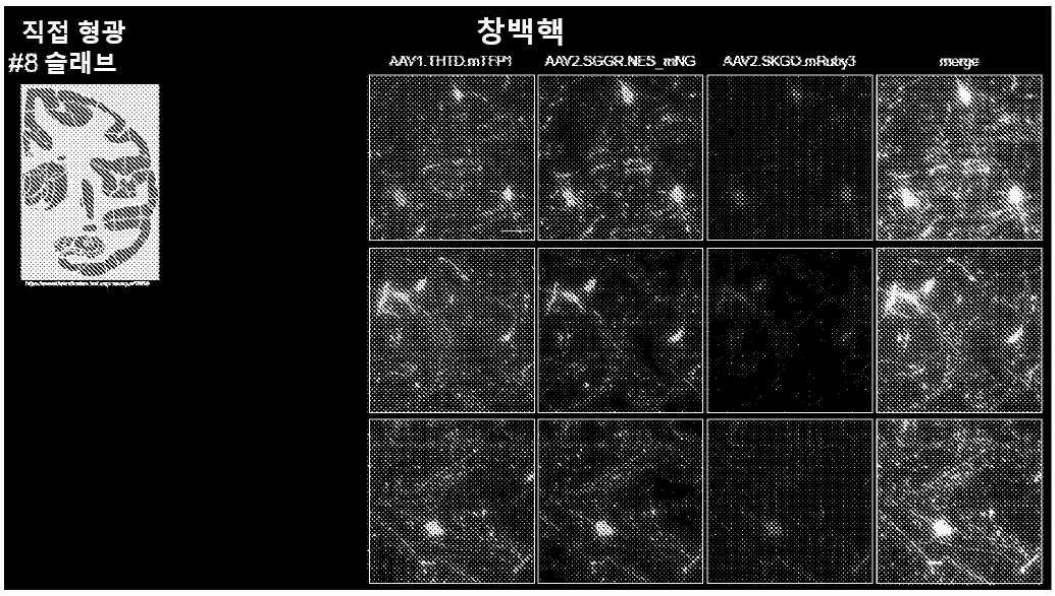
도면1



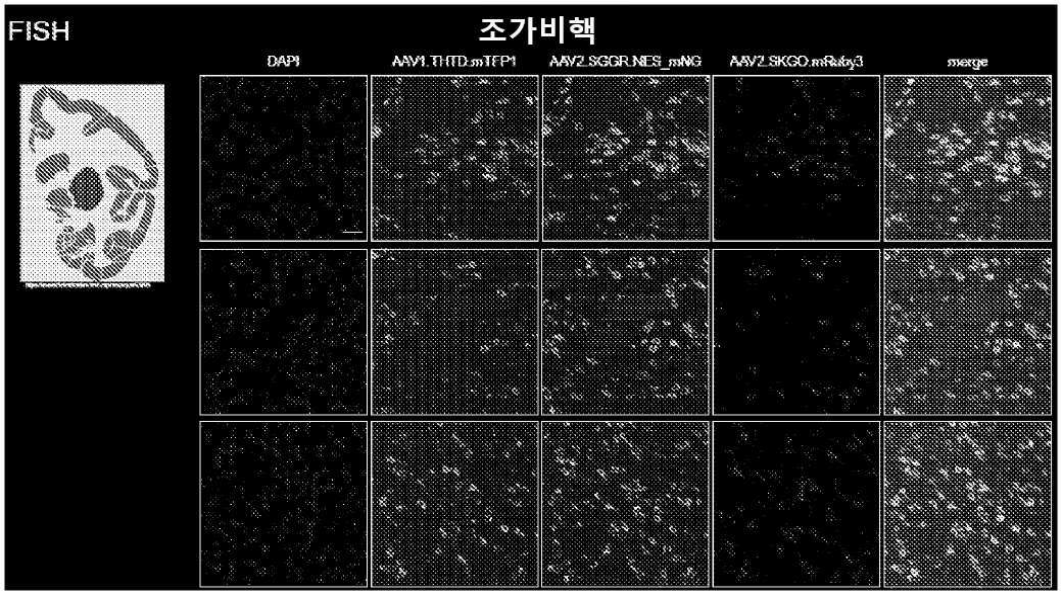
도면2


직접 형광
#6 슬래브
창백핵
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGD.mRuby3
merge

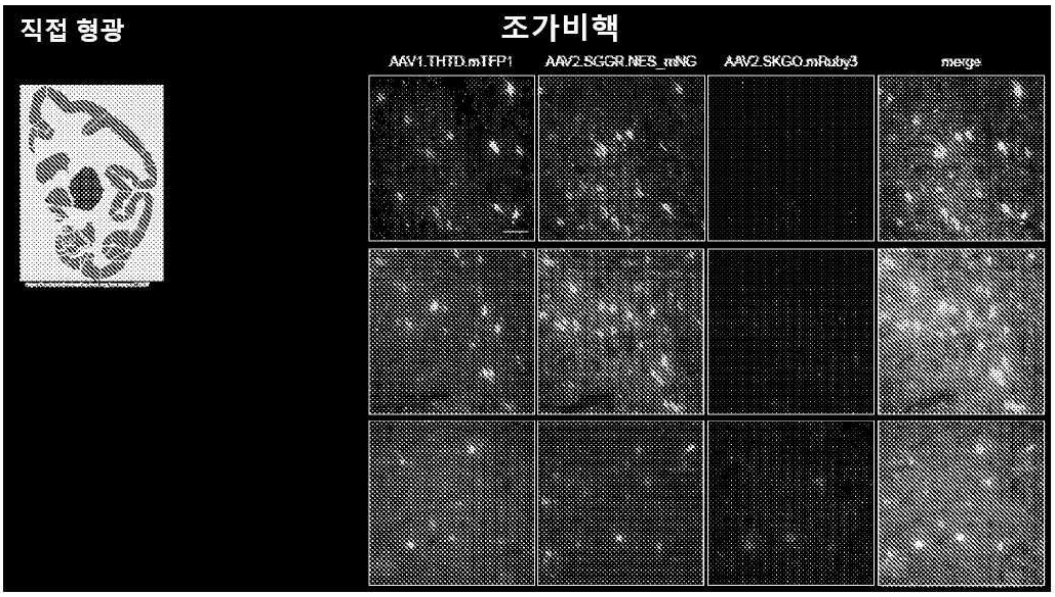
도면3


직접 형광
#8 슬래브
창백핵
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGD.mRuby3
merge

