



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0077471
(43) 공개일자 2019년07월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/85 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 5/079 (2010.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/85 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7015426
(22) 출원일자(국제) 2017년11월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2018년05월29일
(86) 국제출원번호 PCT/IB2017/056792
(87) 국제공개번호 WO 2018/083607
국제공개일자 2018년05월11일
(30) 우선권주장
16196818.5 2016년11월02일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
프리드리히 미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치
스위스 체하-4058 바젤 마울비르스트라쎄 66
(72) 발명자
하르틀, 도미니크
스위스 4058 바젤 마울비르스트라쎄 66 프리드리히 미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치
위트너, 조세핀
스위스 4058 바젤 마울비르스트라쎄 66 프리드리히 미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
양영준, 정진일

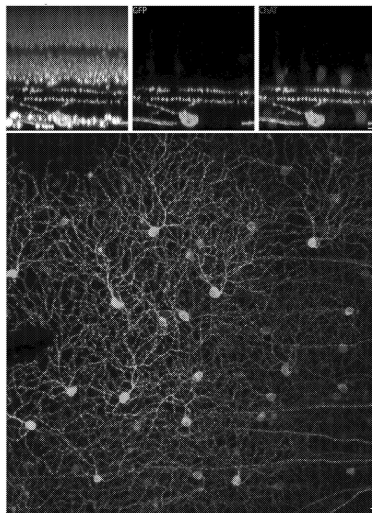
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **방향 선택적인 망막 신경절 세포에서의 유전자의 특이적 발현을 위한 프로모터, SYNP198**

(57) 요약

본 발명은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 또는 상기 SEQ ID NO: 1의 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 적어도 400 bp의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 상기 단리된 핵산 분자는 상기 유전자를 코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되는 경우 유전자의 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서의 발현을 특이적으로 야기한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 27/02 (2018.01)

C12N 5/0621 (2013.01)

C12N 2510/00 (2013.01)

C12N 2800/106 (2013.01)

(72) 발명자

크렘스, 아르나우트

스위스 4058 바젤 마울비르스트라쎄 66 프리드리히
미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치

로스카, 보톤트

스위스 4058 바젤 마울비르스트라쎄 66 프리드리히
미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치

쉬벨러, 디르크

스위스 4058 바젤 마울비르스트라쎄 66 프리드리히
미셔 인스티튜트 포 바이오메디칼 리서치

명세서

청구범위

청구항 1

SEQ ID NO: 1의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는, 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는 적어도 400 bp의 핵산 서열로 구성되는 단리된 핵산 분자로서, 상기 단리된 핵산 분자가 상기 유전자를 코딩하는 핵산 서열이 상기 단리된 핵산 분자에 작동 가능하게 연결되는 경우 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서 유전자의 특이적 발현을 야기하는 단리된 핵산 분자.

청구항 2

제1항에 있어서, 최소 프로모터, 예컨대 SEQ ID NO: 2의 최소 프로모터를 추가로 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 따른 단리된 핵산 분자와 엄격한 조건 하에 혼성화되는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 따른 단리된 핵산을 특정 세포에서 유전자 발현을 촉진하는 요소로서 포함하는 발현 카세트로서, 상기 단리된 핵산이 적어도 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서 특이적으로 발현될 유전자를 인코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결되는 발현 카세트.

청구항 5

제4항의 발현 카세트를 포함하는 벡터.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 벡터가 바이러스 벡터인 벡터.

청구항 7

방향 선택적인 망막 신경절 세포에서의 유전자 발현을 위한 제1항 또는 제2항에 따른 핵산, 또는 제4항에 따른 발현 카세트, 또는 제5항에 따른 벡터의 용도.

청구항 8

제4항에 따른 발현 카세트로 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단을 전달감염시키는 단계를 포함하는 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서 유전자를 발현시키는 방법으로서, 상기 세포가 방향 선택적인 망막 신경절이거나 이를 포함하는 경우, 발현될 유전자가 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단에 의해 특이적으로 발현될 방법.

청구항 9

제4항의 발현 카세트 또는 제5항의 벡터를 포함하는 단리된 세포.

청구항 10

제9항에 있어서, 발현 카세트 또는 벡터가 상기 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합되는 세포.

청구항 11

제1항, 제2항, 제4항, 제5항, 또는 제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 산물이 광-감수성 분자, 예를 들어 할로로돕신 또는 채널로돕신인 단리된 핵산 분자, 발현 카세트, 벡터, 용도, 방법 또는 세포.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 따른 단리된 핵산 분자를 포함하는 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서 유전자를 발현시키

기 위한 키트.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 방향 선택적인 망막 신경절 세포에서 특이적으로 유전자의 발현을 야기하는 핵산 서열에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 발현 목적을 위해, 재조합 유전자는 보통 이중성 유전자의 전사를 허용하는 활성 발현 카세트의 맥락에서의 cDNA 작제물로서, 표적 세포, 세포 집단 또는 조직 내로 전달감염된다. DNA 작제물은 인헨서, 사일런서, 인슐레이터 및 프로모터(본원에서 종합적으로 "프로모터"로 언급됨)를 포함하는, 시스-조절 요소에서 여러 트랜스-작용 전사 인자(TF)의 활성이 관여되는 공정에서 세포 전사 기구에 의해 인식된다.

[0003] 유전자 프로모터는 모든 이러한 조절 수준에 관여되어, DNA 서열, 전사 인자 결합 및 후성적 속성의 영향을 통합하여 유전자 전사에서 결정인자로서 작용한다. 이들은, 예컨대 플라스미드 벡터에 의해 인코딩되는 트랜스유전자 발현의 강도뿐만 아니라 어느 세포 유형 또는 유형들에서 상기 트랜스유전자가 발현될 것인지를 결정한다.

[0004] 포유류 세포에서 이중성 유전자 발현을 유도하기 위해 사용되는 대부분의 일반적인 프로모터는 인간 및 마우스 사이토메갈로바이러스(CMV) 메이저 최조기(major immediate early) 프로모터이다. 이들은 강력한 발현을 부여하며, 몇몇 세포 유형에서 강력한 것으로 증명되었다. 다른 바이러스 프로모터, 예컨대 SV40 최조기 프로모터 및 라우스 육종 바이러스(RSV) 장형-말단-반복(long-terminal-repeat, LTR) 프로모터가 또한 발현 카세트에서 빈번하게 사용된다.

[0005] 바이러스 프로모터 대신, 세포성 프로모터가 또한 사용될 수 있다. 알려진 프로모터 중에는, 풍부하게 전사되는 세포 전사체를 인코딩하는 하우스-키퍼 유전자, 예컨대 베타-액틴, 연장 인자 1-알파(EF-1알파), 또는 유비퀴틴으로부터의 것들이 있다. 바이러스 프로모터와 비교하여, 진핵 유전자 발현이 더 복잡하며, 여러 상이한 인자의 정확한 조율을 필요로 한다.

[0006] 트랜스유전자 발현에 대한 내인성 조절 요소의 사용에 관한 양태 중 하나는 안정한 mRNA의 생성이며, 트랜스-작용 전사 인자가 이에 따라 제공되는 숙주 세포의 원상태 환경에서 발현이 일어날 수 있다는 것이다. 진핵 유전자의 발현은 시스- 및 트랜스-작용 조절 요소의 복잡한 기구에 의해 제어되므로, 대부분의 세포성 프로모터는 광범위한 기능적 특성규명이 되어 있지 않다. 일부 진핵 프로모터는 보통 그 전사되는 서열의 바로 상류에 배치되며 전사 개시 지점으로서 작용한다. 코어 프로모터는 전사 기구에 의해 인식되기 충분한 전사 시작 부위(TSS)의 바로 주변이다. 근위 프로모터는 코어 프로모터 상류 영역을 포함하며, TSS 및 전사 조절을 위해 요구되는 다른 서열 속성을 함유한다. 전사 인자는 프로모터 및 인헨서 서열에서 조절 모티프에 결합함으로써 서열-특이적으로 작용하여 뉴클레옴 구조 및 그 위치를 변경하는 염색질 및 히스톤 개질 효소를 활성화하고, 마지막으로 전사의 개시를 허용한다. 기능적 프로모터의 확인은 주로 연관된 상류 또는 하류 인헨서 요소의 존재에 의존한다.

[0007] 트랜스유전자 발현을 위한 내인성 조절 요소의 사용에 관한 또 다른 증추적 양태는 일부 프로모터가 세포 특이적 방식으로 작용할 수 있고 특정 유형의 세포에서 또는 특정 하위세트의 세포에서 프로모터에 의존하여, 트랜스유전자의 발현을 야기할 것이다.

[0008] 따라서, 본 발명의 하나의 목표는 높은 발현 수준을 가지고 세포 유형 특이적 방식으로, 포유류 세포에서 재조합 유전자의 발현에 적합한 새로운 서열을 수득하는 것이다.

[0009] 이러한 서열은 신경변성 질환, 시력 복원, 약물 탐색, 종양 치료법 및 질환의 진단 연구를 위한 시스템을 개발하기 위한 망막 세포 특이적 프로모터에 대한 당분야에서의 필요성을 해결한다.

