



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0091435
(43) 공개일자 2020년07월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/86 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/86 (2013.01)
A61K 48/0058 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7018368
(22) 출원일자(국제) 2018년11월28일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년06월25일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/082872
(87) 국제공개번호 WO 2019/106027
국제공개일자 2019년06월06일
(30) 우선권주장
17204746.6 2017년11월30일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
프리드리히 미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치
스위스 체하-4058 바젤 마울비르스트라세 66
(72) 발명자
위트너, 요제피네
스위스 4054 바젤 로트베르거스트라세 9
크롤, 야체크
스위스 4052 바젤 빌텐슈타이너스트라세 10
로스카, 보톤트
스위스 4104 오베르빌 인 드리셀 82
(74) 대리인
양영준, 이상영

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **영장류 망막 색소 상피 세포-특이적 프로모터 SynP61**

(57) 요약

본 발명은 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키는 방법에 관한 것으로, 이 방법은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자를 영장류의 망막 색소 상피 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 이 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 이 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도한다.

(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키는 방법으로서, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자를 상기 영장류의 망막 색소 상피 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 발현 카세트는 벡터의 일부인, 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인, 방법.

청구항 6

SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자의 용도로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키기 위해, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 용도.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함하는, 용도.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부인, 용도.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 발현 카세트는 벡터의 일부인, 용도.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 벡터는 바이러스 벡터인, 용도.

청구항 11

SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포 내 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우 상기 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 망막 색소 상피와 관련된 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 단리된 핵산

분자.

청구항 12

제11항에 있어서, 망막 색소 상피와 관련된 상기 질환은 노화관련 황반변성, 망막색소변성증, 당뇨망막병증, 및 망막 색소 상피 비대증으로 이루어진 군으로부터 선택되는, 망막 색소 상피와 관련된 질환을 치료하는 데 사용 하기 위한 단리된 핵산 분자.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 망막 색소 상피(RPE) 세포에서 특이적으로 유전자 발현을 유도하는 핵산 서열에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 발현의 목적으로, 재조합 유전자는 일반적으로, 이중 유전자의 전사가 가능하도록 활성 발현 카세트와 관련된 cDNA 작제물로서 표적 세포, 세포 집단, 또는 조직 내로 형질감염된다. DNA 작제물은 인헨서, 사일런서, 인슐레이터, 및 프로모터(본원에서는 통칭하여 "프로모터"라 함)를 포함하는 시스-조절 요소에서의 여러 트랜스-작용 전사 인자(TF)의 활성화와 관련된 프로세스에서 세포 전사 기구에 의해 인식된다.

[0003] 유전자 프로모터는 이러한 모든 수준의 조절에 관여하며, DNA 서열, 전사 인자 결합, 및 후성적 특성의 영향을 통합하여 유전자 전사에서 결정인자로서 작용한다. 이들은, 예를 들어 플라스미드 벡터에 의해 인코딩되는 이식 유전자 발현의 강도뿐만 아니라, 상기 이식유전자가 어느 세포 유형 또는 유형들에서 발현될 것인지를 결정한다.

[0004] 포유류 세포에서 이중 유전자 발현을 유도하는 데 사용되는 가장 일반적인 프로모터는 인간 및 마우스 사이토메갈로바이러스(CMV) 주요 조기발현(major immediate early) 프로모터이다. 이들은 강력한 발현을 제공하고, 몇몇 세포 유형에서 강력한 것으로 입증되었다. SV40 조기발현 프로모터 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 긴 말단 반복(long-terminal-repeat, LTR) 프로모터와 같은 다른 바이러스 프로모터도 발현 카세트에서 빈번하게 사용된다.

[0005] 바이러스 프로모터 대신, 세포 프로모터도 사용될 수 있다. 알려진 프로모터 중에는, 풍부하게 전사된 세포 전사체를 인코딩하는 하우스-키퍼 유전자, 예컨대 베타-액틴, 연장 인자 1-알파(EF-1알파), 또는 유비퀴틴으로부터 유래된 것들이 있다. 바이러스 프로모터와 비교하여, 진핵세포 유전자 발현은 더 복잡하고, 여러 상이한 인자의 정확한 조절을 필요로 한다.

[0006] 이식유전자 발현을 위한 내인성 조절 요소의 사용에 관한 양태 중 하나는 안정한 mRNA의 생성이며, 트랜스-작용 전사 인자가 적절히 제공되는 숙주 세포의 고유 환경에서 발현이 일어날 수 있다는 것이다. 진핵세포 유전자의 발현은 시스- 및 트랜스-작용 조절 요소의 복잡한 기구에 의해 제어되므로, 대부분의 세포 프로모터는 광범위한 기능적 특성이 구명되어 있지 않다. 진핵세포 프로모터의 일부는 일반적으로, 전사된 서열의 바로 상류에 위치하며, 전사 개시 지점으로서 작용한다. 코어 프로모터는 전사 기구에 의해 인식되기에 충분한 전사 개시 부위(TSS)를 즉시 둘러싼다. 근위 프로모터는 코어 프로모터의 상류 영역을 포함하며, TSS 및 전사 조절에 필요한 다른 서열 특징을 포함한다. 전사 인자는 프로모터 및 인헨서 서열에서 조절 모티프에 결합함으로써 서열 특이적으로 작용하여, 뉴클레오솜의 구조 및 최종적으로 전사의 개시가 가능한 뉴클레오솜의 위치를 변경하는 염색질 및 히스톤 변형 효소를 활성화시킨다. 기능적 프로모터의 식별은 관련된 상류 또는 하류 인헨서 요소의 존재에 주로 좌우된다.

[0007] 이식유전자 발현을 위한 내인성 조절 요소의 사용에 관한 다른 중요한 양태는 일부 프로모터가 세포 특이적 방식으로 작용할 수 있어, 특정 유형의 세포에서, 또는 프로모터에 따라 특정 하위세트의 세포에서 이식유전자의 발현을 유도한다는 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 하나의 목적은 높은 발현 수준 및 세포 유형 특이적 방식으로 망막의 포유류 세포에서 재조합 유전자를 발현시키기에 적합한 새로운 서열을 획득하는 것이다.

[0009] 이러한 서열은 신경변성 장애, 시력 회복, 신약 발굴, 중앙 치료법, 및 장애의 진단 연구를 위한 시스템을 개발하고자 하는 망막 세포 특이적 프로모터에 대한 당업계의 요구를 해결한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은 WO 2015/121793에 기술된 바와 같이 췌장 모델의 물러 세포에서 유전자 발현을 특이적으로 유도하는 것으로 알려진 프로모터가 영장류에서 예상외로 그리고 이례적으로 완전히 다른 특이성을 갖는다는 것을 우연히 발견하였다. 영장류에서, 이 프로모터는 망막 색소 상피(RPE) 세포에서 유전자 발현을 특이적으로 유도한다. 이러한 특이성은, 예를 들어 노화관련 황반변성, 망막색소변성증, 당뇨병망막병증, 또는 망막 색소 상피 비대증 환자의 질환이 있는 망막의 망막 색소 상피 세포에서의 유전자 발현을 다루고 표적화하는 데 매우 유용하다.

[0011] 이 프로모터의 핵산 서열은 다음과 같다.

[0012] ATTGAAGACCTCAGACTTTAGAGATACCAGAGCTATGGGATACCTGCTGAGAAAAGCTGCTAACAGGGAGTGGAACCAGACCAGGAAAAAGAAGTTTGTACAGTCAACAAAGATGAATGGAATTGGAGATCTGATGAGCACTCTGACATTAGAAAATGGAGATGCAGAGTTTGGAGTTTGCTAGCTCTTTTTTGGGGTGTGGGGTGGGTGGTCTTGTTTGCTCCAGTATTTCTCAACAATGACAATTTAGAATGATGGTGTATACACTGCGGTATTTGAGGTATGTGATCTGCTTTTTGATTTTGACTTTATAGGAGATTACAGATAAGTGATCAAATGAACTCAGAAAAGACTTTGACCTTTAGACTTTTAACATTATTGAGAATGCCATAGACTATGGAGACTTTTGAAGTGGGGACTAAATTTATTTTGCATCATGCTTTGGCTAGGTATGGCTCCATAGACTCATCTGTTTGAACAAGCCTAAGGGAGCCAAGGGTGGATGTGGTGGTTGAATATGCTTGGCCAGGAAGGACTATTAGGAGGTATGGACTTGTGGAAGAAGCTTGTACTGTGGGAGTGGGCTTTGAGATCCTTTTCTACCTTGATGATAATGGACCAACGCTGTAACCTGTAACCAGTCCCAATTAATGTTTTCTTTTATAAGAGTTGCTTGGTCATGGTGTATACTCAGCAATGTAAACTCTAAGATGGGGGCAATGGGAGGTGCCAGGGCTACATGATAGAAGGACAGGCATTGTACAAATCCACCTACCCTACTACATGGTCTTGGACTGATTTGCAACCAACTTCTCTCAATGCTCCTCGAAATAGAGATGCTGCGCATCTCACCCATGGGGTTATATTTAGGAGGCTTTTGTATGATCA TCCACTAGTTCAGTCTAATATCTACTACTTTAATAGACATGAGTTTCTTTGTAATAACCTCTGGGATTTAGTTTCTCCATCTGAAAATTAGTTGTCTGT GGCTCATTTTCTCGTGAATAATTCAGCATGAGCCAGTACAAAAGTTGTACCAAGACCTTGTGTGTAGAAGCCGAAGTTCTTAGTGGTTCATGAGGACT TTCAAAAAGAATGAAGCCATCTTTATCTCTGAGAGATATTTATGATTGCATAGCTCAATGGCTGTCTGTGAGACAGGAAGTGAAGCCCTAAATCCATGAT GGAGTTCAACCAGCACTTAAGTGGGAAGGGCATGAAGCAGAAATGACTCAGTTGACAGGAAAACCATCAATGGCAGCAGTGCAGAGCAGACAGCCAGTCA TGGCAGACTCAGTACCAGAGGTCAAGGGTCCAGTACTAGTCAACATTTGCTTTATGACAGCAGTAACTTTACAACCTCACCTGCCACCAATGCTTGC CTACACATACTTCTGAGCCTGTGAATGAACATACAACACACACCCACACACATGCAATGCACGCGCACACACACACACTCACACACACACACACA CACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATGCACACACAGGCAGCTTGTGACGAGCTGTGCACATACAAGGATCTGGCT ATCCAATTCGGGGACAGCTGCAGCTCAAATCCTTTCTCCACTTCCCTCCCTTAGTTATGCAACCCTTACCAATTCAGCTTCTACTCACACACCATTG GATCCAAGACCTTAATCTGCCTAGTGGGCTGGAATGAACAAGCAGAGCTCATTCCAGCTTCACAAAAGCTGCACTATCCATCTACTGAATGGATTCTTTC TATGTGAGCCAAGAGGAAGACTTAGAAGGATAAGAAATAAAAAAGGTGTATTAGTCTACCAATAAATCTCCACATGCCAGCAAGGGAGTGACCAATTAAG AGGAGAGACCTAGCTTCAGAGAGCCAGAAAAGAGCTGTGTAGCTGACAGAGGGAGTCCAGGG (SEQ ID NO:1).