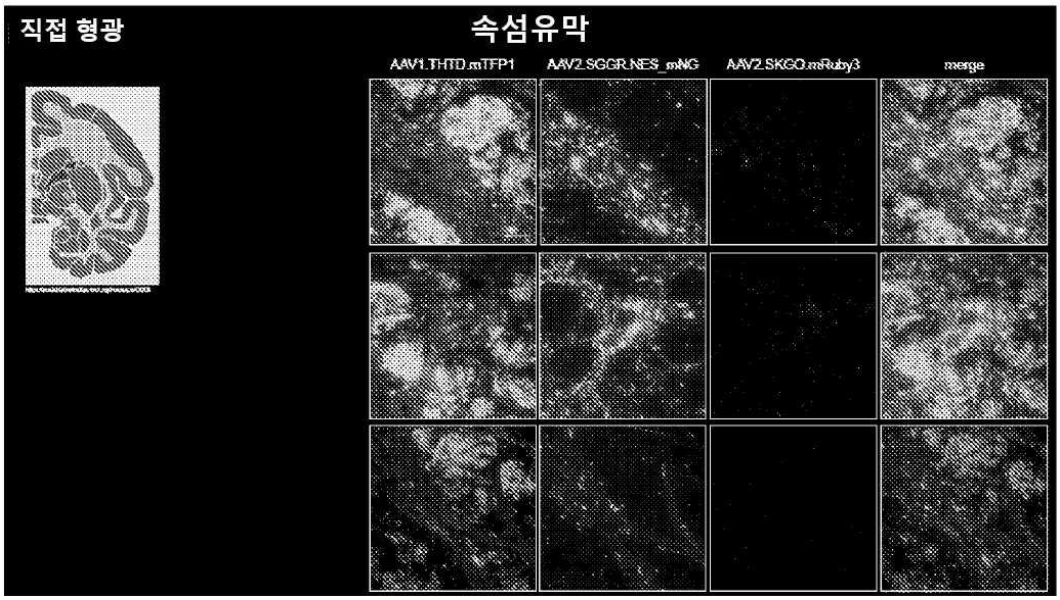
도면4


FISH
조가비핵
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

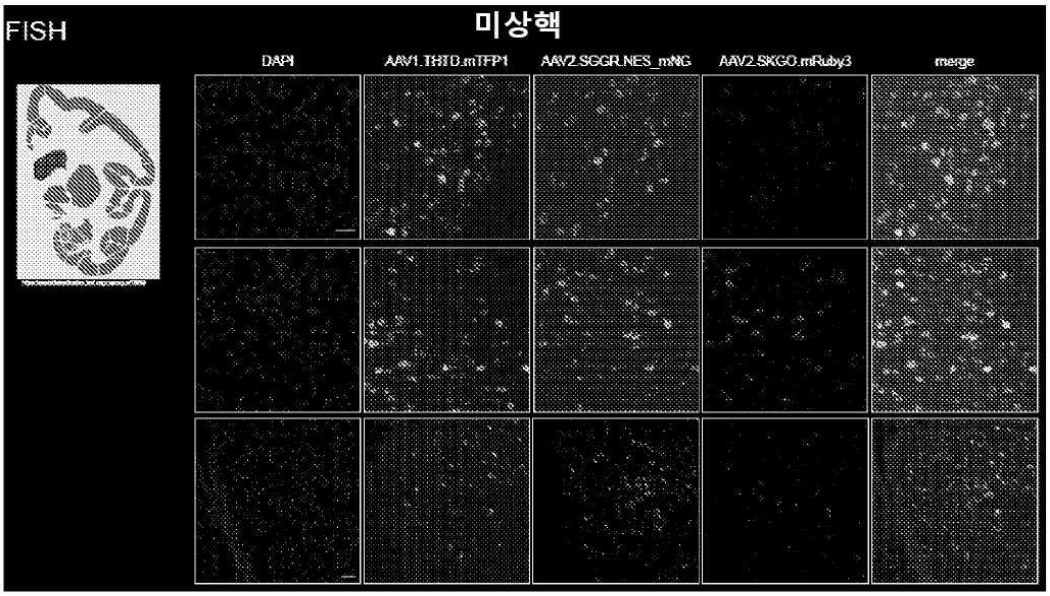
도면5


직접 형광
조가비핵
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

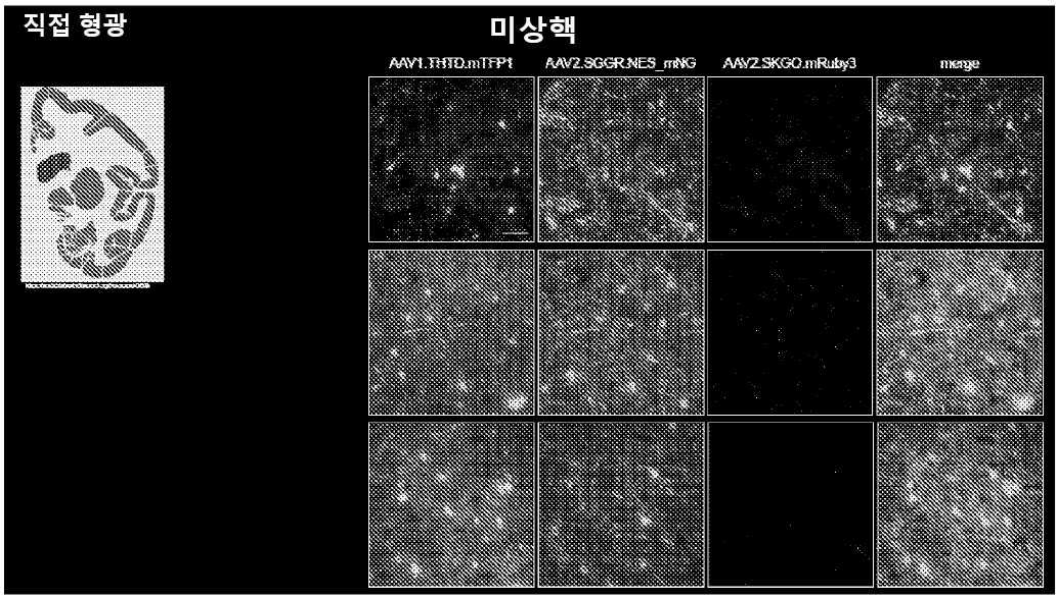
도면6


직접 형광
속섬유막
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

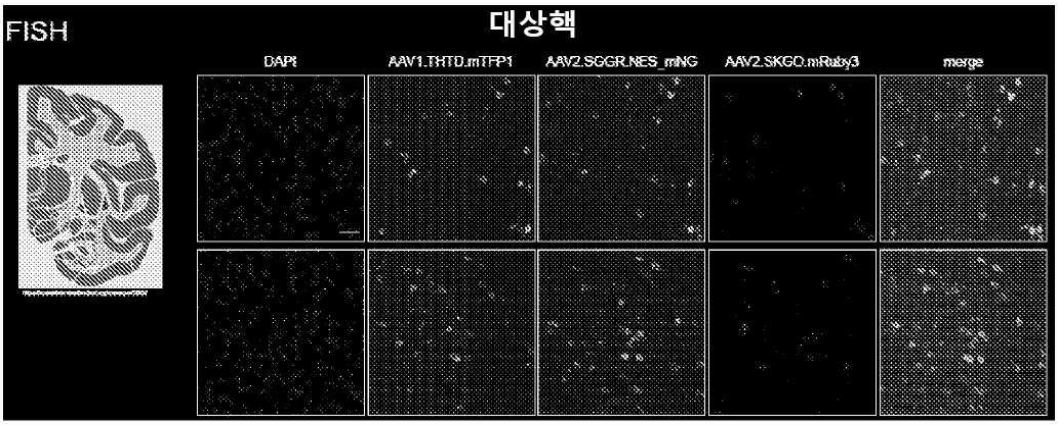
도면7


FISH
미상핵
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

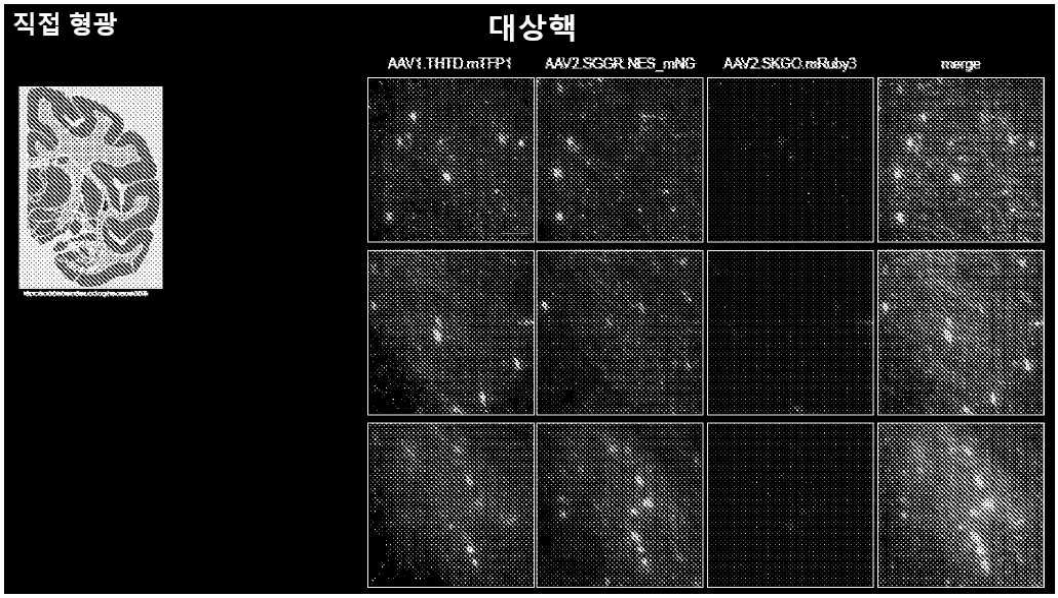
도면8


직접 형광
미상핵