발명의 내용

[0010] 본 발명자들은, 눈에 있는 경우 방향 감수성 망막 신경절 세포에서만 유전자 발현을 유도하는 프로모터를 찾기 위해 후성유전학, 생물정보학 및 신경과학을 조합하였다.

[0011] 본 발명의 서열의 핵산 서열은 다음과 같다:

GGTTCATTGTAAGCCACTGTAGTCGTGGGTGACTCACATCAAACCACCCCTTCGGGAACACGATGCC
 GACTGAAACTACATAGGGGAGAGCAAATAAACTGTCTTCTCTAGTTTGGGGAAATTGGAGCCTG
 CCTTAGGGAAACAGTGACTAATTTACAGCTAGTGTGGGAATGAGATCATCTGTCAAATAAATGTAT
 CTTTACTTCTTCTTGAGAGGAAGCAAGCTGTTTTATGATGTTCCCTTGAATCCTTAAAAATACAGAG
 CAACATTTACATTATTAATGATACGCTTTATTGCTGCAGGCTAACTAGGTCCAAAATTGTCCTTCCATA
 GATGGAGCTGGAGAGTTACACAGAAGTTTGCATATCGAGCTCTTAGGTCTGCATGTACAGCTAATGT
 ACTTGTGGACCCTGTCACAT (SEQ ID NO:1).

[0012]

[0013]

따라서 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 70% 동일성을 갖는 적어도 400 bp의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 상기 단리된 핵산 분자는 상기 유전자를 코딩하는 상기 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 방향 선택적인 망막 신경절에서의 발현을 특이적으로 야기한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 96% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 97% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 98% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 99% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 100% 동일성을 갖는다.

[0014]

본 발명의 단리된 핵산 분자는 추가로 최소 프로모터, 예를 들어 SV40 최소 프로모터, 예컨대 SV40 최소 프로모터 또는 실시예에서 사용되는 것을 포함할 수 있다.

[0015]

또한 상술된 바와 같은 본 발명의 단리된 핵산 분자와 엄격한 조건 하에 혼성화되는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.

[0016]

본 발명은 또한 상술된 바와 같은 본 발명의 단리된 핵산을 포함하는 발현 카세트를 제공하며, 상기 프로모터는 적어도 방향 선택적인 망막 신경절에서 특이적으로 발현될 유전자를 인코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.

[0017]

본 발명은 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다.

[0018]

본 발명은 또한 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자의 발현을 위한 본 발명의 핵산, 본 발명의 발현 카세트 또는 본 발명의 벡터의 용도를 포괄한다.

[0019]

본 발명은 본 발명의 발현 카세트에 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단(예컨대 조직)을 전달감염시키는 단계를 포함하는, 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자를 발현시키는 방법을 추가로 제공하며, 발현될 유전자는 상기 세포가 방향 선택적인 망막 신경절이거나 이를 포함하는 경우, 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단에 의해 발현될 것이다. 일부 구현예에서, 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단 또는 조직은 인간이다.

[0020]

본 발명은 또한 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 단리된 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트 또는 벡터는 상기 세포의 게놈 내로 안정적으로 통합된다.

[0021]

본 발명의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있는 전형적인 유전자는 할로로돕신 또는 채널로돕신을 인코딩하는 유전자이다.

[0022]

추가로, 본 발명은 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자를 발현시키기 위한 키트를 또한 제공하며, 이 키트는 본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함한다.

도면의 간단한 설명

[0023]

도 1: 광수용체 층에서 측면 투영도 및 상면도로서, 성체 C57BL/6 마우스 눈에서 AAV-synP198-ChR2-EGFP의 망막 하 주사 3주 후, SEQ ID NO: 1을 갖는 프로모터로부터 EGFP 발현의 레이저-주사 공초점 현미경 이미지. 방향 선택적인(DS) 신경절 세포에서 유도된 발현을 관찰할 수 있다. 녹색 = SEQ ID NO: 1에 의해 유도된 EGFP, 빨간색

= ChAT(콜린 아세틸트랜스퍼라제), 흰색 = Hoechst.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명자들은, 눈에 있는 경우 방향 감수성 망막 신경절 세포에서만 유전자 발현을 유도하는 프로모터를 찾기 위해 후성유전학, 생물정보학 및 신경과학을 조합하였다.
- [0025] 본 발명의 서열의 핵산 서열은 다음과 같다:

GGTTCATTGTAAGCCACTGTAGTCGTGGGTGACTCACATCAAACCACCCCTTCGGAACACGATGCC
GACTACTGAACTACATAGGGGAGAGCAAATAAACTGTCTTCTCTAGTTTGGGGAAATTGGAGCCTG
CCTTAGGGAAACAGTGACTAATTTACAGCTAGTGTGGGAATGAGATCATCTGTCAAATAAATGTAT
CTTTACTTCTTCTTGAGAGGAAGCAAGCTGTTTTATGATGTTCTTGGAAATCCTTAAAAATACAGAG
CAACATTTACATTATTAATGATACGCTTTATTGCTGCAGGCTAACTAGGTCCAAAATTGTCCTTCCATA
GATGGAGCTGGAGAGTTACACAGAAGTTTGCATATCGAGCTCTTAGGTCTGCATGTACAGCTAATGT
ACTTGTGGACCCTGTCACAT (SEQ ID NO:1).
- [0026]
- [0027] 따라서 본 발명은 SEQ ID NO: 1의 핵산 서열 또는 SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 70% 동일성을 갖는 적어도 400 bp의 핵산 서열을 포함하거나 이로 구성되는 단리된 핵산 분자를 제공하며, 상기 단리된 핵산 분자는 상기 유전자를 코딩하는 상기 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된 유전자의 방향 선택적인 망막 신경절에서의 발현을 특이적으로 야기한다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 80% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 85% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 90% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 95% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 96% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 97% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 98% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 적어도 99% 동일성을 갖는다. 일부 구현예에서, 핵산 서열은 적어도 400 bp이며, SEQ ID NO: 1의 상기 핵산 서열과 100% 동일성을 갖는다.
- [0028] 본 발명의 단리된 핵산 분자는 추가로 최소 프로모터, 예를 들어 SV40 최소 프로모터, 예컨대 SV40 최소 프로모터 또는 실시예에서 사용되는 것을 포함할 수 있다.
- [0029] 또한 상술된 바와 같은 본 발명의 단리된 핵산 분자와 엄격한 조건 하에 혼성화되는 서열을 포함하는 단리된 핵산 분자가 제공된다.
- [0030] 본 발명은 또한 상술된 바와 같은 본 발명의 단리된 핵산을 포함하는 발현 카세트를 제공하며, 상기 프로모터는 적어도 방향 선택적인 망막 신경절에서 특이적으로 발현될 유전자를 인코딩하는 핵산 서열에 작동 가능하게 연결된다.
- [0031] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 벡터를 추가로 제공한다. 일부 구현예에서, 상기 벡터는 바이러스 벡터이다.
- [0032] 본 발명은 또한 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자의 발현을 위한 본 발명의 핵산, 본 발명의 발현 카세트 또는 본 발명의 벡터의 용도를 포괄한다.
- [0033] 본 발명은 본 발명의 발현 카세트로 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단(예컨대 조직)을 전달감염시키는 단계를 포함하는, 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자를 발현시키는 방법을 추가로 제공하며, 발현될 유전자는 상기 세포가 방향 선택적인 망막 신경절이거나 이를 포함하는 경우, 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단에 의해 발현될 것이다. 일부 구현예에서, 단리된 세포, 세포주 또는 세포 집단 또는 조직은 인간이다.
- [0034] 본 발명은 또한 본 발명의 발현 카세트를 포함하는 단리된 세포를 제공한다. 일부 구현예에서, 발현 카세트 또는 벡터는 상기 세포의 계능 내로 안정적으로 통합된다.
- [0035] 본 발명의 프로모터에 작동 가능하게 연결될 수 있는 전형적인 유전자는 할로로돕신 또는 채널로돕신을 인코딩하는 유전자이다.
- [0036] 추가로, 본 발명은 방향 선택적인 망막 신경절에서 유전자를 발현시키기 위한 키트를 또한 제공하며, 이 키트는

본 발명의 단리된 핵산 분자를 포함한다.