[0013] 이로부터, 본 발명은 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키는 방법으로서, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자를 상기 영장류의 망막 색소 상피 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 방법을 제공한다. 단리된 핵산 분자는 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부일 수 있고, 이는 결국 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 일부일 수 있다.

[0014] 본 발명은 또한, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자의 용도로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키기 위해, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 용도를 제공한다. 이러한 용도에서, 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부일 수 있고, 이는 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 일부일 수 있다.

[0015] 본 발명은 또한, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포 내 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우 상기 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 망막 색소 상피와 관련된 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 단리된 핵산 분자를 제공한다. 망막 색소 상피와 관련된 질환은 노화관련 황반변성, 망막색소변성증, 당뇨병

막병증, 및 망막 색소 상피 비대증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0016] SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포 내 유전자를 코딩하는 상기 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 단리된 핵산 분자는 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상일 수 있으며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 85%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 90%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 95%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 96%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 97%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 98%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 99%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 100%의 전체 동일성을 갖는다.

[0017] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예컨대 SV40 최소 프로모터, 예를 들어 바람직하게는 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 SV40 최소 프로모터

[0018] GCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATCGTGACTAATTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCCATAGCTTTTGCAA (SEQ ID NO:2)를 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있는 전형적인 유전자는 광수용체를 인코딩하는 유전자이다. 예를 들어, 이러한 유전자는 채널로돕신 또는 할로로돕신과 같은 감광성 분자일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] **도 1: 프로모터 ID NO:1으로부터의 영장류 망막의 망막 색소 상피 세포를 표적으로 한 발현.** 성체 원숭이 (*Macaca mulatta*) 눈에 AAV-synP61-ChR2-EGFP를 망막하 주사 3개월 후의, SEQ ID NO:1을 포함하는 프로모터로부터의 EGFP 발현에 대한 레이저주사 공초점 현미경 이미지. 망막 색소 상피 세포에서 유도된 발현을 관찰할 수 있다. 녹색 = SEQ ID NO:1에 의해 유도된 EGFP. 백색 = Hoechst.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 본 발명자들은 WO 2015/121793에 기술된 바와 같이 쥐와 같이 쥐와 모델의 물러 세포에서 유전자 발현을 특이적으로 유도하는 것으로 알려진 프로모터가 영장류에서 예상외로 그리고 이례적으로 완전히 다른 특이성을 갖는다는 것을 우연히 발견하였다. 영장류에서, 이 프로모터는 망막 색소 상피 세포에서 유전자 발현을 특이적으로 유도한다. 이러한 특이성은, 예를 들어 노화관련 황반변성, 망막색소변성증, 당뇨망막병증, 또는 망막 색소 상피 비대증 환자의 질환이 있는 망막의 망막 색소 상피 세포에서의 유전자 발현을 다루고 표적화하는 데 매우 유용하다.

[0022] 이 프로모터의 핵산 서열은 다음과 같다.

[0023] ATTGAAGACCTCAGACTTTAGAGATACCAGAGCTATGGGATACCTGCTGAGAAAAGCTGCTAACAGGGAGTGGAACCAGACCAGGAAAAAGAAGTTTGTACAGTCAACAAAGATGAATGGAATGGAGATCTGATGAGCACTCTGACATTAGAAATGGAGATGCAGAGTTTGGAGTTTGCTAGCTCTTTTTGGGTGTGGGTGGGTGGGTCTTGTGTTGCTCCAGTATTTCTCACAATGACAATTTAGAATGATGGTGTATACACTGCGGTATTTGAGGTATGTGATCTGCTTTTTGATTTTGACTTTATAGGAGATTACAGATAAGTGATCAAAATGAAACTCAGAAAAGACTTTGACCTTTAGACTTTTAACATTATTGAGAATGCCATAGACTATGGAGACTTTTGAAGTGGGGACTAAATTTATTTTGCATCATGCTTTGGCTAGGTATGGCTCCATAGACTCATCTGTTCGAACAAGCCTAAGGGAGCCAAGGGGTGGAATGTGGTGGTTGAAATATGCTTGGCCAGGAAGGACACTATTAGGAGGTATGGACTGTGGAAGAAGCTGTCTACTGTGGAGTGGGCTTTGAGATCCTTT

TTCTACCTTGATGATAATGGACCAACGCTGAACCTGTAAACCAGTCCCAATTAATGTTTCTTTTATAAGAGTTGCCTTGGTCATGGTGTATACTCACA
GCAATGTAAACTCTAAGATGGGGGACAATGGGAGGTGCCAGGGCTACATGATAGAAGGACAGGCATTGTTACAATTCACCTACCCTACTACTACATGGTCT
TGGACTGATTGCAACCAACTTCTCTCCAATGTCTCTCGAAATAGAGATGTCTTGGCATCTCACCCATGGGGTTATATTTAGGAGGCTTTTGTATGATCA
TCCACTAGTTCAGTCTAATATCTACTACTTTAATAGACATGAGTTCCCTTTGCTAATAACCCCTCTGGGATTTAGTTTCTCCATCTGAAAATTAGTTGCTGT
GGCTCATTGTTTTCTCGTGAATAATTCAGCATGAGCCAGTACAAAAGTTGTACCAAGACCTGTGTGTAGAAGCCGAAGTTCTTAGTGGGTGATGAGGACT
TTCAAAAAGAATGCAAGCCATCTTTATCCTGAGAGATATTTTATGATTGCATAGCTCAATGGCTGTCTGTGAGACAGGAAGTGAAGCCCTAAATCCATGAT
GGAGTTCAACCAGCACTTAAGTGGGAAGGCATGAAGCAGAAATGACTCAGTTGACAGGAAAACCATCCAATGGCAGCAGTGACAGCAGACAGCCAGTCA
TGGCAGACTCAGTACCAGAGGTCAAGGGTCAAGTACTAGTCAACATTTGCTTTATGACAGCAGTAACCTTACAAAACCTCACCTGCCACCAATGCTTGC
CTACACATACTTCTGAGCCTGTGAATGAACATACAACACACACCCACACACATGCAAATGCACGCGCACACACACACACTCACACACACACACACA
CACAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGATGCACACACAGGCAGCTTGTGACAGCTGTGCACATACAAGGATCTGGCT
ATCCAATTCTCGGGACAGCTGCAGCTCAAATCCTTTCTTCCACTTCCCTCCCTTAGTTATGCAACCCCTACCAATTCAGCTTCTACTCACACACCATTG
GATCCAAGACCTTAATCCTGCTAGTGGCTGGAATGAACAAGCAGAGCTCATTCCAGCTTACAAAAGCTGCACTATCCATCTACTGAATGGATTCTTTC
TATGTGAGCCAAGAGGAAGACTTAGAAGGATAAGAAATAAAAAAGGTGTTATTAGTCTACCATAATAATCTCCACATGCCAGCAAGGGAGTGACCATTTAAA
AGGAGAGACCTAGCTTCCAGAGCCAGAAAAGAGCTGTGTAGCTGACAGAGGGAGTCCAGGG (SEQ ID NO:1).

[0024] 이로부터, 본 발명은 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키는 방법으로서, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자를 상기 영장류의 망막 색소 상피 세포에 전달하는 단계를 포함하되, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 방법을 제공한다. 단리된 핵산 분자는 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부일 수 있고, 이는 결국 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 일부일 수 있다.

[0025] 본 발명은 또한, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자의 용도로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자를 특이적으로 발현시키기 위해, 상기 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우, 상기 단리된 핵산 분자가 영장류의 망막 색소 상피 세포에서 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 용도를 제공한다. 이러한 용도에서, 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예를 들어 SEQ ID NO:2의 최소 프로모터를 추가로 포함할 수 있다. 단리된 핵산 분자는 발현 카세트의 일부일 수 있고, 이는 벡터, 예를 들어 바이러스 벡터의 일부일 수 있다.