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

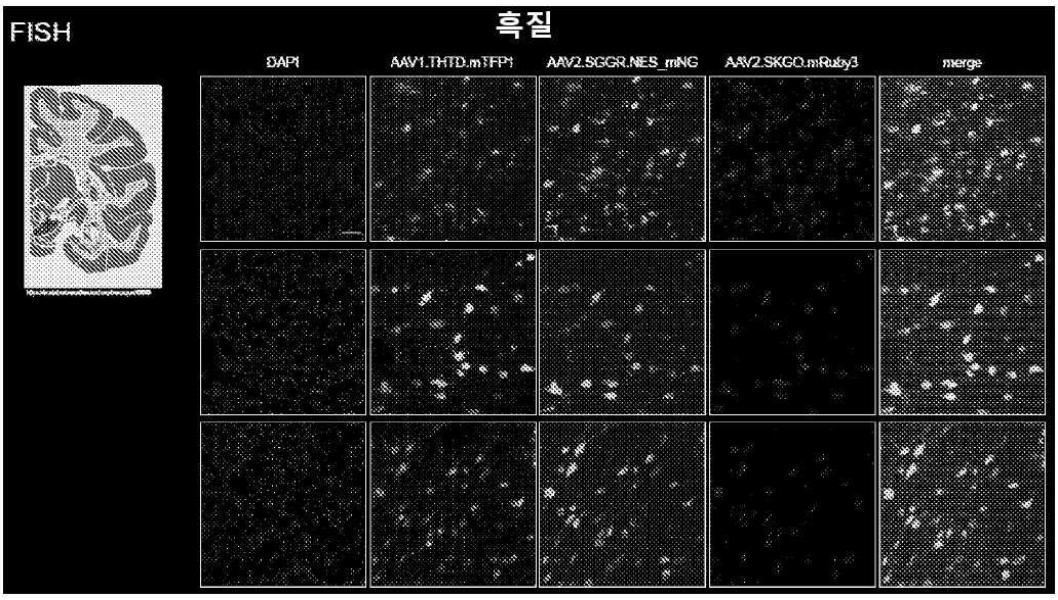
도면9


FISH
대상핵
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

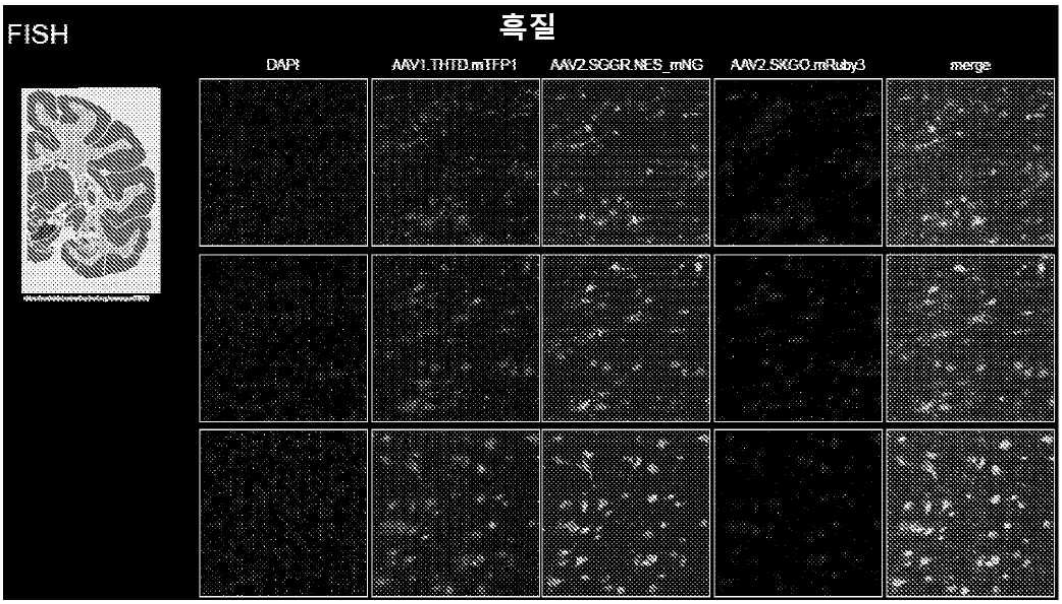
도면10


직접 형광
대상핵
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

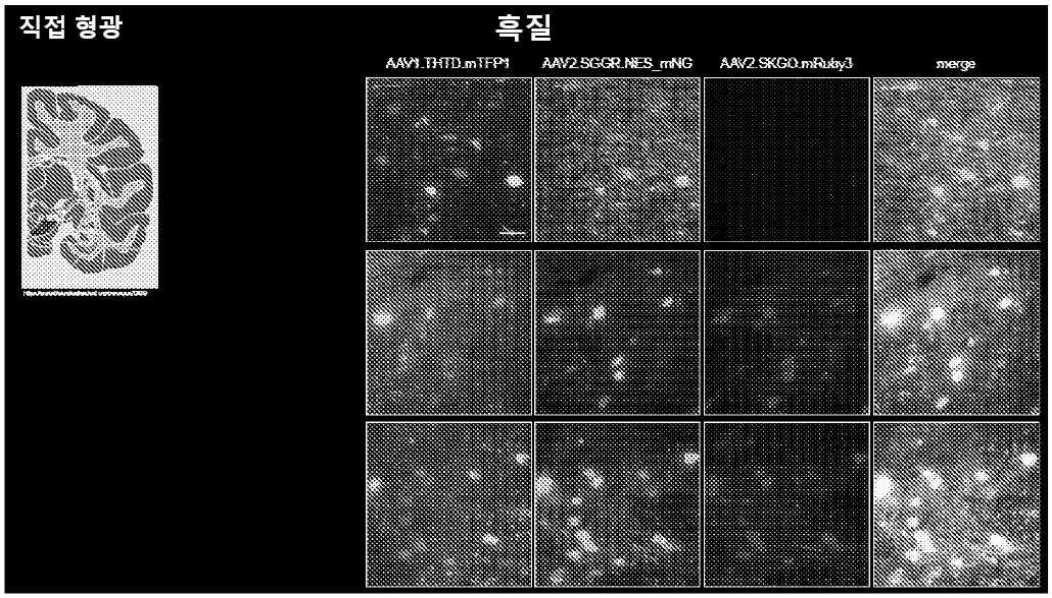
도면11


FISH
흑질
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

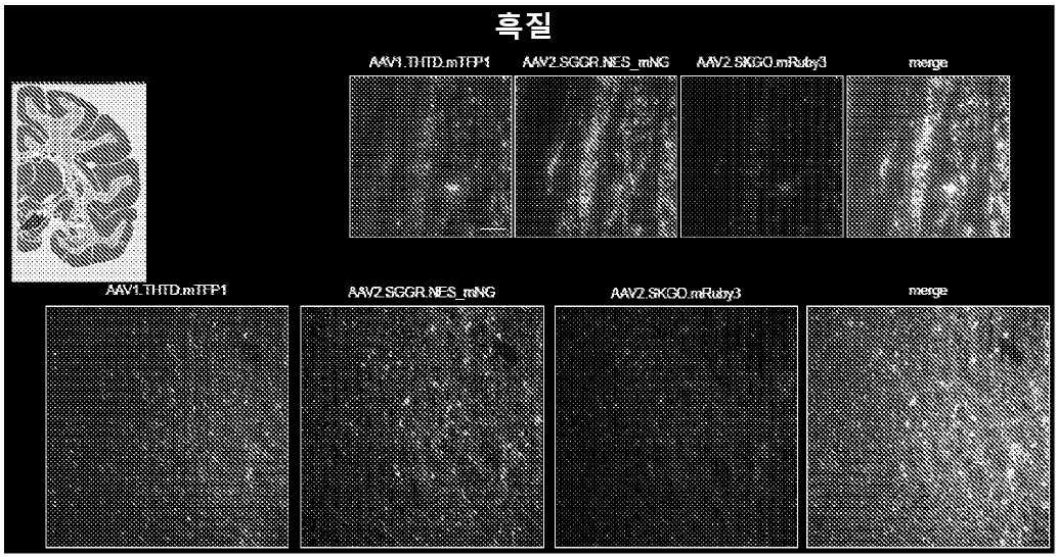
도면12


FISH
흑질
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

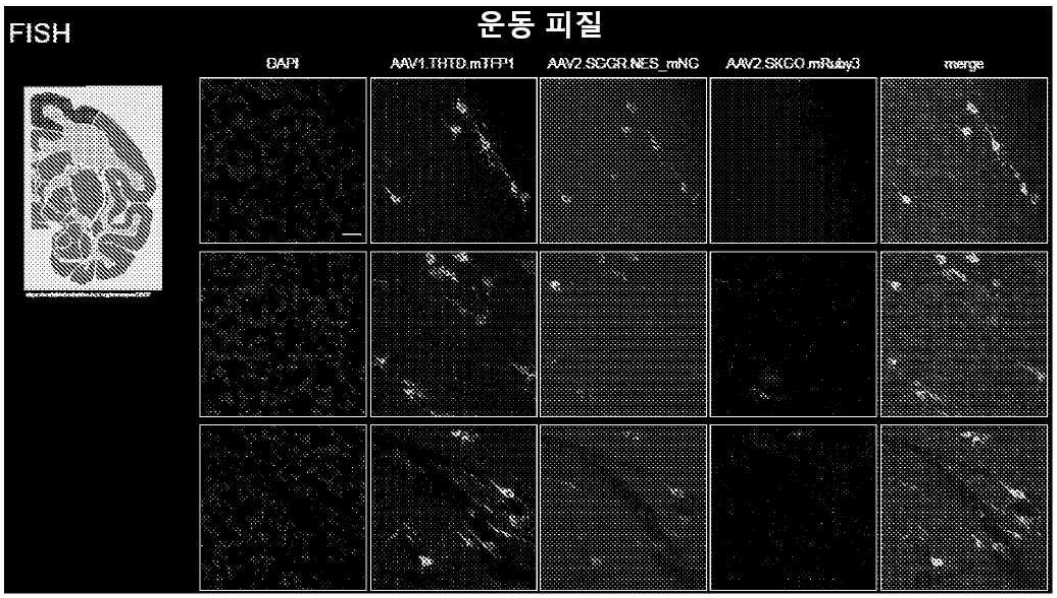
도면13


