(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0011939
(43) 공개일자 2025년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/705 (2006.01) *A61K 48/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C07K 14/47* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01) *C12N 15/90* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/705 (2013.01)
A61K 48/005 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2024-7041372
(22) 출원일자(국제) 2023년05월12일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2024년12월12일
(86) 국제출원번호 PCT/US2023/066969
(87) 국제공개번호 WO 2023/220742
국제공개일자 2023년11월16일
(30) 우선권주장
63/341,665 2022년05월13일 미국(US)
63/478,472 2023년01월04일 미국(US)

(71) 출원인
아시디엔 테라퓨틱스, 인크.
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80 폴쓰 플로어
(72) 발명자
크룸바흐 레베카
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
둘리 스콧
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인아주

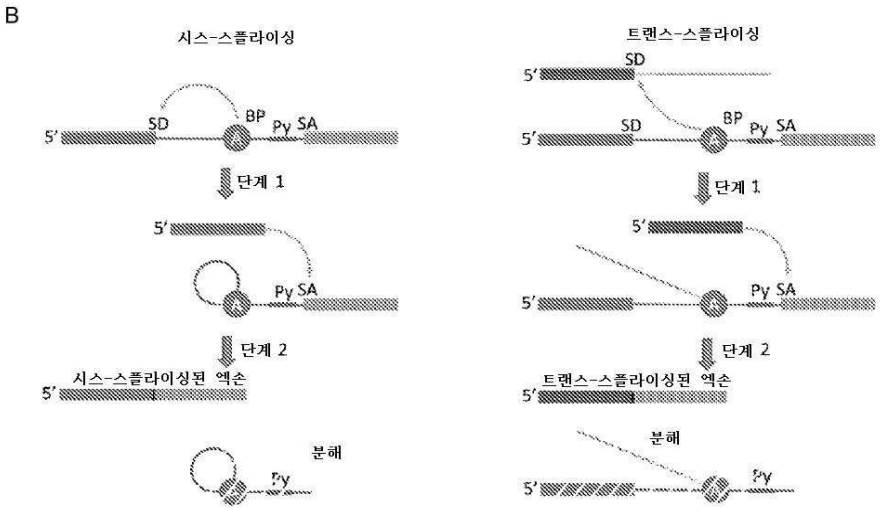
전체 청구항 수 : 총 94 항

(54) 발명의 명칭 **ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자**

(57) 요 약

본 명세서에는 ABCA4 유전자의 돌연변이를 교정할 수 있는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 프리-mRNA 트랜스-스플라이싱 분자(RTM); RNA 엑손 편집 분자)가 제공된다. 이러한 분자는 ABCA4-연관 망막 이영양증(예를 들어, 스타르가르트병 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증)과 같은 장애의 치료에 유용하다. 본 명세서에는 또한 ABCA4의 돌연변이를 교정하여 ABCA4의 돌연변이와 연관된 장애를 치료하기 위한 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 사용 방법 및 ABCA4의 돌연변이와 연관된 장애의 치료를 위한 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 용도 및 ABCA4의 돌연변이와 연관된 장애의 치료를 위한 의약의 제조에서의 용도가 기재된다.

대 표 도 - 도14b



(52) CPC특허분류
A61P 27/02 (2018.01)
C07K 14/4702 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 15/907 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2750/14145 (2013.01)
C12N 2750/14171 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/42 (2013.01)

(72) 발명자
도이 아키코
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
버크하트 커크
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
그레이 제시
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
펑 링타오
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
우 데니스
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
노마 아키코
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
고시크 커크
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
슬로모빅 쉬마인
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
클레멘스 애덤
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80
벨 로버트
미국 매사추세츠 (우편번호 02135) 보스턴 게스트 스트리트 80

명 세 서

청구범위

청구항 1

핵산 트랜스-스플라이싱 분자(nucleic acid trans-splicing molecule)로서,

(a) ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(coding domain sequence: CDS);

(b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 85% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 링커 도메인; 및

(c) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인

을 포함하되, 상기 CDS, 상기 링커 도메인 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 2

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS로서, 상기 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체는 표 3에 열거된 적어도 하나의 크립틱 스플라이스 부위 내에 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하고, 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 적어도 하나의 크립틱 스플라이스 부위 각각에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 감소시키는, 상기 CDS; 및

(b) 링커 도메인; 및

(c) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인

을 포함하되, 상기 CDS, 상기 링커 도메인 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 3

제2항에 있어서, 서열번호 55의 상기 변이체는 서열번호 56 내지 59 중 어느 하나를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 4

제3항에 있어서, 서열번호 55의 상기 변이체는 서열번호 56을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 도메인은 서열번호 27과 적어도 85% 동일성, 적어도 86% 동일성, 적어도 87% 동일성, 적어도 88% 동일성 또는 적어도 89% 동일성, 90% 동일성, 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 링커 도메인은 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 도메인은 상기 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론에 어닐링된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론은 인트론 22인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 결합 도메인은 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 12

제1항 및 제5항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 CDS는 ABCA4 엑손 1 내지 22 또는 이의 변이체를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 CDS는 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 14

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

(b) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 결합 도메인; 및

(c) ABCA4 엑손을 포함하는 CDS

를 포함하되; 상기 CDS, 상기 링커 도메인 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 CDS는 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 16

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

(b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

(c) 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 결합 도메인

을 포함하되, 상기 CDS, 상기 링커 도메인 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산

트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는 적어도 하나의 서열을 포함하는 증진제(potentiator)를 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 18

제17항에 있어서, 상기 증진제는 상기 링커 도메인의 3'에 작동 가능하게 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 19

제17항 또는 제18항에 있어서, 상기 증진제는 탠덤(tandem)으로 배열된 3개의 서열을 포함하고, 작동 가능하게 연결되되, 상기 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 20

제17항 내지 제19 중 어느 한 항에 있어서, 상기 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하되, 상기 3개의 서열은 서열번호 62를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 21

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 번역 증진제를 추가로 포함하되, 상기 번역 증진제는 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열은 상기 증진제의 3'에 작동 가능하게 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 22

제21항에 있어서, 상기 번역 증진제는 서열번호 63과 적어도 91% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 92% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 93% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 94% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 95% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 96% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 97% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 98% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 99% 동일성을 갖는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 23

제21항 또는 제22항에 있어서, 상기 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 24

제1항 내지 제23항 중 어느 한 항에 있어서, GTAAGT, GTAAGG, GTAAGC 또는 GTAACT 중 어느 하나를 포함하는 스플라이싱 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 25

제1항 내지 제24항 중 어느 한 항에 있어서, GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 스플라이싱 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 26

제1항 내지 제25항 중 어느 한 항에 있어서, 5' 미번역 영역을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 27

제26항에 있어서, 상기 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 28

제1항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 29

제28항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 상기 트랜스-스플라이싱 분자의 3' 단부를 보호하는 삼중 나선 구조를 형성하는 리보핵산을 암호화하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 30

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 야생형 MALAT1 서열(서열번호 33) 또는 서열번호 33과 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 33과 적어도 80% 동일성; 서열번호 33과 적어도 85% 동일성; 서열번호 33과 적어도 90% 동일성; 서열번호 33과 적어도 91% 동일성; 서열번호 33과 적어도 92% 동일성; 서열번호 33과 적어도 93% 동일성; 서열번호 33과 적어도 94% 동일성; 서열번호 33과 적어도 95% 동일성; 서열번호 33과 적어도 96% 동일성; 서열번호 33과 적어도 97% 동일성; 서열번호 33과 적어도 98% 동일성; 서열번호 33과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 33과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 32

제28항 또는 제29항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 33 또는 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 스플라이싱 도메인의 3'에 작동적으로 연결된 적어도 하나의 정지 코돈을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 34

제33항에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된,

(a) 5' 미번역 영역;

(b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

(c) 스플라이싱 도메인;

(d) 적어도 하나의 정지 코돈;

(e) 서열번호 27로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

(f) 적어도 하나의 증진제;

(g) 번역 증진제;

(h) 서열번호 18 또는 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

(i) 3' 전사 종결인자 도메인

을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 35

제34항에 있어서,

(a) 상기 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로

이루어지고;

(b) 상기 스플라이싱 도메인은 GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

(c) 상기 적어도 하나의 정지 코돈은 2개의 정지 코돈을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어되, 상기 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 상기 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고;

(d) 상기 적어도 하나의 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하고;

(e) 상기 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고; 그리고

(f) 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

청구항 36

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 5' 미번역 영역;

(b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

(c) 스플라이싱 도메인;

(d) 선택적으로, 적어도 하나의 정지 코돈;

(e) 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

(f) 적어도 하나의 증진제;

(g) 번역 증진제;

(h) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

(i) 3' 전사 종결인자 도메인

을 포함하되, 상기 5' 미번역 영역; 상기 CDS; 상기 스플라이싱 도메인; 존재하는 경우, 상기 적어도 하나의 정지 코돈; 상기 링커 도메인; 상기 적어도 하나의 증진제; 상기 번역 증진제; 상기 결합 도메인; 및 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 37

제36항에 있어서,

(a) 상기 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

(b) 상기 스플라이싱 도메인은 GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

(c) 상기 적어도 하나의 정지 코돈이 존재하고, 이것은 2개의 정지 코돈을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어되, 상기 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 상기 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고;

(d) 상기 적어도 하나의 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하고;

(e) 상기 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고; 그리고

(f) 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 38

핵산 트랜스-스플라이상 분자로서, 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된,

(a) 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 5' 미번역 영역;

(b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

(c) GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 스플라이싱 도메인;

(d) 2개의 정지 코돈으로서, 상기 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 상기 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고, 상기 2개의 정지 코돈과 조합된 상기 스플라이싱 도메인의 서열은 서열번호 68을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 상기 2개의 정지 코돈;

(e) 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

(f) 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제;

(g) 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제;

(h) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

(i) 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인

을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이상 분자.

청구항 39

제37항 또는 제38항에 있어서, 상기 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 69, 서열번호 78 또는 서열번호 90을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 40

제1항 내지 제20항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 70 또는 서열번호 71을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 41

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 40 내지 44, 46 또는 48 내지 50 중 어느 하나와 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 42

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로부터 전사된 리보핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 43

제1항 내지 제41항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 내인성 ABCA4 프리-mRNA는 ABCA4-연관 망막 이영양증(ABCA4-associated retinal dystrophy)과 연관된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 ABCA4-연관 망막 이영양증은 열성 유전되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 ABCA4-연관 망막 이영양증은 상기 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 있는 대립유전자 병원성 돌연변이 및 원뿔세포 막대세포 이영양증(Cone-Rod Dystrophy-3)(예를 들어, 원뿔세포 막대세포 이영양증-3), 스타르가르트 황반이영양증(Stargardt macular dystrophy)(예를 들어, 스타르가르트병-1), 황반 안저, 망막색소변성증-19(Retinitis Pigmentosa-19) 또는 노인성 황반 변성-2(Age-related Macular Degeneration-2)와 일치하는 표현형과 연관되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 46

제1항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 상기 내인성 ABCA4 프리-mRNA는 광수용체 세포 또는 망막 색소 상피 세포에서 발현되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 47

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는, 벡터.

청구항 48

제47항에 있어서, 상기 CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함하는, 벡터.

청구항 49

제48항에 있어서, 상기 5' 조절 도메인은 5' 미번역 영역에 작동적으로 연결된, 벡터.

청구항 50

제48항 또는 제49항에 있어서, 상기 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터를 포함하는, 벡터.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 구성적 프로모터는 CMV 프로모터인, 벡터.

청구항 52

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는, 프로바이러스 플라스미드.

청구항 53

아데노 연관 바이러스(adeno-associated virus: AAV)로서, 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하되, 상기 AAV는 상기 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 선택적으로 포함하는, AAV.

청구항 54

제53항에 있어서, 상기 AAV는 CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함하는, AAV.

청구항 55

제53항 또는 제54항에 있어서, 상기 5' 조절 도메인은 5' 미번역 영역에 작동적으로 연결된, AAV.

