



등록특허 10-2299430



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년09월07일

(11) 등록번호 10-2299430

(24) 등록일자 2021년09월01일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 15/86* (2006.01) *A61K 39/12* (2006.01)  
*A61K 48/00* (2006.01) *A61P 27/02* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 15/86* (2013.01)  
*A61K 39/12* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2020-7021515(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2012년02월21일  
 심사청구일자 2020년08월19일
- (85) 번역문제출일자 2020년07월23일
- (65) 공개번호 10-2020-0092422
- (43) 공개일자 2020년08월03일
- (62) 원출원 특허 10-2013-7024782  
 원출원일자(국제) 2012년02월21일  
 심사청구일자 2017년02월20일
- (86) 국제출원번호 PCT/GB2012/050376
- (87) 국제공개번호 WO 2012/114090  
 국제공개일자 2012년08월30일
- (30) 우선권주장  
 1103062.4 2011년02월22일 영국(GB)
- (56) 선행기술조사문헌  
 W02004084951 A2\*  
 \*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
 옥스포드 유니버시티 이노베이션 리미티드  
 영국 옥스2 0제이비 옥스포드 웨스트 웨이 3 벅  
 스티븐 코트
- (72) 발명자  
 맥클라렌 로버트  
 영국 옥스포드셔 옥스3 9디유 헤딩턴 옥스포드  
 존 래드클리프 호스피탈 웨스트 윙 레벨스 5 & 6  
 너필드 유니버시티 오브 옥스포드 래버러토리 오  
 브 오프셀몰로지 (디파트먼트)
- 시브라 미구엘  
 영국 런던 에스더블유 7 2에이제트 사우쓰 캔징턴  
 캠퍼스 임페리얼 칼리지 런던
- 두링 매튜 존  
 미국 오하이오 43210 콜럼버스 웨스트 12th 에비  
 뉴 460 바이오메디컬 리서치 타워 912 오하이오  
 스테이트 유니버시티 메디컬 센터
- (74) 대리인  
 리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

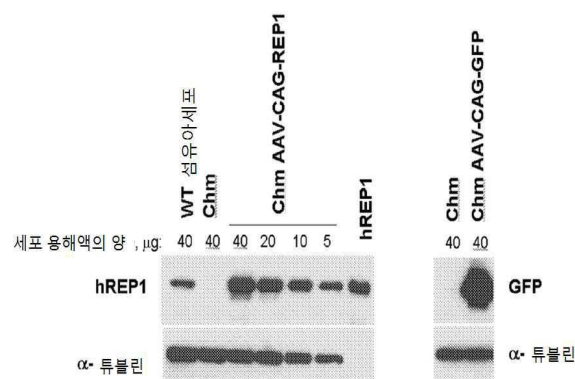
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 범맥락막위축의 유전자 치료에서 사용하기 위한 AAV-벡터

## (57) 요약

본 발명은 범맥락막위축의 치료 또는 예방을 위한 유전자 치료에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61K 48/005** (2013.01)

**A61P 27/02** (2018.01)

*C12N 2750/14143* (2013.01)

*C12N 2750/14171* (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

하기를 포함하는 아데노-관련 바이러스 혈청형 2(AAV2) 벡터:

5' AAV2 역위 말단 반복(inverted terminal repeat: ITR);

사이토메갈로바이러스(cytomegalovirus: CMV) 인핸서;

닭 베타 액틴(chicken beta actin: CBA) 프로모터;

서열번호 3과 97% 이상의 동일성을 갖는 REP1 (Rab escort protein 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 CBA 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 폴리뉴클레오티드 서열;

우드척 간염 후조절 요소(woodchuck hepatitis postregulatory element: WPRE);

소 성장 호르몬의 폴리아데닐화 서열(bGH polyA); 및

3' AAV2 ITR.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 2와 70% 이상의 상동성을 갖는 것인 벡터.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 CBA 프로모터는 구성적으로 활성화된(constitutively active) 것인 벡터.

#### 청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 프로모터로부터의 발현이 망막-세포 특이적인 것인 벡터.

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 WPRE가 서열번호 5와 70% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인 벡터.

#### 청구항 6

5' AAV2 역위 말단 반복(ITR);

사이토메갈로바이러스(CMV) 인핸서;

닭 베타 액틴(CBA) 프로모터;

서열번호 3과 97% 이상의 동일성을 갖는 REP1 (Rab escort protein 1) 폴리펩티드를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열로서, 상기 폴리뉴클레오티드는 상기 CBA 프로모터에 작동 가능하게 연결된 것인 폴리뉴클레오티드 서열;

우드척 간염 후조절 요소(WPRE);

소 성장 호르몬의 폴리아데닐화 서열(bGH polyA); 및

3' AAV2 ITR 를

포함하는 아데노-관련 바이러스 혈청형 2(AAV2) 벡터를 포함하는 조성물로서, 상기 조성물은 밀리리터 당 상기 AAV2 벡터를  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{13}$ 의 게놈 입자(gp/ml)로 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 조성물은 상기 AAV2 벡터를  $1.0 \times 10^{11}$  gp/ml로 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 2와 70% 이상의 상동성을 갖는 것인 조성물.

#### 청구항 9

청구항 6에 있어서, 상기 CBA 프로모터는 구성적으로 활성화된(constitutively active) 것인 조성물.

#### 청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 프로모터로부터의 발현이 망막-세포 특이적인 것인 조성물.

#### 청구항 11

청구항 6에 있어서, 상기 WPRE가 서열번호 5와 70% 이상의 상동성을 갖는 서열을 포함하는 것인 조성물.

#### 청구항 12

청구항 1 내지 11 중 어느 한 항에 따른 벡터 또는 조성물의 치료학적으로 유효한 양을 포함하는, 이를 필요로 하는 환자에서 범맥락막위축(choroideremia)을 치료 또는 예방하기 위한 약학적 조성물로서, 상기 벡터는 직접 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체 내 주사에 의해 투여되는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 13

청구항 12에 있어서, 상기 약학적 조성물은 종점(endpoint)을 포함하여, 상기 벡터를 밀리미터(mL) 당  $1 \times 10^{10}$  내지  $1 \times 10^{13}$  게놈 입자(gp)로 포함하거나 이로 구성된 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 14

청구항 12에 있어서, 상기 조성물은 상기 벡터를  $1 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  또는  $1 \times 10^{13}$  gp/mL로 포함하거나 그로 구성되는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 15

청구항 12에 있어서, 액체 캐리어를 더 포함하는 것인 약학적 조성물.

#### 청구항 16

청구항 12에 있어서, 상기 벡터는 mL 당  $1 \times 10^{12}$  gp의 농도로 존재하고, 상기 상기 약학적 조성물은 액체 캐리어를 더 포함하고, 상기 약학적 조성물은 망막하 공간으로 직접 투여되는 것인 약학적 조성물.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 범맥락막위축의 치료 또는 예방을 위한 유전자 치료에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 범맥락막위축은 안구의 맥락막, 망막 색소 상피 및 광수용체의 희귀한 X염색체 연관 진행성 변성이다. 남성 환자에서 전형적인 자연적 병력(history)은 십대에 야맹증이 발병하고, 그 후 20대 및 30대에 주변시력(peripheral vision)의 손실이 진행되며 40대에 완전한 실명에 이르게 되는 것이다. 여성 보인자들은 가벼운 증상, 가장 현저하게는 야맹증을 가지나, 때때로 더 심각한 표현형을 가질 수 있다.

[0003] 이 질병은 X 염색체 21q 영역(region)에 위치한 REP1 유전자(Rab escort protein 1)의 돌연변이에 의해 유발된다. 체내의 대부분의 세포에서, REP1과 75% 상동인 REP2 단백질이 REP1 결핍을 보완한다. 그러나 안구에서는, 아직 명확하지 않은 이유로, REP2가 REP1 결핍을 보완하지 못한다. 따라서 안구에서는, REP 폴리펩티드 활성이 표적 단백질(Rab GTPase)의 정상적인 프레닐화(prenylation)를 유지하기에 불충분하여, 주로 외부 망막 및 맥락막에 영향을 미치는, 세포의 기능장애 및 궁극적으로는 세포사를 초래한다.

[0004] 범맥락막위축에 대한 치료법은 없고, 치료전략을 평가하기 위한 모델도 부족하다. 이러한 치료의 제공에 대한 요구가 있다.

## 발명의 내용

### [0006] 발명의 요약

[0007] 본 발명은 범맥락막위축의 유전자 치료에 사용될 수 있는 벡터, 및 이 벡터를 사용한, 이 질환의 예방 또는 치료 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 범맥락막위축의 예방 또는 치료 방법에서 벡터의 용도에 관한 것이다.

[0008] 본 발명의 벡터는 바이러스 벡터이고, 구체적으로 아데노-관련 바이러스(adeno-associated virus, AAV)의 게놈(genome)에 기초한 바이러스 벡터이다. 이 벡터는 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 서열을 포함하고, 따라서 표적 세포에서 REP1 기능이 발현되게 한다. 본 발명의 방법과 용도는 구체적으로, 범맥락막위축의 치료 또는 예방을 위하여 직접 망막(direct retinal) 주사, 망막하(subretinal) 주사, 또는 유리체내(intravitreal) 주사에 의하여 환자에게 벡터를 투여하는 것을 포함한다.

[0009] 따라서, 본 발명은 아데노-관련 바이러스(AAV) 게놈 또는 그의 유도체 및 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공한다. 본 발명은 또한 범맥락막위축의 치료 또는 예방이 필요한 환자에게, 직접 망막 주사, 망막하 주사, 또는 유리체 내 주사에 의하여 선행하는 청구항 중 어느 한 항에 따른 벡터의 치료 유효량을 투여하고, 그에 의해 상기 환자에서 범맥락막위축을 치료 또는 예방하는 단계를 포함하는, 범맥락막위축의 치료 또는 예방 방법을 제공한다. 본 발명은 추가적으로 직접 망막 주사, 망막하 주사, 유리체 내 주사에 의하여 환자에게 본 발명의 벡터를 투여하여 범맥락막위축을 치료 또는 예방하는 방법에 사용하기 위한 본 발명의 벡터를 제공한다.

## 도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 AAV.REP1(AAV-CAG-REP1)벡터가 범맥락막위축(Chm) 환자로부터 단리된(isolated) 인간 섬유아세포(fibroblast)에 효율적으로 형질도입될 수 있다는 것을 보여준다. 인간 REP1 단백질(hREP1)의 발현의 상대적 수준은, 서로 다른 농도의 세포 용해액(cell lysate)에서 hREP1의 양을 비교하여 AAV2.REP1 벡터의 활성을 정량할 수 있는, 웨스턴 블랏(Western blot)에 의하여 비교된다. 표시(labeling)와 관련하여, CAG는 CMV 인핸서(enhancer) 프로모터(promoter) 서열을 갖는 닭 베타 액틴(Chicken beta Actin)이고 - 다양한 출판물과 본 명세서의 일부분에서 'CBA'로 호환적으로 지칭될 수 있다.

웨스턴 블랏은 로딩 대조군(loading control)인 REP1(상부 패널) 및 알파-튜블린(하부 패널)에 대해 왼쪽 패널에 표시된다. 레인 1: 대조군 야생형(WT) 섬유아세포의 40 $\mu$ g 세포 용해액. 레인 2: Chm 섬유아세포의 40 $\mu$ g 세포 용해액. 레인 3 - 6: AAV2.REP1 벡터가 형질도입된 Chm 섬유아세포의 40, 20, 10 및 5 $\mu$ g 세포 용해액. 레인 7: 인간 REP1 재조합 단백질. 5 $\mu$ g 용해액 hREP1 밴드는 40 $\mu$ g WT 섬유아세포 용해액과 유사한 밀도를 갖기 때문에, AAV2.REP1 벡터에 의해 달성된 hREP1의 수준은 이러한 조건에서 일반 야생형 수준의 8배(40/5) 이상을 달성할 수 있다.

이 측정법에서 프로모터 및 기타 비-REP1 서열에 대한 양성 대조군(positive control)으로서, REP1 대신에 녹색 형광 단백질(GFP)을 발현시키는 대조군 AAV 벡터(AAV-CAG-GFP)의 결과도 표시된다.

웨스턴 블랏은 로딩 대조군(loading control)인 GFP(상부 패널) 및 알파-튜블린(하부 패널)에 대해 오른쪽 패널에 표시된다. 레인 1: 야생형(WT) 섬유아세포의 40 $\mu$ g 세포 용해액. 레인 2: AAV2.GFP1 벡터가 형질도입된 Chm 섬유아세포(AAV-CAG-REP1)의 40 $\mu$ g 세포 용해액. 표시된 GFP의 높은 수준이 범맥락막위축 환자의 경우에서와 같이, REP1 활성이 결핍된 인간 세포의 형질도입에서 이 벡터 발현 카세트의 효율성을 확인한다.

도 2는 WT 인간 섬유아세포(왼쪽에서 첫 번째 컬럼(column)-밝은 회색), Chm 섬유아세포(두 번째 컬럼-진한 회색), AAV-CAG-GFP 벡터가 형질 도입된 Chm 섬유아세포(세 번째 컬럼-백색, 음성 대조군) 및 AAV-CAG-REP1에 형질도입된 Chm 섬유아세포(네 번째 컬럼-백색)에서 프레닐화 활성의 평가를 보여준다. Y 축은 전달된 방사성 표지 기질 [3H] GGPP 기질의 양을 pmol로 보여주고, 이는 프레닐화, REP1 기능의 척도이다. 컬럼은 표준편차로서 오차 막대를 보여준다(각 컬럼에 대해 n=4). [3H]-GGPP의 수준은 단백질 추출물 10mg 중에서 측정되었다. 왼쪽에서 네 번째 청록색 컬럼은 프레닐화의 기능이 AAV.REP1 벡터의 형질도입 후, 야생형 수준 및 그 이상으로 회복된다는 것을 확인한다. 이는 도 1에서 웨스턴 블랏에 의해 검출된 REP1 단백질이 예상된 기능을 갖는다는 것을 확

인한다.