직접 형광
흑질
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

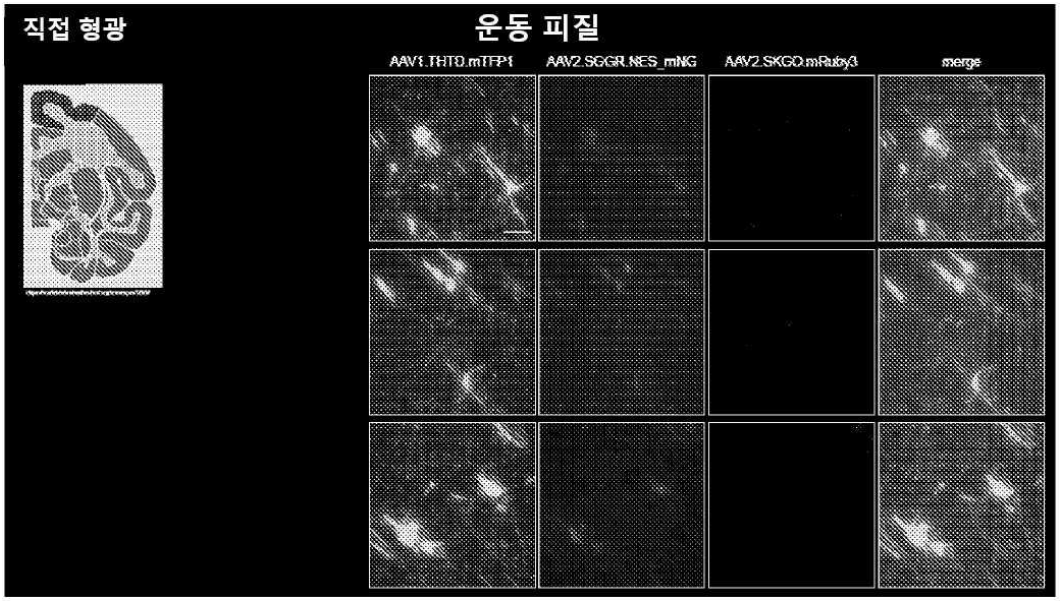
도면14


흑질
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

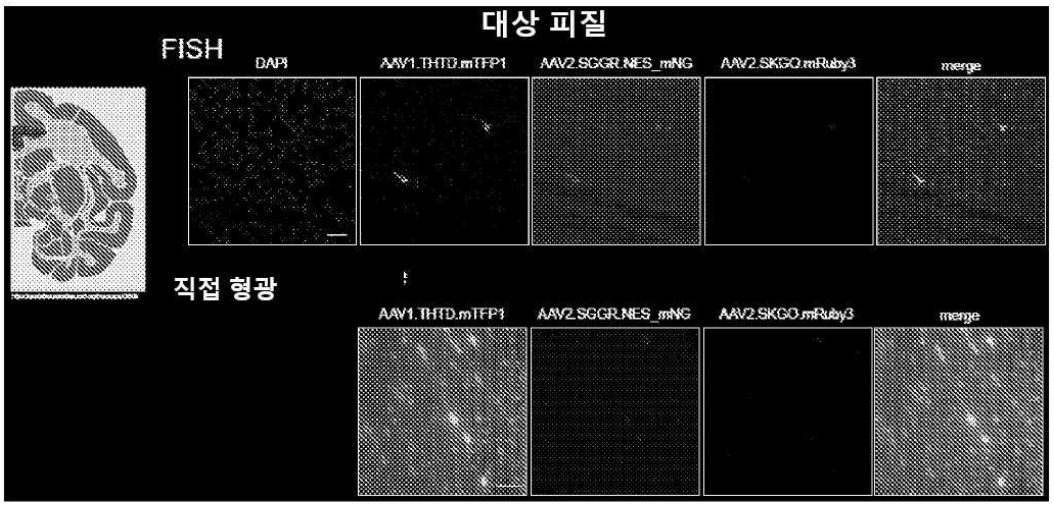
도면15


FISH
운동 피질
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

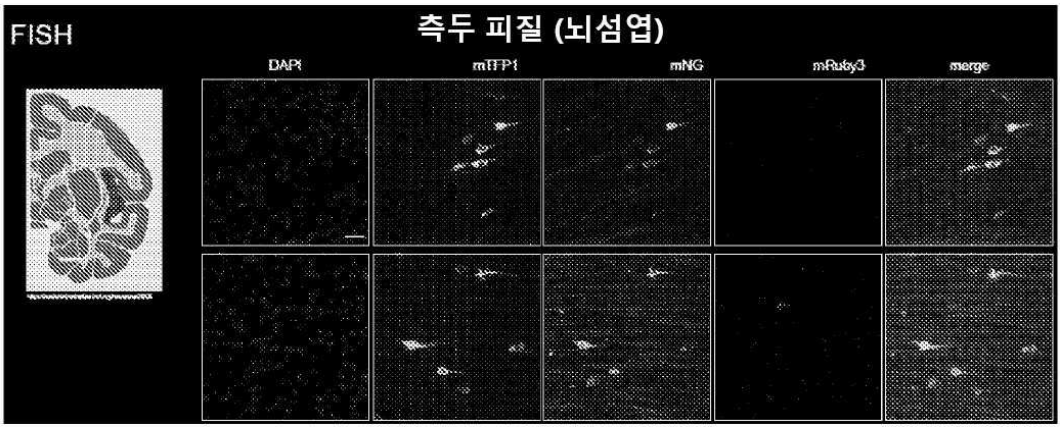
도면16



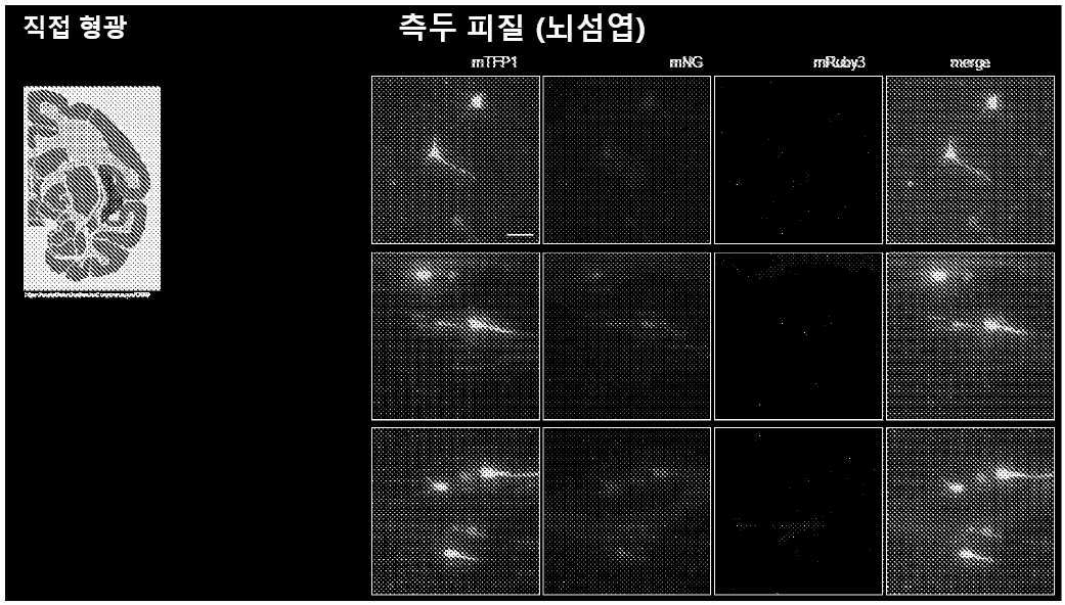
도면17



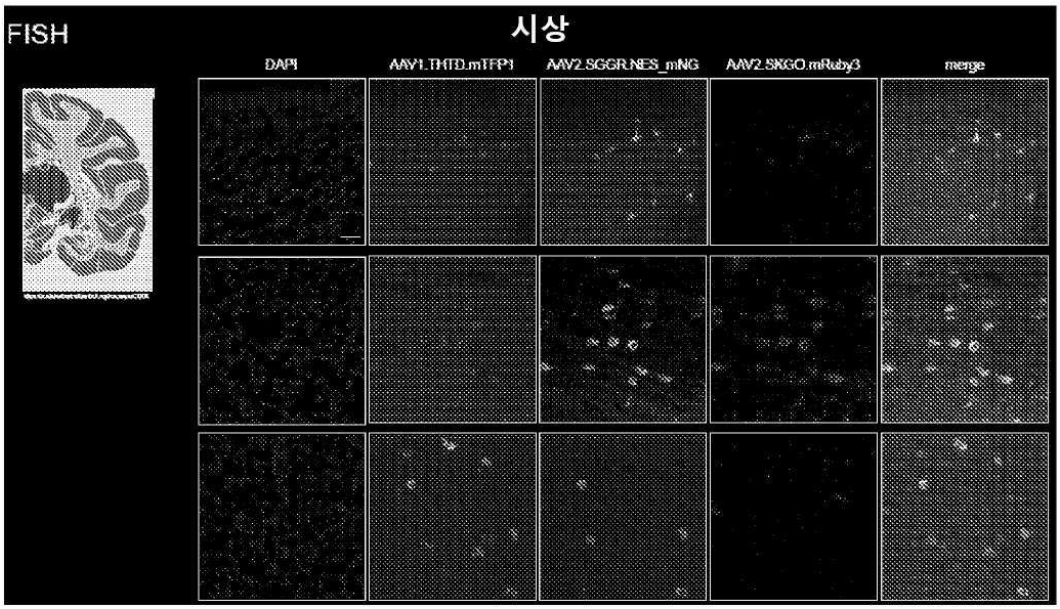
도면18



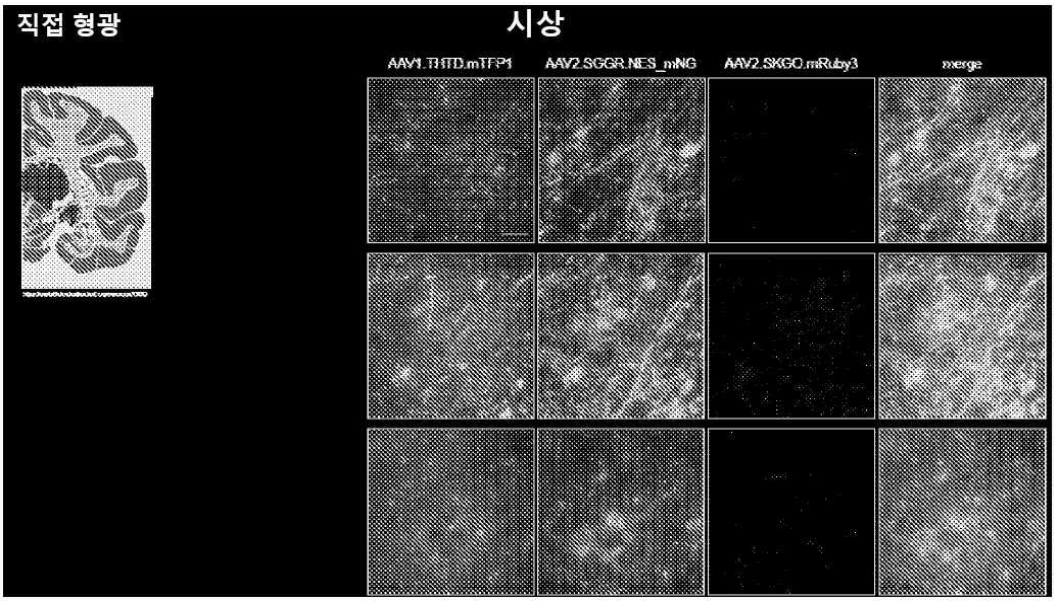
도면19


직접 형광
측두 피질 (뇌섬엽)
mTFP1
mNG
mRuby3
merge