청구항 56

제53항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터를 포함하는, AAV.

청구항 57

제56항에 있어서, 상기 구성적 프로모터는 CMV 프로모터인, AAV.

청구항 58

제53항 내지 제57항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 광수용체 세포 및/또는 망막 색소 상피 세포를 우선적으로 표적으로 하는, AAV.

청구항 59

제53항 내지 제58항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 AAV는 AAV8, AAV5 또는 AAV2인, AAV.

청구항 60

제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드 또는 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV를 포함하는, 조성물.

청구항 61

제60항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 조성물.

청구항 62

표적 세포에서 생물학적으로 활성인 ABCA4를 발현시켜 상기 표적 세포에서 ABCA4 단백질의 기능 수준을 회복시키는 방법으로서, 상기 표적 세포에 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 형질도입시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 63

제62항에 있어서, 상기 표적 세포에서 상기 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 5%, 적어도 10% 또는 적어도 15%가 대체되는, 방법.

청구항 64

제63항에 있어서, 상기 표적 세포의 상기 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 20%가 대체되는, 방법.

청구항 65

제64항에 있어서, 상기 표적 세포에서 상기 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 35%가 대체되는, 방법.

청구항 66

제62항 내지 제65항 중 어느 한 항에 있어서, ABCA4의 기능 수준은 생물학적 기능을 갖는 전장 ABCA4 단백질을 발현시킴으로써 상기 표적 세포에서 회복되는, 방법.

청구항 67

대상체에서 ABCA4-연관 리포푸신 및/또는 A2E 축적을 감소시키는 방법으로서, 상기 대상체의 표적 망막 세포에 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 형질주입 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 68

대상체의 표적 세포에서 ABCA4 엑손 서열의 적어도 하나의 돌연변이를 교정하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 69

ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 망막 이영양증을 치료하는 방법으로서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 70

제67항 내지 제69항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체에게 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 망막하 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 71

제67항 내지 제70항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 비인간 영장류 또는 인간인, 방법.

청구항 72

제67항 내지 제71항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대상체는 ABCA4-연관 망막 이영양증으로 진단된, 방법.

청구항 73

ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 망막 이영양증의 치료에 사용하기 위한, 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물.

청구항 74

ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 상기 망막 이영양증의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 제1항 내지 제46항 중 어느 한 항의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 제47항 내지 제51항 중 어느 한 항의 벡터, 제52항의 프로바이러스 플라스미드, 제53항 내지 제59항 중 어느 한 항의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물.

청구항 75

제67항 내지 제72항 중 어느 한 항의 방법 또는 제73항 또는 제74항의 용도로서, 상기 ABCA4-연관 망막 이영양증은 상기 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 있는 대립유전자 병원성 돌연변이 및 원뿔세포 막대세포 이영양증, 스타르가르트 황반이영양증 또는 황반 안저와 일치하는 표현형과 연관되는, 방법 또는 용도.

청구항 76

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

(b) 선택적으로, 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

(c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

를 포함하되, 상기 링커 도메인; 존재하는 경우, 상기 증진제 및 존재하는 경우, 상기 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 77

제76항에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

상기 링커 도메인; 존재하는 경우, 상기 증진제; 존재하는 경우, 상기 번역 증진제; 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 78

제76항 또는 제77항에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

상기 CDS; 상기 링커 도메인; 존재하는 경우 상기 증진제; 존재하는 경우 상기 번역 증진제; 및 존재하는 경우 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 79

5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 GGTAAGT 또는 서열번호 61과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 중 적어도 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로

이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

(b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

(c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

를 포함하되, 존재하는 경우 상기 링커 도메인; 상기 증진제; 및 존재하는 경우 상기 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 80

5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 62 또는 서열번호 62와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

(b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

(c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

를 포함하되, 존재하는 경우 상기 링커 도메인; 상기 증진제; 및 존재하는 경우 상기 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 81

제79항 또는 제80항에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

존재하는 경우 상기 링커 도메인; 상기 증진제; 존재하는 경우, 상기 번역 증진제; 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 82

제79항 내지 제81항 중 어느 한 항에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

상기 CDS; 존재하는 경우 상기 링커 도메인; 상기 증진제; 존재하는 경우 상기 번역 증진제; 및 존재하는 경우 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 83

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제;

(b) 선택적으로, 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

(c) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인

을 포함하되; 존재하는 경우 상기 링커 도메인; 존재하는 경우 상기 증진제; 및 상기 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 84

제83항에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

존재하는 경우 상기 링커 도메인; 존재하는 경우 상기 증진제; 상기 번역 증진제; 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 85

제83항 또는 제84항에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

상기 CDS; 존재하는 경우 상기 링커 도메인; 존재하는 경우 상기 증진제; 상기 번역 증진제; 및 존재하는 경우 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 86

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

링커 도메인 및 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 상기 카세트는 서열번호 72를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 87

제86항에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

상기 카세트 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 88

제86항 또는 제87항에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

상기 CDS; 상기 카세트; 및 존재하는 경우 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 89

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

링커 도메인, 증진제 및 번역 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 상기 카세트는 서열번호 73을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 90

제89항에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

상기 카세트 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 91

제89항 또는 제90항에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

상기 CDS; 상기 카세트; 및 존재하는 경우 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 92

핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

(a) 서열번호 66 또는 서열번호 66과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 93

제92항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66과 적어도 96% 동일성; 서열번호 66과 적어도 97% 동일성; 서열번호 66과 적어도 98% 동일성; 서열번호 66과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 66과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

청구항 94

제92항 또는 제93항에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **상호참조**

[0002] 본 출원은 미국 특허 가출원 제63/341,665호(출원일: 2022년 5월 13일) 및 미국 특허 가출원 제63/478,472호(출원일: 2023년 1월 4일)의 이익을 주장하며, 이들 각각은 이들의 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0003] **서열 목록**

[0004] 본 출원은 XML 양식으로 전자 제출되고 이에 의해 전문이 참조에 의해 포함되는 서열 목록을 포함한다. 2023년 5월 10자로 작성된 상기 XML 사본은 파일명이 61313-703_601_SL.xml이고, 크기가 1,315,456바이트이다.

[0005] **기술분야**

[0006] ABCA4(ATP-결합 카세트, 서브패밀리 A, 구성원 4)에서 돌연변이를 교정하기 위한 트랜스-스플라이싱(trans-splicing) 분자와 관련된 조성물, 방법 및 용도가 본 명세서에 기재된다.

배 경 기 술

[0007] ABCA4의 열성 유전 돌연변이는 스타가르트병(Stargardt disease) 및 원뿔세포 막대세포 이영양증(cone-rod dystrophy)을 포함한 진행성 실명의 발병 원인이 된다. 광수용체 세포 외측 분절 디스크 막의 가장자리 영역을 따라 국지화된, ABCA4는 디스크 막의 루멘에서 세포질 리플렛으로 N-레티닐리덴-포스파티딜에탄올아민(N-Ret-PE)의 수송체(또는 "플리파제")로 기능한다. 결함이 있는 ABCA4 단백질은 독성 레티노이드 화합물의 축적으로 이어지고 궁극적으로 광수용체 및 망막 색소 상피 세포 사망으로 이어진다. ABCA4의 6882-bp 암호 서열은 단일 AAV 벡터에 의해서 이의 전체를 전달하기에는 너무 크다. 더욱이 유전자 전체에서 수백 개의 질환 유발 돌연변이가 발견되면서, 단일 염기 편집 접근 방식으로는 상당수의 환자를 다룰 수는 없다. 따라서 ABCA4 유전자의 돌연변이를 교정하기 위한 대체 전략에 대한 필요성이 당업계에 존재한다.

발명의 내용

[0008] 스타가르트병과 같은 *ABCA4*-관련 망막병증은 성인 및 어린이 모두에게 영향을 미치는 심각한 희귀 유전성 망막 질환으로, *ABCA4* 유전자의 이대립유전자 병원성 돌연변이로 인해 발생한다. 스타가르트병의 추정 유병률은 전 세계적으로 8 내지 10,000명 중 1명이며, 망막 이영양증(retinal dystrophy)의 대략 7%를 차지한다. *ABCA4*는 상염색체 열성 스타가르트병을 담당하는 유전자로 특징규명되었지만, 여러 다른 망막 표현형도 *ABCA4* 돌연변이와 연관된다. 실제로, *ABCA4*-관련 망막병증은 멘델 유전으로 인한 망막 변성의 가장 흔한 원인으로 간주된다. *ABCA4*-관련 망막병증이 있는 개체는 전형적으로 생후 20년 이내에 진단을 받고 특정 돌연변이의 심각도에 따라 성인이 될 때까지 중심 시야를 완전히 잃을 수 있다.

[0009] 현재 *ABCA4*-관련 망막증에 대해 승인된 치료법은 존재하지 않는다. 따라서, 기능 상실 *ABCA4* 돌연변이의 영향을 받는 성인 및 어린이 모두를 위한 질환 변형 요법을 개발해야 할 충족되지 않은 상당한 의학적 요구가 있다.

[0010] 광범위한 연구를 통해, 본 발명자들은 핵산 트랜스-스플라이싱 분자에 부여하는 핵산 요소를 식별하였으며, 이 분자는 예를 들어, 트랜스-스플라이싱 효율 및 이에 의해 생산된 트랜스-스플라이싱 단백질 수준을 증가시키는 것과 연관된 기술적 과제를 해결하는 특성을 통합한다. 따라서 식별된 요소를 핵산 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, RNA 트랜스-스플라이싱 분자)에 포함시키면 과거의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 구현과 연관된 문제에 대한 다양한 해결책이 제공되며, 여기에는 트랜스-스플라이싱 효율이 낮은 것과 관련된 문제가 포함된다. 따라서, 본 발명자들은 유전자 돌연변이와 연관된 질환에서 치료적 개입을 위한 옵션을 제공하는 오랜 목적을 달성하는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 설계하였으며, 이를 통해 RNA 수준에서 유전자 돌연변이를 교정하면 환자에게 상당한 이점을 제공할 수 있다. 유전자 돌연변이와 연관된 질환을 앓고 있는 많은 환자는 치료 옵션이 거의 없거나 전혀 없으므로 충족되지 않은 요구 사항이 대부분이다. 예를 들어 *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 진행성 형태의 실명 환자는 충족되지 않은 요구 사항이 있는 환자 집단을 나타낸다.

[0011] 이러한 충족되지 않은 요구 사항을 해결하기 위해서, 엑손 편집이라고도 하는 트랜스-스플라이싱 해결책이 본 명세서에 기재되어 있으며, 이는 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 내인성 ABCA4 프리(pre)-mRNA로 트랜스-스플라이싱하도록 설계된 RNA 엑손 편집기(exon editor)를 암호화하는 치료용 핵산 트랜스-스플라이싱 작제물을

전달하는 것을 포함하며, 여기서 트랜스-스플라이싱은 내인성 ABCA4 프리-mRNA의 엑손(적어도 하나의 엑손이 적어도 하나의 돌연변이를 포함함)을 기능적(예를 들어, 야생형) 아미노산 서열을 암호화하는 치료용 RNA 엑손 편집기의 엑손으로 대체하여 내인성 ABCA4 프리-mRNA의 적어도 하나의 돌연변이를 교정한다. 일부 실시형태에서, RNA 엑손 편집기는 세포에 직접 전달될 수 있다. 용어 "핵산 트랜스-스플라이싱 분자", "RNA 엑손 에디팅 분자", "RNA 엑손 편집기", "엑손 편집기" 및 "RNA 트랜스-스플라이싱 작제물"은 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0012] 일부 실시형태에서, 본 명세서에는 (a) ABCA4 엑손을 포함하는 서열(CDS); (b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 링커 도메인; 및 (c) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 포함하는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자가 기재되며, CDS, 링커 도메인 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된다. 또한, *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하기 위한 이의 용도 및 *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 이의 용도뿐만 아니라 *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하는 방법이 또한 본 명세서에 기재된다.