도 3은 AAV 벡터가 마우스 모델에서 망막하(subretinal) 주사 후 외망막(outer retinal)(광수용체 및 맥락막) 세포에 대한 정확한 유주활성(tropism)을 가짐을 보여준다. 오른쪽 패널은 마우스의 안구에서 AAV2.CBA.GFP.WPRE.BGH 벡터의 망막하 주사 후 외핵층(ONL) 및 망막 색소 상피(RPE)의 광수용체에서 녹색 형광 단백질(GFP) 마커(화살표)의 적절한 발현을 보여준다. 왼쪽 패널은 같은 이미지의 회색조를 보여준다. 이는 AAV2.CBA.WPRE.BGH 조절 서열(regulatory sequence)이 범맥락막위축 환자에서 표적화 되어야 하는 망막세포에서 높은 효율로 전이유전자(transgene)를 발현시킬 수 있다는 것을 입증한다.

도 4는 AAV.REP1 벡터는 고용량에서 마우스 망막의 외망막 기능에 부정적인 영향을 미치지 않음을 보여준다. 마우스의 망막하 공간에 고용량(n=5) 또는 저용량(n=4)의 AAV.REP1 벡터를 2 X 1 마이크로리터 망막하 주사 후 6 개월간 망막전위도(ERG)를 측정된 독성연구결과가 표시된다. 저용량은 ml 당  $1 \times 10^{11}$  게놈 입자(genome particle, gp) 및 고용량은 ml 당  $1 \times 10^{12}$  gp 이다(인간 임상 시험의 시작 용량은 ml 당  $1 \times 10^{11}$  gp이다). AAV.GFP 벡터는 동일한 발현 카세트를 가지며 또한 대조군으로서 역할을 위하여 주사 전에 동일한 용량으로 희석된다. Y 축은 암순응(어둠 적응) 간상체 반응을 초과하고 명순응 반응 미만의 밝기(추상체의 광수용체도 포함)의 범위에서 증가하는 섬광 강도에서 ERG 기록(trace)을 보여준다. 모든 지점에서 기록은 고용량 및 저용량 AAV.REP1 노출 후 유사한 ERG 진폭을 보여준다. 고용량군에서 상응하는 GFP 진폭은 약간 감소되고, 높은 수준에서 GFP의 망막 기능에 대한 알려진 한계 효과(marginal effect)와 일치한다. 이 GFP 효과는 또한 본 시험의 민감도를 확인하기 위한 양성 대조군의 역할을 한다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

#### 서열의 설명

서열번호 1은 AAV2 게놈에 대한 DNA 서열이다.

서열번호 2는 인간 Rep-1 단백질, 전사 변이체(transcript variant) 1을 코딩하는 DNA 서열이다.

서열번호 3은 인간 Rep-1 단백질, 전사 변이체 1에 대한 아미노산 서열이다.

서열번호 4는 5'UTR의 일부를 포함한, 인간 Rep-1 단백질, 전사 변이체 1을 코딩하는 DNA 서열이다.

서열번호 5는 우드척 간염 후조절 요소(woodchuck hepatitis postregulatory element, WPRE)에 대한 DNA 서열이다.

서열번호 6은 닭 베타 액틴(CBA) 프로모터에 대한 DNA 서열이다.

서열번호 7은 소 성장 호르몬의 폴리아데닐화 부위(bGH polyA)에 대한 DNA 서열이다.

서열번호 8은 AAV2의 5' 역위 말단 반복(5'inverted terminal repeat, ITR)에 대한 DNA 서열이다.

서열번호 9는 AAV2의 3' ITR에 대한 DNA 서열이다.

#### 발명의 상세한 설명

본 발명은 범맥락막위축의 치료법을 제공한다. 이는 REP1 기능을 회복하기 위하여 전이유전자를 전달하는 유전적 구조물(construct)을 이용한, 범맥락막위축에 대한 유전자 치료 접근법(approach)을 기초로 한다. 유전적 구조물은 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 아데노-관련 바이러스(AAV) 게놈에 기반한 벡터이다. 이 폴리뉴클레오티드 서열은 본 명세서에서 또한 "전이유전자 (transgene)"로 지칭한다. 본 발명자들은 범맥락막위축 치료의 전략을 평가하는 모델을 수립하고, 놀랍게도 범맥락막위축에 내재하는 세포 기능 장애를 표적화하기 위한 본 발명의 벡터의 용도를 입증하였다.

#### 벡터

##### AAV 게놈

본 발명의 벡터는 먼저 아데노-관련 바이러스(AAV) 게놈 또는 그들의 유도체를 포함한다.

AAV 게놈은 AAV 바이러스 입자의 생산에 필요한 기능을 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열이다. 이러한 기능은 AAV 바이러스 입자로의 AAV 게놈의 캡시드화(encapsidation)를 포함한, 숙주 세포 중 AAV에 대한 복제 및 패키징(packaging) 사이클에서 작동하는 기능들을 포함한다. 천연 AAV 바이러스는 복제능력이 결핍되어 있고 복제



및 패키징 사이클의 완료를 위해 트랜스(*trans*)로 헬퍼 기능의 제공에 의존한다. 따라서, 본 발명의 벡터의 AAV 게놈은 일반적으로 복제능력이 결핍되어 있다.

- [0031] AAV 게놈은 양성 또는 음성 센스(positive or negative-sense), 단일-가닥 형태 또는 이중-가닥 형태일 수 있다. 이중-가닥 형태의 사용은 표적 세포에서 DNA 복제 단계의 우회를 가능하게 하고, 따라서 전이유전자의 발현을 가속화할 수 있다.
- [0032] AAV 게놈은 AAV의 천연 유래 혈청형 또는 단리체(isolate) 또는 계통군(clade)으로부터 유래 될 수 있다. 따라서, AAV 게놈은 천연 AAV 바이러스의 전체 게놈일 수 있다. 통상의 기술자에게 알려진 바와 같이, 자연 발생 AAV 바이러스는 다양한 생물학적 시스템에 따라 분류될 수 있다.
- [0033] 일반적으로, AAV 바이러스는 그들의 혈청형에 따라 지칭된다. 혈청형은 자신의 캡시드 표면 항원의 발현 프로파일 때문에 다른 변이체 아종과 구별하는데 사용될 수 있는 독특한 반응성을 갖는 AAV의 변이체 아종(variant subspecies)에 해당한다. 일반적으로, 특정 AAV 혈청형을 가지는 바이러스는 다른 AAV 혈청형에 특이적인 중화 항체와 교차-반응이 효율적으로 일어나지 않는다. AAV 혈청형은 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 및 AAV11을 포함하고, 또한 최근 영장류의 뇌에서 확인된 Rec2 및 Rec3과 같은 재조합 혈청형도 포함한다.
- [0034] 본 발명에 사용하기 위한 AAV의 바람직한 혈청형은 AAV2이다. AAV2 게놈은 서열번호 1의 서열을 가질 수 있다. 본 발명에 사용하기 위해 특히 관심 있는 다른 혈청형은 망막 색소 상피와 같은 안구 내 조직에 효율적으로 형질도입되는 AAV4, AAV5 및 AAV8을 포함한다. 사용되는 AAV의 혈청형은 AAV4가 아닌 AAV 혈청형일 수 있다. AAV 혈청형의 리뷰는 Choi 등(*Curr Gene Ther.* 2005;5(3);299-310) 및 Wu 등(*Molecular Therapy*;14(3),316-327)에서 찾을 수 있다. 본 발명에 사용하는 ITR 서열, rep 또는 cap 유전자를 포함한, AAV 게놈 서열 또는 AAV 게놈의 요소(element)의 서열은 하기의 AAV 전체 게놈 서열의 등록 번호(accession number)에서 유래 될 수 있다: 아데노-관련 바이러스 1 NC\_002077, AF063497; 아데노-관련 바이러스 2 NC\_001401; 아데노-관련 바이러스 3 NC\_001729; 아데노-관련 바이러스 3B NC\_001863; 아데노-관련 바이러스 4 NC\_001829; 아데노-관련 바이러스 5 Y18065, AF085716; 아데노-관련 바이러스 6 NC\_001862; 조류(Avian) AAV ATCC VR-865 AY186198, AY629583, NC\_004828; 조류 AAV 스트레인 DA-1 NC\_006263, AY629583; 소(Bovine) AAV NC\_005889, AY388617.
- [0035] AAV 바이러스는 또한 계통군 또는 클론의 측면에서 지칭된다. 이는 천연 유래 AAV 바이러스의 계통발생학적 관계, 및 일반적으로 공통 조상으로 거슬러 올라갈 수 있는 AAV 바이러스의 계통발생학적 군을 나타내며, 그의 모든 자손을 포함한다. 또한, AAV 바이러스는 자연에서 찾을 수 있는 특정한 AAV 바이러스의 유전적 단리체(isolate) 같은 특정한 단리체에 따라 지칭될 수도 있다. 용어 유전적 단리체(genetic isolate)는 다른 천연 AAV 바이러스와 제한적인 유전자 혼합(genetic mixing)이 일어나서, 그에 의해 유전자 수준에서 인식가능하게 구별되는 별개의 집단(population)을 정의하는, AAV 바이러스 집단을 기술한다.
- [0036] 본 발명에서 사용될 수 있는 AAV의 계통군 및 단리체의 실시예는 하기를 포함한다:
- [0037] 계통군 A: AAV1 NC\_002077, AF063497, AAV6 NC\_001862, Hu. 48 AY530611, Hu 43 AY530606, Hu 44 AY530607, Hu 46 AY530609
- [0038] 계통군 B: Hu. 19 AY530584, Hu. 20 AY530586, Hu 23 AY530589, Hu22 AY530588, Hu24 AY530590, Hu21 AY530587, Hu27 AY530592, Hu28 AY530593, Hu 29 AY530594, Hu63 AY530624, Hu64 AY530625, Hu13 AY530578, Hu56 AY530618, Hu57 AY530619, Hu49 AY530612, Hu58 AY530620, Hu34 AY530598, Hu35 AY530599, AAV2 NC\_001401, Hu45 AY530608, Hu47 AY530610, Hu51 AY530613, Hu52 AY530614, Hu T41 AY695378, Hu S17 AY695376, Hu T88 AY695375, Hu T71 AY695374, Hu T70 AY695373, Hu T40 AY695372, Hu T32 AY695371, Hu T17 AY695370, Hu LG15 AY695377,
- [0039] 계통군 C: Hu9 AY530629, Hu10 AY530576, Hu11 AY530577, Hu53 AY530615, Hu55 AY530617, Hu54 AY530616, Hu7 AY530628, Hu18 AY530583, Hu15 AY530580, Hu16 AY530581, Hu25 AY530591, Hu60 AY530622, Ch5 AY243021, Hu3 AY530595, Hu1 AY530575, Hu4 AY530602 Hu2, AY530585, Hu61 AY530623
- [0040] 계통군 D: Rh62 AY530573, Rh48 AY530561, Rh54 AY530567, Rh55 AY530568, Cy2 AY243020, AAV7 AF513851, Rh35 AY243000, Rh37 AY242998, Rh36 AY242999, Cy6 AY243016, Cy4 AY243018, Cy3 AY243019, Cy5 AY243017, Rh13 AY243013
- [0041] 계통군 E: Rh38 AY530558, Hu66 AY530626, Hu42 AY530605, Hu67 AY530627, Hu40 AY530603, Hu41 AY530604,

Hu37 AY530600, Rh40 AY530559, Rh2 AY243007, Bb1 AY243023, Bb2 AY243022, Rh10 AY243015, Hu17 AY530582, Hu6 AY530621, Rh25 AY530557, Pi2 AY530554, Pi1 AY530553, Pi3 AY530555, Rh57 AY530569, Rh50 AY530563, Rh49 AY530562, Hu39 AY530601, Rh58 AY530570, Rh61 AY530572, Rh52 AY530565, Rh53 AY530566, Rh51 AY530564, Rh64 AY530574, Rh43 AY530560, AAV8 AF513852, Rh8 AY242997, Rh1 AY530556

[0042] 계통군 F: Hu14 (AAV9) AY530579, Hu31 AY530596, Hu32 AY530597, 클론 단리체(clonal Isolate) AAV5 Y18065, AF085716, AAV 3 NC\_001729, AAV 3B NC\_001863, AAV4 NC\_001829, Rh34 AY243001, Rh33 AY243002, Rh32 AY243003/

[0043] 당업자는 그들의 공통된 일반적인 지식에 기초하여 본 발명에 사용하기 위한 AAV의 적절한 혈청형, 계통군, 클론 또는 단리체를 선택할 수 있다. 예를 들어, 유전적 색각 이상(color vision defect)의 성공적인 교정에 의해 입증된 바와 같이 AAV5 캡시드는 영장류 추상체 광수용체에 효율적으로 혈청도입되는 것으로 확인되었다(mancuso 등., Nature 2009, 461:784-7).