[0026] 본 발명은 또한, SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포 내 외인성 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우 상기 외인성 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 망막 색소 상피와 관련된 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 단리된 핵산 분자를 제공한다. 망막 색소 상피와 관련된 질환은 노화관련 황반변성, 망막색소변성증, 당뇨망막병증, 및 망막 색소 상피 비대증으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0027] SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 80%의 전체 동일성을 갖는 1500 bp 이상의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 영장류의 망막 색소 상피 세포 내 유전자를 코딩하는 상기 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 상기 유전자의 발현을 특이적으로 유도하는, 단리된 핵산 분자는 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상일 수 있으며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 80%의 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 85%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 90%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 95%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 96%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 97%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서

열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 98%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 적어도 99%의 전체 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 1500 bp 이상, 1600 bp 이상, 1700 bp 이상, 1800 bp 이상, 1900 bp 이상, 또는 2000 bp 이상이며, SEQ ID NO:1의 상기 핵산 서열과 100%의 전체 동일성을 갖는다.

- [0028] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 최소 프로모터, 예컨대 SV40 최소 프로모터, 예를 들어 바람직하게는 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결된 SV40 최소 프로모터
- [0029] GCTCGAGATCTGCGATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCATTCTCCGCCCATCGTGACTAATTTTTTTTATTTATGAGAGGCCGAGGCCCTCGGCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTGGAGGCTAGGCTTTTGC AAA (SEQ ID NO:2)를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있는 전형적인 유전자는 광수용체를 인코딩하는 유전자이다. 예를 들어, 이러한 유전자는 채널로돕신 또는 할로로돕신과 같은 감광성 분자일 수 있다.
- [0031] 본 발명의 프로모터를 이용한 외인성 유전자의 발현은 시험관내, 생체내, 또는 생체외에서 이루어질 수 있다.
- [0032] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 인헨서, 사일런서, 인슐레이터, 및 프로모터를 포함하는 임의의 시스-조절 요소를 의미한다. 프로모터는 전사되어야 하는 유전자의 상류에(5' 영역 쪽으로) 일반적으로 위치하는 DNA의 영역이다. 프로모터는 프로모터가 제어하는 유전자의 적절한 활성화 또는 억제를 가능하게 한다. 본 발명의 맥락에서, 프로모터는 개재 뉴런에서 프로모터에 작동 가능하게 연결되는 유전자의 특이적 발현을 유도한다. "특정 유형의 세포에서만 발현"으로도 언급되는 "특이적 발현"은 관심 유전자를 발현하는 세포의 적어도 75% 초과가 특정 유형의 세포, 즉 본 경우에는서는 망막 색소 상피(RPE) 세포임을 의미한다.
- [0033] 피그멘텀 니그럼(pigmentum nigrum)으로도 알려진 망막의 색소침착층 또는 망막 색소 상피(RPE)는 망막 시세포에 영양을 공급하는 신경감각 망막 바로 바깥에 있는 색소침착 세포층이며, 아래에 놓인 맥락막과 위에 놓인 망막 시세포에 단단히 부착되어 있다. RPE는 색소 입자로 고밀도로 채워진 육각 세포의 단일층으로 이루어진다. 거상연에서, RPE는 섬모체 위로 지나 홍채의 후면으로 이어지는 막으로서 이어진다. 이는 확대근의 섬유를 생성한다. 이 상피 바로 아래에는 RPE와 함께 통과하는 신경상피(즉, 간상세포 및 원추세포)가 있다. 이 둘의 조합은 배아의 섬모 상피로 이해된다. 망막의 전면 말단 연속은 후부 홍채 상피이며, 홍채에 들어갈 때 색소를 취한다. 외면에서 볼 때, 이들 세포는 매끄럽고 육각형의 형상이다. 단면에서 볼 때, 각각의 세포는 큰 타원형 핵을 포함하는 외측 비색소침착부 및 간상세포들 사이에서 일련의 직선의 실 모양 돌기로서 연장되는(특히, 눈이 빛에 노출되는 경우) 내측 색소침착부로 구성된다. RPE는 광흡수, 상피성 수송, 공간적 이온 완충, 시각 회로, 식세포작용, 분비, 및 면역 조절과 같은 여러 기능을 가지고 있다.
- [0034] 발현 카세트는 일반적으로, 발현 카세트가 숙주 세포에 진입하는 것과 발현 카세트가 숙주 세포에서 유지되는 것을 용이하게 하는 벡터에 도입된다. 이러한 벡터는 일반적으로 사용되며 당업자에게 잘 알려져 있다. 많은 이러한 벡터는, 예를 들어 Invitrogen, Stratagene, Clontech 등에서 상업적으로 입수 가능하며, 많은 지침서, 예컨대 Ausubel, Guthrie, Strathem, 또는 Berger, 상기 모든 회사의 지침서에 설명되어 있다. 이러한 벡터는 일반적으로, 다수의 클로닝 부위와 함께 프로모터, 폴리아데닐화 신호 등뿐만 아니라 추가 요소, 예컨대 복제기원, 선별 마커 유전자(예를 들어, LEU2, URA3, TRP1, HIS3, GFP), 동원체 서열 등을 포함한다.
- [0035] 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV, PRV, 또는 렌티바이러스는 본 발명의 프로모터를 사용하여 유전자를 표적화하고 망막 색소 상피 세포로 전달하기에 적합하다.
- [0036] 망막 세포의 출력은 다중 전극 어레이 또는 패치-클램프와 같은 전기적 방법, 또는 형광 검출과 같은 시각적 방법을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 핵산 서열을 사용하는 방법은 RPE 세포와 관련된 신경계 장애 또는 망막 장애의 치료를 위한 치료제를 동정하기 위해 사용될 수 있으며, 상기 방법은 본 발명의 프로모터 하에 하나 이상의 이식유전자를 발현하는 망막 색소 상피 세포와 시험 화합물을 접촉시키는 단계, 및 상기 시험 화합물의 존재 하에 획득된 망막 색소 상피 세포의 적어도 하나의 출력을 상기 시험 화합물의 부재 하에 획득된 동일한 출력과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0038] 또한, 본 발명의 프로모터를 사용하는 방법은 시력 회복의 시험관내 시험을 위해 사용될 수도 있으며, 상기 방

법은 본 발명의 프로모터의 제어 하에 하나 이상의 이식유전자를 발현하는 망막 색소 상피 세포를 제제와 접촉시키는 단계, 및 상기 제제와의 접촉 후에 획득된 적어도 하나의 출력을 상기 제제와의 접촉 전에 획득된 동일한 출력과 비교하는 단계를 포함한다.