[0013] 일부 실시형태에서, (a) 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS로서, 상기 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체는 표 3에 열거된 적어도 하나의 크립틱(cryptic) 스플라이스 부위 내에 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하고, 상기 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 적어도 하나의 크립틱 스플라이스 부위 각각에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 감소시키는, 상기 CDS; 및 (b) 선택적으로, 링커 도메인; 및 (c) 선택적으로, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 포함하는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자가 본 명세서에 기재되며, CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 변이체는 서열번호 56 내지 59 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 55의 변이체는 서열번호 56을 포함한다. 또한, *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하기 위한 이의 용도 및 *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하기 위한 의약의 제조에서의 이의 용도뿐만 아니라 *ABCA4*의 돌연변이와 연관된 망막병증을 치료하는 방법이 또한 본 명세서에 기재된다.

[0014] 일 양상에서, 본 명세서에는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자(또는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 함유하거나 암호화하는 벡터)가 제공되며, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, (a) 예를 들어, 천연 5' ABCA4 미번역 영역을 포함하는 5' 조절 도메인; (b) 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 포함하는 CDS; (c) 트랜스-스플라이싱을 매개하도록 구성된 스플라이싱 도메인; 및 (d) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 결합하도록 구성된 결합 도메인을 포함하고, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS를 내인성 ABCA4으로 트랜스-스플라이싱하여, 내인성 5' ABCA4 엑손 서열을 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열로 대체하도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터, 예를 들어, CMV/CMV 프로모터(CMV 인핸서 및 프로모터) 또는 이의 변이체를 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 천연 5' ABCA4 미번역 영역은 서열번호 12 또는 13과 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 12 또는 13과 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 서열번호 14 또는 15와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 14 또는 15와 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0015] 일부 실시형태에서, 결합 부위는 ABCA4 인트론 22 내에 존재한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개 이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1160 내지 1309 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1160 내지 1309 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개 이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 16 내의 결합 부위와 적어도 80% 서열 동일성

(예를 들어, 서열번호 16 내의 결합 부위와 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18을 포함한다.

[0016] 일부 실시형태에서, 스플라이싱 도메인은 GTAAGT, GUAAGT, GTAAGG, GUAAGG, GTAAGC, GUAAGC, GTAACT 또는 GUAACU를 포함한다.

[0017] 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 링커 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커 도메인은 25개 초과의 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 25 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 35 내지 45개 뉴클레오타이드 길이 또는 약 40개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 40량체 링커))이다. 일부 예에서, 링커 도메인은 CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTTGGGGGCATGTAC(서열번호 27)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 CCGAATACGACACGTACAAGATCT(서열번호 29)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG(서열번호 31)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다.

[0018] 또 다른 양상에서, 핵산 트랜스-스플라이상 분자가 제공되며, 이것은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, (a) 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 포함하는 CDS; (b) 트랜스-스플라이싱을 매개하도록 구성된 스플라이싱 도메인으로서, 스플라이싱 도메인은 GTAAGT, GUAAGT, GTAAGG, GUAAGG, GTAAGC, GUAAGC, GTAACT 또는 GUAACU를 포함하는, 스플라이싱 도메인; 및 (c) 내인성 ABCA4 인트론 22 내의 결합 부위에 결합하도록 구성된 결합 도메인을 포함하되, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS를 내인성 ABCA4 엑손 23으로 트랜스-스플라이싱하여, 내인성 5' ABCA4 엑손 서열을 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열로 대체하도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 천연 5' ABCA4 미번역 영역, 예를 들어, 서열번호 12 또는 13과 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 12 또는 13과 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 천연 5' ABCA4 미번역 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터를 추가로 포함한다.

[0019] 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 링커 도메인을 추가로 포함한다. 일부 실시형태에서, 링커 도메인은 25개 초과의 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 25 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 35 내지 45개 뉴클레오타이드 길이 또는 약 40개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 40량체 링커))이다. 일부 예에서, 링커 도메인은 CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTTGGGGGCATGTAC(서열번호 27)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 CCGAATACGACACGTACAAGATCT(서열번호 29)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG(서열번호 31)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동

일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다.

[0020] 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개 이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1160 내지 1309 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1160 내지 1309 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개 이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 17 또는 18와 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18을 포함한다.

[0021] 또 다른 양상에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자가 제공되며, 이것은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, (a) 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 포함하는 CDS; (b) 트랜스-스플라이싱을 매개하도록 구성된 스플라이싱 도메인; (c) 25 내지 50개 뉴클레오타이드 길이의 링커 도메인; 및 (d) 내인성 ABCA4 인트론 22 내의 결합 부위에 결합하도록 구성된 결합 도메인을 포함하되, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS를 내인성 ABCA4 엑손 23으로 트랜스-스플라이싱하여, 내인성 5' ABCA4 엑손 서열을 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열로 대체하도록 구성된다. 일부 실시형태에서, 링커 도메인은 35 내지 45개 뉴클레오타이드 길이 또는 약 40개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 40량체 링커)이다. 일부 예에서, 링커 도메인은 CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTTGGGGGCATGTAC(서열번호 27)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 CCGAATACGACACGTACAAGATCT(서열번호 29)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다. 다른 예에서, 링커 도메인은 GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG(서열번호 31)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열이거나 이를 포함한다.

[0022] 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 천연 5' ABCA4 미번역 영역, 예를 들어, 서열번호 12 또는 13과 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 12 또는 13과 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 천연 5' ABCA4 미번역 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터, 예를 들어, CMV/CMV 프로모터를 추가로 포함한다.

[0023] 일부 실시형태에서, 스플라이싱 도메인은 GTAAGT, GUAAGT, GTAAGG, GUAAGG, GTAAGC, GUAAGC, GTAACT 또는 GUAACU를 포함한다.

[0024] 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개 이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위는 뉴클레오타이드 서열번호 16의 1160 내지 1309 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1160 내지 1309 중 임의의 6개 이상, 임의의 8개 이상, 임의의 10개 이상, 임의의 12개

이상, 임의의 18개 이상, 임의의 20개 이상, 임의의 24개 이상, 임의의 50개 이상, 임의의 100개 이상 또는 임의의 150개 이상(예를 들어, 150개))을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 부위에 결합하는 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 17 또는 18와 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 17 또는 18을 포함한다.

[0025] 상기 양상 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 3' 전사 종결인자 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 전사 종결인자 도메인은 트랜스-스플라이싱 분자의 3' 단부를 효과적으로 캡핑하는 삼중 나선 구조를 형성한다. 일부 실시형태에서, 3' 전사 종결인자 도메인은 야생형 MALAT1 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 32 또는 33과 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 32 또는 33과 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0026] 상기 양상 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, CDS는 ABCA4 엑손 1 내지 22 또는 이의 변이체(예를 들어, 이의 코돈 최적화된 변이체)를 포함한다.

[0027] 상기 양상 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 40 내지 50 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 40 내지 50 중 어느 하나와 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0028] 상기 양상 중 임의의 것의 일부 실시형태에서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA는 ABCA4-연관 망막 이영양증(예를 들어, 열성 유전 ABCA4-연관 망막 이영양증, 예를 들어, 스타르가르트병 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증)과 연관된 적어도 하나의 돌연변이를 갖는다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 광수용체 세포 및/또는 망막 색소 상피 세포에서 발현된다.

[0029] 또 다른 양상에서, 핵산 트랜스-스플라이상 분자가 기재되며, 이것은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, (a) 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 포함하는 CDS; (b) 트랜스-스플라이싱을 매개하도록 구성된 스플라이싱 도메인; 및 (c) 서열번호 17-24 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 결합 도메인을 포함하되, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS를 내인성 ABCA4 엑손 23으로 트랜스-스플라이싱하여, 내인성 5' ABCA4 엑손 서열을 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열로 대체하도록 구성된다.

[0030] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 서열번호 18을 포함하는 단리된 DNA 분자 또는 이의 벡터가 제공된다.

[0031] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 서열번호 17을 포함하는 단리된 RNA 분자 또는 이의 벡터가 제공된다.

[0032] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 단리된 핵산(예를 들어, DNA 또는 RNA), 예를 들어, 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 벡터가 제공된다.

[0033] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 프로바이러스 플라스미드가 제공된다.

[0034] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 서열을 포함하는 아데노 연관 바이러스 (AAV)가 제공된다. 일부 실시형태에서, AAV는 광수용체 세포 및/또는 망막 색소 상피 세포를 우선적으로 표적으로 한다. 일부 실시형태에서, AAV는 AAV8, AAV5 또는 AAV2이다.

[0035] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스

플라이싱 분자, 벡터, 프로바이러스 플라스미드 또는 AAV를 포함하는 조성물이 제공된다. 일부 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함한다.

[0036] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 표적 세포(예를 들어, 시험관내 또는 생체내)에서 기능적 ABCA4를 발현시키는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 세포에 상기 양상 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터, AAV 또는 조성물을 형질도입시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 세포에서(예를 들어, 트랜스-스플라이싱된 RNA의 번역으로부터 생성된 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 RNA 또는 상응하는 단백질에 의해 측정되는 경우, 예를 들어, 배양된 인간 세포에서)의 표적 ABCA4 mRNA의 20% 이상을 대체한다. 일부 실시형태에서, 방법은 표적 세포에서(예를 들어, 트랜스-스플라이싱된 RNA의 번역으로부터 생성된 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 RNA 또는 상응하는 단백질에 의해 측정되는 경우, 예를 들어, 배양된 인간 세포에서)의 표적 ABCA4 mRNA의 38% 이상을 대체한다. 일부 실시형태에서, 기능적 ABCA4(트랜스-스플라이싱된 RNA의 번역으로부터 생성된 상응하는 단백질)는 전장 ABCA4 단백질이다.

[0037] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예를 들어, 인간)에서 ABCA4 망막병증-연관된 리포푸신 및/또는 A2E 축적을 감소시키는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에서 표적 망막 세포주에 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터, AAV 또는 조성물을 형질도입시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 비-인간 영장류 또는 인간(예를 들어, ABCA4-연관 망막 이영양증으로 진단된 인간)이다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터 또는 AAV는 안구 투여(예를 들어, 망막하 투여)에 의해서 대상체에게 투여된다.

[0038] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예를 들어, 인간)의 표적 세포의 5' ABCA4 엑손 서열에서 적어도 하나의 돌연변이를 교정하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터, 조성물 또는 AAV를 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 대상체는 비-인간 영장류 또는 인간(예를 들어, ABCA4-연관 망막 이영양증으로 진단된 인간)이다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터 또는 AAV는 안구 투여(예를 들어, 망막하 투여)에 의해서 대상체에게 투여된다.

[0039] 또 다른 양상에서, 본 명세서에는 대상체(예를 들어, 포유동물, 예를 들어, 영장류, 예를 들어, 인간)에서 ABCA4-연관 망막 이영양증을 치료하는 방법이 제공된다. 일부 실시형태에서, 방법은 대상체에게 상기 실시형태 중 임의의 것 또는 상기 양상 중 임의의 것의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터, AAV 또는 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 5' ABCA4 엑손 서열의 돌연변이(예를 들어, ABCA4 엑손 1 내지 22의 임의의 하나의 이상의 돌연변이)와 연관된다. 일부 실시형태에서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 스타르가르트병 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증이다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 스플라이스 도메인(SS), 링커 및 결합 도메인(BD)의 다양한 순열을 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자에 걸친 트랜스-스플라이싱 효율을 나타낸 그래프이다.

도 2는 다양한 스플라이스 도메인 서열을 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자에 걸친 트랜스-스플라이싱 효율을 나타낸 그래프이다.

도 3A 및 도 3B는 배양된 인간 세포에서 AAV에 의해 형질도입된 다양한 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 트랜스-스플라이싱 효율을 나타낸다. 도 3A는 RT-qPCR에 의한 결과를 나타낸다. 도 3B 및 도 3C는 웨스턴 블롯에 의한 결과를 나타낸다. 도 3D는 도 3C의 결과를 정량화한 그래프이다.