[0044] 그러나, 본 발명은 또한 아직 확인 또는 규명되지 않았을 수 있는 다른 혈청형의 AAV 게놈의 사용을 포함하는 것으로 이해되어야 한다. AAV 혈청형은 AAV 바이러스의 감염(또는 유주활성)의 조직 특이성을 결정한다. 따라서, 본 발명에 따라 환자에게 투여되는 AAV 바이러스에 사용하기 바람직한 AAV 혈청형은 범백막위축의 변성된 망막 내 표적 세포에 대한 자연적 유주활성을 갖거나 높은 감염 효율을 갖는 혈청형이다. 따라서, 환자에게 투여되는 AAV 바이러스에 사용하기에 바람직한 AAV 혈청형은 망막내 시신경(neurosensory retina) 및 망막 색소 상피(retinal pigment epithelium)의 세포를 감염시키는 AAV 혈청형이다.

[0045] 일반적으로, AAV의 천연유래 혈청형 또는 단리체 또는 계통군의 AAV 게놈은 하나 이상의 역위 말단 반복 서열(ITR)을 포함한다. ITR 서열은 시스(*cis*) 위치에서 기능적 복제기점을 제공하는 역할을 하고, 세포의 게놈으로부터 벡터의 융합 및 그로부터의 절단을 가능하게 한다. 바람직한 구체예에서, 하나 이상의 ITR 서열은 Rep-1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드 서열을 플랭킹(f flank) 한다. 바람직한 ITR 서열은 서열번호 8 및 9 및 그의 변이체를 포함하는, AAV2의 ITR 서열이다. AAV 게놈은 또한 일반적으로 AAV 바이러스 입자를 위한 패키징 기능을 코딩하는 *rep* 및/또는 *cap* 유전자와 같은 패키징 유전자를 포함한다. *rep* 유전자는 Rep78, Rep68, Rep52 및 Rep40 또는 그의 변이체 단백질 중 하나 이상을 코딩한다. *cap* 유전자는 VP1, VP2 및 VP3 또는 그의 변이체와 같은 하나 이상의 캡시드 단백질을 코딩한다. 이러한 단백질이 AAV 바이러스 입자의 캡시드를 구성한다. 캡시드의 변이체는 하기에서 설명한다.

[0046] 프로모터는 각 패키징 유전자에 작동 가능하게 연결된다. 이러한 프로모터의 구체적인 예는 p5, p19 및 p40 프로모터를 포함한다(Laughlin 등, 1979, PNAS, 76:5567-5571). 예를 들면, p40 프로모터는 일반적으로 *cap* 유전자를 발현시키는데 이용되는 반면, p5 및 p19 프로모터는 일반적으로 *rep* 유전자를 발현시키는데 이용된다.

[0047] 앞서 검토된 바와 같이, 본 발명의 벡터에 사용되는 AAV 게놈은 따라서 천연 AAV 바이러스의 전체 게놈일 수 있다. 예를 들면, 전체 AAV 게놈을 포함하는 벡터가 인 비트로(*in vitro*)에서 AAV 바이러스를 제조하는데 사용될 수 있다. 그러나, 이러한 벡터는 원칙적으로 환자에게 투여될 수는 있지만, 실제 임상에서는 드물게 이루어질 것이다. 바람직하게는, AAV 게놈은 환자에게 투여하기 위한 목적으로 유도체화(derivatise)된다. 이러한 유도체화(derivatisation)는 당 업계의 표준이며 본 발명은 AAV 게놈의 공지된 유도체, 및 당 업계에 알려진 기법을 적용하여 생성될 수 있는 유도체의 이용을 포함한다. AAV 게놈의 유도체화 및 AAV 캡시드의 유도체화는 Coura 및 Nardi(Virology Journal, 2007, 4:99), 앞서 인용된 Choi 등 및 Wu 등에서 검토된다.

[0048] AAV 게놈의 유도체는 생체 내에서(*in vivo*) 본 발명의 벡터에서 Rep-1 전이유전자의 발현을 가능하게 하는 AAV 게놈의 절단된 또는 변형된 형태를 포함한다. 일반적으로, AAV 게놈을 최소한의 바이러스 서열을 포함하나, 전술된 기능을 유지하도록 상당히 절단할 수 있다. 이는 벡터와 야생형 바이러스의 재조합 리스크를 감소시키고, 또한 표적 세포에서 바이러스 유전자 단백질의 존재에 의한 세포 면역 반응을 유발하는 것을 피하기 위한 안전성 이유로 바람직하다.

[0049] 일반적으로, 유도체는 하나 이상의 역위 말단 반복 서열(ITR)을 포함하며, 바람직하게는 2개 이상의 ITR과 같이 하나를 초과하는 ITR을 포함한다. 하나 이상의 ITR은 서로 다른 혈청형을 갖는 AAV 게놈으로부터 유래하거나, 키메라(chimeric) 또는 돌연변이 ITR일 수 있다. 바람직한 돌연변이 ITR은 *trs*(terminal resolution site)의 결실(deletion)을 갖는 ITR이다. 이 결실은 코딩 및 상보적 서열을 모두 포함하는 단일-가닥 게놈, 즉 자기-상보적(self-complementary) AAV 게놈을 생성하기 위한 게놈의 지속적 복제를 가능하게 한다. 이는 표적 세포에서 DNA 복제의 우회를 가능하게 하고, 따라서 전이유전자의 발현을 가속화시킬 수 있다.



- [0050] 하나 이상의 ITR은 바람직하게는 양 말단에서 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 플랭킹한다. 하나 이상의 ITR의 포함은, 예를 들면 숙주 세포 DNA 중합효소의 작용에 의하여 단일-가닥 벡터 DNA가 이중-가닥 DNA로 전환시킨 후, 숙주세포의 핵에서 본 발명의 벡터의 직렬연쇄체(concatamer) 형성을 보조하기 위해 바람직하다. 이러한 에피솜 직렬연쇄체의 형성은 숙주 세포의 수명 동안 벡터 구조물을 보호하고, 그에 의해 생체 내(*in vivo*)에서 전이유전자가 지속적으로 발현되게 할 수 있게 한다.
- [0051] 바람직한 구체예에서, ITR 요소는 유도체에서 원시(native) AAV 게놈으로부터 유지되는 유일한 서열일 것이다. 따라서, 유도체는 바람직하게는 원시 게놈의 rep 및/또는 cap 유전자 및 원시 게놈의 다른 어떤 서열을 포함하지 않을 것이다. 이것이 전술된 이유 때문에 바람직하고, 또한 숙주세포 게놈으로 벡터가 융합되는 가능성을 감소시킨다. 또한, AAV 게놈의 크기를 감소시키는 것은 전이유전자 이외에도 벡터 내에 다른 서열 요소(예를 들면 조절 요소)를 포함(incorporating)시키는데 있어서 유연성을 증가시킬 수 있게 한다.
- [0052] 서열번호 1의 AAV2 게놈에 대해, 하기의 부분은 따라서 본 발명의 유도체에서 제거될 수 있다: 하나의 역위 말단 반복(ITR) 서열, 복제(rep) 및 캡시드(cap) 유전자(NB: 야생형 AAV 게놈의 rep 유전자는 범백락막위축에 영향을 주는 인간 유전자, REP1과 혼동되어서는 안된다). 그러나, 인 비트로(*in vitro*) 구체예를 포함한, 일부 구체예에서, 유도체는 추가적으로 하나 이상의 rep 및 /또는 cap 유전자 또는 AAV 게놈의 다른 바이러스 서열을 포함할 수 있다. 천연 AAV 바이러스는 19번 인간 염색체상 특정한 부위에서 높은 빈도로 통합(integrate)되며, 무작위적인 통합의 빈도는 무시할만한 수준이어서, 그 벡터에서의 통합 능력 유지는 치료 환경(therapeutic setting)에서 허용될 수 있다.
- [0053] 유도체 게놈이 캡시드 단백질 즉, VP1, VP2 및/또는 VP3를 코딩하는 유전자를 포함하는 경우, 이 유도체는 하나 이상의 천연 AAV 바이러스의 키메라 유도체, 셔플된(shuffled) 유도체 또는 캡시드-변형 유도체일 수 있다. 특히, 본 발명은 동일한 벡터 내에 AAV의 서로 다른 혈청형, 계통군, 클론, 또는 단리체로부터의 캡시드 단백질 서열을 제공하는 것 즉, 슈도타입화(pseudotyping)를 포함한다.
- [0054] 키메라 유도체, 셔플된 유도체 또는 캡시드-변형 유도체는 일반적으로 바이러스 벡터를 위한 하나 이상의 원하는 기능을 제공하도록 선택된다. 따라서, 이러한 유도체는 AAV2의 게놈과 같은 천연 AAV 게놈을 포함하는 AAV 바이러스 벡터와 비교하여 증가된 유전자 전달의 효율성, 감소된 면역원성(체액성 또는 세포성), 특정한 세포 종류의 변경된 유주활성 범위 및/또는 개선된 표적화(targeting)를 보일 수 있다. 유전자 전달의 증가된 효율성은 세포 표면에서의 개선된 수용체 또는 보조-수용체 결합, 개선된 내재화(internalisation), 세포 내 및 핵으로의 개선된 이동성(trafficking), 바이러스 입자의 개선된 외피제거(uncoating) 및 단일-가닥 게놈의 이중-가닥 형태로 개선된 전환에 의하여 달성될 수 있다. 증가된 효율성은 또한 특정 세포 집단의 변경된 유주활성 범위 또는 표적화와 관련되어, 벡터의 용량은 필요하지 않은 조직으로의 투여에 의해 희석되지 않는다.
- [0055] 키메라 캡시드 단백질은 천연 AAV 혈청형의 두 개 이상의 캡시드 코딩 서열 간의 재조합에 의하여 생성된 캡시드 단백질을 포함한다. 이는 예를 들면 한 혈청형의 비-감염성 캡시드 서열이 다른 혈청형의 캡시드 서열과 함께 동시형질주입(cotransfected)되고, 원하는 특성을 갖는 캡시드 서열을 선택하기 위해 지정 선택(directed selection)이 사용되는 것인 표지 식별 접근(marker rescue approach)에 의해 실행될 수 있다. 다른 혈청형의 캡시드 서열은 새로운 키메라 캡시드 단백질을 생산하기 위하여 세포 내에서 상동 재조합에 의해 변경될 수 있다.
- [0056] 키메라 캡시드 단백질은 또한 두 개 이상의 캡시드 단백질 사이에서 예를 들면, 두 개 이상의 서로 다른 혈청형의 캡시드 단백질 사이에서 특정 캡시드 단백질 도메인, 표면 루프 또는 특정 아미노산 잔기를 이동시키기 위해 캡시드 단백질 서열을 유전자 조작하는 것에(engineering) 의해 생성된 캡시드 단백질을 포함한다.
- [0057] 셔플된 캡시드 단백질 또는 키메라 캡시드 단백질은 또한 DNA 셔플링 또는 오류-유발 PCR(error-prone PCR)에 의해 생성될 수 있다. 하이브리드 AAV 캡시드 유전자는 관련된 AAV 유전자 예를 들면, 여러 상이한 혈청형의 캡시드 단백질을 코딩하는 유전자의 서열을 무작위로 단편화하고, 그 후에 서열 상동성의 영역에서 또한 교차(crossover)를 야기할 수도 있는, 자체-프라이밍 중합효소 반응에서 단편들을 재조립하여 또한 생성될 수 있다. 여러 혈청형의 캡시드 유전자의 셔플링에 의해 이러한 방법으로 생성된 하이브리드 AAV 유전자의 라이브러리(library)는 원하는 기능을 갖는 바이러스 클론을 확인하기 위해 선별될 수 있다. 유사하게, 오류-유발 PCR은 AAV 캡시드 유전자를 무작위로 돌연변이시켜 원하는 특성에 대해 선택될 수 있는 변이체의 다양한 라이브러리를 구축하기 위해 이용될 수 있다.
- [0058] 캡시드 유전자의 서열은 원시 야생형 서열에 대해 특정한 결실, 치환 또는 삽입을 도입하기 위하여 또한 유전적

으로 변형될 수 있다. 특히, 캡시드 유전자는 캡시드 코딩 서열의 개방 해독틀(open reading frame) 내 또는 캡시드 코딩 서열의 N- 및/또는 C-말단에 관련되지 않은 단백질 또는 펩티드의 서열의 삽입에 의해 변형될 수 있다.

[0059] 관련되지 않은 단백질 또는 펩티드는 유리하게도 특정 세포 타입에 대한 리간드로서 역할을 하여, 그에 의해 표적 세포에 대한 향상된 결합을 부여하거나 특정 세포 집단에 대한 벡터의 표적화 특이성을 향상시키는 것일 수 있다. 그 예는 망막 색소 상피에서 흡수를 차단하고 그에 의해 주변 망막 조직의 형질도입을 증강시키기 위한 RGD 펩티드의 사용을 포함할 수 있다(Cronin 등, 2008 ARVO Abstract: D1048). 관련되지 않은 단백질은 또한 생산 과정의 일부로서 바이러스 입자의 정제를 도와주는 것, 즉 에피토프(epitope) 또는 친화성 태그(affinity tag)일 수 있다. 삽입부위는 일반적으로 바이러스 입자의 내재화, 이동과 같은 바이러스 입자의 다른 기능을 방해하지 않게 선택된다. 당업자는 공통된 일반적인 지식을 기초로 하여 삽입을 위한 적절한 부위를 식별할 수 있다. 특정 부위가 앞서 인용된 Choi 등에 개시된다.