- [0039] 채널로돕신은 광-개폐 이온 채널로서 기능하는 옹신 단백질의 서브패밀리이다. 이들은 단세포 녹조류에서 주광성, 즉 빛에 반응하는 움직임을 제어하는 감각 광수용체로서 작용한다. 이들이 다른 유기체의 세포에서 발현되면, 빛을 사용하여 세포내 산도, 칼슘 유입, 전기적 흥분성, 및 기타 세포 프로세스를 제어할 수 있다. 적어도 3개의 "천연" 채널로돕신(채널로돕신-1(ChR1), 채널로돕신-2(ChR2), 및 Volvox 채널로돕신(VChR1))이 현재 알려져 있다. 또한, 이들 단백질의 변형/개선된 버전도 일부 존재한다. 알려진 모든 채널로돕신은 H⁺, Na⁺, K⁺, 및 Ca²⁺ 이온을 전도하는 비특이적 양이온 채널이다.
- [0040] 할로로돕신은 클로라이드 이온에 특이적인 광활성 이온 펌프이며, 할로박테리아로 알려진 계통발생학적으로 고대의 "박테리아"(고세균)에서 발견된다. 할로로돕신은 광활성 양성자 펌프 박테리오로돕신과 상동성인, 레티널리덴 단백질 패밀리의 7회-막관통 단백질이며, 망막에서 빛을 감지하는 색소인 척추동물 로돕신과 3차 구조가 유사하다(1차 서열 구조는 유사하지 않음). 할로로돕신은 또한, 광활성 이온 채널인 채널로돕신과 서열 유사성을 공유한다. 할로로돕신은 필수적인 광-이성화 가능한 비타민 A 유도체인 올-트랜스-레티날(all-trans-retinal)을 함유한다. 할로로돕신은 결정 구조가 알려진 소수의 막 단백질 중 하나이다. 할로로돕신 이소형은 H. 살리나리움(*H. salinarum*), 및 N. 파라오니스(*N. pharaonis*)를 포함하는 여러 종의 할로박테리아에서 발견될 수 있다. 이러한 차이를 탐구하고 이를 이용해 광순환 특성과 펌프 특성을 분리하여 분석하는 많은 연구가 진행 중이다. 박테리오로돕신 다음으로, 할로로돕신이 가장 많이 연구된 I형(미생물) 옹신일 수 있다. 할로로돕신 망막 복합체의 피크 흡광도는 약 570 nm이다. 최근에, 할로로돕신은 광유전학에서의 도구가 되었다. 청색광 활성화된 이온 채널 채널로돕신-2가 짧은 펄스의 청색광으로 흥분성 세포(예컨대, 뉴런, 근육 세포, 체장 세포, 및 면역 세포)를 활성화하는 능력을 열어주는 것과 마찬가지로, 할로로돕신은 짧은 펄스의 황색광으로 흥분성 세포를 침묵화하는 능력을 열어준다. 따라서, 할로로돕신과 채널로돕신은 함께 신경 활성의 다색 광학 활성화, 침묵화, 및 비동기화를 가능하게 하여, 강력한 신경공학 툴박스를 생성한다.
- [0041] 일부 구현예에서, 프로모터는 망막을 표적화하는 벡터의 일부이며, 상기 벡터는 망막 색소 상피의 생세포에서 검출 가능한 적어도 하나의 리포터 유전자를 발현한다. 이러한 리포터 유전자는 기능성 신경 회로를 나타낼 수 있다. 이러한 벡터의 예는 활성 센서 또는 레인보우 바이러스이다(*Nature Methods* 6, 127-130 (2009)). 이러한 바이러스의 예는 뇌에서 공간적으로 혼합된 뉴런들 중에서 연결된 뉴런의 활성을 광학적으로 보고하는 유전자 인코딩된 활성 센서를 갖는 역행성 시냅스경유 가성광견병 바이러스(PRV)이다. 이러한 활성 센서는 외인성 형광 활성 센서를 발현하는 단리된 시냅스경유 바이러스일 수 있다. 시냅스경유 바이러스는 랩도바이러스, 예를 들어 광견병 바이러스, 또는 헤르페스바이러스, 예컨대 알파헤르페스바이러스, 예를 들어 가성광견병 바이러스일 수 있다.
- [0042] 형광 외인성 활성 센서는 형광 단백질 Ca²⁺ 센서, 예를 들어 황색 카멜레온, 캄가루(camgaroo), G-CaMP/Pericam, 또는 TN-L15, 또는 형광 단백질 전압 센서, 예를 들어 FlAsH, SPARC, 또는 VSP, 바람직하게는 VSP1일 수 있다.
- [0043] 본 발명에 적합한 바이러스 벡터는 당업계에서 잘 알려져 있다. 예를 들어, AAV, PRV, 또는 렌티바이러스는 유전자를 표적화하고 망막 색소 상피 세포로 전달하기에 적합하다.
- [0044] 단리된 망막으로 작업하는 경우, 망막의 광수용체층이 노출되어 형질감염이 더 잘 될 수 있도록 신경절 세포층을 아래쪽으로 마운팅함으로써 광수용체에 대한 최적의 바이러스 전달이 달성될 수 있다. 다른 기법은 전달 바이러스가 내막을 관통할 수 있도록 망막의 내측 경계막을, 예를 들어 레이저 블레이드로, 슬라이싱하는 것이다. 다른 방법은 망막을 한천에 포매하고, 상기 망막을 슬라이싱하고, 슬라이스층으로부터 전달 바이러스를 적용하는 것이다.
- [0045] 형질감염된 세포의 출력은 잘 알려진 방법, 예를 들어 다중 전극 어레이 또는 패치-클램프와 같은 전기적 방법, 또는 형광 검출과 같은 시각적 방법을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, 내측 경계막은 내측 경계막의 미세수술에 의해 제거된다. 다른 경우에, 내측 경계막에 수행된 슬라이스를 통해 기록이 수행된다.
- [0046] 본 발명에 사용되는 망막 세포원은 영장류이다. 본 발명의 일부 구현예에서, 망막 세포는 인간 망막에서 유래되거나 인간 망막에 있다. 다른 구현예에서, 망막은 2개의 다른 계통인 곡비원류(strepsirrhines)와 직비원류(haplorhine) 중 어느 하나의 다른 영장류에서 유래된다. 인간 망막은 각막의 절개 후 망막이 보통은 폐기되는

각막 은행으로부터 쉽게 얻을 수 있다. 성인 인간 망막은 넓은 표면적(약 1100 mm²)을 가지므로, 여러 실험 하위영역으로 쉽게 분리될 수 있다. 또한, 망막은 뇌의 나머지 부분과 동일한 시냅스를 가지므로, 시냅스를 통한 정보전달에 대한 정교한 모델로서 사용될 수도 있다.

[0047] 본원에서 사용되는 용어 "동물"은 모든 동물을 포함하는 것으로 본원에서 사용된다. 일부 구현예에서, 비인간 동물은 척추동물이다. 동물의 예는 인간, 마우스, 래트, 소, 돼지, 말, 닭, 오리, 거위, 고양이, 개 등이다. 용어 "동물"은 또한, 배아 및 태아 단계를 포함하여 모든 발달 단계의 개별 동물을 포함한다. "유전자 변형 동물"은 세포 하위 수준에서 의도적인 유전자 조작에 의해, 예컨대 표적화된 재조합, 미세주사, 또는 재조합 바이러스 감염에 의해 직접 또는 간접적으로 유전 정보가 변경되거나 유전 정보를 받은 하나 이상의 세포를 함유하는 임의의 동물이다. 용어 "유전자 변형 동물"은 전통적인 교배 또는 시험관내 수정을 포괄하려는 것이 아니라, 하나 이상의 세포가 재조합 DNA 분자에 의해 변경되거나 재조합 DNA 분자를 받는 동물을 포괄하는 의미이다. 이 재조합 DNA 분자는 정의된 유전자좌에 특이적으로 표적화되거나, 염색체에 무작위로 통합되거나, 염색체의 복제하는 DNA일 수 있다. 용어 "생식계열 유전자 변형 동물"은 유전자 변경 또는 유전 정보가 생식 세포에 도입됨으로써 유전 정보를 자손에게 전달하는 능력을 부여하는 유전자 변형 동물을 의미한다. 이러한 자손이 실제로 그러한 변경 또는 유전 정보의 일부 또는 전부를 보유하는 경우, 이들도 유전자 변형 동물이다.

[0048] 이러한 변경 또는 유전 정보는 수용체가 속하는 동물의 종과 이질적이거나, 특정 개별 수용체에 대해서만 이질적이거나, 수용체가 이미 보유한 유전 정보일 수 있다. 마지막 경우에, 변경되거나 도입된 유전자는 천연 유전자와 다르게 발현되거나, 전혀 발현되지 않을 수 있다.

[0049] 표적 유전자를 변경하는 데 사용되는 유전자는 게놈원으로부터의 단리, 단리된 mRNA 주형으로부터의 cDNA의 제조, 직접적 합성, 또는 이들의 조합을 비배타적으로 포함하는 매우 다양한 기법에 의해 얻을 수 있다.

[0050] 이식유전자 도입을 위한 표적 세포의 한 유형은 ES 세포이다. ES 세포는, 시험관내 배양되고 배아와 융합된 이식전 배아로부터 얻을 수 있다(Evans et al. (1981), Nature 292:154-156; Bradley et al. (1984), Nature 309:255-258; Gossler et al. (1986), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9065-9069; Robertson et al. (1986), Nature 322:445-448; Wood et al. (1993), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:4582-4584). 이식유전자는 표준 기법, 예컨대 전기천공을 이용한 DNA 형질감염, 또는 레트로바이러스-매개 형질도입에 의해 ES 세포에 효율적으로 도입될 수 있다. 생성되는 형질전환된 ES 세포는 이후, 응집에 의해 상실배와 결합되거나, 비인간 동물의 배반포에 주사될 수 있다. 도입된 ES 세포는 이후, 배아에 이식되어, 생성되는 키메라 동물의 생식계열에 기여한다(Jaenisch (1988), Science 240:1468-1474). 유전자-표적화된 유전자 변형 마우스의 생성에서 유전자-표적화된 ES 세포의 사용은 문헌[Thomas et al. (1987), Cell 51:503-512]에 기술되어 있고, 다른 문헌[Frohman et al. (1989), Cell 56:145-147; Capecchi (1989), Trends in Genet. 5:70-76; Baribault et al. (1989), Mol. Biol. Med. 6:481-492; Wagner (1990), EMBO J. 9:3025-3032; Bradley et al. (1992), Bio/Technology 10:534-539]에서 검토되어 있다.

[0051] 표적화된 상동 재조합을 사용하여 염색체 대립유전자에 특정 변화를 삽입함으로써 임의의 유전자 영역을 불활성화하거나 원하는 임의의 돌연변이로 변경하는 기법이 이용 가능하다.

[0052] 본원에서 사용되는 "표적 유전자"는 본원에 기재된 방법들을 비배타적으로 포함하는 인간 개입 방식에 의해 비인간 동물의 생식계열에 도입되는 DNA 서열이다. 본 발명의 표적 유전자는 동족 내인성 대립유전자를 특이적으로 변경하도록 설계된 DNA 서열을 포함한다.

[0053] 본 발명에서, "단리된" 것은 원래의 환경(예를 들어, 천연 발생적인 경우 천연 환경)으로부터 제거되어 천연 상태에서 "사람의 손에 의해" 변경된 물질을 의미한다. 예를 들어, 단리된 폴리뉴클레오티드는 벡터 또는 물질 조성물의 일부이거나, 세포 내에 함유될 수 있고, 벡터, 물질 조성물, 또는 특정 세포가 폴리뉴클레오티드의 원래 환경이 아니기 때문에 여전히 "단리된" 것일 수 있다. "단리된"이란 용어는 게놈 또는 cDNA 라이브러리, 전체 세포의 총 RNA 또는 mRNA 조제물, 게놈 DNA 조제물(전기영동에 의해 분리되어 불룩에 옮겨진 것들을 포함), 전단된 전체 세포 게놈 DNA 조제물, 또는 당업계에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드/서열의 특유의 특징을 나타내지 않는 기타 조성물을 의미하지 않는다. 단리된 DNA 분자의 다른 예는 이중 숙주 세포에 유지된 재조합 DNA 분자, 또는 용액 중의 (부분적으로 또는 실질적으로) 정제된 DNA 분자를 포함한다. 단리된 RNA 분자는 본 발명의 DNA 분자의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체를 포함한다. 그러나, 라이브러리의 다른 구성원으로부터 단리되지 않은 라이브러리(예를 들어, 게놈 또는 cDNA 라이브러리)의 구성원인 클론에 함유된 핵산(예를 들어, 라이브러리의 클론 및 다른 구성원을 함유하는 균질 용액 형태), 또는 세포 또는 세포 용해물로부터 제거된 염색체(예를 들어, 핵형에서와 같은 "염색체 펠침"), 또는 무작위 전단된 게놈 DNA의 조제물, 또는 하나 이상의 제한효소로

절단된 게놈 DNA의 조제물은 본 발명의 목적상 "단리된" 것이 아니다. 본원에서 추가로 논의되는 바와 같이, 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자는 천연적으로, 재조합적으로, 또는 합성적으로 제조될 수 있다.