도 4는 VP1, VP2 및 VP3 밴드를 나타내는 트랜스-스플라이싱 분자의 AAV8 제제의 웨스턴 블롯이다.

도 5A 내지 도 5C는 망막하 주사 후 아프리카 녹색 원숭이(AGM) 비인간 영장류(NHP)에서 생체내 GFP 트랜스-스플라이싱 분자에 의한 GFP 단백질 발현을 나타낸다. 도 5A는 GFP 단백질을 나타낸 라이브 영상이다. 도 5B는 제28일에 음성 대조군에서 망막 절편(감광세포와 맥락막이 표지됨)의 항-GFP 면역조직화학(IHC) 염색을 나타낸 현미경 사진이다. 도 5C는 제28일에 GFP 트랜스-스플라이싱 분자-처리된 동물에서 망막 절편(감광세포와 맥락막이 표지됨)의 항-GFP IHC 염색을 나타낸 현미경 사진이다.

도 6은 기준선, 망막하 주사 후 제14일 및 제28일에 cSLO 및 OCT 영상 세트이다. 수포는 "주사 후" 패널에 표지되어 있다.

도 7은 제28일에 비히클, 엑손 편집기 443 및 엑손 편집기 274로 처리된 NHP 눈의 컬러 안저 영상 세트(정방도, 후방도, 상부도 및 하부도)이다.

도 8A는 트랜스-스플라이싱 분자에 대한 RT-qPCR 검사 방법론을 나타낸 개략도이다. 5' 태그를 갖는 트랜스-스플라이싱 분자(엑손 편집기 RNA)는 AGM 프리-mRNA로 트랜스-스플라이싱하고, 편집된(예를 들어, 트랜스-스플라이싱된) 전장 mRNA는 그 결과의 고유한 서열에 의해 정량화된다. 도 8B는 엑손 편집기 443, 274, 497 및 505에 대한 정량적 RT-qPCR 결과를 나타낸다. 도시된 바와 같이, 편집된 카피 수/10ng RNA를 정량화하여 결정되는 경우 엑손 편집기 443, 274, 497 및 505는 각각 생체내에서 AGM 망막에서 내인성 AGM 프리-mRNA와 통계적으로 유의미한 빈도로 트랜스-스플라이싱한다.

도 9는 AGM 망막에서 AGM 프리-mRNA로 엑손 편집기 443, 274, 497 및 505가 트랜스-스플라이싱되어 생성된 전장 키메라(인간/AGM) ABCA4 단백질을 나타낸 웨스턴 블롯이다. 단백질 태그는 망막의 막 추출물에서 검출되었다.

도 10A 및 도 10B는 인간 및 AGM ABCA4 단백질의 고유한 펩타이드를 검출한 질량 분석 결과이다. 도 10A는 음성 대조군(비히클 처리) 망막 조직에 대한 결과를 나타낸다. 위쪽 행은 인간 단백질 스파이크가 나타나야 하는 곳에 스파이크가 없는 대조군 샘플을 나타내고; 두 번째 행은 인간 단백질 스파이크가 나타날 곳을 나타내기 위해 표준 물질로 스파이킹된 대조군 샘플을 나타내고; 세 번째 행은 AGM 단백질을 나타내는 스파이크를 포함하는 대조군 샘플을 나타내고; 아래쪽 행은 AGM 단백질 스파이크를 포함하는 표준 물질로 스파이킹된 샘플을 나타낸다. 도 10B는 인간과 AGM 펩타이드가 모두 검출된 엑손 편집기 처리 망막 조직에 대한 결과를 나타낸다. 위쪽 행은 인간 펩타이드 스파이크를 나타내는 대조군 샘플을 나타내는데, 이는 인간/AGM 키메라 단백질의 존재를 반영하고(도 10A에 표시된 음성 대조군과 대조적임); 두 번째 행은 표준 물질로 스파이킹된 대조군 샘플을 나타내고; 세 번째 행은 AGM 단백질을 나타내는 스파이크를 포함하는 대조군 샘플을 나타내고; 아래쪽 행은 AGM 단백질 스파이크를 포함하는 표준 물질로 스파이킹된 샘플을 나타낸다.

도 11A 내지 도 11F는 망막하 투여된 AAV8 엑손 편집기 또는 비히클로 처리한 후 AGM의 눈 건강을 나타낸 막대 그래프이다. 데이터는 비히클의 평균 및 엑손 편집기의 평균 443, 274, 497 및 505 +/- 표준 편차로 표시된다. 도 11A는 기준선, 제14일 및 제28일의 망막 두께를 나타낸다. 도 11B는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 안압계에 의한 안구 내압을 나타낸다. 도 11C 내지 도 11F는 눈 염증의 지표에 대한 결과를 나타낸다. 도 11C는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 총 임상 점수를 나타내고; 도 11D는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 유리체 세포 점수를 나타내고; 도 11E는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 수성 세포 점수를 나타내고; 도 11F는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 염증성 각막 입자를 나타낸다.

도 12A 및 도 12B는 망막하 투여된 AAV8 엑손 편집기 또는 비히클로 처리한 후 AGM의 일반 건강 지표에 대한 결과를 나타낸다. 도 12A는 기준선, 제7일, 제14일, 제21일 및 제28일의 체중 측정치를 나타낸다. 도 12B는 기준선 및 제28일의 심박수(분당 박동수(bpm))를 나타낸다.

도 13은 엑손 에디터의 인간 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22를 내인성 ABCA4 프리-mRNA 전사체의 엑손 23 내지 50으로 트랜스-스플라이싱하도록 설계된 예시적인 RNA 엑손 편집기의 요소를 도시한다. 예시적인 엑손 편집기는 ABCA4의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 있는 돌연변이를 보유하는 대상체를 치료하도록 설계되었다. 숫자 태그는 다음과 같다: 1: ABCA4 RNA 엑손 편집기의 AAV 패키징을 위한 AAV2-기반 역위 말단 반복 서열(ITR); 2: 사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터(CMV 극초기 인핸서 및 CMV 극초기 프로모터)는 광수용체 세포에서 ABCA4 RNA 엑손 편집기 발현을 구동함; 3: 인간 ABCA4 mRNA로부터의 천연 5' 미번역 영역(UTR)은 천연 5' 조절을 유지함; 4: 동의어 코돈 변화를 포함하는 ABCA4 엑손 1 내지 21은 트랜스-스플라이싱을 통해 상응하는 내인성 암호 서열을 대체함. 동의어 코돈 변화를 사용하여, 예를 들어, 크립틱 스플라이스 수용체 부위를 제거하여 잠재적인 대체 스플라이싱 반응을 완화시킬 수 있음; 5: 서열-기반 정량화가 가능한 동의어 코돈 변경을 포함하는 ABCA4 엑손 22; 6: 스플라이스 공여체(본 명세서에서 스플라이싱 도메인이라고도 함)는 엑손 22를 포함하는 ABCA4 RNA 엑손 편집기 암호 도메인 서열(CDS)을 갖는 서열 상부에서 내인성 ABCA4 프리-mRNA의 대체로 이어지는 내인성 ABCA4 인트론 22 스플라이스 수용체 부위로 트랜스-스플라이싱함; 7: 정지 코돈(이중 정지)은 엑손 22 하류의 ABCA4 엑손 편집기에서 아미노산의 번역을 감소/방지함(예를 들어, 링커, 3x U1, ARE, BD 도메인 영역). 8: 링커는 스플라이스 도메인 부위에 구조적 유연성과 접근성을 제공함. 9: U1 snRNP와 연관될 것으로 예측되고 본 명세서에서 ABCA4 RNA 엑손 편집기 매개 활성을 강화하는 것으로 입증된 3개의 탠덤 U1 결합 부위(3x U1). 10: 세포질로 유입되는 스플라이싱되지 않은 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 안정성을 감소시키는 것으로 입증된 AU-풍부 요소(ARE). 11: 결합 도메인(BD)은 서열 상보성을 통해 ABCA4 RNA 엑손 편집기가 내인성 ABCA4 프리-mRNA 인트론 22를 표적으로 하도록 매개함. 12: MALAT1 종결인자는 효율적인 트랜스-스플라이싱을 촉진함. 13: 엑손 편집기 카세트의

AAV 패키징을 위한 AAV2-기반 ITR. 도시된 예시적인 RNA 엑손 편집기에 상응하는 예시적인 서열은 서열번호 90(ABCA4-01)에 제시되어 있음. 서열번호 90은 서열번호 82의 뉴클레오타이드 4284 내지 9073에 상응한다. 서열번호 90은 서열번호 78(5' UTR에서 항-mut1을 포함하는 MALAT1-Masc RNA 단부에 걸쳐 있음)과 서열번호 69(5' UTR 내의 ATG에서 항-mut1을 포함하는 MALAT1-Masc RNA 단부에 걸쳐 있음)를 포함한다. 서열번호 82는 서열번호 90을 암호화한다.

도 14A 및 도 14B는 RNA 트랜스-스플라이싱 및 시스-스플라이싱 반응을 나타낸다. (A) 트랜스-스플라이싱을 통한 엑손 편집의 일반적인 메커니즘이 ABCA4 RNA 엑손 편집기와 관련하여 제시된 RNA 트랜스-스플라이싱 반응 개략도를 나타낸다. 대표적인 ABCA4 엑손 편집기 RNA가 표적 ABCA4 프리-mRNA 위에 도시되어 있다. 인트론 22에 상보적인 결합 도메인(BD)은 엑손 편집기를 프리-mRNA와 회합시키고 스플라이소좀 매개 트랜스-스플라이싱 반응이 엑손 편집기의 스플라이스 공여체(SD) 부위(또는 스플라이싱 도메인)와 천연 인트론 22 스플라이스 수용체(SA) 부위 사이에서 발생하도록 하여 표적 프리-mRNA의 상류 영역이 엑손 편집기가 제공하는 암호 서열(CDS)로 대체되도록 한다. 프리-mRNA 분자는 계속해서 공통 시스-스플라이싱 과정을 거쳐 임의의 남아 있는 하류 인트론을 제거하여 성숙한 mRNA를 만들고, 이 mRNA는 번역을 거쳐 기능적(생물학적으로 활성인) ABCA4 단백질을 형성할 수 있다. 내인성 프리-mRNA 도면의 적색 "x" 돌연변이는 단일 프리-mRNA 전사체의 ABCA4 유전자에 존재하는 대표적인 개별 대립유전자 돌연변이를 나타낸다. SD 및 SA 부위는 적색 화살표로 표시되어 있다. 트랜스-스플라이싱을 통해 형성된 엑손-엑손 접합부는 적색으로 둘러싸여 있다. (B) RNA 시스 및 트랜스-스플라이싱 메커니즘을 나타낸다. RNA 시스- 및 트랜스-스플라이싱은 모두 내인성 스플라이소좀에 의존하여 스플라이싱을 매개하고 폴리피리미딘 트랙(Py)의 상류에 있는 분기점(BP)과 SD 부위의 첫 번째 뉴클레오타이드 사이에 공유 결합 형성으로 시작한다. 시스-스플라이싱 동안 라리아트가 형성되고, 트랜스-스플라이싱 동안 Y-가지가 형성된다. 다음으로, 스플라이소좀은 하류 엑손에 대한 상류 엑손의 연결을 매개하는데 그 동안 라리아트 및 Y-가지 분자가 빠르게 분해된다.