- [0037] 본원에서 사용되는 용어 "프로모터"는 인핸서, 사일런서, 인슐레이터 및 프로모터를 포함하는 임의의 시스-조절 요소를 나타낸다. 프로모터는 일반적으로 전사되어야 하는 유전자의 상류에(5' 영역쪽으로) 배치되는 DNA 영역이다. 프로모터는 이것이 제어하는 유전자의 적절한 활성화 또는 억제를 허용한다. 본 발명의 맥락에서, 프로모터는 방향 선택적인 망막 신경절에서 이들에 작동 가능하게 연결되는 유전자의 특이적 발현을 야기한다. "소정 유형의 세포에서만 발현"으로도 언급되는 "특이적 발현"은 관심 유전자를 발현하는 세포의 적어도 75% 초과가 특정되는 유형의 세포, 즉 본 경우에는 방향 선택적인 망막 신경절임을 의미한다.
- [0038] 발현 카세트는 전형적으로 숙주 세포 내로의 발현 카세트의 진입 및 숙주 세포에서 발현 카세트의 유지를 용이하게 하는 벡터 내로 도입된다. 이러한 벡터는 일반적으로 사용되며 당업자에게 널리 알려져 있다. 다수의 이러한 벡터는, 예컨대 Invitrogen, Stratagene, Clontech 등에서 상업적으로 이용 가능하며, 많은 가이드, 예컨대 Ausubel, Guthrie, Strathern, 또는 Berger, 모든 상기 회사에서 설명되어 있다. 이러한 벡터에는 전형적으로 다수의 클로닝 부위와 함께 프로모터, 폴리아데닐화 신호 등뿐만 아니라 추가 요소, 예컨대 복제 기원, 선별 마커 유전자(예컨대, LEU2, URA3, TRP 1, HIS3, GFP), 중심체 서열 등이 포함된다.
- [0039] 바이러스 벡터, 예를 들어 AAV, PRV 또는 렌티바이러스는 본 발명의 프로모터를 사용하여 유전자를 방향 선택적인 망막 신경절로 표적화하고 전달하기 적합하다.
- [0040] 망막 세포의 출력은 전기적 방법, 예컨대 다전극 어레이 또는 패치-클램프를 사용하여, 또는 시각적 방법, 예컨대 형광 검출을 사용하여 측정될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 핵산 서열의 사용 방법은 방향 선택적인 망막 신경절이 관여되는 신경학적 질환 또는 망막 질환의 치료를 위한 치료제를 확인하기 위해 사용될 수 있고, 상기 방법은 평가 화합물을 본 발명의 프로모터 하에 하나 이상의 트랜스유전자를 발현하는 방향 선택적인 망막 신경절과 접촉시키는 단계, 및 상기 평가 화합물의 존재 하에 수득되는 방향 선택적인 망막 신경절의 적어도 하나의 출력을 상기 평가 화합물의 부재 하에 수득되는 동일한 출력과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0042] 또한, 본 발명의 프로모터의 사용 방법은 시력 복원의 시험관내 평가를 위해 사용될 수도 있고, 상기 방법은 본 발명의 프로모터의 제어 하에 하나 이상의 트랜스유전자를 발현하는 방향 선택적인 망막 신경절을 제제와 접촉시키는 단계, 및 상기 제제와의 접촉 후 수득되는 적어도 하나의 출력을 상기 제제와의 상기 접촉 전에 수득된 동일한 출력과 비교하는 단계를 포함한다.
- [0043] 채널로돕신은 광-관문화 이온 채널로서 기능하는 오피신 단백질의 서브패밀리이다. 이들은 단세포성 녹조류에서의 감각 광수용체로서, 주광성, 즉 빛에 대해 반응하는 운동을 제어하는 작용을 한다. 이들은 다른 유기체의 세포에서 발현되어, 세포내 산성도, 칼슘 유입, 전기적 흥분성, 및 다른 세포성 공정을 제어하기 위해 빛을 사용할 수 있도록 한다. 적어도 3개의 "천연" 채널로돕신, 즉 채널로돕신-1(ChR1), 채널로돕신-2(ChR2), 및 Volvox 채널로돕신(VChR1)이 현재 알려져 있다. 또한, 이들 단백질의 일부 개질된/개선된 버전도 존재한다. 모든 알려진 채널로돕신은 비특이적인 양이온 채널로, H⁺, Na⁺, K⁺, 및 Ca²⁺ 이온을 전도한다.
- [0044] 할로로돕신은 클로라이드 이온에 특이적인 광-유도 이온 펌프이며, 할로박테리아로서 알려진, 계통발생학적으로 고대의 "박테리아"(원시세균)에서 확인된다. 이는 광-유도된 양성자 펌프 박테리아로돕신과 상동성인, 레티날리덴 단백질 패밀리의 7회-막통과 단백질이며, 망막에서 빛을 감지하는 색소인 척추동물 로돕신과 (일차 서열 구조가 아니라) 삼차 구조가 유사하다. 할로로돕신은 또한 광-유도된 이온 채널인 채널로돕신과 서열 유사성을 공유한다. 할로로돕신은 필수적인 광-이성화 가능한 비타민 A 유도체인 전체-트랜스-레티날을 함유한다. 할로로돕신은 그 결정 구조가 알려진 소수의 막 단백질 중 하나이다. 할로로돕신 이소형은 *H. 살리나룸(salinarum)*, 및 *N. 파라오니스(pharaonis)*를 포함하는 여러 종의 할로박테리아에서 확인될 수 있다. 진행 중인 많은 연구는 이러한 차이를 탐구하고 있으며, 이들을 광주기 및 펌프 특성을 분석하기 위해 사용하고 있다. 박테리아로돕신 다음으로, 할로로돕신이 가장 많이 연구된 I형(미생물) 오피신일 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 할로로돕신 및 채널로돕신은 함께 다색의 광학적 활성화, 침묵화, 및 신경 활성의 비동기화를 가능하게 하여, 강력한 신경조작 도구상자를 생성한다.
- [0045] 일부 구현예에서, 프로모터는 망막을 표적화하는 벡터의 일부이며, 상기 벡터는 살아있는 방향 선택적인 망막

신경절에서 검출 가능한 적어도 하나의 리포터 유전자를 발현한다.

- [0046] 본 발명에 적합한 바이러스 벡터는 당분야에 널리 알려져 있다. 예를 들어 AAV, PRV 또는 렌티바이러스는 방향 선택적인 망막 신경절로 유전자를 표적화하고 전달하는 데 적합하다.
- [0047] 단리된 망막으로 작업하는 경우, 망막 세포에 대한 최적의 바이러스 전달은 망막의 광수용체층이 노출되고 이에 따라 더 우수하게 전달감염될 수 있도록 신경절 세포층을 아래 방향으로 실장하여 달성될 수 있다. 또 다른 기법은, 전달 바이러스가 내부 막에 침투할 수 있도록 하는, 예컨대 레이저 블레이드를 사용하는, 망막의 내부 경계막의 슬라이싱이다. 추가 방식은 망막을 한천 중에 포매하고, 상기 망막을 슬라이싱하고, 슬라이스층으로부터 전달 바이러스를 적용하는 것이다.
- [0048] 전달감염된 세포의 출력은 당분야에 널리 알려진 방법, 예를 들어 전기적 방법, 예컨대 다전극 어레이 또는 패치-클램프를 사용하여, 또는 시각적 방법, 예컨대 형광 검출을 사용하여 측정될 수 있다. 일부 경우에, 내부 경계막은 내부 경계막의 미세수술에 의해 제거된다. 다른 경우에서, 기록은 내부 경계막에 대해 수행되는 슬라이스를 통해 달성된다.
- [0049] 임의의 망막 세포 원천이 본 발명을 위해 사용될 수 있다. 본 발명의 일부 구현예에서, 망막 세포는 인간 망막 유래이거나, 그 안에 있다. 다른 구현예에서, 망막은 동물 유래, 예컨대 소 또는 설치류 기원이다. 인간 망막은 각막의 절제 후 상기 망막이 보통 폐기되는 각막 은행으로부터 쉽게 수득될 수 있다. 성인 인간 망막은 큰 표면적을 가지며(약 1100 mm²) 이에 따라 여러 실험 하위영역으로 쉽게 분리될 수 있다. 또한, 망막이 뇌의 나머지 와 동일한 시냅스를 가지므로, 망막은 또한 시냅스 커뮤니케이션에 대한 뛰어난 모델로서 사용될 수 있다.
- [0050] 본원에서 사용되는 용어 "동물"은 본원에서 모든 동물을 포함시키기 위해 사용된다. 본 발명의 일부 구현예에서, 비-인간 동물은 척추동물이다. 동물의 예는 인간, 마우스, 래트, 소, 돼지, 말, 닭, 오리, 거위, 고양이, 개 등이다. 용어 "동물"에는 또한 배아 및 태아 단계를 포함하는 모든 발생 단계의 개별 동물이 포함된다. "유전적으로-개질된 동물"은 세포-하위 수준에서의 의도적인 유전적 조작, 예컨대 표적화된 재조합, 미세주사 또는 재조합 바이러스로의 감염에 의해, 직접적으로 또는 간접적으로 변경되거나 수신된 유전 정보를 보유하는 하나 이상의 세포를 함유하는 임의의 동물이다. 용어 "유전적으로-개질된 동물"은 전통적인 교배 또는 시험관내 수정을 포괄하려는 것이 아니며, 오히려 하나 이상의 세포가 재조합 DNA 분자에 의해 변경되거나 이를 수신하는 동물을 포괄하려는 것이다. 상기 재조합 DNA 분자는 정의된 유전자좌에 특이적으로 표적화될 수 있거나, 염색체 내에 무작위로 통합될 수 있거나, 염색체의 복제하는 DNA일 수 있다. 용어 "생식계열이 유전적으로-개질된 동물"은 유전적 변경 또는 유전 정보가 생식계열 세포 내로 도입됨으로써, 유전 정보를 그 자손에게 전달하는 능력을 부여하는 유전적으로-개질된 동물을 나타낸다. 이러한 자손이 실제로 그러한 변경 또는 유전 정보를 일부 또는 전부 보유하는 경우, 이들도 유전적으로-개질된 동물이다.
- [0051] 변경 또는 유전 정보는 수신체가 속하는 동물의 종에 대해 외래일 수 있거나, 특정 개별 수신체에만 외래일 수 있거나, 수신체가 이미 보유하는 유전 정보일 수 있다. 마지막 경우, 변경되거나 도입된 유전자는 원상태 유전자와 상이하게 발현될 수 있거나, 전혀 발현되지 않을 수 있다.
- [0052] 표적 유전자의 변경에 사용되는 유전자는 비제한적으로 게놈 원천으로부터의 단리, 단리된 mRNA 주형으로부터의 cDNA의 제조, 직접적 합성, 또는 이의 조합을 포함하는 매우 다양한 기법에 의해 수득될 수 있다.
- [0053] 트랜스유전자 도입을 위한 표적 세포의 한 유형은 ES 세포이다. ES 세포는 시험관내 배양된 착상-전 배아로부터 수득되고 배아와 융합될 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). 트랜스유전자는 표준 기법, 예컨대 전기천공을 사용하는 DNA 전달감염에 의해 또는 레트로바이러스-매개된 형질도입에 의해 ES 세포 내로 효율적으로 도입될 수 있다. 이후 생성되는 형질전환된 ES 세포는 응집에 의해 상실배와 조합되거나, 비-인간 동물로부터의 포배 내로 주사될 수 있다. 이후 도입되는 ES 세포는 배아에 집락하며 생성되는 키메라 동물의 생식계열에 기여한다(Jaenisch (1988), Science 240:1468-1474). 유전자-표적화된 유전적으로-개질된 마우스의 생성에서 유전자-표적화된 ES 세포의 사용은 1987년도의 문헌[(Thomas et al. (1987), Cell 51:503-512)]에서 설명되었으며, 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 검토된다.
- [0054] 염색체 대립유전자 내로 특정 변화를 삽입하기 위해 표적화된 상동 재조합을 사용하여 임의의 유전 영역을 불활