[0054] "폴리뉴클레오티드"는 단일 가닥 및 이중 가닥 DNA, 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 DNA, 단일 가닥 및 이중 가닥 RNA, 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물인 RNA, 및 단일 가닥, 또는 보다 일반적으로는 이중 가닥, 또는 단일 가닥 영역과 이중 가닥 영역의 혼합물일 수 있는 DNA와 RNA를 포함하는 하이브리드 분자로 이루어질 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA와 DNA 둘 다 포함하는 삼중 가닥 영역으로 이루어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한, 하나 이상의 변형된 염기, 또는 안정성을 위해 또는 다른 이유로 변형된 DNA 또는 RNA 백본을 함유할 수 있다. "변형된" 염기는, 예를 들어 트리틸화된 염기 및 이노신과 같은 특이한 염기를 포함한다. DNA 및 RNA에 대한 다양한 변형이 이루어질 수 있으므로, "폴리뉴클레오티드"는 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사적으로 변형된 형태를 포괄한다.

[0055] "폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드"라는 표현은 폴리펩티드에 대한 코딩 서열만을 포함하는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 추가적인 코딩 및/또는 비코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.

[0056] "엄격한 혼성화 조건"은 50% 포름아미드, 5x SSC(750 mM NaCl, 75 mM 트리소듐 시트레이트), 50 mM 인산나트륨 (pH 7.6), 5x 덴하르트(Denhardt) 용액, 10% 텍스트란 설페이트, 및 20 µg/ml의 변성, 절단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액에서 42°C로 밤새 인큐베이션한 후, 약 50°C에서 0.1x SSC로 필터를 세척하는 것을 의미한다. 혼성화 엄격성 및 신호 검출의 변화는 주로 포름아미드 농도(포름아미드 비율이 낮을수록 엄격성은 낮아짐), 염 조건, 또는 온도의 조정을 통해 달성된다. 예를 들어, 중등도로 높은 엄격성 조건은 6X SSPE(20X SSPE = 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4), 0.5% SDS, 30% 포름아미드, 100 µg/ml의 연어 정자 차단 DNA를 포함하는 용액에서 37°C로 밤새 인큐베이션한 후, 50°C에서 1XSSPE, 0.1% SDS로 세척하는 것을 포함한다. 또한 훨씬 더 낮은 엄격성을 달성하기 위해, 엄격한 혼성화 후 수행되는 세척은 더 높은 염 농도(예를 들어, 5X SSC)에서 수행될 수 있다. 상기 조건의 변화는 혼성화 실험에서 백그라운드를 억제하기 위해 사용되는 대안적 차단 시약의 함유 및/또는 대체를 통해 달성될 수 있다. 일반적인 차단 시약은 덴하르트 시약, BLOTTO, 헤파린, 변성된 연어 정자 DNA, 및 시판되는 독점적인 제제를 포함한다. 특정 차단 시약의 함유는 상용성 문제로 인해 상기 혼성화 조건의 수정을 필요로 할 수 있다.

[0057] 폴리펩티드를 언급하는 경우, 용어 "단편", "유도체", 및 "유사체"는 이러한 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 의미한다. 유사체는 프로단백질 부분의 절단에 의해 활성화되어 활성 성숙 폴리펩티드를 생성할 수 있는 프로단백질을 포함한다.

[0058] 용어 "유전자"는 폴리펩티드 사슬을 생성하는 데 관여하는 DNA의 분절을 의미하며, 코딩 영역 전후의 영역인 "리더 및 트레일러"뿐만 아니라 개별 코딩 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)을 포함한다.

[0059] 폴리펩티드는 펩티드 결합 또는 변형된 펩티드 결합(즉, 펩티드 이소스테어)에 의해 서로 연결된 아미노산으로 이루어질 수 있으며, 20개의 유전자-인코딩된 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는 번역 후 처리와 같은 천연 프로세스에 의해 또는 당업계에 잘 알려진 화학적 변형 기법에 의해 변형될 수 있다. 이러한 변형은 기초 교재 및 더 상세한 논문, 뿐만 아니라 다수의 연구 문헌에 잘 기술되어 있다. 변형은 펩티드 백본, 아미노산 측쇄, 및 아미노 또는 카복실 말단을 비롯해 폴리펩티드의 어느 곳에서나 일어날 수 있다. 주어진 폴리펩티드의 여러 부위에서, 동일하거나 다양한 정도로, 동일한 유형의 변형이 존재할 수 있음은 이해될 것이다. 또한, 주어진 폴리펩티드는 여러 유형의 변형을 포함할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어 유비퀴틴화의 결과, 분지형일 수 있고, 분지를 갖거나 갖지 않는 환형일 수 있다. 환형, 분지형, 및 분지된 환형 폴리펩티드는 번역 후 천연 프로세스로부터 생성되거나, 합성 방법에 의해 제조될 수 있다. 변형은 아세틸화, 아실화, 비오틴화, ADP-리보실화, 아미드화, 플라빈의 공유 부착, 헴 모이어티의 공유 부착, 뉴클레오티드 또는 뉴클레오티드 유도체의 공유 부착, 지질 또는 지질 유도체의 공유 부착, 포스포티딜이노시톨의 공유 부착, 가교, 고리화, 알려진 보호기/차단기에 의한 유도체화, 디설파이드 결합 형성, 탈메틸화, 공유 가교의 형성, 시스테인의 형성, 피로글루타메이트의 형성, 포르밀화, 감마-카복실화, 글리코실화, GPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 항체 분자 또는 다른 세포 리간드에 대한 결합, 메틸화, 미리스토일화, 산화, 폐길레이션, 단백질분해 처리(예를 들어, 절단), 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황화, 단백질에 아미노산의 전달-RNA 매개 첨가, 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화를 비배타적으로 포함한다(예를 들어, PROTEINS-STRUCTURE AND MOLECULAR PROPERTIES, 2nd Ed., T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York (1993); POSTTRANSLATIONAL COVALENT MODIFICATION OF PROTEINS, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth Enzymol 182:626-646 (1990); Rattan et al., Ann NY Acad Sci 663:48-62 (1992)

참조).