도 15는 개별 RNA 엑손 편집기 활성 RT-qPCR 분석의 개략도를 나타낸다. RNA 엑손 편집기로 처리한 세포 또는 조직에서 RNA를 추출한 후, RNA를 역전사하여 qPCR 또는 ddPCR에 적용한다. 개략도에서, RNA 엑손 편집기 RNA 카피 수는 자색 정방향 프라이머(1로 표시)와 녹색 역방향 프라이머(2로 표시)를 사용하여 측정한다. 천연 ABCA4 RNA는 청색 정방향(3으로 표시) 및 역방향(4로 표시) 프라이머 쌍을 사용하여 구체적으로 정량화할 수 있다. ABCA4 RNA 엑손 편집기의 말단 엑손 22에서 동의어 코돈 변화로 인해 청색 정방향 프라이머(3으로 표시)는 이 위치와 상보성이 낮아 자색 정방향 프라이머(1로 표시)로 대체하여 대신 엑손 편집된 ONT RNA 생성물을 정량화한다. 자색 정방향(1로 표시) 및 역방향(5로 표시) 프라이머 쌍은 RNA 엑손 편집기, ONT 및 OFT RNA 분자를 함께 정량화하는 데 사용된다.

도 16은 예시적인 ABCA4 엑손 편집기의 스크리닝 및 식별을 나타낸다. NGS 라이브러리 기반 접근 방식(위)과 단일 엑손 편집기 생물발광 기반 접근 방식(아래)이 모두 적용되어 BD117을 ABCA4 유전자 인트론 22에서 엑손 편집기를 지시하는 예시적인 위치로 식별하였다.

도 17A 및 도 17B는 40량체 링커가 LinkD 링커보다 훨씬 더 성능이 뛰어나다는 것을 나타낸다. (A) 표시된 각각의 작제물 또는 형질주입되지 않은 음성 대조군에 대한 ABCA4 RNA의 대체 백분율을 나타내는 히스토그램을 제공한다. 40량체 링커를 포함하는 엑손 편집기는 전구체 링커(LinkD)를 포함하는 엑손 편집기와 비교하여 ABCA4 RNA의 대체 백분율이 극적이고 통계적으로 유의미하게 증가하였다. (B) 표적내(on-target: ONT) 트랜스-스플라이싱된 RNA에서 번역된 단백질 수준이 극적으로 더 높다는 것에 의해서 반영되는, 40량체 링커가 LinkD 링커에 비해 더 높은 트랜스-스플라이싱 활성을 촉진한다는 것을 나타낸 웨스턴 블롯을 나타낸다. 돌연변이체 ABCA4 mRNA를 과발현하도록 설계된 HEK293T 17+06 세포를 사용한 형질주입 실험에서, 40량체 링커를 포함하는 엑손 편집기는 LinkD 링커를 포함하는 엑손 편집기에 비해 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질(ONT) 수준이 극적으로 높고 스플라이싱되지 않은 단백질(non-spliced protein: NSP) 수준이 상당히 낮았다. 웨스턴 블롯은 ABCA4의 C-말단에 특이적인 항-ABCA4 항체(상단 패널), 트랜스-스플라이싱된 단백질과 NSP의 N-말단에 통합된 V5 에피토프 태그에 특이적인 항-V5 에피토프 태그 항체(중간 패널) 및 단백질 로딩 대조군인 나트륨/칼륨 ATPase(Na+/K+ ATPase)에 특이적인 항체로 조사되었다.

도 18은 전장 단백질과 NSP를 도시한 도면. C 말단 Ab는 전장 ABCA4 단백질만 면역침전시킨다.

도 19A 및 도 19B는 예시적인 ABCA4 5' RTM의 컨택스트에서 표시된 RTM 요소 단독 및 조합물 각각의 활성을 설명한다. (A) 표시된 각각의 작제물에 대한 ABCA4 RNA의 대체 백분율을 나타내는 히스토그램을 나타낸다. 대체 백분율은 각각의 작제물에 대해 약 20 내지 30%이다. 흥미롭게도, U1 결합 부위의 40량체 + 3x 반복(3XUBS)의

조합물은 40량체 단독에 비해 ABCA4 RNA의 대체 백분율이 증가하는 경향을 나타낸다. (B) 표시된 작제물 40량체, 40량체 + 3XUBS, 40량체 + AU-풍부 요소(ARE), 40량체 + 3XUBS + ARE가 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질(ONT)을 발현하고, 조합된 이러한 RTM 요소는 40량체 단독에 비해 ONT 수준이 증가하는 경향을 보인다는 것을 나타낸 웨스턴 블롯을 도시한다. 또한 웨스턴 블롯은 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 40량체 + 3XUBS + ARE의 조합물 각각이 40량체 단독에 비해 스플라이싱되지 않은 단백질(NSP) 감소에 대한 조합 효과를 보인다는 것을 나타낸다. NSP 감소에 대한 조합 효과는 40량체 단독에 비해 40량체 + 3XUBS + ARE에서 특히 두드러진다. 최소 NSP 컨텍스트(엑손 편집기에서 슬라이스 공여체 서열 바로 뒤에 정지 코돈 포함)에서 NSP 수준을 독립적으로 감소시키는 두 가지 전략(3x UBS 및 AU 풍부 요소 포함)의 조합은 NSP 수준 감소에 대해 협력적인 효과를 나타내었다. 이 조합은 40량체만에 비해 NSP 수준을 약 70% 감소시켜 비-정지 엑손 편집기에서 볼 수 있는 수준까지 감소시켰다. 예시적 작제물은 서열번호 84(40량체 레인); 서열번호 85(40량체 + 3XUBS 레인); 서열번호 86(40량체 + ARE); 서열번호 87(40량체 + 3XUBS + ARE)를 포함한다.

도 20A 및 도 20B는 MALAT1 종결인자(삼중 나선 + mascRNA)가 예시적인 ABCA4 5' 엑손 편집기에서 ONT 트랜스-스플라이싱에 상당한 개선을 부여하고, 항-mut1 MALAT1 종결인자가 ONT 단백질 및 NSP 발현과 관련하여 MALAT1 종결인자와 유사한 활성을 나타냄을 나타낸다. (A) 예시적인 ABCA4 5' 엑손 편집기의 컨텍스트에서 전구체 종결인자와 비교하여 MALAT1 종결인자에 의해 부여된 상대적 트랜스-스플라이싱을 도시하는 히스토그램을 나타낸다. MALAT1 종결인자는 전구체 종결인자에 비해 트랜스-스플라이싱에서 23배 증가를 부여한다. (B) 3개의 상이한 ABCA4 5' 엑손 편집기, MALAT1 및 항-mut1 MALAT1에 대해 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질(ONT) 및 스플라이싱되지 않은 단백질(NSP)의 발현 수준과 관련하여 유사한 활성을 나타내는 것을 나타낸 웨스턴 블롯을 도시한다. 웨스턴 블롯은 ABCA4의 N-말단에 특이적인 항-ABCA4 항체(상단 패널), ABCA4의 C-말단에 특이적인 항-ABCA4 항체(가운데 패널) 및 단백질 로딩 대조군인 나트륨/칼륨 ATPase(Na^+/K^+ ATPase)에 특이적인 항체로 조사되었다

도 21A 및 도 21B는 돌연변이체 ABCA4 mRNA를 과발현하도록 조작된 HEK293T 17+06 세포에 형질도입된 예시적인 AAV2-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 용량 반응을 나타내고, 여기서 ABCA4 RNA 엑손 편집기는 도 13에 도시되어 있고(5' UTR에서 항-mut1 MALAT1 종결인자의 단부에 걸쳐 있음); 서열번호 78), 40량체 링커 + 3XUBS + ARE(서열번호 73)의 카세트를 포함한다. AAV2-ABCA4 엑손 편집기를 다음과 같이 일련의 감염 다중도(MOI)로 생물학적 복제물로 HEK293T 17+06 세포에 도입하였다: 0, 1k, 10k(1e4), 100k(1e5), 1M(1e6) 다음에 (A) ddRT-PCR RNA 대체 %를 위한 RNA 추출 또는 (B) 막 단백질 추출 및 ABCA4 특이적 항체로 조사한 웨스턴 블롯. ABCA4의 N-말단에 특이적인 항-ABCA4 항체로 조사한 웨스턴 블롯(상단 패널)은 ONT 단백질과 NSP가 MOI 1e4에서 검출 가능하고 MOI 1e6을 통해 증가함을 나타낸다. 웨스턴 블롯은 ABCA4의 N-말단에 특이적인 항-ABCA4 항체(상단 패널; 20초 노출) 및 단백질 로딩 대조군인 나트륨/칼륨 ATPase(Na^+/K^+ ATPase; 5초 패널)에 특이적인 항체로 조사되었다 이러한 결과는 ABCA4 RNA% 및 단백질 대체 수준의 측면에서 MOI를 증가시키는 예상된 용량-반응 효과를 나타낸다.

도 22는 생체내 ABCA4 RNA 엑손 편집을 나타낸다. RT-qPCR로 측정한 AGM 망막에서의 엑손 편집. 처리된 영역의 신경 망막 펀치를 RT-qPCR로 분석하였다. (A) RNA 대체%는 총 ABCA4(천연 및 편집됨)의 %로 표시하였다. (B) 10ng RNA당 엑손 편집기 카피 수를 RNF20으로 정규화하였다. 이 생체내 연구에 사용된 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물(AAV8-REEC)은 서열번호 77을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함한다. 결과는 1개월(4주) 및 3개월(12주) 시점에 대해 표시하였다.

도 23은 ABCA4-01(서열번호 90)을 암호화하는 AAV 벡터 플라스미드(서열번호 82)의 개략적 표현을 나타낸다.

도 24는 엑손 편집된 ABCA4 RNA에서 번역된 단백질의 기능적 활성을 도시한다. 이러한 결과는 *ABCA4* RNA 엑손 편집을 통해 구제된 ABCA4 단백질의 기능적 활성을 확인하는 증거를 제공한다. 미처리(음성 대조군) 또는 서열번호 78(V5 태그 REEC)을 포함하는 엑손 편집기의 V5 에피토프-태깅된 버전으로 형질주입시킨 후 *ABCA4* KO 세포에서 면역침전에 의해 풍부해진 ABCA4 단백질의 ATPase 활성, 여기서 V5 에피토프-태깅된 버전(서열번호 81)의 활성이 표시된다. ATR이 없는(기준선) 또는 40 ##μM ATR을 첨가한(+ ATR) ABCA4 ATPase 활성 측정값이 표시된다. 데이터는 기술적 이중 또는 삼중 측정값을 사용한 단일 생물학적 반복이다.

도 25는 OFT-seq에 의해 캡처된 RNA 종을 나타낸다. GSP는 엑손 편집기의 엑손 22(Ex22)에서 코돈 최적화된(CO) 서열을 표적으로 한다. 적색 점선 영역은 Illumina 서열측정 플랫폼에 의해 서열측정된다. 자색 영역은 엑손 편집기에 의해 제공된 ABCA4 CDS를 나타낸다. 3개의 추정 OFT 접합부(A, B, C)와 2개의 추정 자가-스플라이싱된

엑손 편집기 서열이

설명 목적으로 제공된다.

도 26은 지정된 요소를 포함하는 예시적인 ABCA4 작제물에 대해 HEK 17+06 세포에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위와 이의 사용 빈도를 나타내는 결과를 나타낸다. 유사한 크립틱 스플라이스 부위 패널이 NHP 망막에서 생체내에서 식별되고 특징규명되었다. 식별된 크립틱 스플라이스 부위에 동의어 돌연변이를 도입하기 전 전구체 서열을 포함하는 ABCA4 작제물에 대한 크립틱 스플라이스 부위 빈도를 실험적으로 결정한 것(서열번호 46)(상단 패널)과 크립틱 스플라이스 부위에 동의어 돌연변이를 도입한 후(하단 패널)이며, 이를 도입하면 스플라이스 부위 저항성 서열(서열번호 79)이 생성되는데, 이는 스플라이싱 빈도의 상당한 감소를 통해 입증된다.