[0060] 본 발명은 또한 원시 AAV 게놈의 것과 다른 순서와 구조(configuration)의 AAV 게놈의 서열의 제공을 포함한다. 본 발명은 또한 하나 이상의 AAV 서열 또는 유전자를 또 다른 바이러스 서열로 치환 또는 둘 이상의 바이러스로부터의 서열로 이루어진 키메라 유전자로 치환하는 것을 포함한다. 이러한 키메라 유전자는 상이한 바이러스 중의 두 개 이상의 관련된 바이러스 단백질로부터의 서열로 이루어질 수 있다.

[0061] 본 발명의 벡터는 AAV 게놈 또는 그의 유도체 및 REP1 또는 그의 유도체를 코딩하는 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드 서열의 형태를 취한다.

[0062] 의심의 소지를 없애기 위해, 본 발명은 또한 본 발명의 벡터를 포함하는 AAV 바이러스 입자를 제공한다. 본 발명의 AAV 입자는 하나의 혈청형의 ITR을 갖는 AAV 게놈 또는 유도체가 상이한 혈청형의 캡시드에 패키징되는 것인 트랜스캡시드 형태(transcapsidated form)를 포함한다. 본 발명의 AAV 입자는 또한 두 개 이상의 상이한 혈청형으로부터 변형되지 않은 캡시드 단백질의 혼합물이 바이러스 외피(virus envelope)를 구성하는 것인 모자이크 형태를 포함한다. AAV 입자는 또한 캡시드 표면에 흡착된 리간드를 갖는(bearing) 화학적으로 변형된 형태를 포함한다. 예를 들면, 이러한 리간드는 특정한 세포 표면 수용체를 표적으로 하는 항체를 포함할 수 있다.

[0063] 본 발명은 또한 본 발명의 벡터 또는 AAV 바이러스 입자를 포함하는 숙주 세포를 제공한다.

[0065] *REP1*

[0066] 본 발명의 벡터는 또한 REP1 폴리펩티드 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함한다. REP1(또는 Rab 단백질 게라닐게라닐전이효소 구성성분 A(Rab protein geranylgeranyltransferase component A)로도 알려진, Rab 에스코트 단백질-1(Rab escort protein-1))에 대한 인간 cDNA 서열은 서열번호 2로 표시되고 서열번호 3으로 표시된 단백질을 코딩한다. Rep1에 대한 다른 cDNA 서열은 서열번호 4로 표시된다.

[0067] REP1 폴리펩티드 또는 그의 변이체는 Rab GTP가수분해효소 단백질(Rab GTPase protein)의 프레닐화를 도와주는 폴리펩티드이다. Rab GTP가수분해효소 단백질의 프레닐화를 도와주는 REP1 폴리펩티드 또는 그의 변이체의 능력은 일상적으로 당업자에 의해 결정될 수 있다. REP1의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열은 Rab-1 GTP가수분해효소의 프레닐화 활성을 도와주는 단백질을 코딩하는 서열이다. 바람직하게는, 그 서열은 서열번호 3의 폴리펩티드와 비교하여 Rab-1 GTP가수분해효소에 대해 유사하거나 더 높은 프레닐화 활성을 제공하는 것을 도와주는 단백질을 코딩한다.

[0068] 보다 바람직하게는, 폴리뉴클레오티드 서열은 서열번호 3 또는 그의 변이체를 코딩하고, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열의 변이체이다. 서열번호 2 또는 3의 변이체는 기능적 REP 폴리펩티드를 코딩하는 그의 절단체(truncation), 돌연변이체 또는 동족체(homologue), 및 그의 전사 변이체를 포함할 수 있다.

[0069] 본 명세서에 언급된 동족체는 일반적으로 서열번호 2 또는 3의 관련 영역과 70% 이상의 상동성을 가진다. 특정 동족체는 REP1과 75% 상동인 REP2 폴리펩티드이고, REP1 결핍을 기능적으로 보완할 수 있다.

[0070] 상동성(homology)은 공지된 방법을 이용하여 측정될 수 있다. 예를 들면, UWGCG 패키지는 상동성을 계산하기 위해 이용될 수 있는(예를 들면 그의 디폴트 설정에서 사용된) BESTFIT 프로그램을 제공한다(Devereux 등(1984) Nucleic Acids Research 12, 387-395). 예를 들면, Altschul S.F.(1993) J Mol Evol 36:290-300; Altschul, S. F. 등(1990) J Mol Biol 215:403-10에서 설명한 바와 같이, PILEUP 및 BLAST 알고리즘은 상동성을 계산하거나 서열을 정렬(line up)하기 위해 이용될 수 있다. BLAST 분석을 수행하기 위한 소프트웨어는 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information)를 통해 공개적으로 이용할 수 있다

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

- [0071] 바람직한 구체예에서, 변이체 서열은 20개 이상, 바람직하게는 30개 이상, 예를 들면 40, 60, 100, 200, 300, 400개 이상 또는 그 이상의 연속하는 아미노산, 또는 변이체의 전체 서열에 걸쳐 서열번호 3의 관련 영역과 55%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상 및 더욱 바람직하게는 95%, 97% 또는 99% 이상 상동인 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 관련 영역은 Rab-1 GTP가수분해효소에 대한 프레닐화 활성을 도와주는 REP1의 기능적 활성을 제공하는 영역(region)일 것이다.
- [0072] 대안적으로, 및 바람직하게는, 변이체 서열은 그 전체 서열에 걸쳐 전장(full-length) 서열번호 3과 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상 및 더욱 바람직하게는 95%, 97% 또는 99% 이상 상동성을 갖는 폴리펩티드를 코딩할 수 있다. 일반적으로 변이체 서열은 서열번호 3의 관련 영역과 2, 5, 10, 20, 40, 50 또는 60개 이상 또는 미만 돌연변이(각각은 치환, 삽입 또는 결실일 수 있음)에 의해 상이하다.
- [0073] REP-1 폴리펩티드 변이체는 서열번호 3의 특정 부위와 백분율 동일성을 가질 수 있고 이는 앞서 언급한 서열의 길이에 걸쳐서 특정 백분율 상동성 값과 동일하다(즉, 70%, 80% 또는 90% 이상 및 더욱 바람직하게는 95%, 97% 또는 99% 이상 동일성을 가질 수 있다).
- [0074] 서열번호 3의 변이체는 또한 절단을 포함한다. 절단체(truncation)는 변이체가 Rab-1 GTP가수분해효소 기질 폴리펩티드를 프레닐화 할 수 있는 한 사용될 수 있다. 절단은 일반적으로 프레닐화 활성에 비-본질적이고 및/또는 폴딩된 단백질(folded protein)의 구조(conformation), 특히 활성 부위의 폴딩에 영향을 주지 않는 서열을 제거하기 위해 이루어질 것 것이다. 적절한 절단은 N- 또는 C-말단에서 다양한 길이의 서열의 체계적인 절단(systemic truncation)에 의하여 일상적으로 확인될 수 있다. 바람직한 절단은 N-말단이고 촉매 도메인을 제외하고는 다른 모든 서열을 제거할 수 있다.
- [0075] 서열번호 3의 변이체는 또한 서열번호 3의 특정 영역에 관하여 하나 이상, 예를 들면, 2, 3, 4, 5 내지 10, 10 내지 20, 20 내지 40개 또는 그 이상의 아미노산 삽입, 치환 또는 결실을 갖는 돌연변이체를 포함한다. 결실 및 삽입은 바람직하게는 하기 설명과 같이 촉매 도메인의 외부에서 일어난다. 치환은 또한 일반적으로 단백질분해효소(protease) 활성에 비-본질적이고 및/또는 폴딩된 단백질의 구조에 영향을 주지 않는 영역에서 일어난다.
- [0076] 치환은 바람직하게는 아미노산을 유사한 화학적 구조, 유사한 화학적 특성 또는 유사한 측쇄(side-chain) 부피의 다른 아미노산으로 대체하는, 하나 이상의 보존적 교환(conservative change)을 도입한다. 도입된 아미노산은 그들이 대체한 아미노산과 유사한 극성, 친수성, 소수성, 염기성, 산성, 중성 또는 전하를 가질 수 있다. 대안적으로, 보존적 교환은 이미 존재하는 방향족 또는 지방족 아미노산대신에 방향족 또는 지방족인 다른 아미노산을 도입할 수 있다. 보존적 아미노산 교환은 당 업계에 잘 알려져 있으며 하기 표 A에 정의된 20개의 주요 아미노산의 특성에 따라 선택될 수 있다.
- [0077] 마찬가지로, 서열번호 2의 폴리뉴클레오티드 서열의 바람직한 변이체는 서열번호 2의 관련 영역과 70%, 75%, 80%, 85%, 90% 이상 및 더욱 바람직하게는 95%, 97% 또는 99% 이상 상동인 폴리뉴클레오티드를 포함한다. 바람직하게는, 변이체는 그 전체 서열에 걸쳐 전장 서열번호 2와 이러한 상동성의 수준을 보인다.

## 표 1

[0078] 표 A - 아미노산의 화학적 특성

|     |                      |     |                 |
|-----|----------------------|-----|-----------------|
| Ala | 지방족, 소수성, 중성         | Met | 소수성, 중성         |
| Cys | 극성, 소수성, 중성          | Asn | 극성, 친수성, 중성     |
| Asp | 극성, 친수성, (-) 전하      | Pro | 소수성, 중성         |
| Glu | 극성, 친수성, (-) 전하      | Gln | 극성, 친수성, 중성     |
| Phe | 방향족, 소수성, 중성         | Arg | 극성, 친수성, (+) 전하 |
| Gly | 지방족, 중성              | Ser | 극성, 친수성, 중성     |
| His | 방향족, 극성, 친수성, (+) 전하 | Thr | 극성, 친수성, 중성     |
| Ile | 지방족, 소수성, 중성         | Val | 지방족, 소수성, 중성    |
| Lys | 극성, 친수성, (+) 전하      | Trp | 방향족, 소수성, 중성    |
| Leu | 지방족, 소수성, 중성         | Tyr | 방향족, 극성, 소수성    |

[0079] 프로모터 및 조절서열

[0080] 본 발명의 벡터는 또한 인 비트로 또는 인 비보에서 REP1 전이유전자를 발현할 수 있게 하는 요소를 포함한다.

따라서, 벡터는 일반적으로 Rep-1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열과 작동 가능하게 연결된 프로모터 서열을 포함한다.

- [0081] 어떤 적합한 프로모터라도 사용될 수 있다. 프로모터 서열은 구성적으로 활성화(constitutively active)될 수 있고, 즉 어떤 숙주 세포 환경에서도 작동가능하거나, 또는 대안적으로, 오직 특정 숙주세포 환경에서만 활성화될 수 있어, 특정 세포 타입에서 전이유전자의 표적화된 발현을 가능하게 한다. 프로모터는 또 다른 인자, 예를 들면 숙주 세포에 존재하는 인자의 존재에 반응하여 유도성 발현을 보일 수 있다. 벡터가 치료를 위해 투여되는 경우, 프로모터는 망막 세포 환경에서 작동해야 한다.
- [0082] 일부 구체예에서, 전이유전자가 오직 망막 세포 집단에서만 발현되게 하기 위하여 프로모터가 망막-세포 특이적 발현을 보이는 것이 바람직하다. 따라서, 그 프로모터로부터의 발현은 예를 들면 오직 망막내 시신경(neurosensory retina) 및 망막 색소 상피의 세포에만 국한된 것과 같이, 망막-세포 특이적일 수 있다.
- [0083] Rep-1 전이유전자에 대한 바람직한 프로모터는 선택적으로 사이토메갈로바이러스(CME) 인핸서 요소와 조합된, 닭 베타-액틴(CBA) 프로모터를 포함한다. 특히 바람직한 프로모터는 하이브리드 CBA/CAG 프로모터, 예를 들면 rAVE 발현 카세트에 사용되는 프로모터(GeneDetect.com)이다. 또한 바람직한 프로모터는 서열번호 6으로 표시된다. 망막 특이적 유전자 발현을 유도하는 인간 서열에 기초한 프로모터의 예는 간상체 및 추상체에 대한 로돕신 키나아제(rhodospin kinase)(Allocca 등, 2007, J Virol 81:11372-80), 추상체 단독에 대한 PR2.1(Mancuso 등, 2009, Nature) 및/또는 망막 색소 상피에 대한 RPE65(Bainbridge 등, 2008, N Eng J Med)를 포함한다.
- [0084] 본 발명의 벡터는 또한 전사 전 또는 후에 작용할 수 있는 하나 이상의 추가적인 조절 서열을 포함할 수 있다. 조절 서열은 원시 REP1 유전자 좌(locus)의 일부가 될 수 있거나 이중 조절 서열일 수 있다. 본 발명의 벡터는 원시 REP1 전사체로부터의 5'UTR 또는 3'UTR의 일부를 포함할 수 있다. 예를 들면, 서열번호 4의 폴리뉴클레오티드는 원시 REP1 전사체로부터의 5'UTR 서열의 일부를 포함한다.
- [0085] 조절 서열은 전이유전자의 발현을 촉진하는 서열 즉, 전사체의 발현을 증가시키거나, mRNA의 핵 유출(export)을 향상시키거나 또는 그의 안정성을 증강시키는 역할을 하는 서열이다. 이러한 조절 서열은 예를 들면, 인핸서 요소(enhancer element), 후조절 요소(postregulatory element) 및 폴리아데닐화 부위를 포함한다. 바람직한 폴리아데닐화 부위는 서열번호 7에 표시된 것과 같을 수 있는 소 성장 호르몬 폴리-A 신호(Bovine Growth Hormone poly-A signal)이다. 본 발명의 벡터 상황에서 이러한 조절 서열은 시스(cis)-작용성일 것이다. 그러나 본 발명은 또한 추가적인 유전적 구조물에 위치한 트랜스(trans)-작용 조절 서열의 사용을 포함한다.
- [0086] 본 발명의 벡터에 사용하기 위한 바람직한 후조절 요소는 우드척 간염 후조절 요소(WPRE) 또는 그의 변이체이다. WPRE의 서열은 서열번호 5로 제공된다. 본 발명은 WPRE 없는 벡터와 비교하여 REP1 전이유전자의 발현을 증가시키는 WPRE의 변이체 서열의 사용을 포함한다. 바람직하게는, 변이체 서열은 그의 전체 서열에 걸쳐 서열번호 5와 70% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 75%, 80%, 85%, 90% 이상의 상동성, 더욱 바람직하게는 그의 전체 서열에 걸쳐 서열번호 5와 95%, 97% 또는 99% 이상의 상동성을 보인다.
- [0087] 본 발명의 벡터에 사용될 수 있는 또 다른 조절 서열은 스캐폴드 부착 영역(scaffold-attachment region, SAR)이다. 추가적인 조절 서열은 공통적이고 일반적인 지식에 근거하여 당업자에 의하여 선택될 수 있다.
- [0089] **벡터의 제조**
- [0090] 본 발명의 벡터는 유전자 치료를 위한 벡터를 제공하기 위해 당 업계에 공지된 표준수단에 의하여 제조될 수 있다. 따라서, 정립된 공중의 영역(public domain)인 형질주입(transfection), 패키징 및 정제 방법이 적절한 벡터를 제조하는데 이용될 수 있다.
- [0091] 앞서 검토된 바와 같이, 본 발명의 벡터는 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 뿐만 아니라 천연 AAV 바이러스의 전체 게놈을 포함할 수 있다. 그러나, 통상 유도체화된(derivatised) 게놈, 예를 들면 하나 이상의 역위 말단 반복 서열(ITR)을 가지나, *rep* 또는 *cap* 와 같은 AAV 유전자가 결핍될 수 있는 유도체가 사용될 것이다.
- [0092] 이러한 구체예에서, AAV 바이러스 입자로의 유도체화된 게놈의 조립 (assembly)을 제공하기 위하여, AAV 및/또는 헬퍼 바이러스 기능을 제공하는 추가적인 유전적 구조물이 유도체화된 게놈과 함께 숙주 세포에 제공될 것이다. 이러한 추가적인 구조물은 일반적으로 구조적 AAV 캡시드 단백질을 코딩하는 유전자, 즉 *cap*, VP1, VP2, VP3, 및 *rep*와 같은, AAV 생활사를 위해 필요한 기타 기능을 코딩하는 유전자를 포함한다. 추가적인 구조물에 제공되는 구조적 캡시드 단백질의 선택은 패키징된 바이러스 벡터의 혈청형을 결정할 것이다.