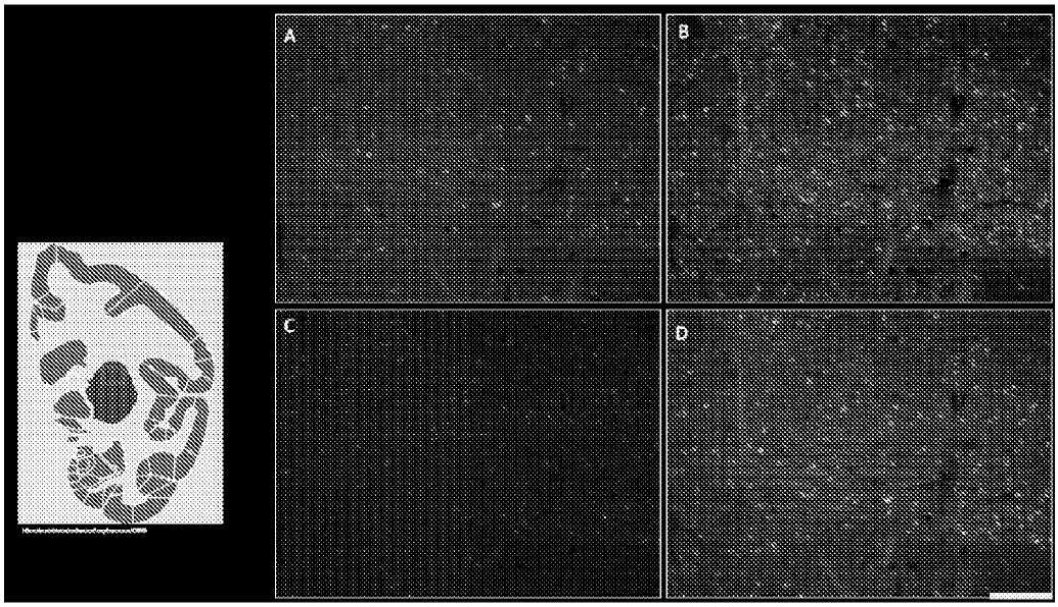
도면20


FISH
시상
DAPI
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

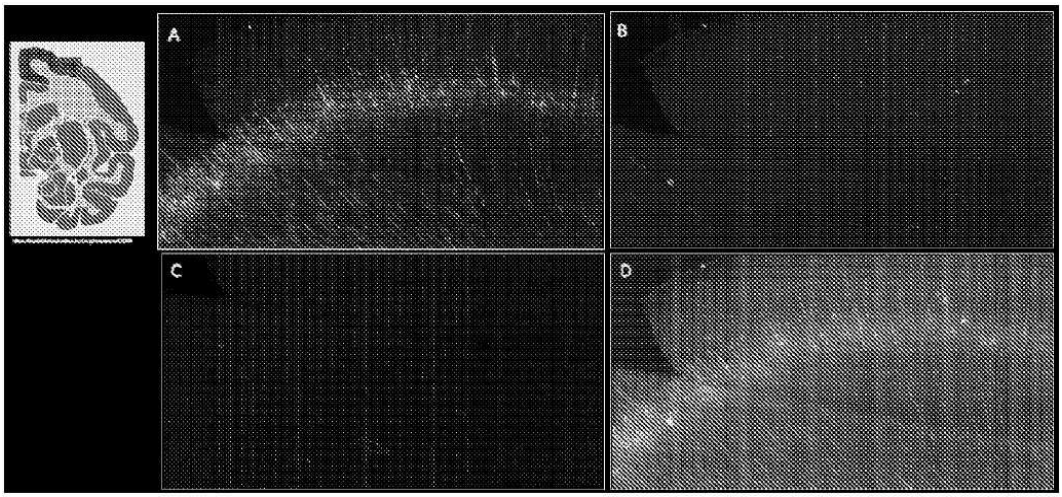
도면21


직접 형광
시상
AAV1.THTD.mTFP1
AAV2.SGGR.NES_mNG
AAV2.SKGO.mRuby3
merge

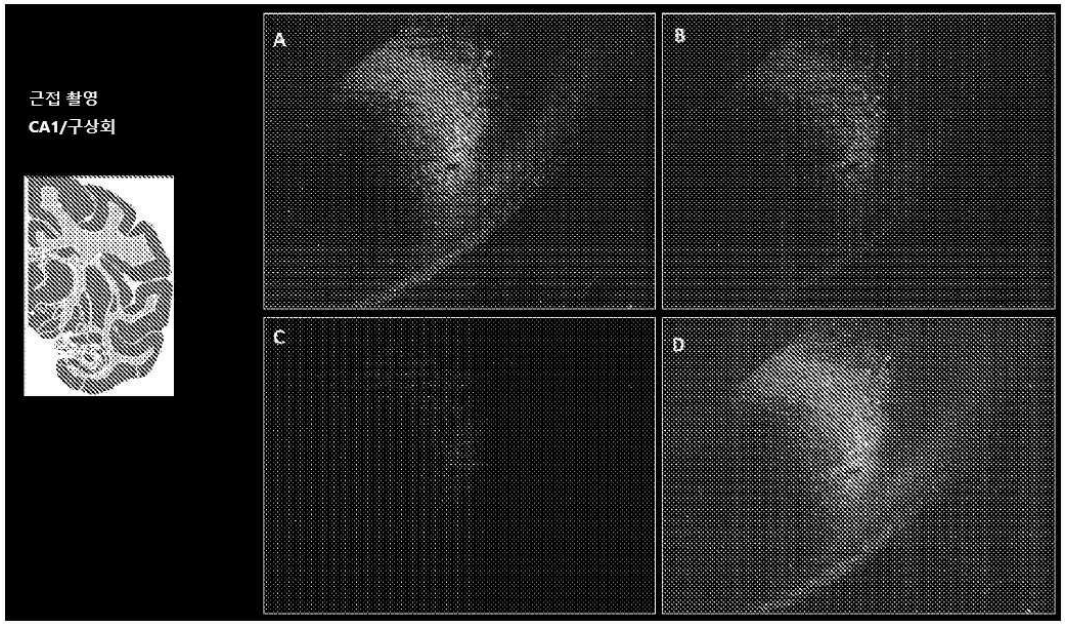
도면22


A
B
C
D

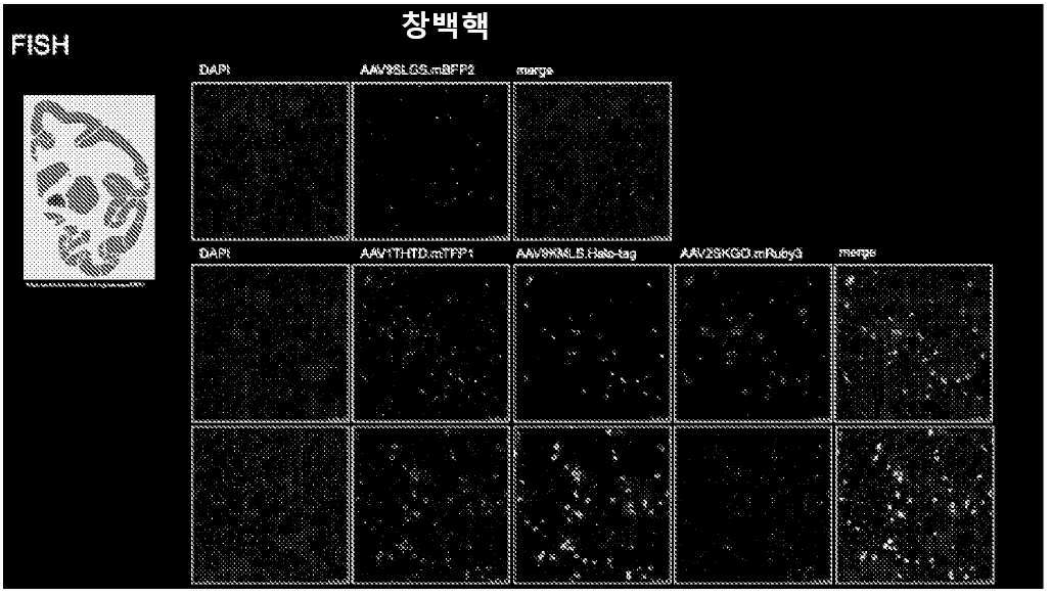
도면23



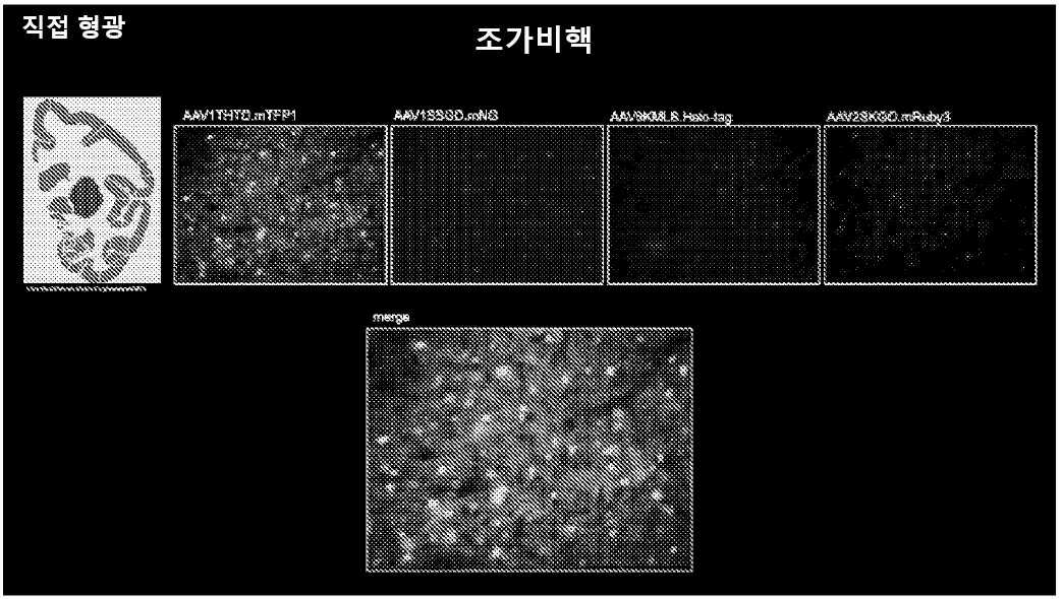
도면24



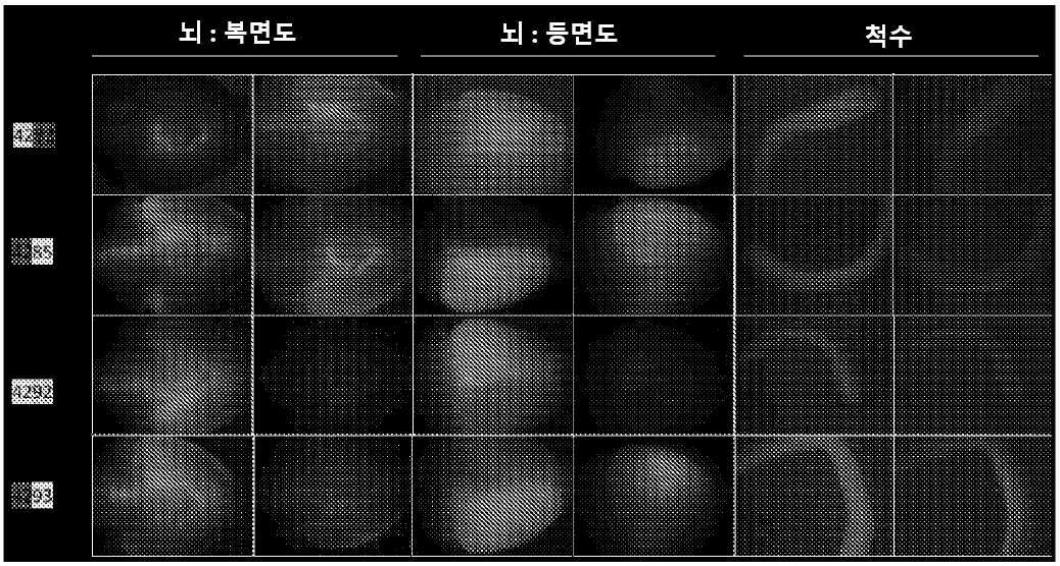
도면25


창백핵
FISH
DAPI
AAV9SLGS.mBFP2
merge
DAPI
AAV1THTD.mTFP1
AAV9KMLS.Halo-tag
AAV2SKGD.mRuby3
merge