도 27A 및 도 27B는 시험관내에서 조사된 표적 프리-mRNA의 예시적인 인트론(인트론 A)에 대한 5' RTM의 컨택스트에서 표시된 RTM 요소 단독 및 조합물 각각에 대한 활성을 설명한다. **(A)** 표시된 각각의 작제물에 대한 표적 RNA의 대체 백분율을 나타내는 히스토그램을 제공한다. 흥미롭게도, 40량체 + 3XUBS의 조합물, 40량체 + ARE의 조합물 또는 40량체 + 3XUBS + ARE의 조합물은 40량체 단독에 비해 표적 RNA의 대체 백분율이 감소하는 경향을 나타낸다. **(B)** 표시된 작제물 40량체, 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 그리고 40량체 + 3XUBS + ARE가 트랜스-스플라이싱된 표적내 단백질(ONT)을 발현하고, 각각의 조합이 40량체 단독에 비해 NSP 감소에 대한 조합 효과를 나타낸다는 것을 나타낸 웨스턴 블롯을 도시한다. 더 구체적으로, 40량체 + 3XUBS의 조합물은 NSP 수준을 약 75% 감소시켰고; 40량체 + ARE의 조합물은 NSP 수준을 약 40% 감소시켰고; 40량체 + 3XUBS + ARE의 조합물은 40량체 단독에 비해 NSP 수준을 약 88% 감소시켰다.

도 28A 및 도 28B는 시험관내에서 조사된 표적 프리-mRNA의 예시적인 인트론(인트론 B)에 대한 5' RTM의 컨택스트에서 표시된 RTM 요소 단독 및 조합물 각각에 대한 활성을 설명한다. (A) 표시된 각각의 작제물에 대한 표적 RNA의 대체 백분율을 나타내는 히스토그램을 제공한다. 흥미롭게도, 40량체 + 3XUBS의 조합물 또는 40량체 + ARE의 조합물은 40량체 단독에 비해 표적 RNA의 대체 백분율이 증가하는 경향을 나타낸다. (B) 표시된 작제물 40량체, 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 및 40량체 + 3XUBS + ARE가 트랜스-스플라이싱된 표적내 단백질(ONT)을 발현하고 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 및 40량체 + 3XUBS + ARE의 각각의 조합물이 40량체 단독에 비해 NSP 감소에 대한 결합 효과를 나타낸다는 것을 나타낸 웨스턴 블롯을 도시한다. NSP 감소에 대한 조합 효과는 40량체 단독에 비해 40량체 + 3XUBS + ARE에서 특히 두드러진다. 더 구체적으로, 40량체 + 3XUBS의 조합물은 NSP 수준을 약 38% 감소시켰고; 40량체 + ARE의 조합물은 NSP 수준을 약 33% 감소시켰고; 40량체 + 3XUBS + ARE의 조합물은 40량체 단독에 비해 NSP 수준을 약 66% 감소시켰다.

도 29는 시험관내에서 조사된 표적 프리-mRNA의 예시적인 인트론(인트론 C)에 대한 5' RTM의 컨택스트에서 표시된 RTM 요소 단독 및 조합물 각각에 대한 활성을 설명한다. 간략하면, HEK293T 세포를 비결합 도메인(NBD) + 40량체; BD34(인트론 C에 특이적으로 결합) + 40량체; BD34 + 40량체 + 3XUBS를 함유하는 RTM; 또는 RTM이 없는 것(형질주입 대조군)으로 형질주입시켰다. 세포를 형질주입 후 48시간 후에 수거하여 RT-qPCR로 트랜스-스플라이싱 효율을 검정하였다. BD34 + 40량체의 대체 백분율은 약 1% 대체였고 BD34 + 40량체 + 3XUBS를 포함하는 RTM의 경우 약 3% 대체로 증가하였다. 따라서 3x UBS 요소는 표시된 인트론 C를 표적으로 하는 예시적인 RTM에서 대체 백분율을 약 3배 증가시켰다.

도 30A 내지 도 30C는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물로 처리한 후 6개월 후에 NHP에서 강력한 ABCA4 RNA 및 단백질 대체를 생체내에서 입증하는 결과를 나타낸다. (A) 바이러스 게놈 카피(VGC)(x축) 및 엑손 편집기 RNA 카피 수(y축); (B) ABCA4 RNA 대체%; 및 (C) ABCA4-01(3.5E11 vg/눈)로 처리한 후 6개월 후에 n=3 시노몰거스 동물에서 단백질 대체. A 및 B에서 DNA 및 RNA 수준은 ddPCR(Droplet Digital Polymerase Chain Reaction) 기반 검정을 사용하여 평가하였다. C에서 총 단백질 백분율(편집된 단백질과 NHP 천연 단백질의 합 대비 편집된 ABCA4)은 적격 IA MS 검정을 사용하여 정량화하였다. 이 생체내 연구에 사용된 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물은 서열번호 90을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함한다. 4개의 NHP에 대한 결과가 표시되고 (B) 및 (C)에 1 내지 4: 1(비히클 처리); 2 내지 4(3.5E11 vg/눈으로 처리)로 지정된다.

도 31은 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물이 생체외 인간 망막에서 ABCA4 RNA를 편집한다는 것을 나타낸 결과를 나타낸다. 이 생체외 연구에 사용된 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물은 서열번호 90을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함한다. 그래프는 3명의 독립적인 공여자의 인간 망막 이식편에서 비히클 또는 서열번호 90을 포함하는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물로 치료한 후 제21일에 ABCA4 RNA 대체 백분율을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 ABCA4 유전자의 돌연변이에 의해 야기되는 질환 또는 장애를 치료하기 위한 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 프리-mRNA 트랜스-스플라이싱 분자)를 포함한다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 유전자 요법(예를 들어, 아데노 연관 바이러스에 의해 전달되는 생체내 유전자 요법)를 위한 프리-mRNA 트랜스-스플라이싱 분자를 사용하여 ABCA4의 적어도 하나의 돌연변이로 인한 질환, 예컨대, 스타르가르트병 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증을 치료한다.

[0042] *ABCA4*는 크기가 대략 6.8kb이고, 50개의 엑손을 포함하고, 광수용체 세포와 RPE 세포에서 발현되는 250kDa ATP-결합 카세트 수송체 단백질을 암호화한다 ABCA4는 막대세포 및 원뿔세포 광수용체의 외측 분절 디스크의 가장자리와 절개에 특이적으로 국재화된 막 관통 단백질이다. 망막에서 ABCA4는 루멘에서 광수용체 디스크 막의 세포질 리플렛으로 N-레티닐리덴-포스파티딜에탄올아민을 운반하는데, 이 과정은 화학적 이성질체화와 조합하여 잠재적으로 독성이 있는 레티노이드 화합물을 제거하는 데 도움이 된다. 반대로, 손상된 ABCA4 기능은 망막 색소상피(RPE)에 다이레티날 접합체 A2E와 같은 비스레티노이드가 축적되는 결과를 초래한다. 리포푸신이라고도 알려진 이 파편은 RPE 대사를 방해하고 궁극적으로 세포 사멸에 기여하는 것으로 생각된다. 현재의 유전형-표현형 모델은 잔류 ABCA4 활성의 정도를 망막 질환 표현형의 심각성과 연관시킨다. *ABCA4*-관련 망막병증은 일반적으로 상염색체 열성 방식으로 유전되므로 광수용체에서 *ABCA4* 수준이 50%인 개체는 정상적인 망막 기능을 가질 것으로 예상된다. *Abca4* 넉아웃 마우스에서 얻은 데이터는 ABCA4 수준을 10 내지 25% 교정하면 망막의 독성 지질 축적을 감소시키는 것을 포함한 관련 치료 효과를 얻는 데 충분하다는 것을 나타내었다.

[0043] 중요하게도, 본 발명자들은 조기 정지 코돈 돌연변이를 모방하는 질환을 갖는 시험관내 조작된 인간 *ABCA4* 단백질 넉아웃(KO) 세포주에서 ABCA4 단백질 수준의 완전한 구제를 입증하였고, NHP 망막 및 인간 망막 이식편에서 생체내 RNA 엑손 편집의 치료적으로 관련 있는 수준을 달성하였다. 보다 구체적으로, 본 발명자들은 ABCA4 RNA 엑손 편집 효율(RNA 대체%)이 20%를 초과하는 AAV-*ABCA4* 엑손 편집기 처리가 *ABCA4* 단백질 KO 세포주에서 시험관내 ABCA4 단백질 수준의 100% 구제를 달성하기에 충분하다는 것을 관찰하였다. 예를 들어, 도 3C를 참조한다. 내인성 ABCA4 유전자좌 상류에 넉인된 강력한 CAG 프로모터를 함유하는 모체 ABCA4 넉인(KI) 세포주를 ABCA4 단백질 구제 효율을 비교하기 위한 기준으로 사용하였다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 시험관내에서 조작된 인간 *ABCA4* 단백질 KO 세포주는 ABCA4 유전자에 질환 모방 조기 정지 코돈 돌연변이를 도입하여 모체 ABCA4 KI 세포주에서 유래되었다. 따라서 시험관내에서 조작된 인간 *ABCA4* 단백질 넉아웃 세포주는 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(핵산 트랜스-플라이싱 분자)의 치료 효능을 예측하기 위한 시험관내 모델 시스템 역할을 한다.

[0044] 또한, 본 발명자들은 예시적인 AAV8 기반 ABCA4 엑손 편집 분자의 단일 망막하 투여가 NHP 눈에서 3개월(12주) 시점에서 생체내 최대 37%의 RNA 대체를 초래한다는 것을 밝혀 내었다. 예를 들어, 도 22를 참조한다. 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 37 대체%는 처리된 세포 또는 조직에서 정량화된 총 ABCA4 mRNA의 37%가 엑손 편집된 형태로 존재한다는 것을 의미한다.이 연구에서 사용된 예시적인 AAV8 기반 ABCA4 엑손 편집 분자는 서열번호 77을 포함하는데, 이는 동일한 조절 요소와 서열번호 90에 존재하는 이중 정지 코돈을 공유한다. RNA 트랜스-스플라이싱으로 인한 전장 인간/NHP ABCA4 단백질 발현의 번역도 본 연구에서 입증되었으며 발현 수준은 RNA 대체%의 수준과 같은 경향을 나타낸다. 치료 후 다른 시점에서 조사한 다양한 다른 AAV8 기반 ABCA4 엑손 편집 분자를 사용한 추가 NHP 연구는 RNA 트랜스-스플라이싱으로 인한 지속적인 RNA 엑손 편집 및 인간/NHP ABCA4 단백질 발현을 입증하였다. 예를 들어, 도 9 및 도 10B를 참조한다. 따라서 본 발명자들은 스플라이소좀 매개 트랜스-스플라이싱을 통해 치료적으로 관련성 있는 RNA 엑손 편집을 달성하였으며, NHP에서 단일 AAV 벡터를 매개로 한 결과적인 전장 ABCA4 단백질 발현을 달성하였다. 이러한 연구는 ABCA4-01(서열번호 90)과 공통적으로 공유하는 선택된 조절 요소 및 40량체 링커 및 BD가 NHP에서 3개월 시점까지 지속적인 발현 및 엑손 편집 활성을 부여한다는 것을 입증하였다. 예를 들어, 도 22A 및 22B를 참조한다.

[0045] 본 명세서에 제시된 추가 증거는 서열번호 82를 포함하는 AAV 벡터 플라스미드에 의해 암호화된 예시적인 AAV8-패키징 RNA 엑손 편집기인 ABCA4-01(서열번호 90)이 시험관내 및 생체내에서 세포에서 ABCA4 생물학적 활성을 적어도 부분적으로 회복하기에 충분한 정도로 내인성 프리-RNA의 트랜스-스플라이싱을 매개할 수 있음을 입증한다. ABCA4-01(서열번호 90)은 도 13에 도시되어 있으며 5' ITR에서 3' ITR까지의 RNA 엑손 편집기의 길이에 걸쳐 있다. 일부 실시형태에서, 서열번호 78[5' UTR에서 MALAT1-MascRNA(항-mut1)의 단부에 걸쳐 있는 서열번호 90의 일부; 도 13 참조]은 RNA 엑손 편집기로 사용될 수 있다. 일부 실시형태에서, 도 13에 도시된 엑손 1 내지 22 CDS에서 항-mut1을 포함하는 MALAT1-MascRNA의 단부에 걸쳐 있는 서열번호 78의 일부(예를 들어, 서열번호

69)는 ABCA4 RNA 엑손 편집기에서 다른 5' UTR과 조합될 수 있으며, ABCA4 생물학적 활성의 비슷한 회복을 달성할 수 있을 것으로 합리적으로 기대할 수 있다.