- [0093] 본 발명에서 사용하기 위한, 특히 바람직한 패키징된 바이러스 벡터는 AAV5 또는 AAV8 캡시드 단백질과 함께 AAV2의 유도체화된 게놈을 포함한다. 이 패키징 바이러스 벡터는 일반적으로 선택적으로 서열번호 8 및/또는 9로 표시된, 하나 이상의 AAV2 ITR, 또는 그의 변이체를 포함한다.
- [0094] 앞서 언급한 바와 같이, AAV 바이러스는 복제 능력이 없고, 따라서 AAV 복제를 가능하게 하기 위해 헬퍼 바이러스 기능, 바람직하게는 아데노바이러스 헬퍼 기능이 하나 이상의 추가적인 구조물에 또한 제공될 것이다.
- [0095] 진술된 추가적인 구조물 모두는 숙주 세포의 플라스미드 또는 기타 에피솜 요소(episomal element)로 제공될 수 있거나, 또는 대안적으로, 하나 이상의 구조물이 숙주 세포의 게놈내로 통합될 수 있다.
- [0096] 이러한 양태에서, 본 발명은 본 발명의 벡터의 제조 방법을 제공한다. 이 방법은 숙주 세포에 아데노-관련 바이러스(AAV) 게놈 또는 그의 유도체 및 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리펩티드 서열을 포함하는 벡터를 제공하는 단계, 상기 벡터의 복제 및 AAV 바이러스 입자로의 조립 수단을 제공하는 단계를 포함한다. 바람직하게는, 이 방법은 AAV 및/또는 헬퍼 바이러스 기능을 코딩하는 하나 이상의 추가적인 유전적 구조물과 함께 AAV 게놈의 유도체 및 REP1 또는 그의 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 서열을 포함하는 벡터를 제공하는 단계를 포함한다. 일반적으로, AAV 게놈의 유도체는 하나 이상의 ITR을 포함한다. 선택적으로, 이 방법은 또한 조립된 바이러스 입자의 정제 단계를 포함한다. 또한, 이 방법은 치료 용도를 위해 바이러스 입자를 제제화 하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0098] 치료방법 및 의약 용도
- [0099] 앞서 검토된 바와 같이, 본 발명자들은 놀랍게도 본 발명의 벡터가 범맥락막위축에 내재하는 세포 기능장애를 해결하기 위해 사용될 수 있다는 것을 보여주었다. 특히, 이들은 벡터의 사용은 범맥락막위축과 관련된 프레닐화 결함을 교정할 수 있다는 것을 보여주었다. 이는 질병의 퇴행 과정을 치료, 정지(arrest), 완화(palliated) 또는 예방할 수 있는 수단을 제공한다.
- [0100] 본 발명은 따라서 직접 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사에 의하여 환자에게 본 발명의 벡터의 치료 유효량을 투여하는 단계를 포함하는, 범맥락막위축의 치료 또는 예방이 필요한 환자에서 범맥락막위축을 치료 또는 예방하는 방법을 제공한다. 따라서, 범맥락막위축은 이에 의하여 상기환자에서 치료되거나 예방된다.
- [0101] 관련된 양태에서, 본 발명은 직접 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사에 의하여 환자에게 상기 벡터를 투여하여 범맥락막위축을 치료 또는 예방하는 방법에서 본 발명의 벡터의 용도를 제공한다. 또한, 본 발명은 직접 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사에 의하여 범맥락막위축을 치료 또는 예방하는 약물의 제조에서 본 발명의 벡터의 용도를 제공한다.
- [0102] 이러한 모든 구체예에서, 본 발명의 벡터는 범맥락막위축의 하나 이상의 증상의 발현(onset)을 예방하기 위하여 투여될 수 있다. 환자는 무증상일 수도 있다. 대상은 범맥락막위축에 대한 소인(predisposition)이 있을 수도 있다. 이 방법이나 용도는 대상이 범맥락막위축의 발병 위험이 있는지, 또는 범맥락막위축을 가지는지 여부를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 벡터의 예방적 유효량(prophylactically effective amount)이 이러한 대상에게 투여된다. 예방적 유효량이 질병의 하나 이상의 증상의 발현을 예방하는 양이다.
- [0103] 대안적으로, 벡터는 질병의 증상이 대상에 나타나면, 즉 질병의 기존의 증상을 치료하기 위하여 투여될 수 있다. 길항제의 치료 유효량이 이러한 대상에게 투여된다. 치료 유효량은 질병의 하나 이상의 증상을 개선하는데 효과적인 양이다. 일반적으로, 이러한 양은 안구에서 Rab GTP가수분해효소의 프레닐화 수준을 증가시킨다. 이는 하기의 설명과 같이 확인될 수 있다. 이러한 양은 범맥락막위축과 관련된 주변시력의 상실을 정지시키거나, 느리게하거나 또는 되돌릴 수 있다. 이러한 양은 또한 야맹증의 발병을 정지시키거나, 느리게하거나 또는 되돌릴 수 있다.
- [0104] 대상은 남성 또는 여성일 수 있다. 범맥락막위축은 X-염색체 연관 질환이기 때문에, 남성은 더욱 심각한 증상을 보이나, 여성도 이 질병의 증상이 나타나고 가끔 심각한 표현형을 갖는다. 대상은 바람직하게는 이 질병의 위험이 있거나 질병이 있는 것으로 확인된다. 망막은 먼저 맥락막이 얇아지고 부분적으로 그 아래에 있는 공막의 노출로 진행되는 특징적인 외관을 보일 수 있다. 말초에서(peripherally) 망막전위도의 진폭의 손실이 있을 수 있다. 많은 경우에서 범맥락막위축의 가족력이 있을 수 있다. 일반적으로, 항상은 아니지만, 돌연변이는 X-염색체에 위치한 REP1 유전자에서 확인될 수 있다.
- [0105] 벡터의 투여는 일반적으로 직접 망막 주사 또는 망막하 주사에 의한다. 이는 상피세포 또는 광수용체 세포와 같은 망막내 시신경(neurosensory retina) 및 망막 색소 상피 세포에 직접 전달하는 것을 포함한다. 이 전달은 일

반적으로 범막락막위축 환자의 변성되는 망막에 직접 또는 망막하로 이루어진다. 벡터는 다른 세포 집단에 들어가는 것 없이 전술된 표적 세포에 형질도입될 수 있다. 유리체 내 주사가 본 발명의 벡터를 전달하기 위해 또한 사용될 수 있다. 전달은 망막하로 이루어지지 않거나 또는 망막하 주사에 의하지 않을 수 있다. 전달은 유리체를 통과(transvitreal)하지 않을 수 있다.

[0106] 본 발명의 벡터의 용량은 다양한 파라미터, 특히 치료받을 환자의 나이, 체중 및 상태; 투여경로; 및 요구되는 요법(regimen)에 따라 결정될 수 있다. 또한, 의사는 특정 환자에 필요한 투여경로 및 용량을 결정할 수 있다.

[0107] 형질도입이 필요한 남아있는 망막 조직의 양에 따라, 일반적인 일회 용량(single dose)은  $10^{10}$  내지  $10^{12}$  게놈 입자(gp)이다. 게놈 입자(genome particle)는 본 명세서에서, 서열 특이적 방법(예: 실시간 PCR)으로 정량화할 수 있는 단일 가닥 DNA 분자를 포함하는 AAV 캡시드로 정의된다. 이 용량이 일회 용량으로서 제공될 수 있지만, 반대쪽 안구에 대해 또는 어떠한 이유로(예: 수술 합병증) 벡터가 망막의 정확한 영역을 표적화하지 못했을 경우 반복될 수 있다. 치료는 바람직하게는, 각 안구에 대해 일회 영구 치료이고, 그러나, 예를 들면 수년 후 및/또는 다른 AAV 혈청형에 의한 반복 주사가 고려될 수 있다.

[0108] 본 발명은 또한 직접 망막 주사, 망막하 주사 또는 유리체내 주사에 의하여 본 발명의 AAV 벡터를 투여한 후 환자로부터 얻은 망막 세포에서 체외(ex vivo) 프레닐화 활성을 측정하는 단계를 포함하는, 환자에서 범막락막위축의 치료 또는 예방을 모니터링하는 방법을 제공한다. 이 방법은 치료의 유효성을 결정할 수 있게 한다.

[0110] 약학적 조성물

[0111] 본 발명의 벡터는 약학적 조성물로 제제화될 수 있다. 이러한 조성물은, 벡터 이외에도, 약학적으로 허용가능한 부형제, 캐리어, 버퍼, 안정제 또는 당업자에게 잘 알려진 다른 물질을 포함할 수 있다. 이러한 물질은 독성이 없어야 하고 활성 성분의 효능을 방해하지 않아야 한다. 캐리어 또는 다른 물질의 정확한 속성은 투여경로, 즉 직접 망막 주사, 망막하 주사, 유리체내 주사에 따라 당업자에 의하여 결정될 수 있다.

[0112] 약학적 조성물은 일반적으로 액체 형태이다. 액체 약학적 조성물은 일반적으로 물, 석유, 동물성유 또는 식물성유, 미네랄유 또는 합성유(synthetic oil)와 같은 액체 캐리어를 포함한다. 생리 식염수 용액, 염화 마그네슘, 텍스트로오스 또는 다른 당(saccharide) 용액 또는 에틸렌 글리콜, 프로필렌 글리콜 또는 폴리에틸렌 글리콜과 같은 글리콜이 포함될 수 있다. 일부 경우에, 플루론산(pluronic acid)(PF68) 0.001%와 같은 계면활성제가 사용될 수 있다.

[0113] 환부에 주사하기 위하여, 활성 성분은 발열성 물질이 제거되고(pyrogen-free) 적절한 pH, 등장성 및 안정성을 갖는 수성 용액의 형태일 것이다. 당업자는, 예를 들면 염화나트륨 주사액, 링거 주사액, 젖산화 링거 주사액(lactated Ringer's Injection)과 같은 등장성 비히클(isotonic vehicles)을 사용하여 적절한 용액을 잘 제조할 수 있다. 필요에 따라, 보존제, 안정제, 버퍼, 항산화제 및/또는 다른 첨가제가 포함될 수 있다.

[0114] 연장된 방출(delayed release)을 위하여, 벡터는 당업계에 알려진 방법에 따라, 서방형(slow release)을 위해 제제화된 약학적 조성물에, 예를 들면, 생체적합성 중합체로부터 형성된 마이크로 캡슐 또는 리포솜 캐리어 시스템에 포함될 수 있다.

[0116] 실시예

[0118] 본 실시예는 범막락막위축의 치료 전략을 평가하기 위한 모델 및 범막락막위축 표현형의 교정을 설명한다. 프로모터, REP1 cDNA, 및 3' 조절 요소로 이루어진 유전적 구조물이 재조합 바이러스 벡터로 패키징된 경우, 변성된 망막 내 표적 세포에 효율적으로 형질도입되는 것으로 나타난다.