성화하거나 요망되는 임의의 돌연변이로 변경하기 위한 기법이 이용 가능하다.

- [0055] 본원에서 사용되는 "표적화된 유전자"는 비제한적으로 본원에 기재되는 방법을 포함하는, 인간 개입에 의해 비-인간 동물의 생식계열 내로 도입되는 DNA 서열이다. 본 발명의 표적화된 유전자에는 인지체 내인성 대립유전자를 특이적으로 변경하도록 설계되는 DNA 서열이 포함된다.
- [0056] 본 발명에서, "단리된"은 그 원래 환경(예컨대, 이것이 천연 발생인 경우 천연 환경)으로부터 제거되고, 이에 따라 그 천연 상태에서부터 "인간의 손에 의해" 변경되는 물질을 나타낸다. 예를 들어, 단리된 폴리뉴클레오티드는 벡터 또는 대상 조성물의 일부일 수 있거나, 세포 내에 함유될 수 있고, 그 벡터, 대상 조성물, 또는 특정 세포는 폴리뉴클레오티드의 원래 환경이 아니므로, 여전히 "단리된" 것일 수 있다. 용어 "단리된"은 게놈 또는 cDNA 라이브러리, 전체 세포 총 또는 mRNA 조제물, 게놈 DNA 조제물(전기천공에 의해 분리되고 블롯 상으로 전달된 것들 포함), 전단된 전체 세포 게놈 DNA 조제물 또는 당분야에서 본 발명의 폴리뉴클레오티드/서열의 구별되는 속성을 실증하지 않는 다른 조성물을 나타내지 않는다. 단리된 DNA 분자의 추가 예에는 이중성 숙주 세포에서 유지되는 재조합 DNA 분자 또는 용액 중 정제된(부분적으로 또는 실질적으로) DNA 분자가 포함된다. 단리된 RNA 분자에는 본 발명의 DNA 분자의 생체내 또는 시험관내 RNA 전사체가 포함된다. 그러나, 라이브러리의 다른 구성원(예컨대, 라이브러리의 클론 및 다른 구성원을 함유하는 동종성 용액 형태)으로부터 단리되지 않은 라이브러리(예컨대, 게놈 또는 cDNA 라이브러리)의 구성원인 클론에 함유된 핵산, 또는 세포 또는 세포 용해액으로부터 제거된 염색체(예컨대, 핵형에서와 같은 "염색체 펠집"), 또는 무작위 전단된 게놈 DNA의 조제물 또는 하나 이상의 제한효소로 절단된 게놈 DNA의 조제물은 본 발명의 목적을 위해 "단리된" 것이 아니다. 본원에서 추가로 논의되는 바와 같이, 본 발명에 따른 단리된 핵산 분자는 천연적으로, 재조합적으로, 또는 합성적으로 제조될 수 있다.
- [0057] "폴리뉴클레오티드"는 단일쇄 및 이중쇄 DNA, 단일쇄 및 이중쇄 영역의 혼합물인 DNA, 단일쇄 및 이중쇄 RNA, 및 단일쇄 및 이중쇄 영역의 혼합물인 RNA, 단일쇄 또는 보다 전형적으로는 이중쇄 또는 단일쇄 및 이중쇄 영역의 혼합물일 수 있는 DNA 및 RNA를 포함하는 하이브리드 분자로 이루어질 수 있다. 또한, 폴리뉴클레오티드는 RNA 또는 DNA 또는 RNA 및 DNA를 둘 다 포함하는 삼중쇄 영역으로 이루어질 수 있다. 폴리뉴클레오티드는 또한 하나 이상의 개질된 염기 또는 안정성 또는 다른 이유로 개질된 DNA 또는 RNA 골격을 함유할 수 있다. "개질된" 염기에는, 예를 들어, 트리틸화된 염기 및 비일반 염기, 예컨대 이노신이 포함된다. 다양한 개질이 DNA 및 RNA에 대해 수행될 수 있다; 따라서, "폴리뉴클레오티드"는 화학적으로, 효소적으로, 또는 대사적으로 개질된 형태를 포괄한다.
- [0058] 표현 "폴리펩티드를 인코딩하는 폴리뉴클레오티드"는 폴리펩티드에 대한 코딩 서열만을 포함하는 폴리뉴클레오티드뿐만 아니라 추가적인 코딩 및/또는 비-코딩 서열을 포함하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.
- [0059] "엄격한 혼성화 조건"은 50% 포름아미드, 5x SSC(750 mM NaCl, 75 mM 트리나트륨 시트레이트), 50 mM 나트륨 포스페이트(pH 7.6), 5x 덴하르트 용액, 10% 텍스트란 셀레이트, 및 20 µg/ml의 변성되고 전단된 연어 정자 DNA를 포함하는 용액 중 42°C에서 하룻밤 인큐베이션 후, 약 50°C에서 0.1x SSC 중 필터 세척을 나타낸다. 혼성화 엄격성의 변화 및 신호 검출은 일차적으로는 포름아미드 농도(낮은 백분율의 포름아미드는 낮은 엄격성으로 이어짐); 염 농도, 또는 온도의 조작을 통해 달성된다. 예를 들어, 중등도로 높은 엄격성 조건에는 6X SSPE(20X SSPE = 3M NaCl; 0.2M NaH₂PO₄; 0.02M EDTA, pH 7.4), 0.5% SDS, 30% 포름아미드, 100 µg/ml 연어 정자 차단 DNA를 포함하는 용액 중 37°C에서의 하룻밤 인큐베이션에 이어; 1XSSPE, 0.1% SDS로의 50°C에서의 세척이 포함된다. 또한 더 낮은 엄격성을 달성하기 위해, 엄격한 혼성화 후 수행되는 세척은 더 높은 염 농도(예컨대 5X SSC)로 수행될 수 있다. 상기 조건의 변동은 혼성화 실험에서 배경을 억제하기 위해 사용되는 대안적 차단 시약의 포함 및/또는 치환을 통해 달성될 수 있다. 전형적인 차단 시약에는 덴하르트 시약, BLOTTO, 헤파린, 변성된 연어 정자 DNA, 및 상업적으로 이용 가능한 전용 제형물이 포함된다. 특정한 차단 시약의 포함은 상용성 문제로 인해, 상실되는 혼성화 조건의 변형을 필요로 할 수 있다.
- [0060] 폴리펩티드를 언급한 경우, 용어 "단편", "유도체" 및 "유사체"는 이러한 폴리펩티드와 실질적으로 동일한 생물학적 기능 또는 활성을 보유하는 폴리펩티드를 의미한다. 유사체에는 활성 성숙 폴리펩티드를 제조하기 위해 프로-단백질 부분의 절단에 의해 활성화될 수 있는 프로-단백질이 포함된다.
- [0061] 용어 "유전자"는 폴리펩티드쇄의 제조에 관여되는 DNA 분절을 의미한다; 여기에는 코딩 서열에 선행하는 영역 및 뒤따르는 영역 "리더 및 트레일러"뿐만 아니라 개별 코딩 분절(엑손) 사이의 개재 서열(인트론)이 포함된다.
- [0062] 폴리펩티드는 펩티드 결합에 의해 서로 연결된 아미노산 또는 개질된 펩티드 결합에 의해 서로 연결된