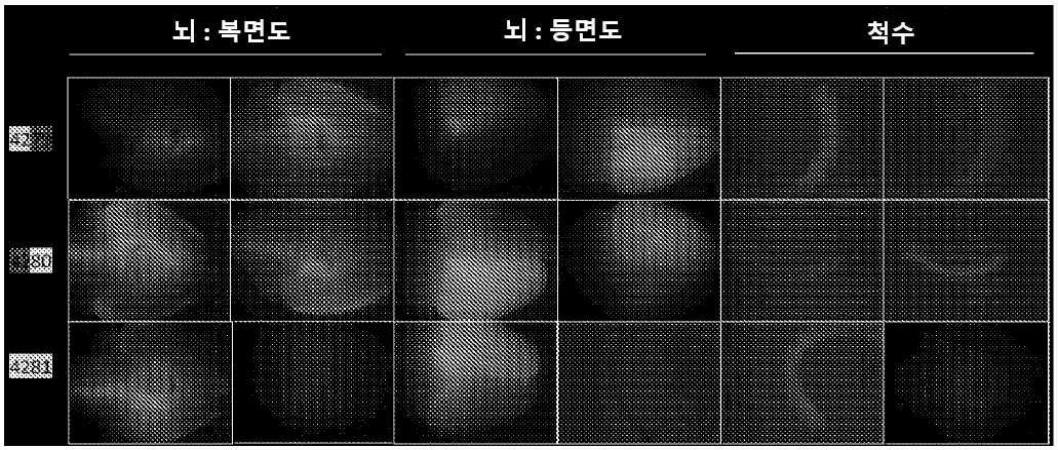
도면26


직접 형광
조가비핵
AAV1THTD.mTFP1
AAV1SSGD.mNS
AAV9KMLS.Halo-tag
AAV2SKGD.mRuby3
merge

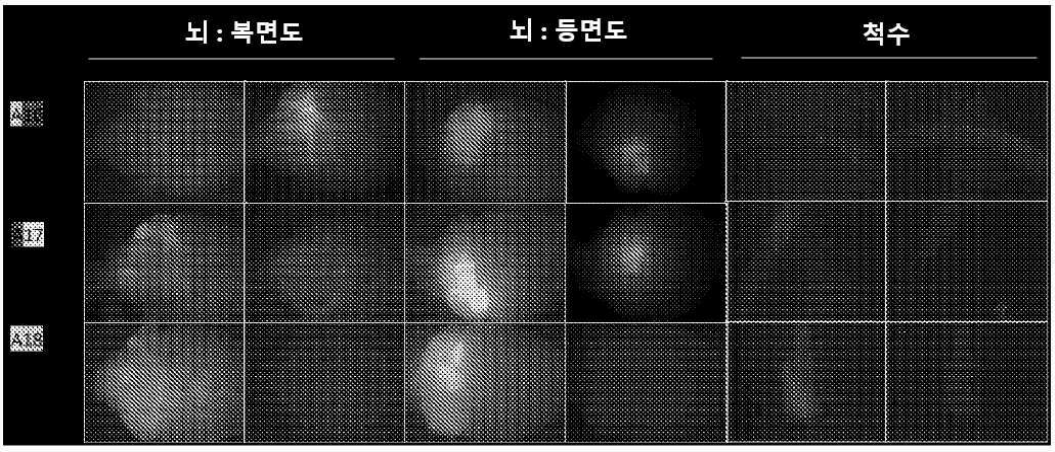
도면27



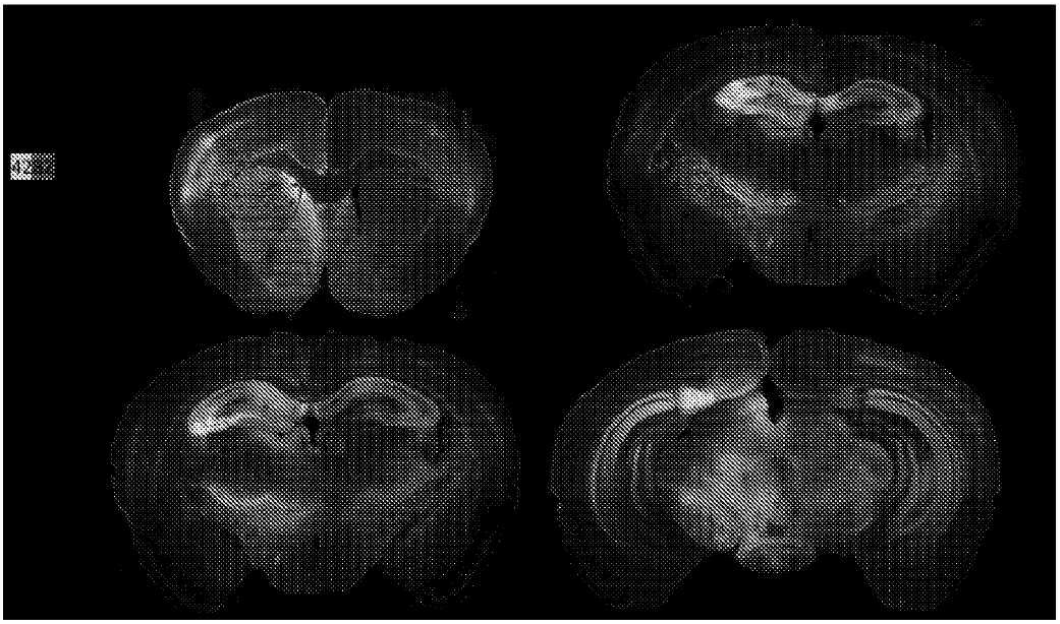
도면28



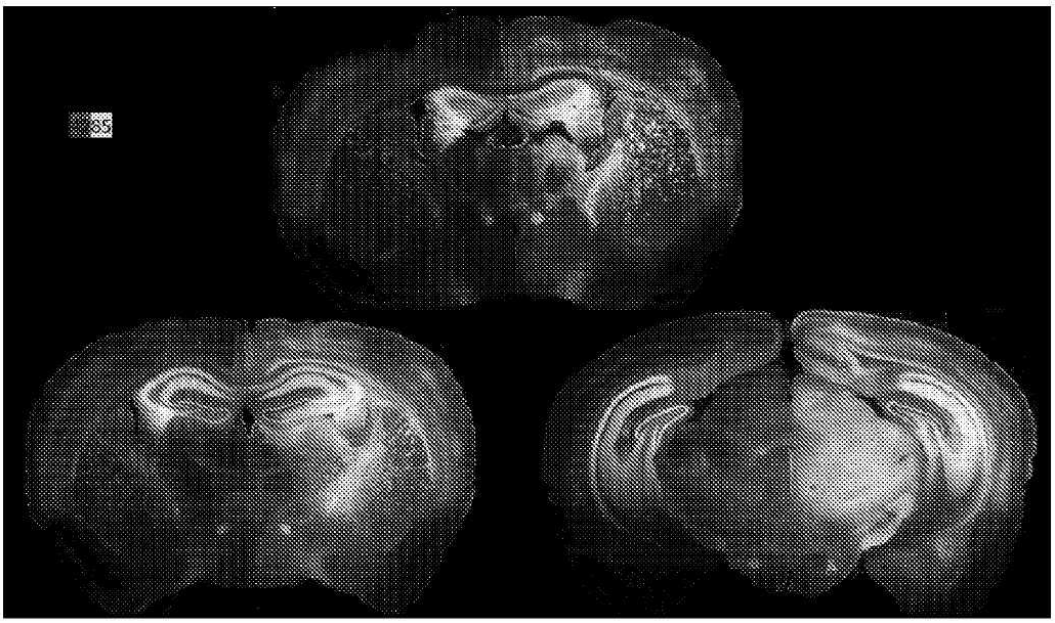
도면29



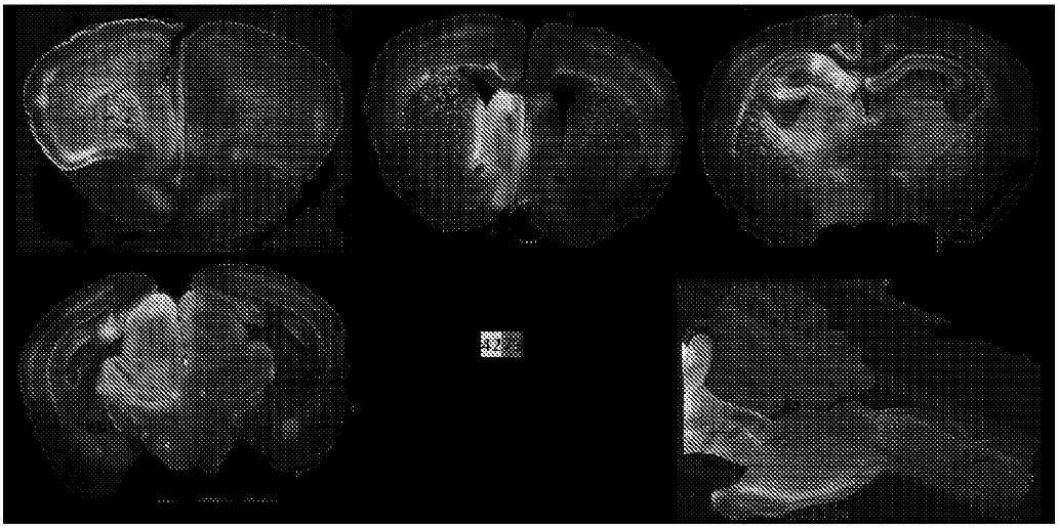
도면30



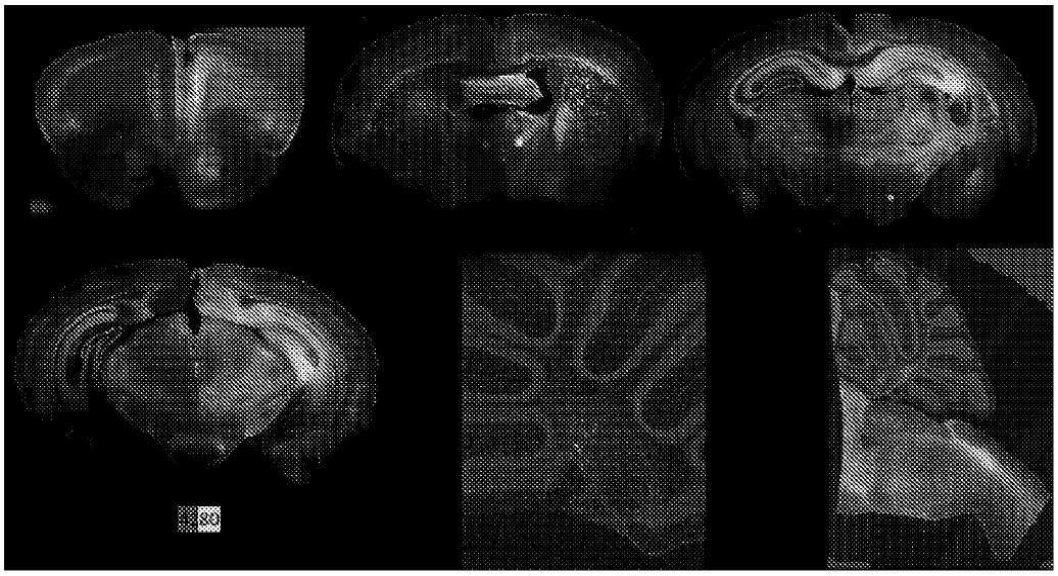