[0046] 상기에 더하여, 도 30A 내지 도 30C는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물(ABCA4-01; 서열번호 90)로 처리한 후 6개월 후에 NHP에서 생체내 강력한 ABCA4 RNA 및 단백질 대체를 입증하는 결과를 나타낸다. 간략하면, 본 발명자들은 야생형 시노몰거스 마카크에게 ABCA4-01(3.5E11 vg/눈)의 단일 망막하 용량을 처리하였다. 그런 다음 6개월 시점에서 AAV 벡터 게놈 DNA 카피(VGC) 생체 분포, 엑손 편집기 RNA 발현 및 편집된 ABCA4 RNA 및 단백질의 백분율을 평가하였다. 엑손 편집기 RNA 발현은 VGC와 양호한 상관관계가 있었고(도 30A) 강력한 RNA 대체%(천연 ABCA4 RNA 카피를 편집된 카피로 변환)를 초래했으며, 신경 망막 샘플에 존재하는 총(편집된 + 천연) ABCA4 RNA 집단에서 편집된 ABCA4 RNA의 백분율로 계산되었다(도 30B). 도 30B에 표시된 대로, RNA 대체 백분율은 이 ABCA4-01 용량에 대해 약 40% 내지 60% 범위였다. 이는 적격 IA-MS 검정으로 측정되는 경우 생성된 인간-NHP 키메라 ABCA4 단백질의 치료 수준을 초래하였다(도 30C). 보다 구체적으로, 이러한 동물에서 ABCA4 RNA 편집으로 인해 생성된 인간 NHP 키메라 ABCA4 단백질은 시험된 샘플에서 총(인간-NHP + NHP) ABCA4 단백질의 20 내지 40%로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 또한 단일 망막하 주사를 통해 전달된 고용량 ABCA4-01로 처리된 야생형 시노몰거스 마카크에서 최대 66%의 RNA 대체 및 최대 45%의 인간/NHP 키메라 ABCA4 단백질을 입증하였다. 이러한 결과는 ABCA4-01이 NHP에서 편집된 ABCA4 단백질 발현의 치료적으로 관련성 있는 수준을 달성한다는 것을 나타내며, 이 수준은 이전에 Abca4 KO 마우스 모델에서 치료적 이점을 제공하는 것으로 나타난 구제된 ABCA4 단백질 수준을 초과한다.

[0047] 본 발명자들은 또한 인간 공여자 망막 이식편을 서열번호 90을 포함하는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물인 ABCA4-01로 처리하여 인간 광수용체에서 ABCA4 엑손 편집을 평가하였다. 본 명세서에 자세히 설명된 바와 같이, 본 발명자들은 다수의 공여자로부터 얻은 이식편을 ABCA4-01(3.9E11 vg/망막 펀치)로 처리하고, 세포를 21일 동안 인큐베이션시킨 다음, RNA를 추출하였다. 추출된 RNA의 분석은 내인성 엑손 1 내지 22가 ABCA4-01에 의해 암호화된 동일한 해당 엑손으로 약 20 내지 30% RNA 대체되었음을 나타내었다(도 31).

[0048] 본 발명자들은 또한 ABCA4-01의 RNA 엑손 편집기의 N-말단 V5-에피토프 태깅된 버전(서열번호 81)을 암호화하는 과발현 플라스미드로 형질주입된 ABCA4 단백질 KO 세포에서 구제된 ABCA4 단백질이 ATPase 활성을 나타냄을 입증하였다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, ABCA4-01의 RNA 엑손 편집기의 V5-에피토프 태깅된 버전(서열번호 81)에 의해 매개된 트랜스-스플라이싱 후 구제된 ABCA4 단백질의 활성은 ABCA4 단백질 면역침전 후 40μM 올-트랜스 레티날(ATR)이 없거나 있는 상태에서 평가되었다. 결과는 ABCA4 단백질 KO 세포에서 구제된 ABCA4 단백질이 40μM 올-트랜스 레티날을 첨가한 반응으로 기저 수준의 ATPase 활성이 증가하여 반영된 것처럼 ATPase 활성을 나타냄을 나타낸다. 도 24를 참조한다. 이러한 결과는 ABCA4-01(서열번호 90) 처리에서 생성된 엑손 편집된 ABCA4 단백질이 광수용체로부터 ATR 및 11-시스-레티날을 제거하는 데 필요한 기능적 ATPase 활성을 나타내었다는 증거를 제공한다. 이러한 결과는 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 발현 후 ABCA4 생물학적 활성의 회복을 나타낸다.

[0049] 따라서, 본 명세서에 제시된 결과는 본 명세서에 기술된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(예를 들어, 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69 중 하나를 포함하는 RNA 엑손 편집기) 및 이를 포함하는 조성물에 대한 치료적 잠재력을 입증하여 이것이 ABCA4-관련 망막병증을 치료하고 ABCA4-관련 망막병증을 치료하기 위한 약물을 제조하는 데 사용될 수 있으며, ABCA4-관련 망막병증을 가진 대상체를 치료하는 방법에 사용될 수 있음을 입증한다. 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(예를 들어, 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69 중 어느 하나를 포함하는 RNA 엑손 편집기) 및 이를 포함하는 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 ABCA4-관련 망막병증은 스타르가르트병-1(STGD1); 황반 안저, 망막색소변성증-19(RP19); 원뿔세포 막대세포 이영양증-3(CORD3); 및 노인성 황반 변성-2(ARMD2)을 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(예를 들어, 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69 중 하나를 포함하는 RNA 엑손 편집기) 및 이를 포함하는 조성물을 사용하여 치료될 수 있는 ABCA4-관련 망막병증은 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 2개의 대립유전자 병원성 돌연변이를 갖는 유전성 망막 질환을 포함하며, 이는 원뿔세포 막대세포 이영양증, 스타르가르트 황반이영양증 또는 황반 안저와 일치하는 표현형을 나타낸다. 이용 가능한 데이터에 따르면, ABCA4의 알려진 돌연변이의 대략 60%는 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(예를 들어, 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69 중 하나를 포함하는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자에 의해 암호화된 RNA 엑손 편집기)를 사용하여 교정할 수 있으며, ABCA4-관련 망막병증으로 진단받은 환자의 70 내지 85%는 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기(예를 들어, 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69 중 하나를 포함하는 RNA 엑손 편집기)를 사용한 치료로부터 이익을 얻을 수 있다.

[0050] 상기에 더하여, 당업자는 ABCA4 유전자에서 새로운 돌연변이가 정기적으로 확인되고 반드시 특정 표현형/표현형에 기인하는 것은 아니라는 것을 알고 있다. 당업자는 또한 CORD3→STGD1→RP19가 돌연변이의 심각도에 따라 표현형의 스펙트럼을 나타내는 것으로 보인다는 것을 알고 있다. 따라서 RNA 엑손 편집기 및 이를 암호화하는 작제물뿐만 아니라 이를 포함하는 조성물은 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에서 확인된 임의의 및 모든 돌연변이와 관련된 병태/질환의 치료에 유리하게 사용될 수 있으며, 이후에 기인된 표현형은 ABCA4 망막병증에 대한 지식이 진화함에 따라 특징규명될 수 있다는 것을 이해한다.

[0051] 일부 실시형태에서, 대상체/환자는 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 것으로 식별된다. 일부 실시형태에서, 대상체/환자는 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 대상체/환자를 식별하기 위해 유전자형이 결정된다. 일부 실시형태에서, ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 대상체/환자를 식별하기 위해 이미 유전자형이 결정된 대상체/환자를 얻는다. 어떠한 모델에서든, 대상체/환자는 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에서 적어도 하나의 돌연변이를 갖는 대상체/환자를 기준으로 선택되며, 선택 프로세스가 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기를 갖는 그러한 대상체/환자의 제안된 치료와 관련하여 이루어지는 유전자형 결정의 시기와는 무관하다. 이러한 대상체/환자는 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 사용하여 ABCA4-관련 망막병증을 치료하거나, 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 포함하는 의약을 사용하여 ABCA4-관련 망막병증을 치료하거나, 본 명세서에 기재된 ABCA4 RNA 엑손 편집기 또는 이를 포함하는 조성물을 투여해야 하는 ABCA4-관련 망막병증을 치료하는 방법의 이점을 얻을 수 있다.

[0052] 스타가르트병-1(STGD1)은 염색체 1p22의 ABCA4 유전자(OMIM #601691)에서 상동접합성 또는 복합 이형접합성 돌연변이로 인해 발생한다. 미스센스, 스플라이싱, 절단 및 프레임시프트 변형을 포함한 900개를 초과하는 다양한 돌연변이가 ABCA4 유전자에서 보고되었으며 망막 변성과 관련이 있는 것으로 나타났다. 이러한 돌연변이 중 다수는 ABCA4 단백질의 단일 아미노산을 변경하여 광수용체 세포에서 ABCA4 활성이 없거나 감소하게 된다. 감소된 ABCA4 활성은 망막 세포에서 비타민 A 유도체의 축적과 리포푸신의 축적으로 이어지며, 이는 망막 색소 상피 및 광수용체에 독성을 미친다. 스타가르트 황반변성은 망막에 영향을 미치는 유전적 안구 질환으로, 더 구체적으로는 독서, 운전, 얼굴 인식을 포함한 다양한 시각 작업에 중요한 선명한 중앙 시력을 담당하는 황반부라는 영역에 영향을 미친다. 중앙 시력 상실 외에도 스타가르트 황반변성을 앓은 대상체는 야간 시력이 손상되고 일부 영향을 받은 개체는 색각도 손상된다. 질환 과정 후반에는 주변 시야도 중간에서 광범위한 제한을 보일 수 있다. 스타가르트 황반변성의 징후와 증상은 일반적으로 어린 시절부터 성인 초기에 나타나며 환자는 시간이 지남에 따라 점진적인 양측 시력 상실을 나타내며 종종 20/200에 도달하거나 더 악화된다.

[0053] 황반 안저(FFM)는 ABCA4 유전자와 페리피린-2(PRPH2) 유전자의 돌연변이와 관련된 스타르가르트병의 대립유전자 하위 유형이다. 반점 안저 질환의 한 형태인 황반 안저는 안저에 널리 분포된 리포푸신의 침전으로 인해 많은 흰색-노란색 반점이 발생하는 데서 명칭이 유래되었다. FFM은 망막 색소 상피의 네트워크 위축과 맥락막 혈관 위축을 특징으로 한다. 중심 시력 상실, 색각 상실, 광공포증, 중심 주변 암점 및 느린 어둠 적응은 FFM의 특징적인 특징이다. FFM은 다른 스타르가르트의 하위 유형보다 나중에 나타나고 진행 과정이 더 느린 경향이 있다. 시력 상실이 생후 20년 이내에 시작되면 환자는 일반적으로 스타가르트병으로 진단받는 반면, 질환이 생후 추후에 나타나고 진행이 느린 경우 환자는 일반적으로 FFM병으로 진단된다.

[0054] 망막색소변성증-19(RP19)은 염색체 1p22의 ABCA4 유전자에서 상동접합성 또는 복합 이형접합성 돌연변이로 인해 발생할 수 있다. 망막색소변성증은 주변 시력의 점진적인 상실과 야간 시력 장애를 특징으로 하는 유전성 안구 질환이다. 많은 유전자가 망막색소변성증과 관련이 있다. 망막색소변성증-19는 야맹증, 주변 시력 상실, 진행성 망막 변성, 터널 비전, 진행성 시력 상실, 야간 또는 저조도에서 시력 감소, 진행된 단계에서 중심 시력 상실 및 망막 색소 상피(RPE) 얼룩을 특징으로 한다. 임상적으로 안저는 광범위한 외측 망막 변성, 뼈-스피큘 색소 침착, 혈관 감쇠, 납작한 디스크 창백 및 심각한 위축성 변화와 황반의 맥락막 흉터를 나타낸다.