아미노산, 즉 펩티드 이소스테어로 이루어질 수 있고, 20개의 유전자-인코딩 아미노산 이외의 아미노산을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는 천연 공정, 예컨대 번역 후 가공에 의해 또는 당분야에서 널리 알려진 화학적 개질 기법에 의해 개질될 수 있다. 이러한 개질은 기본 교과서 및 보다 상세한 논문뿐만 아니라 다수의 연구 문헌에 잘 기재되어 있다. 개질은 펩티드 골격, 아미노산 측쇄 및 아미노 또는 카복실 말단을 포함하는, 폴리펩티드 내의 임의의 위치에서 일어날 수 있다. 동일한 유형의 개질이 주어진 폴리펩티드에서 몇몇 부위에서 동일하거나 다양한 정도로 존재할 수 있음이 이해될 것이다. 또한, 주어진 폴리펩티드는 여러 유형의 개질을 함유할 수 있다. 폴리펩티드는, 예를 들어, 유비퀴틴화의 결과 분기형일 수 있고, 이들은 분기를 포함하거나 포함하지 않는 고리형일 수 있다. 고리형, 분기형 및 분기화 고리형 폴리펩티드는 번역 후 천연 공정으로부터 생성될 수도 있고 합성 방법에 의해 제조될 수도 있다. 개질에는 비제한적으로 아세틸화, 아실화, 바이오틴화, 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, CPI 앵커 형성, 하이드록실화, 요오드화, 항체 분자 또는 다른 세포성 리간드에 대한 결합, 메틸화, 미리스토일화, 산화, peg화, 단백질에 가공(예컨대, 절단), 인산화, 프레닐화, 라세미화, 셀레노일화, 황화, 단백질에 대한 아미노산의 전달-RNA 매개 부가, 예컨대 아르기닐화, 및 유비퀴틴화가 포함된다(예를 들어, 문헌[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)] 참고).

[0063] "생물학적 활성을 갖는" 폴리펩티드 단편은 용량 의존성을 갖거나 갖지 않고, 특정 생물학적 검정에서 측정되는, 성숙한 형태를 포함하여 원래 폴리펩티드의 활성과 유사하지만 반드시 동일하지는 않은 활성을 나타내는 폴리펩티드를 나타낸다. 용량 의존성이 존재하는 경우, 이것이 폴리펩티드의 활성과 동일할 필요는 없으며, 오히려 원래 폴리펩티드에 비해 주어진 활성에서의 용량-의존성과 실질적으로 유사하다(즉, 후보 폴리펩티드는 원래 폴리펩티드에 비해 약 25배보다 큰 활성 또는 그 이하의 활성을, 일부 구현예에서는 약 10배 이하의 활성을, 또는 약 3배 이하의 활성을 나타낼 것임).

[0064] 본원에서 제공된 서열로부터 적합한 탐침 또는 프라이머를 제조하고 요망되는 동족체에 대해 적합한 핵산 원천을 스크리닝하여 중 동족체가 단리되고 확인될 수 있다.

[0065] "변이체"는 원래 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 상이하지만 이의 본질적 특성은 보유하는 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드를 나타낸다. 일반적으로, 변이체는 원래 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드와 전반적으로 상당히 유사하며, 여러 영역이 동일하다.

[0066] 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. 전체 서열 정렬로도 불리는, 쿼리 서열(본 발명의 서열) 및 대상 서열 간 최적의 전반적 매칭을 결정하기 위한 바람직한 방법은 Brutlag 등의 알고리즘(Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245)에 기반하는 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 및 대상 서열은 둘 다 DNA 서열이다. RNA 서열은 U를 T로 전환하여 비교될 수 있다. 상기 전체 서열 정렬 결과가 동일성 백분율이다. 동일성 백분율을 계산하기 위한 DNA 서열의 FASTDB 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 매트릭스=Unitary, k-터플(tuple)=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. 대상 서열이 내부 결실때문인 아니라 5' 또는 3' 결실로 인해 쿼리 서열보다 짧은 경우, 결과에 대해 수동 교정이 수행되어야 한다. 이는 FASTDB 프로그램이 동일성 백분율을 계산할 때 대상 서열의 5' 및 3' 절단을 고려하지 않기 때문이다. 쿼리 서열 대비 5' 또는 3' 말단이 절단된 대상 서열에 있어서, 동일성 백분율은 쿼리 서열의 총 염기의 백분율로서, 매칭되지/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3'인 쿼리 서열의 염기 수를 계산하여 교정된다. 뉴클레오티드가 매칭되는지/정렬되는지 여부는 FASTDB 서열 정렬 결과에 의해 결정된다. 이어서 상기 백분율은 특정된 파라미터를 사용해서 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산되는 동일성 백분율로부터 감소되어, 최종 동일성 백분율 스코어에 도달한다. 상기 교정된 스코어가 본 발명의 목적을 위해 사용되는 스코어이다. 쿼리 서열과 매칭되지/정렬되지 않은, FASTDB 정렬에 의해 디스플레이되는 대상 서열의 5' 및 3' 염기 외부의 염기만 동일성 백분율 스코어의 수동 조정을 위해 계산된다. 예를 들어, 90개 염기 대상 서열이 동일성 백분율을 결정하기 위해 100개 염기 쿼리 서열과 정렬된다. 결실은 대상 서열의 5' 말단에서 일어나며, 이에 따라 FASTDB 정렬은 5' 말단의 처

음 10개 염기의 매칭/정렬은 나타내지 않는다. 10개의 페어링되지 않은 염기는 서열의 10%를 나타내므로(매칭되지 않은 5' 및 3' 말단에서의 염기 수/쿼리 서열에서의 총 염기 수) 10%가 FASTDB 프로그램에 의해 계산되는 동일성 백분율 스코어로부터 감소된다. 나머지 90개 염기가 완벽하게 매칭된 경우, 최종 동일성 백분율은 90%일 것이다. 또 다른 예에서, 90개 염기 대상 서열이 100개 염기 쿼리 서열과 비교된다. 이번에는 결실이 내부 결실이므로 쿼리와 매칭되지/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 또는 3' 상의 염기가 존재하지 않는다. 이 경우, FASTDB에 의해 계산되는 동일성 백분율은 수동 교정되지 않는다. 또 다시, 쿼리 서열과 매칭되지/정렬되지 않은 대상 서열의 5' 및 3' 염기만 수동 교정된다.

[0067] 본 발명의 쿼리 아미노산 서열과 적어도, 예를 들어, 95% "동일한" 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드란, 대상 폴리펩티드 서열에 쿼리 아미노산 서열의 각각의 100개의 아미노산 당 최대 5개의 아미노산 변경이 포함될 수 있음을 제외하고, 대상 폴리펩티드의 아미노산 서열이 쿼리 서열과 동일하다는 것으로 의도된다. 다시 말하면, 쿼리 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열을 갖는 폴리펩티드를 수득하기 위해, 대상 서열 내 최대 5%의 아미노산 잔기가 삽입되거나, 결실되거나, 또 다른 아미노산으로 치환될 수 있다. 참조 서열의 이러한 변경은 참조 아미노산 서열의 아미노 또는 카복시 말단 위치, 또는 참조 서열 내 잔기 중에 개별적으로 또는 참조 서열 내에서 하나 이상의 인접한 군에 산재된, 이들 말단 위치 사이의 임의의 위치에서 일어날 수 있다.

[0068] 실질적으로, 임의의 특정 폴리펩티드가, 예를 들어, 하나의 서열에 나타낸 아미노산 서열과 또는 기탁된 DNA 클론에 의해 인코딩되는 아미노산 서열과 적어도 80%, 85%, 90%, 92%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100% 동일한지 여부는 알려진 컴퓨터 프로그램을 사용하여 통상적으로 결정될 수 있다. 전체 서열 정렬로도 언급되는, 쿼리 서열(본 발명의 서열) 및 대상 서열 간 최상의 전반적 매칭의 바람직한 결정 방법은 Brutlag 등의 알고리즘(Comp. App. Biosci. (1990) 6:237-245)에 기반하는 FASTDB 컴퓨터 프로그램을 사용하여 결정될 수 있다. 서열 정렬에서, 쿼리 및 대상 서열은 둘 다 뉴클레오티드 서열 또는 둘 다 아미노산 서열이다. 상기 전체 서열 정렬 결과는 동일성 백분율이다. FASTDB 아미노산 정렬에서 사용되는 바람직한 파라미터는 다음과 같다: 매트릭스=PAM 0, k-터플=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. 대상 서열이 내부 결실때문이 아니라 N- 또는 C-말단 결실로 인해 쿼리 서열보다 짧은 경우, 결과에 대해 수동 교정이 수행되어야 한다. 이는 FASTDB 프로그램이 전체 동일성 백분율을 계산할 때 대상 서열의 N- 및 C-말단 절단을 고려하지 않기 때문이다. 쿼리 서열 대비 N- 및 C-말단이 절단된 대상 서열에 있어서, 동일성 백분율은 쿼리 서열의 총 잔기의 백분율로서, 대응하는 대상 잔기와 매칭되지/정렬되지 않은 대상 서열의 N- 및 C-말단인 쿼리 서열의 잔기 수를 계산하여 교정된다. 잔기가 매칭되는지/정렬되는지 여부는 FASTDB 서열 정렬 결과에 의해 결정된다. 이어서 상기 백분율은 특정된 파라미터를 사용해서 상기 FASTDB 프로그램에 의해 계산되는 동일성 백분율로부터 감소되어, 최종 동일성 백분율 스코어에 도달한다. 상기 최종 동일성 백분율 스코어가 본 발명의 목적을 위해 사용되는 스코어이다. 쿼리 서열과 매칭되지/정렬되지 않은, 대상 서열의 N- 및 C-말단에 대한 잔기만 동일성 백분율 스코어의 수동 조정 목적을 위해 고려된다. 즉, 대상 서열의 가장 원위의 N- 및 C-말단 잔기 밖의 쿼리 잔기 위치만 고려된다. 쿼리 서열과 매칭되지/정렬되지 않은, FASTDB 정렬에서 디스플레이 되는 대상 서열의 N- 및 C-말단 끝 밖의 잔기 위치만 수동 교정된다. 본 발명의 목적을 위해 다른 수동 교정은 수행되지 않는다.