도면31



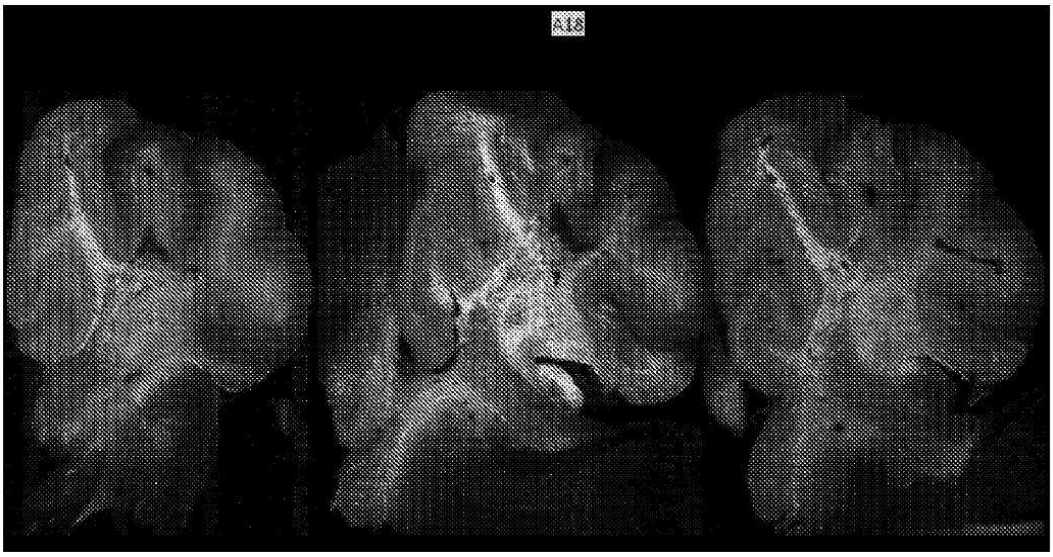
도면32



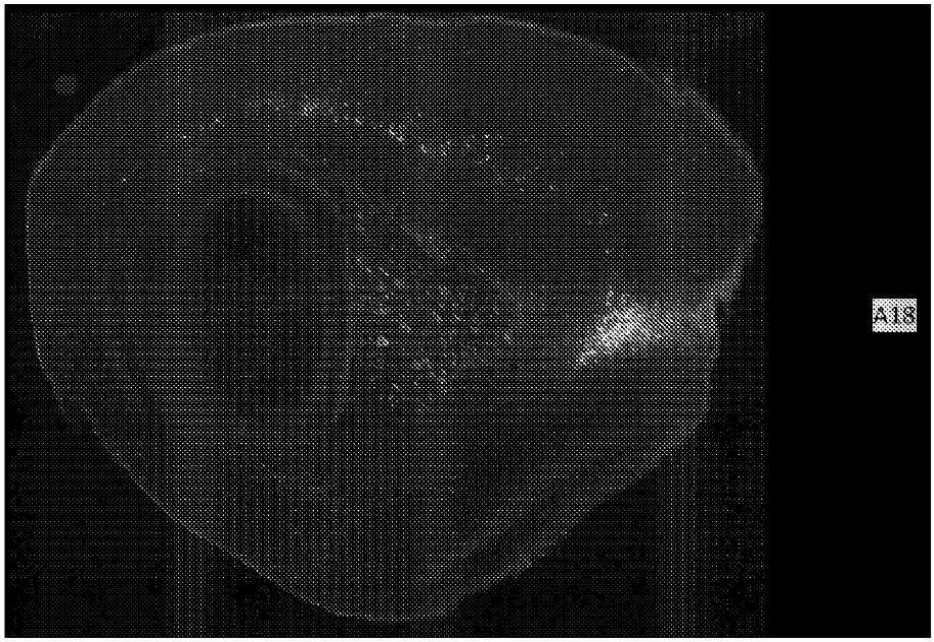
도면33



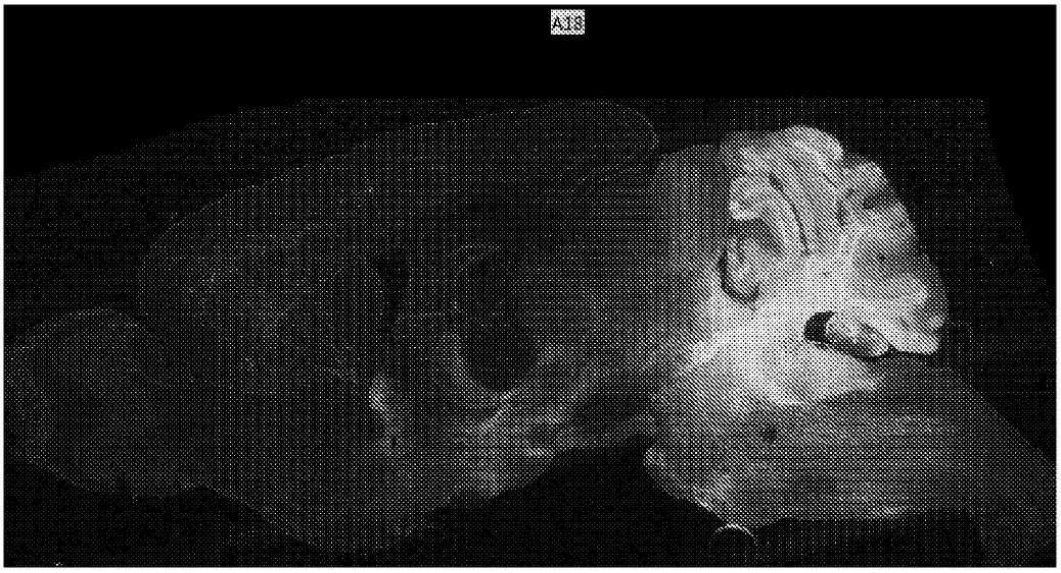
도면34



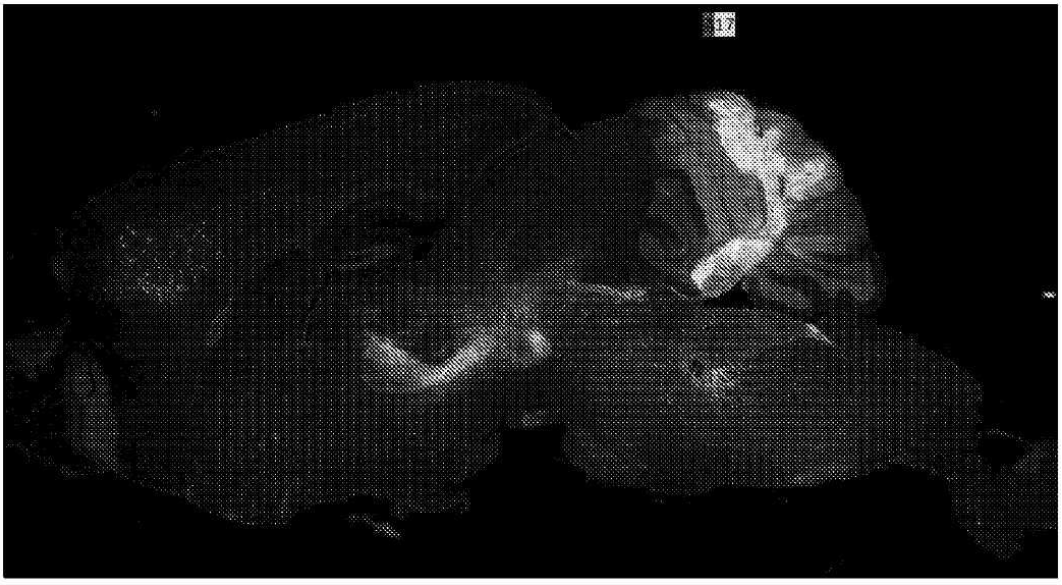
도면35



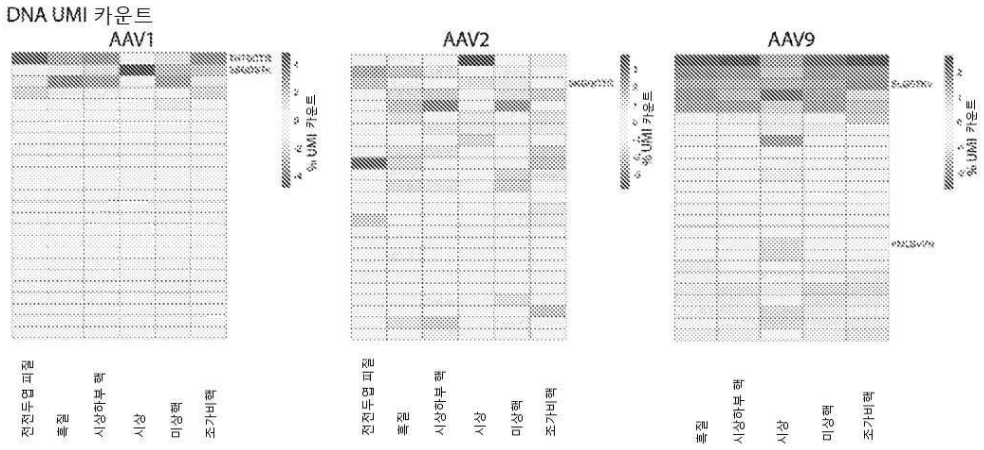
도면36



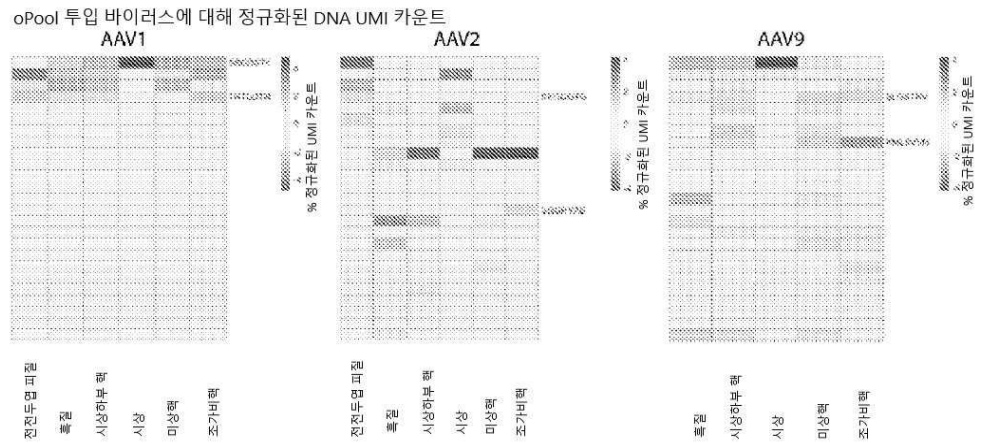
도면37



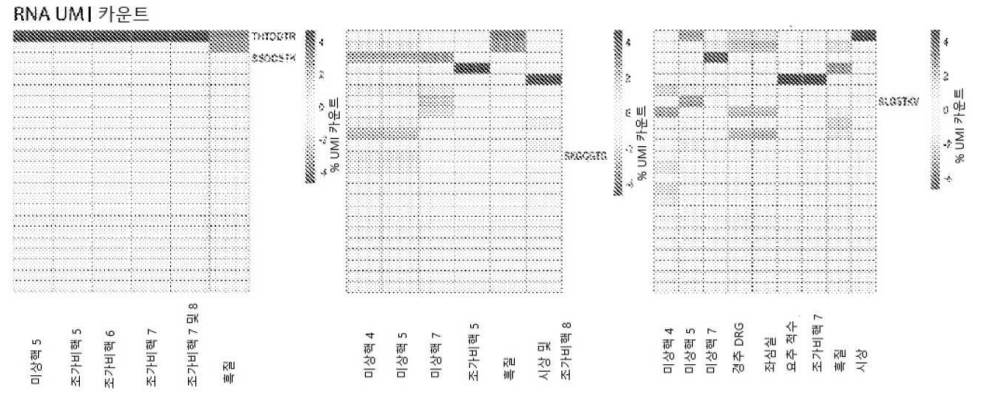
도면38a