- [0060] "생물학적 활성을 갖는" 폴리펩티드 단편은, 용량 의존성 유무에 관계없이, 특정 생물학적 검정으로 측정시, 성숙한 형태를 포함하여, 원래 폴리펩티드의 활성과 유사한(반드시 동일할 필요는 없음) 활성을 나타내는 폴리펩티드를 의미한다. 용량 의존성이 존재하는 경우, 용량 의존성은 폴리펩티드의 용량 의존성과 동일할 필요는 없고, 오히려 원래 폴리펩티드와 비교하여 소정 활성에서의 용량 의존성과 실질적으로 유사하다(즉, 후보 폴리펩티드는 원래 폴리펩티드에 비해 더 큰 활성 또는 약 25배 이하의 활성을, 일부 구현예에서는 약 10배 이하의 활성 또는 약 3배 이하의 활성을 나타낼 것이다).
- [0061] 본원에 제공된 서열로부터 적합한 프로브 또는 프라이머를 제조하고 원하는 상동체에 적합한 핵산원을 스크리닝함으로써 중 상동체가 단리되고 동정될 수 있다.
- [0062] "변이체"는 원래의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 상이하지만 본질적 특성을 보유한 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 의미한다. 일반적으로, 변이체는 원래의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 전반적으로 상당히 유사하며, 여러 영역이 동일하다.
- [0063] 실질적으로, 임의의 특정 핵산 분자 또는 폴리펩티드가 본 발명의 뉴클레오티드 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한지 여부는 알려진 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 전역 서열 정렬로도 불리는, 쿼리 서열(본 발명의 서열)과 대상 서열 간 최적의 전반적 매칭을 결정하기 위한 바람직한 방법은 Brutlag 등의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램(Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245)을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 서열과 대상 서열은 모두 DNA 서열이다. RNA 서열은 U를 T로 변환하여 비교될 수 있다. 상기 전역 서열 정렬의 결과는 동일성 백분율로 표시된다. 동일성 백분율을 계산하기 위해 DNA 서열의 FASTDB 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 행렬=단위 행렬, k-튜플=4, 미스매치 페널티--1, 연결 페널티--30, 무작위화 균 길이=0, 컷오프 스코어=1, 갭 페널티--5, 갭 크기 페널티 0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상 뉴클레오티드 서열의 길이 중 짧은 것. 내부 결실 때문이 아니라 5' 또는 3' 결실로 인해 대상 서열이 쿼리 서열보다 짧은 경우, 결과를 수동으로 보정해야 한다. 이는 FASTDB 프로그램이 동일성 백분율 계산시 대상 서열의 5' 및 3' 절단을 고려하지 않기 때문이다. 쿼리 서열 대비 5' 또는 3' 말단이 절단된 대상 서열의 경우, 동일성 백분율은, 대상 서열의 5' 및 3'인 매칭/정렬되지 않는 쿼리 서열의 염기 수를 쿼리 서열의 총 염기의 백분율로서 계산하여 보정된다. 뉴클레오티드의 매칭/정렬 여부는 FASTDB 서열 정렬 결과에 의해 결정된다. 이어서, 특정 파라미터를 사용해 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성 백분율에서 이 백분율을 감산하여 최종 동일성 백분율 스코어를 도출한다. 이렇게 보정된 스코어가 본 발명의 목적을 위해 사용되는 스코어이다. FASTDB 정렬로 표시할 때, 쿼리 서열과 매칭/정렬되지 않는 대상 서열의 5' 및 3' 염기 이외의 염기만이 동일성 백분율 스코어의 수동 조정을 위해 계산된다. 예를 들어, 동일성 백분율을 결정하기 위해 90개 염기의 대상 서열이 100개 염기의 쿼리 서열에 정렬된다. 결실은 대상 서열의 5' 말단에서 일어나므로, FASTDB 정렬은 5' 말단의 처음 10개의 염기에 대한 매칭/정렬을 나타내지 않는다. 10개의 페어링되지 않은 염기는 서열의 10%(매칭되지 않는 5' 및 3' 말단에서의 염기 수/쿼리 서열에서의 총 염기 수)를 나타내므로, FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성 백분율 스코어에서 10%를 감산한다. 나머지 90개의 염기가 완벽하게 매칭되면, 최종 동일성 백분율은 90%이다. 다른 예에서, 90개 염기의 대상 서열이 100개 염기의 쿼리 서열과 비교된다. 이때, 결실은 내부 결실이므로, 대상 서열의 5' 또는 3'에 쿼리와 매칭/정렬되지 않는 염기는 존재하지 않는다. 이 경우, FASTDB에 의해 계산된 동일성 백분율은 수동 보정되지 않는다. 다시 한번, 쿼리 서열과 매칭/정렬되지 않는 대상 서열의 5' 및 3' 염기만 수동으로 보정된다. 그럼에도 불구하고, 특정의 경우에, 전체 동일성은, 예를 들어 SEQ ID NO:1의 서열과 적어도 어느 정도 유사성을 갖는 서열의 부분만을 의미한다. 다시 말하면, 2000 bp의 쿼리 서열의 서열 동일성은 SEQ ID NO:1을 포함하는 서열의 부분 또는 이와 매우 유사한 부분에 대해서만 계산될 것이다.
- [0064] 본 발명의 쿼리 아미노산 서열과 적어도, 예를 들어 95% "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드란, 대상 폴리펩티드 서열이 쿼리 아미노산 서열의 각각의 100개의 아미노산 당 최대 5개의 아미노산 변경을 포함할 수 있다는 점을 제외하고는, 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열이 쿼리 서열과 동일하다는 것을 의미한다. 다시 말하면, 쿼리 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 얻기 위해, 대상 서열 내 최대 5%의 아미노산 잔기가 삽입되거나, 결실되거나, 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 참조 서열의 이러한 변경은 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카복시 말단 위치에서 일어나거나, 이들 말단 위치 사이에서 개별적으로 참조 서열 내 잔기 중에 산재되거나 참조 서열 내 하나 이상의 인접한 군에 산재된 어디서든 일어날 수 있다.

- [0065] 실질적으로, 임의의 특정 폴리펩티드가, 예를 들어 하나의 서열에 나타난 아미노산 서열 또는 기탁된 DNA 클론에 의해 인코딩된 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한지 여부는 알려진 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 전역 서열 정렬로도 불리는, 쿼리 서열(본 발명의 서열)과 대상 서열 간 최적의 전반적 매칭을 결정하기 위한 바람직한 방법은 Brut lag 등의 알고리즘에 기반한 FASTDB 컴퓨터 프로그램(Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245)을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 서열과 대상 서열은 모두 뉴클레오티드 서열이거나 모두 아미노산 서열이다. 상기 전역 서열 정렬의 결과는 동일성 백분율로 표시된다. FASTDB 아미노산 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 행렬=PAM 0, k-튜플=2, 미스매치 페널티--1, 연결 페널티=20, 무작위화 군 길이=0, 컷오프 스코어=1, 윈도우 크기=서열 길이, 갭 페널티--5, 갭 크기 페널티--0.05, 윈도우 크기=500 또는 대상 아미노산 서열의 길이 중 짧은 것. 내부 결실 때문이 아니라 N- 또는 C-말단 결실로 인해 대상 서열이 쿼리 서열보다 짧은 경우, 결과를 수동으로 보정해야 한다. 이는 FASTDB 프로그램이 전역 동일성 백분율 계산시 대상 서열의 N- 및 C-말단 절단을 고려하지 않기 때문이다. 쿼리 서열 대비 N- 및 C-말단이 절단된 대상 서열의 경우, 동일성 백분율은, 대상 서열의 N- 및 C-말단인, 상응하는 대상 잔기와 매칭/정렬되지 않는 쿼리 서열의 잔기 수를 쿼리 서열의 총 염기의 백분율로서 계산하여 보정된다. 잔기의 매칭/정렬 여부는 FASTDB 서열 정렬 결과에 의해 결정된다. 이어서, 특정 파라미터를 사용해 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산된 동일성 백분율에서 이 백분율을 감산하여 최종 동일성 백분율 스코어를 도출한다. 이러한 최종 동일성 백분율 스코어가 본 발명의 목적을 위해 사용되는 스코어이다. 쿼리 서열과 매칭/정렬되지 않는, 대상 서열의 N- 및 C-말단에 대한 잔기만이 동일성 백분율 스코어의 수동 조정을 위해 고려된다. 즉, 대상 서열의 가장 원위의 N- 및 C-말단 잔기 이외의 쿼리 잔기 위치만이 고려된다. FASTDB 정렬로 표시할 때, 쿼리 서열과 매칭/정렬되지 않는 대상 서열의 N- 및 C-말단 이외의 잔기 위치만이 수동으로 보정된다. 본 발명의 목적을 위해 다른 수동 보정은 수행되지 않아야 한다.
- [0066] 천연 발생적 단백질 변이체는 "대립유전자 변이체"라고 하며, 유기체의 염색체 상의 소정 유전자좌를 차지하는 유전자의 여러 대체 형태 중 하나를 의미한다(Genes 11, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). 이들 대립유전자 변이체는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 수준에서 서로 다를 수 있다. 대안적으로, 돌연변이화 기법 또는 직접 합성에 의해 비천연 발생적 변이체가 제조될 수 있다.
- [0067] "표지"는 직접적으로 또는 신호 생성 시스템의 하나 이상의 추가적인 구성원과의 상호작용을 통해, 검출 가능한 신호를 제공할 수 있는 체제를 의미한다. 직접 검출 가능하며 본 발명에 사용할 수 있는 표지는 형광 표지를 포함한다. 구체적인 형광단은 플루오레세인, 로다민, BODIPY, 시아닌 염료 등을 포함한다.
- [0068] "형광 표지"는 다른 파장의 빛에 의해 활성화될 때 특정 파장의 빛을 방출할 수 있는 임의의 표지를 의미한다.
- [0069] "형광성"은 강도, 스펙트럼, 파장, 세포내 분포 등을 비롯해 형광 신호의 임의의 검출 가능한 특성을 의미한다.
- [0070] 형광의 "검출"은 정성적 또는 정량적 방법을 사용하여 세포의 형광성을 평가하는 것을 의미한다. 본 발명의 일부 구현예에서, 형광은 정성적 방식으로 검출될 것이다. 다시 말하면, 재조합 융합 단백질이 발현됨을 나타내는 형광 마커의 존재, 또는 부재가 검출된다. 다른 경우에, 형광성은 상이한 조건 하에서 얻은 값들을 통계적으로 비교할 수 있는 정량적 수단을 이용해, 예를 들어 형광 강도, 스펙트럼, 또는 세포내 분포를 측정하여 결정될 수 있다. 여러 샘플, 예를 들어 형광 현미경 또는 다른 광학 검출기(예컨대, 이미지 분석 시스템 등)를 이용해 검출된 샘플들을 사람이 시각적으로 분석하고 비교하는 것과 같은 정성적 방법을 사용하여 수준을 결정할 수도 있다. 형광에서의 "변화" 또는 "변조"는 다른 조건과 비교하여 특정 조건 하에서의 형광의 강도, 세포내 분포, 스펙트럼, 파장, 또는 다른 양태의 임의의 검출 가능한 차이를 의미한다. 예를 들어, "변화" 또는 "변조"는 정량적으로 검출되며, 차이는 통계적으로 유의미한 차이이다. 형광에서의 임의의 "변화" 또는 "변조"는 형광 현미경, CCD, 또는 임의의 다른 형광 검출기와 같은 표준 기기를 사용하여 검출될 수 있고, 통합 시스템과 같은 자동화 시스템을 사용하여 검출될 수 있거나, 인간 관찰자에 의한 변화의 주관적 검출을 반영할 수 있다.
- [0071] "녹색 형광 단백질"(GFP)은, 청색광에 노출시 녹색 형광을 내는 해파리(*Aequorea victoria/Aequorea aequorea/Aequorea forskalea*)로부터 최초 단리된, 238개의 아미노산(26.9 kDa)으로 이루어진 단백질이다. *A. victoria*로부터의 GFP는 395 nm의 파장에서 주(major) 여기 피크를 갖고 475 nm에서 부(minor) 여기 피크를 갖는다. 방출 피크는 가시광선 스펙트럼의 더 낮은 녹색 부분에 있는 509 nm에 있다. 바다 팬지(*Renilla reniformis*)의 GFP는 498 nm에서 하나의 주 여기 피크를 갖는다. 광범위한 사용 가능성 및 연구자들의 변화하는 요구로 인해, 다양한 GFP 돌연변이체가 조작되었다. 최초 주요 개선은 Roger Tsien이 1995년에 Nature에 보고한 단일 점 돌연변이(S65T)였다. 이 돌연변이는 GFP의 스펙트럼 특성을 크게 개선하여, 형광성과 광안정성을 증가시켰고, 피크 방출을 509 nm에서 유지하면서 주 여기 피크를 488 nm로 이동시켰다. 이 스캐폴드에 37°C 접힘 효

을(F64L) 점 돌연변이체를 추가하여 강화된 GFP(EGFP)를 수득하였다. EGFP는 광학 단면으로도 알려진 흡광 계수 (ϵ 으로 표시)가 $9.13 \times 10^{-21} \text{ m}^2 / \text{분자이고}$, 이는 $55,000 \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ 로서도 표시된다. 잘 접하지 않는 펩티드에 융합된 경우에도 GFP를 빠르게 잡고 성숙시킬 수 있는 일련의 돌연변이인 슈퍼폴더 GFP가 2006년에 보고되었다.