[0119] 실시예 1

[0120] 인간 REP1 cDNA의 클로닝, 및 CBA-REP-1-WPRE 발현 카세트의 생성, pAAV-CBA-REP-1-WPRE-bGHpA의 구축 및 AAV REP-1 바이러스의 패키징.

[0121] 인간 REP1의 cDNA를 PCR 증폭 및 알려진 REP1 서열과 상동인 프라이머를 사용하여 인간 cDNA 라이브러리로부터 분리하였다. 분리된 cDNA의 서열을 결정하고 Genebank에 등록번호 NM\_000390으로 기탁된 REP1 mRNA 서열의 공지된 번역 변이체(translated variant) 1과 상동인 것으로 확인하였다. 이 cDNA는 서열번호 4의 서열을 갖는다.

[0122] 이 cDNA를 pAM이라는, pAAV 시스(cis) 플라스미드에 삽입하였다. pAM은 pBR322로부터 본래 유래된 높은 복제수를 갖는 플라스미드이나, 선택된 발현 카세트를 플랜킹하는 안정화된 AAV-2 좌우 역위 말단 반복을 포함한다. AAV-REP1 벡터에서, 변형된 CBA/CAG 프로모터(CMV 인핸서를 갖는 닭 베타-액틴)을 REP1 및 변형된 WPRE 서열의



발현을 구동(drive)하기 위해 사용하였고 bGH polyA를 cDNA의 3'에 제공하였다. 이 플라스미드는 pAAV2-CBA-hREP-1-WPRE-bGH, (pAAV-REP-1)이라고 명명하였다.

[0123] pAAV-REP-1를 정립된 공중의 영역(public domain)에 있는 삼중 형질주입 패키징(triple transfection packaging) 및 정제 방법을 사용하여 재조합 AAV-Rep-1을 생성하기 위해 사용하였다. 이 방법을 사용하여 생성된 벡터 원액(stock)은 계능 역가(titer)가 다양했으나, 가장 일반적으로 정제 후 얻어진 원액은  $10^{12}$  -  $10^{13}$  gp/ml였다(gp= 계능 입자 - 전술 참조). 이 원액을 그 후에 하기의 설명과 같이 생체 내 사용하기 위하여 희석하였다.

[0125] 실시예 2

[0126] *인간 범맥락막위축(Chm) 세포에서 벡터로부터 REP1의 발현*

[0127] AAV2.REP1 벡터로부터의 REP1의 발현을 인간 범맥락막위축(Chm) 섬유아세포에서 평가하였다. 이러한 섬유아세포를 범맥락막위축 환자로부터 윤리동의서와 함께 피부 생검으로부터 얻었다. 대조군 벡터로부터의 GFP의 발현이 대조군으로 작용했다. 인간세포에 의한 연구의 준비로서, 항체 프로브가 REP1 단백질의 인간형태는 인식하나 마우스의 형태는 인식하지 못하므로 마우스에 AAV.REP1 벡터의 망막하 주사 후 발현을 웨스턴 블랏에 의해 또한 확인하였다.

[0128] 도 1에 결과가 표시된다. REP1은 형질도입되지 않은(nontransduced) Chm 섬유아세포(레인 2)에서 항-hREP1 항체를 이용한 면역블랏팅(immunoblotting)에 의해 검출되지 않았고, 반면 REP1은 일반(WT=인간 야생형) 섬유아세포(레인 1)에서 검출된다. AAV2.REP1 벡터에 의한 형질도입 후,  $40\mu\text{g}$  용해액 및  $5\mu\text{g}$  희석액의 같은 용량에서 Chm 세포에서 AAV2.REP1 벡터에 의하여 발현된 hREP1의 수준은 야생형 세포(레인 1)에서의 수준보다 약 10배 더 높다(레인 3-6)는 것을 알 수 있다. 세포 성장에 독성 효과가 없다는 것을 이러한 과-발현(over-expression)의 정도로 함께 관찰하였다.

[0130] 실시예 3

[0131] *Chm 세포에서 벡터에 의한 프레닐화 결함의 교정*

[0132] 범맥락막위축 마우스는 인간 환자와 같은 방식의 망막 변성 표현형을 갖지 않기 때문에 유전자 치료 접근법을 사용하여 망막 복구(rescue)의 직접적인 평가를 수행하는 것은 불가능하다. 이러한 이유로, 범맥락막위축 표현형의 교정을 인 비트로로 인간 Chm 세포에서 평가하였다.

[0133] 도 2에 결과가 표시된다. AAV2.REP1에 의한 형질도입은 Chm 세포에서 나타난 프레닐화 결함의 교정을 보여, AAV2.REP1의  $1.5 \times 10^{10}$  바이러스 계능 입자로  $2 \times 10^5$  세포의 처리 후 정상 수준보다 프레닐화 활성을 유의하게 더 높였다. 이는 AAV2.REP1 벡터가 범맥락막위축에 의해 영향을 받은 인간 세포에서 기능적 REP1 단백질을 발현시킨다는 것을 확인한다.

[0134] 보다 상세하게, 야생형(WT) 섬유아세포에서 정상의 프레닐화 활성은 [3H]-GGPP의 약 0.32 pmol을 산출하고; 범맥락막위축(Chm) 섬유아세포에서, 이는 0.19pmol로 감소한다. 예상대로 프레닐화 활성은 AAV.GFP 대조군 벡터의 Chm 섬유아세포로의 형질도입 후 변하지 않았다. 그러나, AAV2.REP1 벡터에 의해 형질도입 후, 프레닐화 활성은 유의하게 증가하여( $n=4$ ,  $p<0.01$ ) [3H]-GGPP의 0.42pmol를 산출했다.

[0136] 실시예 4

[0137] *마우스에서 벡터로부터 리포터 유전자의 생체 내 표적화된 발현*

[0138] AAV2 벡터에서 CBA 프로모터 및 조절 서열의 유비쿼터스(ubiquitous) 활성을 확인하기 위하여, REP1을 코딩하는 유전자를 AAV2.CBA.GFP.WPRE.BGH(AAV2.GFP)를 만들기 위하여 녹색 형광 단백질(GFP)을 코딩하는 리포터 유전자로 대체하였다. 인간 REP1 단백질은 웨스턴 블랏 상으로는 쉽게 식별되지만, 망막 절편(retinal section)에서 간접적인 면역조직화학(immunohistochemistry)에 의하여 쉽게 검출되지 않기 때문에 생체 내 발현을 평가하기 위하여 GFP를 선택하였다.

[0139] AAV2.GFP 구조물을 마우스 망막하 공간에 주사하고 GFP의 발현을 현미경으로 모니터링하였다. 도 3에 결과가 표시되고 이는 벡터가 망막내 시신경 및 망막 색소 상피 모두에 예상된 유주활성을 갖는다는 것을 확인한다. 이는 캡시드 서열 및 조절 요소가 광수용체 및 망막 색소 상피에서 높은 수준의 유전자 발현을 가져온다는 것을 확인한다.

[0141] 실시예 5

[0142] 독성 연구

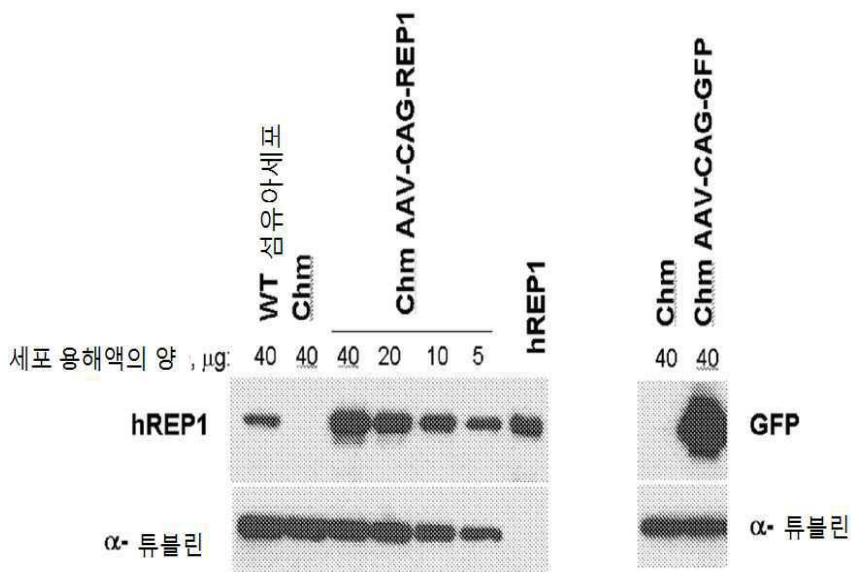
[0143] 가장 높은 용량에서 망막 기능에 가능한 독성 효과를 결정하기 위하여, AAV2.REP1 벡터의 용량을 야생형 마우스의 망막하 공간에 주사하였다(n=9). 본 발명자들은 마우스에서 환자에서 사용되는 것으로 제안되는 고농도 및 저농도(ml 당  $10^{10}$  및  $10^{11}$  gp)보다 높은 로그 단위의 벡터 농도(ml 당  $1 \times 10^{11}$  및  $1 \times 10^{12}$  ml 당 gp)를 시험하였다.

[0144] 도 4에 결과가 표시된다. AAV.REP1 벡터의 고용량(n=5) 또는 저용량(n=4) 중 하나의 용량으로 망막하 주사 후 6개월간 망막전위도(ERG)에 독성효과가 검출되지 않았다. 망막 수술 또는 AAV2 벡터의 비 특이적 효과를 조정하기 위해, 반대쪽 안구에 매우 유사하게 AAV2.GFP의 역가를 망막하 주사하였다.

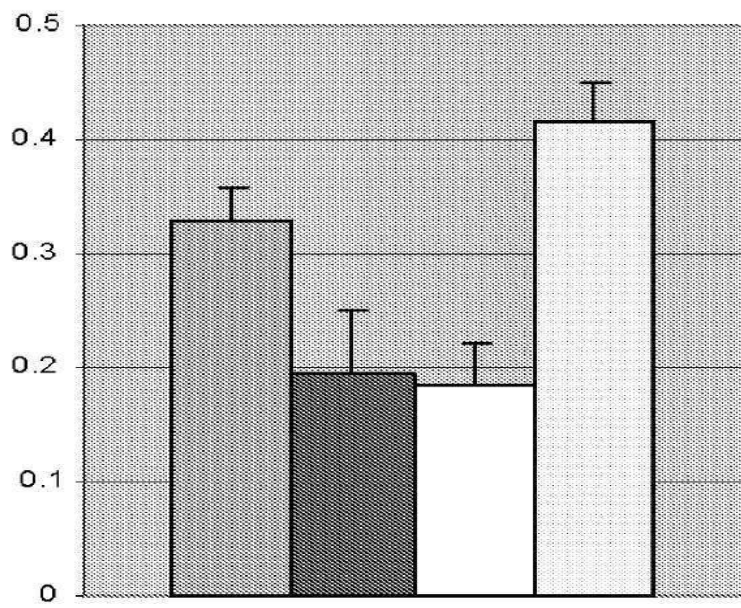
[0145] AAV2.GFP의 최고 용량에서 ERG 진폭의 경미한(mild) 감소가 있었고, 이는 이 강력한 프로모터로 GFP를 발현시키는 벡터의 최대 용량을 사용한, 알려진 경미한 독성효과를 반영하고, 용량에 따른 효과(dose-related effect)의 검출에 대한 이 시험의 민감도를 확인한다. 그럼에도 불구하고 고용량 또는 저용량으로 AAV2.REP1로 치료 받은 안구에서 검출가능한 ERG 감소가 없었고, 이는 망막에서 REP1 과-발현이 GFP보다 독성이 덜하다는 것을 시사하였다.