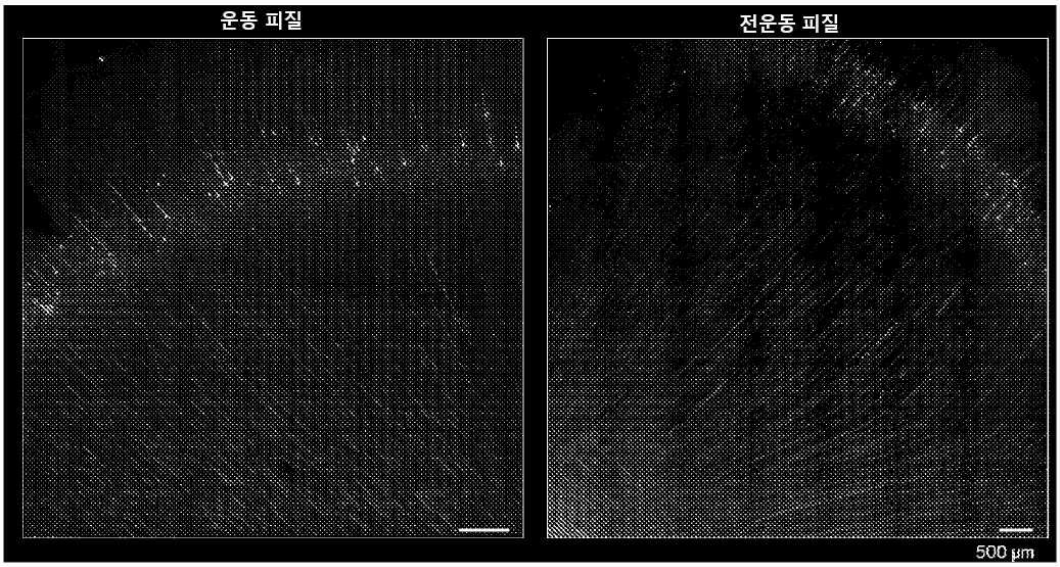
도면38b



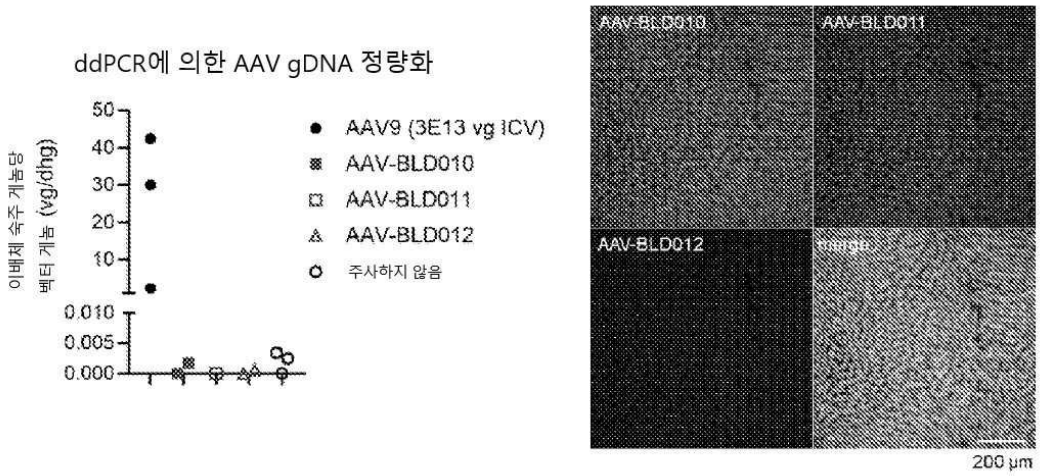
도면38c



도면39


운동 피질
전운동 피질
500 μm

도면40


ddPCR에 의한 AAV gDNA 정량화
이배체 숙주 게놈당
벡터 게놈 (vg/dhg)
50
40
30
20
10
0.010
0.005
0.000
AAV9 (3E13 vg ICV)
AAV-BLD010
AAV-BLD011
AAV-BLD012
주사하지 않음
AAV-BLD010
AAV-BLD011
AAV-BLD012
200 μm

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.