- [0072] "황색 형광 단백질"(YFP)은 *Aequorea victoria*로부터 유래된, 녹색 형광 단백질의 유전자 돌연변이체이다. YFP의 여기 피크는 514 nm이고, 방출 피크는 527 nm이다.
- [0073] 본원에서 사용되는 단수 형태는 문맥상 명확히 달리 나타내지 않는 한 복수의 참조를 포함한다.
- [0074] "바이러스"는 숙주 세포 밖에서 성장하거나 번식할 수 없는 극미소의 감염원이다. 각각의 바이러스 입자, 또는 비리온은 캡시드로 불리는 보호 단백질 피막 내의 유전 물질, DNA 또는 RNA로 구성된다. 캡시드 형상은 단순한 나선 및 20면체(다면체 또는 거의 구형) 형태부터 테일 또는 외피를 갖는 보다 복잡한 구조에 이르기까지 다양하다. 바이러스는 세포 생명체를 감염시키며, 감염되는 숙주의 유형에 따라 동물, 식물, 및 박테리아 유형으로 분류된다.
- [0075] 본원에서 사용되는 용어 "시냅스경유 바이러스"는 시냅스를 통해 하나의 뉴런으로부터 다른 연결 뉴런으로 이동할 수 있는 바이러스를 의미한다. 이러한 시냅스경유 바이러스의 예는 랩도바이러스, 예를 들어 광견병 바이러스, 및 알파헤르페스바이러스, 예를 들어 가성광견병 또는 단순 헤르페스 바이러스이다. 본원에서 사용되는 용어 "시냅스경유 바이러스"는 또한, 시냅스 및 생물학적 벡터를 통해 하나의 뉴런으로부터 다른 연결 뉴런으로 이동하는 능력을 자체적으로 갖는 바이러스 서브유닛, 예컨대 이러한 서브유닛을 포함하고 시냅스를 통해 하나의 뉴런으로부터 다른 연결 뉴런으로 이동하는 능력을 나타내는 변형된 바이러스를 포괄한다.
- [0076] 시냅스경유 이동은 순행성 또는 역행성일 수 있다. 역행성 이동시, 바이러스는 시냅스후 뉴런으로부터 시냅스전 뉴런으로 이동할 것이다. 따라서, 순행성 이동시, 바이러스는 시냅스전 뉴런으로부터 시냅스후 뉴런으로 이동할 것이다.
- [0077] 상동체는 공통 조상을 공유하는 단백질을 의미한다. 유사체는 공통 조상을 공유하지는 않지만, 하나의 클래스에 포함되도록 하는 일부 기능적(구조적이 아닌) 유사성을 갖는다(예를 들어, 트립신 유사 세린 프로테이나제와 서브틸리신은 분명히 관련이 없지만(활성 부위 밖의 구조가 완전히 다름), 기하학적으로 거의 동일한 활성 부위를 가지므로 유사체에 대한 수렴 진화의 예로서 간주된다).
- [0078] 상동체에는 2개의 서브클래스, 이종상동체(ortholog) 및 동종상동체(paralog)가 있다. 이종상동체는 상이한 종에서의 동일한 유전자(예를 들어, 시토크롬 'c')이다. 동일한 유기체에서의 2개의 유전자는 이종상동체가 될 수 없다. 동종상동체는 유전자 중복의 결과이다(예를 들어, 헤모글로빈 베타와 델타). 2개의 유전자/단백질이 상동성이고 동일 유기체에 있다면, 이들은 동종상동체이다.
- [0079] 본원에서 사용되는 용어 "장애"는 경증, 질환, 병, 임상적 상태, 또는 병리적 상태를 의미한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 활성 성분의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않으며, 화학적으로 불활성이고, 투여되는 환자에게 독성이 없는 담체 매질을 의미한다.
- [0081] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 유도체"는 대상체에 비교적 무독성인, 예를 들어 본 발명의 스크리닝 방법을 사용하여 확인되는, 제제의 임의의 상동체, 유사체, 또는 단편을 의미한다.
- [0082] 용어 "치료제"는 장애 또는 장애 합병증의 예방 또는 치료를 보조하는 임의의 분자, 화합물, 또는 치료를 의미한다.
- [0083] 상용성 약학 담체에 제형화된 이러한 제제를 포함하는 조성물이 치료를 위해 제조되고, 패키징되고, 라벨링될 수 있다.
- [0084] 복합체가 수용성인 경우, 적절한 완충액, 예를 들어 인산염 완충 식염수 또는 다른 생리학적으로 적합한 용액에 제형화될 수 있다.
- [0085] 대안적으로, 생성된 복합체가 수성 용매에 난용성인 경우, 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 함께 제형화될 수 있다. 따라서, 화합물 및 이의 생리학적으로 허용 가능한 용매화물은 (입이나 코를 통한) 흡입 또는 취입에 의한 투여, 또는 경구, 협측, 비경구, 직장 투여용으로 제형화될 수 있거나, 종양의 경우, 고형 종양에 직접 주사될 수 있다.

- [0086] 경구 투여의 경우, 약학 제제는 액체 형태, 예를 들어, 용액, 시럽, 또는 현탁액일 수 있거나, 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클과 함께 재구성하기 위한 의약품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 제제는 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예컨대 현탁제(예를 들어, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체, 또는 수소첨가 식용 지방); 유화제(예를 들어, 레시틴 또는 아카시아); 비수성 비히클(예를 들어, 아몬드 오일, 유성 에스테르, 또는 분별 식물성 오일); 및 보존제(예를 들어, 메틸 또는 프로필-p-하이드록시벤조에이트 또는 소르브산)와 함께 통상적 수단에 의해 제조될 수 있다. 약학 조성물은, 예를 들어 약학적으로 허용 가능한 부형제, 예컨대 결합제(예를 들어, 사전젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈, 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예를 들어, 락토스, 미정질 셀룰로스, 또는 인산수소칼슘); 윤활제(예를 들어, 마그네슘 스테아레이트, 활석, 또는 실리카); 붕해제(예를 들어, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예를 들어, 소듐 라우릴 설페이트)와 함께 통상적 수단에 의해 제조된 정제 또는 캡슐 형태일 수 있다. 정제는 당업계에 잘 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다.
- [0087] 경구 투여용 제제는 활성 화합물의 제어된 방출을 제공하도록 적합하게 제형화될 수 있다.
- [0088] 흡입에 의한 투여의 경우, 본 발명에 따라 사용하기 위한 화합물은 적합한 추진제, 예를 들어 디클로로디플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소, 또는 기타 적합한 가스를 사용하여, 가압 팩 또는 분무기로부터 에어로졸 스프레이 방식의 형태로 간편하게 전달된다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공함으로써 결정될 수 있다. 예를 들어 흡입기 또는 취입기에 사용하기 위한 젤라틴의 캡슐 또는 카트리지가 화합물과 락토스 또는 전분과 같은 적합한 분말 베이스의 분말 혼합물을 함유하여 제형화될 수 있다.
- [0089] 화합물은 주사, 예를 들어 볼루스 주사 또는 연속 주입에 의한 비경구 투여용으로 제형화될 수 있다. 주사용 제제는, 예를 들어 보존제가 첨가된 앰플 또는 다회-투여 용기에 단위 투여 형태로 제공될 수 있다.
- [0090] 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중의 현탁액, 용액, 또는 에멀전과 같은 형태일 수 있고, 현탁제, 안정화제, 및/또는 분산제와 같은 제형화제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 사용 전에 적합한 비히클, 예를 들어 발열물질이 없는 멸균수와 함께 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.
- [0091] 화합물은 또한, 크림 또는 로션과 같은 국소 도포제로서 제형화될 수 있다.
- [0092] 앞서 설명한 제제 외에, 화합물은 데포제로서 제형화될 수도 있다. 이러한 장기 작용 제제는 이식(예를 들어, 안내, 피하, 또는 근육내 이식) 또는 안내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0093] 따라서, 예를 들어 화합물은 적합한 고분자 또는 소수성 물질과 함께(예를 들어, 허용 가능한 오일 중의 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 난용성 유도체, 예를 들어 난용성 염으로서 제형화될 수 있다. 리포솜 및 에멀전은 친수성 약물에 대한 전달 비히클 또는 담체의 잘 알려진 예이다.
- [0094] 원하는 경우, 조성물은 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여 형태를 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치로 제공될 수 있다. 팩은, 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일(예컨대, 블리스터 팩)을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 설명서가 첨부될 수 있다.
- [0095] 본 발명은 또한, 본 발명의 치료 요법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 하나 이상의 용기에 치료 또는 예방 유효량의 조성물을 약학적으로 허용 가능한 형태로 포함한다.
- [0096] 키트의 바이알 내 조성물은, 예를 들어 멸균 식염수, 텍스트로스 용액, 또는 완충 용액, 또는 기타 약학적으로 허용 가능한 멸균 유체와 조합된 약학적으로 허용 가능한 용액 형태일 수 있다. 대안적으로, 복합체는 동결건조되거나 건조될 수 있다. 이 경우, 키트는 선택적으로, 복합체를 재구성하여 주사 목적의 용액을 형성하기 위해, 약학적으로 허용 가능한 용액(예를 들어, 식염수, 텍스트로스 용액 등), 바람직하게는 멸균 용액을 용기에 추가로 포함한다.
- [0097] 다른 구현예에서, 키트는 복합체를 주사하기 위한, 바람직하게는 멸균 형태로 패키징된 바늘 또는 주사기, 및/또는 패키징된 알코올 패드를 추가로 포함한다. 선택적으로, 임상의 또는 환자에 의한 조성물 투여를 위한 설명서가 포함된다.
- [0098] 달리 정의되지 않는 한, 본원에 사용된 모든 기술 용어 및 과학 용어는 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자가 일반적으로 이해하는 것과 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기술된 것과 유사하거나 동등한 방법 및 재료가 본 발명의 실시 또는 시험에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 재료를 이하 설명한다. 상충하는 경우, 정의를 포함