## 도면

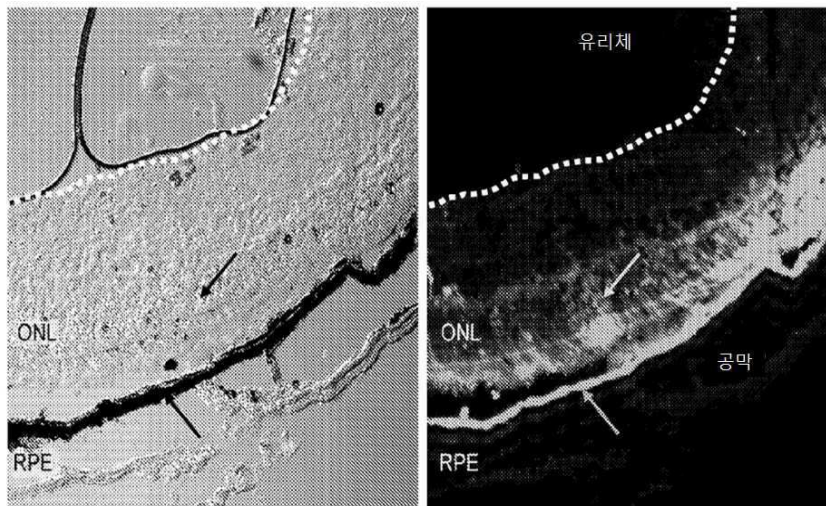
### 도면1



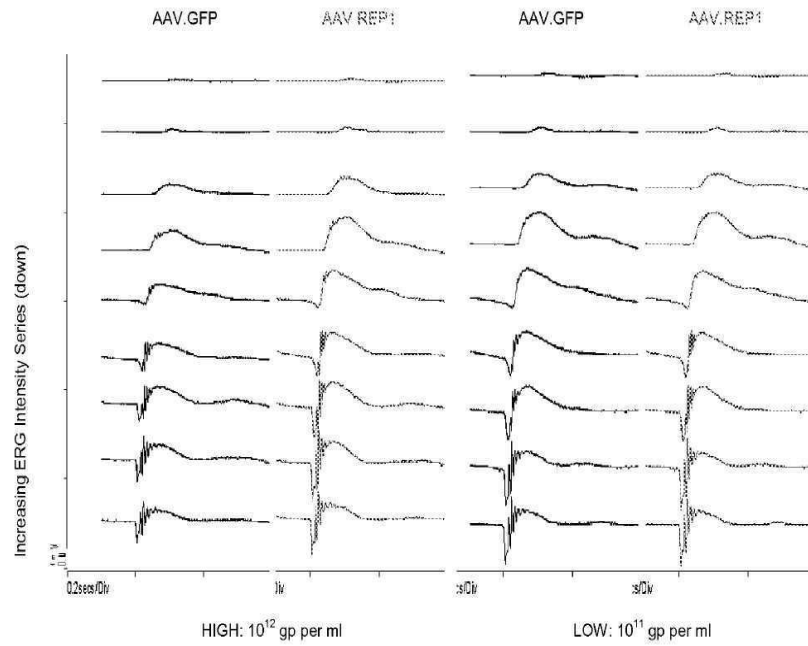
도면2



도면3



도면4



## 서열 목록

<110> ISIS INNOVATION LIMITED

<120> METHOD

<130> N.112542A LPC

<150> GB 1103062.4

<151> 2011-02-22

<160> 9

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4679

<212> DNA

<213> adeno-associated virus 2

<400> 1

```

ttggccaatc cctctctgcg cgctcgctcg ctactgagg ccgggcgacc aaaggtcgcc      60
cgacgcccgg gctttgcccg ggcggcctca gtgagcgagc gagcgcgag agagggagtg      120
gccaactcca tacttagggg ttcttgaggg ggtggagtgc tgactgaat tacgtcatag      180
ggttaggagg gtccgtgatt agaggtcacg tgagtgtttt gcgacatttt gcgacaccat      240

giggtcacgc tgggtattta agcccgagtg agcacgcagg gtctccattt tgaagcggga      300
ggtttgaacg cgcagccgcc atgccggggt ttacgagat tgtgattaag gtccccagcg      360
accttgacga gcatctgccc ggcattttctg acagctttgt gaactgggtg gccgagaagg      420

```

|  |      |
|--|------|
| aatgggagtt gccgccagat tctgacatgg atctgaatct gattgagcag gcacccctga  | 480  |
| ccgtggccga gaagctgcag cgcgactttc tgacggaatg gcgccgtgtg agtaaggccc  | 540  |
| cggaggccct tttctttgtg caatttgaga agggagagag ctacttcac atgcacgtgc   | 600  |
| tcgtggaaac caccggggtg aaatccatgg ttttgggacg tttcctgagt cagattcgcg  | 660  |
| aaaaactgat tcagagaatt taccgcgga tcgagccgac ttgccaac tggttcgcgg     | 720  |
| tcacaaagac cagaaatggc gccggaggcg ggaacaaggt ggtggatgag tgctacatcc  | 780  |
| ccaattactt gctcccaaa acccagcctg agctccagtg ggctggact aatatggaac    | 840  |
| agtatttaag cgcctgtttg aatctcacgg agcgtaaac gttggtggcg cagcatctga   | 900  |
| cgcacgtgtc gcagacgcag gagcagaaca aagagaatca gaatccaat tctgatgcgc   | 960  |
| cggatgatcag atcaaaaact tcagccaggc acatggagct ggtcgggtgg ctctggaca  | 1020 |
| aggggattac ctcggaag cagtggatcc aggaggacca ggctcatac atctccttca     | 1080 |
| atgcgcctc caactcgcgg tcccaaatca aggtgcctt ggacaatgcg ggaaagatta    | 1140 |
| tgagcctgac taaaaccgcc cccgactacc tggtaggcca gcagcccgtg gaggacattt  | 1200 |
| ccagcaatcg gatttataaa attttgaac taaacgggta cgatcccaa tatgcggctt    | 1260 |
| ccgtctttct gggatgggcc acgaaaaagc tcggcaagag gaacaccatc tggtgtttg   | 1320 |
| ggcctgcaac taccgggaag accaaccatc cggaggccat agccacact gtgcccttct   | 1380 |
| acgggtgcgt aaactggacc aatgagaact ttcccttcaa cgactgtgtc gacaagatgg  | 1440 |
| tgatctggtg ggaggagggg aagatgaccg ccaaggtcgt ggagtcggcc aaagccattc  | 1500 |
| tcggaggaag caaggtgcgc gtggaccaga aatgcaagtc ctggcccag atagaccga    | 1560 |
| ctcccgtgat cgtcacctcc aacaccaaca tgtgcgccgt gattgacggg aactcaacga  | 1620 |
| ccttcgaaca ccagcagccg ttgcaagacc ggatgttcaa atttgaactc acccgccgtc  | 1680 |
| tggatcatga ctttgggaag gtcaccaagc aggaagtcaa agacttttcc cggtagggcaa | 1740 |
| aggatcacgt ggttgagggtg gagcatgaat tctacgtcaa aaagggtgga gccaagaaaa | 1800 |
| gaccgcccc cagtgcacga gatataagt agcccaaacg ggtgcgcgag tcagttgcgc    | 1860 |
| agccatcgac gtcagacgcg gaagcttcga tcaactacgc agacaggtac caaaacaaat  | 1920 |
| gttctcgtca cgtgggcatg aatctgatgc tgtttccctg cagacaatgc gagagaatga  | 1980 |
| atcagaattc aaatatcgc ttacttcacg gacagaaaga ctgtttagag tgctttccc    | 2040 |
| tgtcagaatc tcaaccggtt tctgtcgtca aaaaggcgta tcagaaactg tgctacattc  | 2100 |
| atcatatcat gggaaagggtg ccagacgctt gcactgcctg cgatctggtc aatgtggatt | 2160 |
| tggatgactg catctttgaa caataaatga tttaaatcag gtatggctgc cgatggttat  | 2220 |
| cttcagatt ggctcgagga cactctctct gaaggaataa gacagtgtg gaagctcaaa    | 2280 |

|   |      |
|---|------|
| cctggccac caccacaaa gccgcagag cggcataagg acgacagcag gggctttgtg    | 2340 |
|   |      |
| cttcctgggt acaagtacct cggacccttc aacggactcg acaagggaga gccggtcaac | 2400 |
| gaggcagacg ccgcgccct cgagcacgac aaagcctacg accggcagct cgacagcgga  | 2460 |
| gacaacccgt acctcaagta caaccacgcc gacgcggagt ttcaggagcg ccttaagaa  | 2520 |
| gatacgtctt ttgggggcaa cctcggacga gcagtcttc aggcgaaaaa gagggttctt  | 2580 |
| gaacctctgg gcctggtga ggaacctgtt aagacggctc cgggaaaaa gaggccggtg   | 2640 |
| gagcactctc ctgtggagcc agactcctcc tcgggaaccg gaaaggcggg ccagcagcct | 2700 |
| gcaagaaaaa gattgaattt tggtcagact ggagacgcag actcagtacc tgacccccag | 2760 |
|   |      |
| cctctcggac agccaccagc agccccctct ggtctgggaa ctaatacgat ggctacaggc | 2820 |
| agtggcgcac caatggcaga caataacgag ggcgccgacg gagtgggtaa ttcctcggga | 2880 |
| aattggcatt gcgattccac atggatgggc gacagagtca tcaccaccag caccgaacc  | 2940 |
| tgggccctgc ccacctaca caaccacctc tacaacaaa tttccagcca atcaggagcc   | 3000 |
| tcgaacgaca atcactactt tggctacagc accccttggg ggtattttga cttcaacaga | 3060 |
| ttccactgcc acttttcacc acgtgactgg caaagactca tcaacaacaa ctggggattc | 3120 |
| cgaccaaga gactcaactt caagctcttt aacattcaag tcaaagaggt cacgcagaat  | 3180 |
|   |      |
| gacggtacga cgacgattgc caataacctt accagcacgg ttcaggtgtt tactgactcg | 3240 |
| gagtaccagc tcccgtagct cctcggctcg gcgcatcaag gatgcctccc gccgttccca | 3300 |
| gcagagctct tcatggtgcc acagtatgga tacctaccc tgaacaacgg gagtacggca  | 3360 |
| gtaggacgct cttcatttta ctgctggag tactttcctt ctcagatgct gcgtaccgga  | 3420 |
| aacaacttta ccttcagcta cacttttgag gacgttctt tccacagcag ctacgtcac   | 3480 |
| agccagagtc tggaccgtct catgaatcct ctcatcgacc agtacctgta ttacttgagc | 3540 |
| agaacaacaa ctccaagtgg aaccaccacg cagtcaagc ttcagtttcc tcaggccgga  | 3600 |
|   |      |
| gcgagtgaca ttcgggacca gtctaggaac tgcttctctg gacctgtta ccgccagcag  | 3660 |
| cgagtatcaa agacatctgc ggataacaac aacagtgaat actcgtggac tggagctacc | 3720 |
| aagtaccacc tcaatggcag agactctctg gtgaatccgg gcccgccat ggcaagccac  | 3780 |
| aaggacgatg aagaaaagtt ttttctcag agcggggttc tcatctttgg gaagcaaggc  | 3840 |
| tcagagaaaa caaatgtgga cattgaaaag gtcatgatta cagacgaaga ggaaatcagg | 3900 |
| acaaccaatc ccgtggctac ggagcagtat ggttctgtat ctaccaacct ccagagaggc | 3960 |
| aacagacaag cagctaccgc agatgtcaac acacaaggcg ttcttccagg catggtctgg | 4020 |



|   |      |
|---|------|
| caggacagag atgtgtacct tcaggggccc atctgggcaa agattccaca cacggacgga   | 4080 |
| cattttcacc cctctccct catgggtgga ttcgactta aacacctcc tccacagatt      | 4140 |
| ctcatcaaga acaccccggt acctgcgaat ccttcgacca ccttcagtgc ggcaaagttt   | 4200 |
| gtttccttca tcacacagta ctccacggga caggtcagcg tggagatcga gtgggagctg   | 4260 |
| cagaaggaaa acagcaaac ctggaatccc gaaattcagt acacttcaa ctacaacaag     | 4320 |
| tctgttaatg tggactttac tgtggacact aatggcgtgt attcagagcc tcgccccatt   | 4380 |
| ggcaccagat acctgactcg taatctgtaa ttgcttgta atcaataaac cgtttaattc    | 4440 |
|   |      |
| gtttcagttg aactttggtc tctgcgtatt tctttcttat ctagtttcca tggctacgta   | 4500 |
| gataagtagc atggcgggtt aatcattaac tacaaggaac ccctagtgat ggagttggcc   | 4560 |
| actccctctc tgcgcgctcg ctgcctcact gaggccgggc gaccaaaggt cggccgacgc   | 4620 |
| ccgggctttg cccgggcggc ctcatgtagc gagcgagcgc gcagagaggg agtggccaa    | 4679 |
| <210> 2   |      |
| <211> 1962  |      |
| <212> DNA   |      |
| <213> Homo sapiens  |      |
| <400> 2   |      |
| atggcggata ctctcccttc ggagtttgat gtgatcgtaa tagggacggg ttgacctgaa   | 60   |
| tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga   | 120  |
|   |      |
| agctactatg gaggaaactg ggccagtttt agcttttcag gactattgtc ctggctaaag   | 180  |
| gaataaccagg aaaacagtga cattgtaagt gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt  | 240  |
| gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta   | 300  |
| ttttgttatg ccagtcagga ttgcatgaa gatgtcgaag aagctggtgc actgcagaaa    | 360  |
| aatcatgctc ttgtgacatc tgcaactcc acagaagctg cagattctgc cttcctgcct    | 420  |
| acggaggatg agtcattaag cactatgagc tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc   | 480  |
| agcgatccag agaatgcgct agaagtaaat ggtgctgaag tgacagggga aaaagaaaac   | 540  |
|   |      |
| catttgtatg ataaaacttg tgtgcatca acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg    | 600  |
| cctatagcag aagataccac agagcaacca aagaaaaaca gaattactta ctacaaaatt   | 660  |
| attaaagaag gcaggagatt taatatgat ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga    | 720  |
| ttactaattg atcttctaata caaatctaata gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt | 780  |
| accaggattc ttgcatttcg agaaggacga gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat   | 840  |
| gtctttaata gcaacaact tactatggta gaaaagcgaa tgctaataaa atttcttaca    | 900  |

ttttgtatgg aatatgagaa atatacctgat gaataataaag gatatgaaga gatcacattt 960  
  
 tatgaatatt taaagactca aaaattaacc cccaacctcc aatatattgt catgcattca 1020  
 attgcaatga catcagagac agccagcagc accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac 1080  
 tttcttcact gtcttgggcg gtatggcaac actccatttt tgtttccttt atatggccaa 1140  
 ggagaactcc ccagtggttt ctgcaggatg tgtgctgtgt ttggtggaat ttattgtctt 1200  
 cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata 1260  
 gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag ctttctctcg tggaggacag ttactttcct 1320  
 gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg cagatctcca gggcagtgct gattacagat 1380  
  
 agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa cagatttcca tttgacagt gccagcagag 1440  
 gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt gagttatgtt cttcaacgat gacatgcatg 1500  
 aaaggcacct atttggttca tttgacttgc acatcttcta aaacagcaag agaagattta 1560  
 gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa 1620  
 gtagaaaagc caagaattct gtgggctctt tacttcaata tgagagattc gtcagacatc 1680  
 agcaggagct gttataatga tttaccatcc aacgtttatg tctgctctgg ccagatttgt 1740  
 ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag gctgaaacac ttttcagga aatctgcccc 1800  
  
 aatgaagatt tctgtccccc tccaccaaat cctgaagaca ttatccttga tggagacagt 1860  
 ttacagccag aggcttcaga atccagtgcc ataccagagg ctaactcgga gactttcaag 1920  
 gaaagcacia accttggaac cctagaggag tcctctgaat aa 1962  
  