[0069] 천연 발생 단백질 변이체는 "대립유전자 변이체"로 언급되며 유기체의 염색체 상에서 주어진 유전자위를 점유하는 유전자의 몇몇 대안적 형태 중 하나를 나타낸다(Genes 11, Lewin, B., ed., John Wiley & Sons, New York (1985)). 이들 대립유전자 변이체는 폴리뉴클레오티드 및/또는 폴리펩티드 수준에서 변할 수 있다. 대안적으로, 비-천연 발생 변이체가 돌연변이화 기법에 의해 또는 직접 합성에 의해 제조될 수 있다.

[0070] "표지"는 직접 또는 신호 발생 시스템의 하나 이상의 추가적인 구성원과의 상호작용을 통해, 검출 가능한 신호를 제공할 수 있는 체제를 나타낸다. 직접 검출 가능하며 본 발명에서 사용할 수 있는 표지에는 형광 표지가 포함된다. 구체적인 형광단에는 플루오레세인, 로다민, BODIPY, 시아닌 염료 등이 포함된다.

[0071] "형광 표지"는 또 다른 파장의 빛에 의해 활성화되는 경우, 소정 파장의 빛을 방출하는 능력을 갖는 임의의 표지를 나타낸다.

[0072] "형광"은 강도, 스펙트럼, 파장, 세포내 분포 등을 포함하는, 형광 신호의 임의의 검출 가능한 특징을 나타낸다.

[0073] 형광의 "검출"은 정성적 또는 정량적 방법을 사용하는 세포의 형광 평가를 나타낸다. 본 발명의 일부 구현예에서, 형광은 정성적 방식으로 검출될 것이다. 다시 말하면, 제조합 융합 단백질이 발현됨을 시사하는 형광 마커

가 존재하는지, 또는 아닌지가 검출된다. 다른 경우에서, 형광은 정량적 수단을 사용하여, 예컨대 형광 강도, 스펙트럼, 또는 세포내 분포를 측정하여, 상이한 조건 하에 수득된 값의 통계적 비교를 가능하게 하여 결정될 수 있다. 수준은 또한 정성적 방법을 이용하여, 예컨대 형광 현미경 또는 다른 광학 검출장치(예컨대 이미지 분석 시스템 등)를 사용하여 검출되는 샘플과 같은 다수의 샘플을 사람이 시각적으로 분석하고 비교하여 결정될 수 있다. 형광의 "변경" 또는 "조정"은 또 다른 조건과 비교할 때 특정 조건 하에 형광의 강도, 세포내 분포, 스펙트럼, 파장, 또는 다른 양태에서의 임의의 검출 가능한 차이를 나타낸다. 예를 들어, "변경" 또는 "조정"은 정량적으로 검출되며, 차이는 통계적으로 유의미한 차이이다. 형광에서의 임의의 "변경" 또는 "조정"은 표준 기기, 예컨대 형광 현미경, CCD, 또는 임의의 다른 형광 검출장치를 사용하여 검출될 수 있고, 자동화 시스템, 예컨대 통합 시스템을 사용하여 검출될 수 있거나, 인간 관찰자에 의한 변경의 주관적 검출을 반영할 수 있다.

[0074] "녹색 형광 단백질"(GFP)은 청색광에 노출되는 경우 녹색으로 형광을 내는 해파리 애쿠오레아 빅토리아(*Aequorea victoria*)/애쿠오레아 애쿠오레아(*Aequorea aequorea*)/애쿠오레아 폴스칼레아(*Aequorea forskalea*)로부터 최초 단리된, 238개 아미노산(26.9 kDa)으로 이루어진 단백질이다. 애쿠오레아 빅토리아(*A. victoria*)로부터의 GFP는 395 nm의 파장에서 주요 여기 피크 및 475 nm에서 소형 피크를 갖는다. 방출 피크는 가시광선 스펙트럼의 낮은 녹색 부분에 있는 509 nm에 있다. 바다 표고(레닐라 레니포르미스(*Renilla reniformis*))의 GFP는 498 nm에서 하나의 주요 여기 피크를 갖는다. 광범위한 사용 가능성 및 연구자들의 높아지는 요구로 인해, GFP의 여러 상이한 돌연변이체가 조작되었다. 최초 주요 개선은 1995년에 Nature에서 Roger Tsien에 의해 보고된 단일 점 돌연변이(S65T)였다. 상기 돌연변이는 GFP의 스펙트럼 특징을 극적으로 개선하여, 증가된 형광, 광 안정성 및 509 nm에서 유지되는 피크 방출을 가지며 주요 여기 피크의 488 nm로의 이동을 일으켰다. 상기 스캐폴드로의 37°C 폴딩 효율(F64L) 점 돌연변이체의 부가는 증강된 GFP(EGFP)를 산출하였다. EGFP는 55,000 L/(mol·cm)로도 인용되는, 9.13×10^{-21} m²/분자의 광학 단면으로도 알려진 소멸 계수(ϵ 로 표시됨)를 갖는다. GFP가 신속히 폴딩되고, 불량하게 폴딩되는 펩티드에 융합되는 경우에도 성숙하도록 하는 일련의 돌연변이 슈퍼폴더 GFP는 2006년에 보고되었다.

[0075] "황색 형광 단백질"(YFP)은 애쿠오레아 빅토리아(*Aequorea victoria*)로부터 유래되는 녹색 형광 단백질의 유전적 돌연변이체이다. 이의 여기 피크는 514 nm이며 방출 피크는 527 nm이다.

[0076] 본원에서 사용되는 단수 형태("a", "an" 및 "the")에는 문맥 상 명확히 달리 나타내지 않는 한 복수의 참조물이 포함된다.

[0077] "바이러스"는 숙주 세포 밖에서 성장하거나 생식할 수 없는 현미경크기-미만 감염성 체제이다. 각각의 바이러스 입자, 또는 비리온은 캡시드로 불리는 보호 단백질 피막 내의 유전 물질, DNA 또는 RNA로 구성된다. 캡시드 형태는 단순한 나선 및 20면체(다면체 또는 거의-구형) 형태에서부터 꼬리 또는 외피를 갖는 보다 복잡한 구조까지 다양하다. 바이러스는 세포성 생명 형태를 감염시키며, 감염되는 숙주의 유형에 따라 동물, 식물 및 박테리아 유형으로 그룹화된다.

[0078] 본원에서 사용되는 용어 "시냅스통과 바이러스"는 하나의 뉴런으로부터 또 다른 연결 뉴런으로 시냅스를 통해 이동할 수 있는 바이러스를 나타낸다. 이러한 시냅스통과 바이러스의 예는 램프디바이러스, 예컨대 광견병 바이러스, 및 알파헤르페스바이러스, 예컨대 거짓광견병 또는 단순 헤르페스 바이러스이다. 본원에서 사용되는 용어 "시냅스통과 바이러스"는 또한 이들 스스로가 하나의 뉴런으로부터 또 다른 연결 뉴런으로 시냅스를 통해 이동하는 능력을 갖는 바이러스 서브유닛 및 생물학적 벡터, 예컨대 이러한 서브유닛을 포함하며 하나의 뉴런으로부터 또 다른 연결 뉴런으로 시냅스를 통해 이동하는 능력을 실증하는 개질된 바이러스를 포괄한다.

[0079] 시냅스통과 이동은 앞방향 또는 후방향일 수 있다. 후방향 이동 동안, 바이러스는 시냅스 후 뉴런으로부터 시냅스 전 뉴런으로 이동할 것이다. 따라서, 앞방향 이동 동안, 바이러스는 시냅스 전 뉴런으로부터 시냅스 후 뉴런으로 이동할 것이다.