한 본 명세서가 우선한다. 또한, 재료, 방법, 및 실시예는 단지 예시적인 것이며, 제한하려는 것이 아니다.

[0099] **실시예**

[0100] 유전자 작제

[0101] 본 연구에 사용된 합성 프로모터(SEQ ID NO:1)는 망막 G 단백질 결합 수용체(Rgr)를 인코딩하는 마우스 유전자의 번역 개시 코돈 전에 2000 bp로 구성된다. 이 프로모터 및 최적화된 Kozak 서열(GCCACC) 바로 뒤에 ChR2-eGFP 코딩 서열을 삽입한 다음, 우드척 간염 바이러스 전사후 조절 요소(WPRE) 및 SV40 폴리아데닐화 부위가 이어졌다. 1.56E+13 GC/mL의 역가를 갖는 AAV 혈청형 BP2를 사용하여 비인간 영장류 망막 뉴런을 표적화하였다.

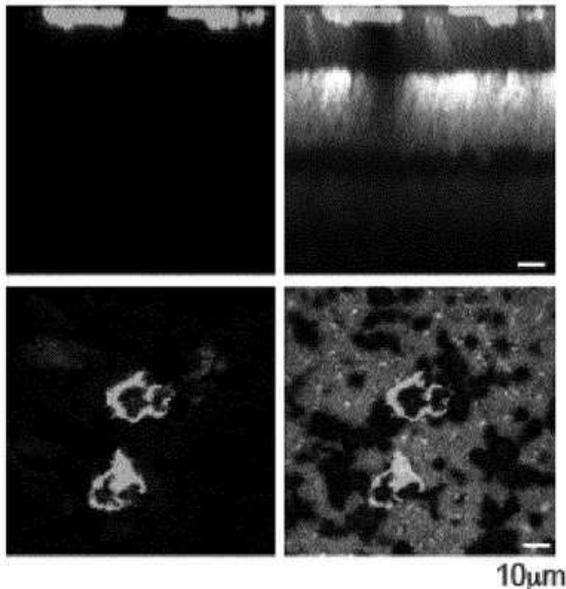
[0102] 바이러스 형질감염 및 조직 준비

[0103] AAV 투여는 안과 의사 및 중국 쿤밍의 제3자 계약자와 협력하여 수행되었다. 케타민 및 페노바르비탈 나트륨으로 붉은털원숭이를 마취시켰다. 25-게이지 천자 바늘을 사용하여 각각 비강 및 측두 공막 영역에 국한된 2개의 천자 터널을 생성하였다. 하나의 터널을 통해 유리체방에 조명 섬유를 주입하고, 두 번째 터널을 통해 해밀턴 주사기에 장착된 30-게이지 바늘을 사용하여 50 µl의 AAV를 망막하 주사하였다. 3개월 후에, 단리된 망막을 PBS 중의 4% PFA에서 30분 동안 고정시킨 후, 4°C의 PBS에서 세척 단계를 수행하였다. 전체 망막을 실온에서 1시간 동안 PBS 중의 10% 정상 당나귀 혈청(NDS), 1% BSA, 0.5% Triton X-100으로 처리하였다. PBS 중의 3% NDS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100에서 단클론 래트 항-GFP Ab(Molecular Probes Inc.; 1:500)에 의한 처리를 실온에서 5일 동안 수행하였다. 2차 당나귀 항-래트 Alexa Fluor-488 Ab(Molecular Probes Inc.; 1:200)에 의한 처리를 2시간 동안 수행하였다. 단면을 세척하고, 유리 슬라이드 상에 ProLong Gold 안티페이드 시약(Molecular Probes Inc.)으로 마운팅하고, Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2 레이저주사 공초점 현미경(Carl Zeiss Inc.)을 사용하여 촬영하였다.

도면

도면1

망막 색소 상피 세포(EGFP)
Hoechst



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research

<120> SynP61, a primate retinal pigment epithelium cell-specific promoter
 <130> 57970
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 2000
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 1

```

attgaagacc tcagacttta gagataccag agctatggga tacctgctga gaaaagctgc      60
taacagggag tggaaccaga ccaggaaaaa gaagtttgtt acagtcaaca aagatgaatg      120
gaattggaga tctgatgagc actctgacat tagaaatgga gatgcagagt ttggagtttg      180

cctagctctt ttttgggtg tgggtgggg tgggtccttg tttgctccag tatttcctca      240
caatgacaat ttagaatgat ggtgtataca ctgcggtatt tgaggatgt gatctgcttt      300
ttgattttga cttatagga gattacagat aagtgatcaa atgaaactca gaaaagactt      360
tgacctttag acttttaaca ttattgagaa tgccatagac tatggagact tttgaagtgg      420
ggactaaatt tattttgcat catgctttgg ctaggtatgg cctccataga ctcactctgt      480
cgaacaagcc taaggagcc aaggggtgga atgtggtggt ttgaatatgc ttggcccagg      540
aaggacacta ttaggagta tggacttgct ggaagaagct tgtcactgtg ggagtgggct      600

ttgagatcct ttttctacct tgatgataat ggaccaaagc tctgaacctg taaaccagtc      660
ccaattaaat gttttctttt ataagagttg ccttggatcat ggtgtatact cacagcaatg      720
taaaacttaa gatgggggac aatgggaggt gccaggcctt acatgataga aggacaggca      780
ttgttacaat tccacctacc actcactaca tggctttgga ctgatttga accaacttct      840
ctccaatgtc ctctcggaa atagagatgt cctggcatct caccatggg gttatattta      900
ggaggctttt gatgatcacc cactagttca gtctaatac tactacttta atagacatga      960
gttcctttgc taataaccct ctgggattta gtttctccat ctgaaaatta gttgtcctgt      1020

ggctcattgt tttctcgtga gaatttcagc atgagccagt acaaaagtgt taccaagacc      1080
ttgtgtgtag aagccgaagt tcttagtggg tcatgaggta ctttcaaaaa gaatgcaagc      1140
cattctttat cctgagagat attttatgat tgcatagctc aatggctgtc tgtgagacag      1200
gaagtgaage cctaaatcca tgatggagtt caaccagcac ttaactaggg aaggcatga      1260
agcagaaatg actcagttga caggaaaacc atccaatggc agcagtcagc agcagacagc      1320
cagtcatggc agactcagta ccagaggtca agggtcaggt actagtcaac atttgcttta      1380
    
```

tgacagcacg taactttaca aacctcacc tgcccaccaa atgcttgctt acacatactt 1440

 ctgagcctgt gaatgaacat acaacacaca cccacacaca tgcaaatgca cgcgcacaca 1500
 cacacacaca ctcacacaca cacacacaca cacagagaga gagagagaga gagagagaga 1560
 gagagagaga gagagagaga tgcacacaca caggcagctt gtcagcagct gtgcacatac 1620
 aaggatctgg ctatccaatt ctcggggaca gctgcagctc aaatccttcc ttccacttcc 1680
 ctcccttagt tatgcaacce ttaccecaatt cagctttcac tcacacacca ttggatcca 1740
 agaccttaat ccigcctagt gggctggaat gaacaagaca gagctcattc cagcttcaca 1800
 aaagctgcac tatccatcta ctgaatggat tctttctatg tgagccaaga ggaagactta 1860

 gaaggataag aaataaaaaa ggtgttatta gtctaccata ataatctcca catgccagca 1920
 agggagtgc catttaaaag gagagaccta gcttcagaga gccagaaaag agctgtgtag 1980
 ctgacagagg gagtccaggg 2000

 <210> 2
 <211> 214
 <212> DNA
 <213> sv40
 <400> 2

 gctcgagatc tgcgatctgc atctcaatta gtcagcaacc atagtcccgc ccctaactcc 60
 gcccatcccg ccctaactc cgcccagttc cgcccattct ccgcccctc gctgactaat 120
 tttttttatt tatgagagg ccgaggccgc ctggcctct gagctattcc agaagtagtg 180

 aggaggcttt ttggaggcc taggcttttg caaa 214