 <210> 3  
 <211> 653  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 Met Ala Asp Thr Leu Pro Ser Glu Phe Asp Val Ile Val Ile Gly Thr  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Pro Glu Ser Ile Ile Ala Ala Ala Cys Ser Arg Ser Gly Arg  
 20 25 30  
  
 Arg Val Leu His Val Asp Ser Arg Ser Tyr Tyr Gly Gly Asn Trp Ala  
 35 40 45  
 Ser Phe Ser Phe Ser Gly Leu Leu Ser Trp Leu Lys Glu Tyr Gln Glu  
 50 55 60

Asn Ser Asp Ile Val Ser Asp Ser Pro Val Trp Gln Asp Gln Ile Leu  
 65                      70                      75                      80  
 Glu Asn Glu Glu Ala Ile Ala Leu Ser Arg Lys Asp Lys Thr Ile Gln  
                     85                      90                      95  
 His Val Glu Val Phe Cys Tyr Ala Ser Gln Asp Leu His Glu Asp Val  
  
                     100                      105                      110  
 Glu Glu Ala Gly Ala Leu Gln Lys Asn His Ala Leu Val Thr Ser Ala  
                     115                      120                      125  
 Asn Ser Thr Glu Ala Ala Asp Ser Ala Phe Leu Pro Thr Glu Asp Glu  
                     130                      135                      140  
 Ser Leu Ser Thr Met Ser Cys Glu Met Leu Thr Glu Gln Thr Pro Ser  
 145                      150                      155                      160  
 Ser Asp Pro Glu Asn Ala Leu Glu Val Asn Gly Ala Glu Val Thr Gly  
                     165                      170                      175  
  
 Glu Lys Glu Asn His Cys Asp Asp Lys Thr Cys Val Pro Ser Thr Ser  
                     180                      185                      190  
 Ala Glu Asp Met Ser Glu Asn Val Pro Ile Ala Glu Asp Thr Thr Glu  
                     195                      200                      205  
 Gln Pro Lys Lys Asn Arg Ile Thr Tyr Ser Gln Ile Ile Lys Glu Gly  
                     210                      215                      220  
 Arg Arg Phe Asn Ile Asp Leu Val Ser Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Gly  
 225                      230                      235                      240  
 Leu Leu Ile Asp Leu Leu Ile Lys Ser Asn Val Ser Arg Tyr Ala Glu  
  
                     245                      250                      255  
 Phe Lys Asn Ile Thr Arg Ile Leu Ala Phe Arg Glu Gly Arg Val Glu  
                     260                      265                      270  
 Gln Val Pro Cys Ser Arg Ala Asp Val Phe Asn Ser Lys Gln Leu Thr  
                     275                      280                      285  
 Met Val Glu Lys Arg Met Leu Met Lys Phe Leu Thr Phe Cys Met Glu  
                     290                      295                      300  
 Tyr Glu Lys Tyr Pro Asp Glu Tyr Lys Gly Tyr Glu Glu Ile Thr Phe

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

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

Pro Asn Pro Glu Asp Ile Ile Leu Asp Gly Asp Ser Leu Gln Pro Glu  
610 615 620  
Ala Ser Glu Ser Ser Ala Ile Pro Glu Ala Asn Ser Glu Thr Phe Lys  
625 630 635 640  
Glu Ser Thr Asn Leu Gly Asn Leu Glu Glu Ser Ser Glu  
645 650

<210> 4

<211> 1992

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 4

gatatcgaat tctgcagcc cggcggcacc atggcggata ctctcccttc ggagtttgat 60

gtgatcgtaa tagggacggg ttgcctgaa tccatcattg cagctgcatg ttcaagaagt 120

ggccggagag ttctgcatgt tgattcaaga agctactatg gaggaactg ggccagtttt 180

agcttttcag gactattgtc ctggctaaag gaataccagg aaaacagtga cattgtaagt 240

gacagtccag tgtggcaaga ccagatcctt gaaaatgaag aagccattgc tcttagcagg 300

aaggacaaaa ctattcaaca tgtggaagta tttgtttatg ccagtcagga ttgcatgaa 360

gatgtcgaag aagctgggtc actgcagaaa aatcatgctc ttgtgacatc tgcaaactcc 420

acagaagctg cagattctgc ctctctgcct acggaggatg agtcattaag cactatgagc 480

tgtgaaatgc tcacagaaca aactccaagc agcgatccag agaatgcgct agaagtaaat 540

ggtgtcgaag tgacagggga aaaagaaaac cattgtgatg ataaaacttg tgtgccatca 600

acttcagcag aagacatgag tgaaaatgtg cctatagcag aagataccac agagcaacca 660

aagaaaaaca gaattactta ctacaaaatt attaaagaag gcaggagatt taatattgat 720

ttagtatcaa agctgctgta ttctcgagga ttactaattg atcttctaata caaatctaata 780

gttagtcgat atgcagagtt taaaaatatt accaggattc ttgcatttcg agaaggacga 840

gtggaacagg ttccgtgttc cagagcagat gtctttaata gcaaacaact tactatggta 900

gaaaagcgaa tgctaataaa atttcttaca ttttgtatgg aatatgagaa ataccctgat 960

gaatataaag gatataaaga gatcacattt tatgaatatt taaagactca aaaattaacc 1020

cccaacctcc aatataattgt catgcattca attgcaatga catcagagac agccagcagc 1080

accatagatg gtctcaaagc taccaaaaac tttcttcact gtcttgggcg gtatggcaac 1140

actccatttt tgtttccttt atatggccaa ggagaactcc cccagtgttt ctgcaggatg 1200

tgtgctgtgt ttgggtggaat ttattgtctt cgccattcag tacagtgcct tgtagtggac 1260

aaagaatcca gaaaatgtaa agcaattata gatcagtttg gtcagagaat aatctctgag 1320

catttctctg tggaggacag ttactttcct gagaacatgt gctcacgtgt gcaatacagg 1380

cagatctcca gggcagtgtc gattacagat agatctgtcc taaaaacaga ttcagatcaa 1440

cagatttcca ttttgacagt gccagcagag gaaccaggaa cttttgctgt tcgggtcatt 1500

gagttatgtt cttaacgat gacatgcatt aaaggcacct atttggttca ttgacttgc 1560

acatcttcta aaacagcaag agaagattta gaatcagttg tgcagaaatt gtttgttcca 1620

tatactgaaa tggagataga aaatgaacaa gtagaaaagc caagaattct gtgggtcttt 1680

tacttcaata tgagagattc gtcagacatc agcaggagct gttataatga ttaccatcc 1740

aacgtttatg tctgctctgg cccagattgt ggtttaggaa atgataatgc agtcaaacag 1800

gtgaaacac ttttccagga aatctgcccc aatgaagatt tctgtcccc tccaccaa 1860

cctgaagaca ttatccttga tggagacagt ttacagccag aggccttcaga atccagtgc 1920

ataccagagg ctaactcgga gactttcaag gaaagcaca accttggaac cctagaggag 1980

tcctctgaat aa 1992

<210> 5

<211> 588

<212> DNA

<213> Woodchuck hepatitis B virus

<400> 5

atcaacctct ggattacaaa atttgtgaaa gattgactgg tattcttaac tatgttgctc 60

cttttacgt atgtggatac gctgctttta tgcctttgta tcatgctatt gcttcccgt 120

tggttttcat ttctctctcc ttgtataaat cctggttgct gtctctttat gaggagtgt 180

ggcccgttgt caggcaacgt ggcgtgggtg gcactgtgtt tgctgacga accccactg 240

gttggggcat tgccaccacc tgcagctcc ttccgggac ttctgcttc cccctcccta 300

ttgccacggc ggaactcatc gccgcctgcc ttgcccgctg ctggacaggg gctcggtgt 360



tgggcactga caattccgtg gtgtttgtcgg ggaaatcatc gtcctttcct tggctgctcg 420  
cctgtgttgc cacctggatt ctgcgcggga cgtccttctg ctacgtccct tcggccctca 480

atccacggga ctttcttcc cgcggcctgc tgcggctctt ggcgcctctt ccgcgtcttc 540  
gccttcgccc tcagacgagt cggatctccc ttggggccgc ctccccgc 588

<210> 6  
<211> 934  
<212> DNA  
<213> Gallus gallus  
<400> 6

attgacgtca ataagacgt atgttcccat agtaaccca atagggaact tccattgacg 60  
tcaatgggtg gactatttac ggtaaaactgc ccacttggca gtacatcaag tgtatcatat 120  
gccaagtacg cccctattg acgtcaatga cggtaaatgg cccgcctggc attatgcccc 180  
gtacatgacc ttatgggact ttctacttg gcagtacac tacgtattag tcacgctat 240

taccatggtc gaggtgagcc ccacgttctg cttcactctc cccatctccc cccctcccc 300  
acccccaatt ttgtatttat ttatttttta attattttgt gcagcgatgg gggcgggggg 360  
gggggggggg cgcgccag gcggggcggg gcggggcgag gggcggggcg gggcgaggcg 420  
gagaggtgcg gcggcagcca atcagagcgg cgcgtccga aagtttctt ttatggcgag 480  
gcggcgggcg cgcgggccct ataaaagcg aagcgcgcg cgggcgggag tcgctgcgcg 540  
ctgccttcgc cccgtgcccc gtcgcgcgc cgcctcgcgc ccccccccc ggctctgact 600  
gaccgcgtta ctccacagg tgagcgggcg ggacggccct tctcctcgg gctgtaatta 660

gcgcttggtt taatgacggc ttgtttcttt tctgtgctg cgtgaaagcc ttgaggggct 720  
ccgggagggc ctttgtgcg gggggagcgg ctcgggctg tccgcggggg gacggtgcc 780  
ttcggggggg acggggcagg gcggggttcg gcttctggcg tgtgaccggc ggctctagag 840  
cctctgctaa ccatgttat gccttcttct ttttctaca gctcctgggc aacgtgctgg 900  
ttattgtgct gtctcatcat ttggcaaag aatt 934

<210> 7  
<211> 270  
<212> DNA  
<213> Bos primigenius  
<400> 7

tcgctgatca gcctcgactg tgccttctag ttccagcca tctgtgtttt gcccctcccc 60

|   |     |
|---|-----|
| cgtgccttcc ttgaccctgg aagggtgccac tccactgtc ctttcctaataaaaatgagga | 120 |
| aattgcacgc cattgtctga gtaggtgtca ttctattctg gggggtgggg tggggcagga | 180 |
| cagcaagggg gaggattggg aagacaatag caggcatgct ggggatgcgg tgggctctat | 240 |
| ggcttctgag gcggaaagaa ccagctgggg                                  | 270 |
| <210> 8   |     |
| <211> 144   |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> adeno-associated virus 2                                    |     |
| <400> 8   |     |
| ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccgcc cgggcaaagc cggggtgtcg ggcgaccttt   | 60  |
| ggtcgcccgg cctcagttag cgagcgagcg gcagagagg gattggccaa ctccatcact  | 120 |
| aggggttcct ttagttaat gatt   | 144 |
| <210> 9   |     |
| <211> 145   |     |
| <212> DNA   |     |
| <213> adeno-associated virus 2                                    |     |
| <400> 9   |     |
| tgcgcgtcg ctcgtcact gaggccgggc gaccaaaggt cggcgacgc cggggtttg     | 60  |
| cccgggcggc ctcagttagc gagcgagcg gcagagcttt ttgcaaaagc ctaggcctcc  | 120 |
| aaaaaagcct ctcactact tctgg  | 145 |

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 13

【변경전】

청구항 12에 있어서, 상기 약학 조성물은 종점(endpoint)을 포함하여, 상기 배터를 밀리미터(mL) 당 1 X 10<sup>10</sup> 내지 1 X 10<sup>13</sup> 게놈 입자(gp)로 포함하거나 이로 구성된 것인 약학적 조성물.

【변경후】

청구항 12에 있어서, 상기 약학적 조성물은 종점(endpoint)을 포함하여, 상기 배터를 밀리미터(mL) 당 1 X 10<sup>10</sup> 내지 1 X 10<sup>13</sup> 게놈 입자(gp)로 포함하거나 이로 구성된 것인 약학적 조성물.

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 16

【변경전】

청구항 12에 있어서, 상기 배터는 mL 당 1x10<sup>12</sup> gp의 농도로 존재하고, 상기 약학 조성물은 액체 캐

리어를 더 포함하고, 상기 약학 조성물은 망막하 공간으로 직접 투여되는 것인 약학적 조성물.

【변경후】

청구항 12에 있어서, 상기 벡터는 mL 당  $1 \times 10^{12}$  gp의 농도로 존재하고, 상기 상기 약학적 조성물은 액체 캐리어를 더 포함하고, 상기 약학적 조성물은 망막하 공간으로 직접 투여되는 것인 약학적 조성물.