[0080] 동족체는 공통 선조를 공유하는 단백질을 나타낸다. 유사체는 공통 선조를 공유하지는 않지만, 이들이 하나의 클래스에 포함되도록 하는 일부 기능적(구조적이 아닌) 유사성을 갖는다(예컨대 트립신 유사 세린 프로테이나제 및 서브틸리신은 명확히 관련되지 않는다 - 활성 부위 밖의 이의 구조는 완전히 상이하지만, 이들은 실제로 기하구조적으로 동일한 활성 부위를 가지며 이에 따라 유사체에 대한 수렴 진화의 일례로서 간주된다).

[0081] 동족체에는 2개의 서브클래스 오르소로그 및 파라로그가 존재한다. 오르소로그는 상이한 종 내의 동일한 유전자(예컨대 시토크롬 'c')이다. 동일한 유기체에서의 2개 유전자는 오르소로그가 될 수 없다. 파라로그는 유전자 중복의 결과이다(예컨대 헤모글로빈 베타 및 델타). 2개 유전자/단백질이 상동성이고 동일한 유기체에 있는 경

우, 이들은 파라로그이다.

- [0082] 본원에서 사용되는 용어 "질환"은 불쾌함, 질병, 병, 임상적 상태, 또는 병리적 상태를 나타낸다.
- [0083] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 담체"는 활성 성분의 생물학적 활성의 효과를 방해하지 않고, 화학적으로 불활성이고, 이것이 투여되는 환자에게 독성이 없는 담체 매질을 나타낸다.
- [0084] 본원에서 사용되는 용어 "약학적으로 허용 가능한 유도체"는, 예컨대 대상체에 비교적 무독성인, 본 발명의 스크리닝 방법을 사용하여 확인되는, 제제의 임의의 동족체, 유사체, 또는 단편을 나타낸다.
- [0085] 용어 "치료제"는 질환, 또는 질환 합병증의 예방 또는 치료를 보조하는 임의의 분자, 화합물, 또는 치료를 나타낸다.
- [0086] 상용성 약학 담체 중에 제형화된 이러한 제제를 포함하는 조성물이 치료를 위해 제조되고, 패키징되고, 라벨링될 수 있다.
- [0087] 복합체가 수용성인 경우, 이는 적절한 완충액, 예를 들어, 인산염 완충 식염수 또는 다른 생리적으로 상용성인 용액 중에 제형화될 수 있다.
- [0088] 대안적으로, 생성되는 복합체가 수성 용매 중 불량한 용해도를 갖는 경우, 이는 비이온성 계면활성제, 예컨대 Tween, 또는 폴리에틸렌 글리콜과 함께 제형화될 수 있다. 따라서, 화합물 및 이의 생리적으로 허용 가능한 용매화물은 흡입 또는 취입에 의한 투여(입 또는 코를 통해) 또는 경구, 협측, 비경구, 직장 투여를 위해 제형화될 수 있거나, 종양의 경우, 고형 종양 내로 직접 주사될 수 있다.
- [0089] 경구 투여를 위해, 약학 조성물은 액체 형태, 예를 들어, 용액, 시럽 또는 현탁액일 수 있거나, 사용 전에 물 또는 다른 적합한 비히클로의 재구성을 위한 약품으로서 제공될 수 있다. 이러한 액체 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제, 예컨대 현탁화제(예컨대, 소르비톨 시럽, 셀룰로스 유도체 또는 수소화된 식용 지방); 유화제(예컨대, 레시틴 또는 아카시아); 비-수성 비히클(예컨대, 아몬드 오일, 유성 에스테르, 또는 분획화된 식물성 오일); 및 보존제(예컨대, 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(예컨대, 사전 젤라틴화된 옥수수 전분, 폴리비닐 피롤리돈 또는 하이드록시프로필 메틸셀룰로스); 충전제(예컨대, 락토스, 미정질 셀룰로스 또는 칼슘 하이드로겐 포스페이트); 윤활제(예컨대, 마그네슘 스테아레이트, 활석 또는 실리카); 붕해제(예컨대, 감자 전분 또는 나트륨 전분 글리콜레이트); 또는 습윤제(예컨대, 나트륨 라우릴 설페이트)와 함께 통상적 수단에 의해 제조되는 정제 또는 캡슐 형태를 취할 수 있다. 정제는 당분야에 널리 알려진 방법에 의해 코팅될 수 있다.
- [0090] 경구 투여용 조성물은 활성 화합물의 제어되는 방출을 제공하기 위해 적합하게 제형화될 수 있다.
- [0091] 화합물은 주사, 예컨대 볼투스 주사 또는 연속 주입에 의해 비경구 투여를 위해 제형화될 수 있다. 주사용 제형물은 단위 투여량 형태, 예컨대 앰플 또는 다중-용량 용기에서, 첨가되는 보존제와 함께 제공될 수 있다.
- [0092] 조성물은 유성 또는 수성 비히클 중 현탁액, 용액 또는 에멀전과 같은 형태를 취할 수 있고, 현탁화제, 안정화제 및/또는 분산제와 같은 제형화 제제를 함유할 수 있다. 대안적으로, 활성 성분은 적합한 비히클, 예컨대 멸균 발열원-비함유수로 사용 전에 구성하기 위한 분말 형태일 수 있다.
- [0093] 화합물은 또한 국소 적용, 예컨대 크림 또는 로션으로서 제형화될 수 있다.
- [0094] 이전에 기재된 제형물에 부가하여, 화합물은 또한 데포 조성물로서 제형화될 수 있다. 이러한 장기 작용 제형물은 이식에 의해(예를 들어, 안내, 피하 또는 근육내) 또는 안내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0095] 따라서, 예를 들어, 화합물은 적합한 중합체성 또는 소수성 물질과 함께(예를 들어 허용 가능한 오일 중 에멀전으로서) 또는 이온 교환 수지와 함께, 또는 거의 불용성인 유도체로서, 예를 들어, 거의 불용성인 염으로서 제형화될 수 있다. 리포솜 및 에멀전은 친수성 약물에 대한 전달 비히클 또는 담체의 널리 알려진 예이다.
- [0096] 조성물은, 요망되는 경우, 활성 성분을 함유하는 하나 이상의 단위 투여량 형태를 함유할 수 있는 팩 또는 디스펜서 장치에서 제공될 수 있다. 팩은, 예를 들어 금속 또는 플라스틱 호일, 예컨대 블리스터 팩을 포함할 수 있다. 팩 또는 디스펜서 장치에는 투여 설명서가 동반될 수 있다.
- [0097] 본 발명은 또한 본 발명의 치료 요법을 수행하기 위한 키트를 제공한다. 이러한 키트는 약학적으로 허용 가능한 형태로 치료 또는 예방 유효량의 조성물을 하나 이상의 용기에 포함한다.

- [0098] 키트의 바이알 내 조성물은 약학적으로 허용 가능한 용액 형태, 예컨대 멸균 식염수, 텍스트로스 용액, 또는 완충 용액, 또는 다른 약학적으로 허용 가능한 멸균액과 조합된 형태일 수 있다. 대안적으로, 복합체는 동결건조되거나 건조될 수 있다; 이 경우, 키트는 선택적으로 주사 목적의 용액을 형성하기 위해 복합체를 재구성하기 위한 약학적으로 허용 가능한 용액(예컨대, 식염수, 텍스트로스 용액 등), 바람직하게는 멸균인 용액을 용기에 추가로 포함한다.
- [0099] 또 다른 구현예에서, 키트는 복합체를 주사하기 위한, 바람직하게는 멸균 형태로 패키징화된, 바늘 또는 주사기, 및/또는 패키징화된 알코올 패드를 추가로 포함한다. 선택적으로 의사에 의한 또는 환자에 의한 조성물의 투여를 위해 설명서가 포함된다.
- [0100] 시각의 움직임 감지는 유기체로 하여금 그 시야에 걸쳐 움직임을 검출할 수 있도록 한다. 이는 가능한 짝, 먹이, 또는 포식자를 검출하는 데 중요하며, 이에 따라 이것이 모든 종에서 보편적인 것은 아니지만, 매우 다양한 종에 걸쳐 척추동물 및 무척추동물 시각에서 모두 확인된다. 척추동물에서, 이 과정은 망막에서, 보다 구체적으로는 망막 신경절 세포에서 일어나며, 이는 시각 정보에 대한 양극성 세포 및 무축삭 세포로부터 입력을 수신하여 시상, 시상하부, 및 중간뇌를 포함하는 뇌의 상위 영역으로의 출력을 가공하는 뉴런이다.
- [0101] 망막 내 방향 선택적인(DS) 신경절 세포는 시각 자극의 방향에 대해 차별적으로 반응하는 뉴런으로서 정의된다. Barlow 및 Levick에 따르면, 이 용어는 "자극 물체가 그 수용장을 통해 하나의 방향으로 움직이는 경우, 강력한 자극 방출을 제공하는" 일군의 뉴런을 설명하기 위해 사용된다(B, Barlow H., and Levick W. R. "The Mechanism of Directionally Selective Units in Rabbit's Retina." *The Journal of Physiology* 178.3 (1965): 477-504). 이는 한 세트의 뉴런이 이의 "선호되는 방향"에 가장 강력하게 반응하는 방향이다. 대조적으로, 이들은 반대 방향인 "무(null) 방향"에는 전혀 반응하지 않는다. 바람직한 방향은 자극에 의존하지 않는다. 즉, 자극의 크기, 형태, 또는 색상과 무관하게, 뉴런은 이의 바람직한 방향으로 이동하고 있을 때 반응하며, 이것이 무 방향으로 이동하고 있을 때 반응하지 않는다. 척추동물 망막에는 3가지 알려진 유형의 DS 망막 신경절 세포인 ON/OFF DS 신경절 세포, ON DS 신경절 세포, 및 OFF DS 신경절 세포가 존재한다. 각각은 생리학적으로, 그리고 해부학적으로 구별된다. ON/OFF DS 신경절 세포는 국소 움직임 검출기로서 작용한다. 이들은 자극(광원)의 온셋 및 오프셋에서 발사된다. 자극이 세포의 선호 방향으로 이동하고 있는 경우, 이는 리딩 및 트레일링 가장자리에서 발사될 것이다. 이의 발사 패턴은 시간-의존적이다. ON/OFF 세포의 해부구조는 가지돌기가 내부 열기층의 2개의 판-아래로 연장되고 양극성 및 무축삭 세포와 시냅스를 만드는 것이다. 이들은 4개의 서브타입을 가지며, 각각 고유한 방향 선호도를 갖는다. 자극의 리딩 및 트레일링 가장자리 모두에 반응하는 ON/OFF DS 신경절 세포와는 달리, ON DS 망막 신경절 세포는 리딩 가장자리에만 반응성이다. ON DS 신경절 세포의 가지돌기는 단층화되며 내부 열기층의 내부 판-아래 내로 연장된다. 이들은 상이한 방향 선호성을 갖는 3개의 서브타입을 갖는다. OFF DS 신경절 망막 세포는 구심 움직임 검출장치로서 작용하며, 이들은 자극의 트레일링 가장자리에만 반응한다. 이들은 자극의 상향 움직임에 대해 조정된다. 가지돌기는 비대칭이며 이의 선호도 방향으로 휘다.
- [0102] 달리 정의되지 않는 한, 본원에서 사용되는 용어 모든 기술 및 과학 용어는 본 발명이 속한 기술 분야의 당업자에게 일반적으로 이해되는 바와 동일한 의미를 갖는다. 본원에 기재되는 것과 유사하거나 동등한 임의의 방법 및 물질이 본 개시의 실시 또는 평가에 사용될 수 있지만, 적합한 방법 및 물질이 아래에 기재된다. 상충되는 경우, 정의를 포함하는 본 명세서가 우선될 것이다. 또한, 물질, 방법, 및 예는 단지 예시적인 것이며 제한하려는 것이 아니다.
- [0103] 실시예
- [0104] 유전자 작제물
- [0105] 후보 조절 영역을 확인하기 위해 전체 게놈 고해상 DNA 메틸화 맵을 관심 세포 유형(신경절)에서 생성하였다. 후보 인핸서를 세포 유형 특이적 DNA 저메틸화의 존재에 기반하여 선택하였다. 이렇게-선택된 요소를 마우스 망막에서 생체내 고처리량 리포터 검정을 사용하여 발현에 대해 스크리닝하였다. 이어서 신경절 세포 특이적 서열 요소를 합성하고, 하기의 최소 프로모터 서열 앞에 클로닝하였다:
- ATCCTCACATGGTCCTGCTGGAGTTAGTAGAGGGTATATAATGGAAGCTCGACTTCCAG
- [0106] CTATCACATCCACTGTGTTGTTGTGAAGTCCACTATAGGCCA (SEQ ID NO:2). ChR2-eGFP 코딩 서열을 상기 프로모터 및 최적화된 Kozak 서열(GCCACC) 바로 뒤에 삽입하고, 이어서 우드척 간염 바이러스 전사 후 조절 요소(WPRE) 및 SV40 폴리아데닐화 부위가 뒤따랐다. 망막 뉴런을 3.43E+11 내지 1.75E+12 GC/ml

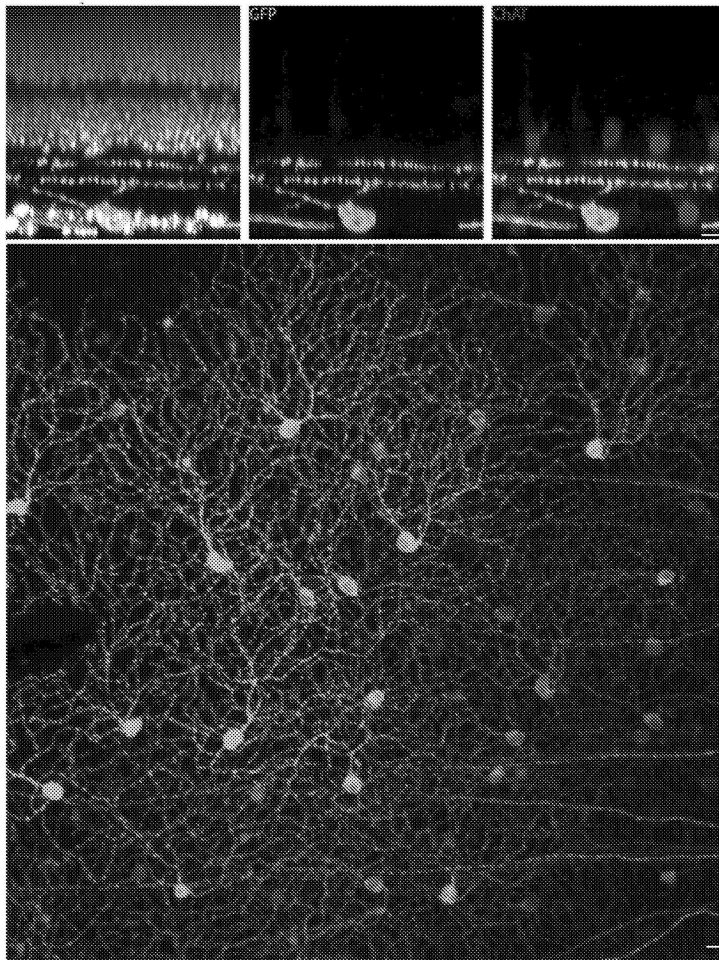
범위의 역가로 AAV 혈청형 2/8을 사용하여 표적화하였다.

[0107] 바이러스 전달감염 및 조직 제조

[0108] AAV 투여를 위해, 마취된 동물의 눈을 예리한 30 게이지 바늘에 의해 수정체와 가까운 공막에서 천공하였다. 2 μ l의 AAV 입자 현탁액을 Hamilton 주사기에 의해 망막하 주사하였다. 3주 후, 단리된 망막을 PBS 중 4% PFA에서 30분 동안 고정한 후, 4°C에서 PBS 중 세척 단계를 거쳤다. 전체 망막을 실온에서 1 h 동안 PBS 중 10% 일반 당 나귀 혈청(NDS), 1% BSA, 0.5% Triton X-100으로 처리하였다. PBS 중 3% NDS, 1% BSA, 0.5% Triton X-100 내 모노클로날 래트 항-GFP 항체(Molecular Probes Inc.; 1:500) 및 폴리클로날 토끼 항-마우스 원뿔 어레스틴 (Cone Arrestin) 항체(Millipore: 1:200)로의 처리를 실온에서 5일 동안 수행하였다. 이차 당나귀 항-래트 Alexa Fluor-488 Ab(Molecular Probes Inc.; 1:200), 항-토끼 Alexa Fluor-633 및 Hoechst로의 처리를 2 hr 동안 수행하였다. 구획을 세척하고, 유리 슬라이드 상에서 ProLong Gold 안티페이드 시약(Molecular Probes Inc.)과 함께 실장하고, Zeiss LSM 700 Axio Imager Z2 레이저 주사 공초점 현미경(Carl Zeiss Inc.)을 사용하여 촬영하였다.

도면

도면1



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Friedrich Miescher Institute for Biomedical Research

<120> SynP198, a promoter for the specific expression of genes in
direction selective retinal ganglion cells

<130> PAT057494

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 426

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

ggttcattgt aagccactgt agtcgtgggt gactcacatc aaaccacccc ttcgggaaca 60

cgatgccgac actgaaacta cataggggag agcaataaaa actgtcttct ctagtttggg 120

gaaattggag cctgccttag ggaaacagtg actaatttac agctagtgtt tggaatgaga 180

tcatctgtca aaataaatgt atctttactt ccttcttgag aggaagcaag ctgttttatg 240

atgttccttg gaatccttaa aaatacagag caacatttac attattaatg atacgcttta 300

ttgctgcagg ctaactaggt ccaaaattgt ccttccatag atggagctgg agagttacac 360

agaagtttg atacgagct cttaggtctg catgtacagc taatgtactt gtggaccctg 420

tcacat 426

<210> 2

<211> 106

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 2

atcctcacat ggcctgctg gagttagtag agggatatata atggaagctc gacttccagc 60

tatcacatcc actgtgttgt tgtgaactgg aatccactat aggcca 106