[0055] 원뿔세포 막대세포 이영양증-3은 염색체 1p22의 ABCA4 유전자에서 상동접합성 또는 복합 이형접합성 돌연변이로 인해 발생한다. ABCA4는 원뿔세포 막대세포 이영양증의 병인에 관여하는 네 가지 주요 원인 유전자 중 하나이며 ABCA4 돌연변이는 상염색체 열성 원뿔세포 막대세포 이영양증의 30 내지 60%와 관련이 있다. CORD3은 상염색체 열성, 임상적으로 이질적인 망막 질환으로, 일반적으로 증상이 있는 급속히 진행되는 시력 상실과 광선공포증 및 색차별 상실이 초기에 나타나고, 그 후에 야맹증 및 점진적인 시야 상실을 특징으로 한다. 원뿔세포 변성은 망막의 중심부가 영향을 받아 일찍 나타나고, 그 후 수년 후에 막대세포의 변성이 나타난다. 원뿔세포 막대세포 이영양증의 진단은 임상 병력, 안저 검사 및 전기망막도 검사를 기반으로 한다. 원뿔세포 막대세포 이영양증은 일반적으로 다른 ABCA4-망막병증보다 일찍 나타나고 훨씬 더 빠르게 진행되며, 광범위한 황반 위축은 발병 후

수년 후에 발생한다. 현재로서는 질환의 진행을 멈추거나 시력을 회복하는 치료법이 없으며, 시력 예후는 좋지 않다. 관리의 목표는 퇴행성 과정을 늦추고, 합병증을 치료하고, 실명의 사회적, 심리적 영향과 관련된 어려움에 대비하도록 환자를 준비시키는 것이다.

[0056] 노인성 황반 변성-2(ARMD2)에 대한 감수성은 염색체 1p22의 ABCA4 유전자의 변이에 의해 부여된다. ARMD2는 RPE 내부 및 아래에 드루젠(황색 침전물 축적)이 축적되고 황반 RPE가 점진적으로 위축되는 것을 특징으로 하는 복잡한 질환이다. 이러한 변화로 인해 광수용체 기능이 상실되고 시력이 손상된다. 노인성 황반 변성은 선진국 노인의 시력 상실의 주요 원인이다. 시력 상실은 보통 60대 또는 70대에 눈에 띄게 나타나고 시간이 지남에 따라 악화되는 경향이 있다. 노인성 황반 변성은 주로 중앙 시력에 영향을 미치며, 이는 독서, 운전 및 얼굴 인식과 같은 세부 작업에 중요하다. 노인성 황반 변성의 두 가지 주요 유형인 건성 형태 및 습성 형태가 설명되어 있따. 건성 형태가 훨씬 더 흔하며, 노인성 황반 변성의 모든 사례의 85 내지 90%를 차지한다. 이는 망막 아래에 드루젠이 쌓이고 황반에 위축이 생기며 시력 상실이 천천히 진행되는 것이 특징이다. 이 병태는 일반적으로 양쪽 눈에 영향을 미친다. 습성 노인성 황반 변성은 갑작스럽게 발병하는 심각한 시력 상실과 관련이 있으며 빠르게 악화될 수 있다. 이러한 병태의 형태는 VEGF의 과발현으로 인해 황반 아래에 비정상적이고 연약한 혈관이 자라는 것이 특징이다. 이러한 혈관은 혈액과 체액을 누출하여 황반을 손상시키고 중앙 시야를 흐릿하게 만들고 왜곡한다. 습성 황반 변성은 다양한 치료법을 사용하여 치료할 수 있다. 건성 AMD는 지리적 위축이 있는 환자에게만 C3 저해제인 @@도 8A는 트랜스-스플라단일의 사용 가능한 치료법이 있다. 위축 또는 체액 누출 없이 드루젠 침전만 발생한 초기 형태의 ARMD에 대한 치료법은 현재 존재하지 않는다.

[0057] **I. 정의**

[0058] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "트랜스-스플라이싱"은 하나 이상의 엑손(예를 들어, 외인성 엑손 또는 트랜스-스플라이싱 분자의 CDS의 일부인 엑손)을 포함하는 제1 RNA 분자를 제2 RNA 분자(예를 들어, 프리-mRNA 분자, 예를 들어, 내인성 프리-mRNA 분자)에 결합하고 스플라이소좀 매개 메커니즘을 통해 제2 RNA 분자의 일부를 제1 RNA 분자의 일부로 대체하는 것을 의미한다. RNA 트랜스-스플라이싱 반응에 대한 일반적인 메커니즘은 도 14B에 설명되어 있다.

[0059] "핵산 트랜스-스플라이싱 분자" 또는 "트랜스-스플라이싱 분자"는 3개의 주요 요소를 갖는다: (a) 트랜스-스플라이싱 분자를 이의 표적 유전자(예를 들어, 프리-mRNA)에 테더링하는 것에 의해 특이성을 부여하는 결합 도메인; (b) 스플라이싱 도메인(예를 들어, 3' 또는 5' 스플라이스 부위가 있는 스플라이싱 도메인); 및 (c) 표적 핵산 내의 하나 이상의 엑손(예를 들어, 하나 이상의 돌연변이된 엑손)을 대체할 수 있는, 표적 핵산 상에 트랜스-스플라이싱되도록 구성된 CDS. "프리-mRNA 트랜스-스플라이싱 분자" 또는 "RTM"은 프리-mRNA를 표적으로 하는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 지칭한다. 용어 "핵산 트랜스-스플라이싱 분자" 및 "트랜스-스플라이싱 분자"는 (1) RNA 전사체가 표적 프리-mRNA에 물리적으로 결합하는 효과기 분자인 RNA를 암호화하는 DNA 및 (2) RNA 전사체 자체를 모두 지칭한다. 명확성을 위해, 용어 "-암호화 서열"(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자-암호화 서열)은 대상체가 효과기를 암호화한다는 것을 명시하기 위해 본 명세서에서 사용된다(예를 들어, 암호화 서열은 DNA이고 효과기는 RNA이다). 일부 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱 분자-암호화 서열은 예를 들어, 돌연변이된 ABCA4 엑손을 대체하기 위한 기능적 엑손(예를 들어, 기능적 ABCA4 엑손)의 일부로서 cDNA를 포함할 수 있다.

[0060] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "엑손 편집기"는 트랜스-스플라이싱 분자 또는 이를 포함하는 벡터(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자인 RNA 전사체를 암호화하는 DNA를 포함하는 AAV 벡터)를 지칭하는 데 사용될 수 있다.).

[0061] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "트랜스-스플라이싱 효율"은 원하는 트랜스-스플라이싱된 RNA 생성물(즉, RNA 트랜스-스플라이싱 반응에 의해 생성된 내인성 표적 프리-mRNA에 작동적으로 연결된 트랜스-스플라이싱 분자의 기능적 엑손을 포함하는 키메라 RNA 분자)의 검출된 발현 수준과 트랜스-스플라이싱 분자(또는 참조 분자)에 도입된 DNA 또는 RNA의 양의 비율을 지칭한다. 일부 경우에, RNA-seq를 사용하여 세포 또는 조직에서 단리된 RNA에서 트랜스-스플라이싱된 RNA 생성물의 발현 수준을 검출한다.

[0062] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "RNA 대체%"는 성공적인 트랜스-스플라이싱(TS)을 거친 전체 표적 mRNA 집단의 일부를 지칭하며, 다음 방정식을 통해 계산한다: % 표적내(ONT) TS = 100*(ONT 카피 수/(ONT 카피 수 + 천연 카피 수)).

[0063] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "상대 트랜스-스플라이싱 효율"은 참조 트랜스-스플라이싱 효율에 대한 시

험 트랜스-스플라이싱 효율의 비율을 지칭하며, 여기서 시험 트랜스-스플라이싱 효율은 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자)의 트랜스-스플라이싱 효율이고, 참조 트랜스-스플라이싱 효율은 참조 분자(예를 들어, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자와 동일한 요소를 갖지만 결합 도메인이 스크램블된 결합 도메인(예를 들어, 서열번호 1을 포함하거나 이로 이루어진 결합 도메인, 예를 들어, 서열번호 2를 포함하거나 이로 이루어진 결합 도메인)으로 대체된 참조 분자)의 트랜스-스플라이싱 효율이다. 트랜스-스플라이싱 분자의 상대 트랜스-스플라이싱 효율은 유사한 조건하에 시험된 참조 트랜스-스플라이싱 효율에 대한 시험 트랜스-스플라이싱 RNA 효율의 비율(일명 배수 증가)로 나타낼 수 있다.

[0064] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "작동 가능하게 연결된" 또는 "작동적으로 연결된"은 요소의 배열을 의미하며, 여기서 설명된 구성 요소는 일반적인 기능을 수행하도록 구성된다. 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 다른 핵산 서열에 "작동 가능하게 연결"된다. 요소는 작동 가능하게 연결되기 위해 인접할 필요는 없다. 따라서 예를 들어, 개입 서열은 작동 가능하게 연결된 서열 사이에 존재할 수 있다(예를 들어, 결합 도메인과 암호 서열은 개입 서열에 의해 분리될 수 있으며 결합 도메인은 여전히 암호 서열에 "작동 가능하게 연결"된 것으로 간주된다).

[0065] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "CDS"는 단백질의 일부(예를 들어, 돌연변이가 교정되는 표적 단백질)를 암호화하는 핵산 서열(예를 들어, RNA 서열, DNA 서열 또는 RNA와 DNA의 조합)을 의미한다. 따라서 CDS는 하나 이상의 기능적 엑손(예를 들어, 기능적 엑손의 서열)을 포함할 수 있다. 일부 경우에는 CDS의 하나 이상의 기능적 엑손이 인트론(예를 들어, 내인성 프리-mRNA에서와 같이)으로 분리되지 않고 서로 인접해 있다(예를 들어, cDNA와 같이). 일부 경우에는 CDS가 하나 이상의 인트론(예를 들어, 천연 인트론) 또는 미번역 영역(UTR, 예를 들어, 천연 UTR)을 엑손 사이 또는 엑손에 인접해 있는(예를 들어, 상류 또는 하류) 곳에 포함할 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "천연 5' ABCA4 미번역 영역" 또는 "천연 5' ABCA4 UTR"은 ATG 시작 코돈에 대해 5'에 있는 천연 ABCA4 유전자(예를 들어, 인간 ABCA4 유전자)의 영역과 적어도 90%의 서열 동일성을 갖는 길이가 20개 뉴클레오타이드를 초과하는 서열을 지칭한다. 천연 5' ABCA4 미번역 영역의 예는 서열번호 13의 DNA 서열 또는 서열번호 12의 RNA 서열로 제공된다. 또한 본 명세서에는 천연 5' ABCA4 미번역 영역의 변이체, 예를 들어, 서열번호 64의 DNA 서열 또는 서열번호 65의 RNA 서열의 변이체이다.

[0067] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "5' ABCA4 엑손의 기능적 서열"은 ABCA4 단백질의 기능적(생물학적으로 활성인) 부분을 암호화하는 ABCA4 엑손 1 내지 22 중 하나 이상을 포함하는 핵산 서열을 지칭한다. 결합 부위에 대해 내인성 ABCA4 엑손 3'으로 트랜스-스플라이싱될 때, 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열은 기능적 ABCA4 단백질(예를 들어, 돌연변이되지 않은 ABCA4 단백질)의 발현을 제공한다. 일부 경우, 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열은 트랜스 스플라이싱 분자가 트랜스 스플라이싱되는 엑손에 인접한 엑손 서열을 포함한다(예를 들어, ABCA4 인트론 22에 결합하고 내인성 ABCA4 엑손 23과 트랜스 스플라이싱하는 트랜스 스플라이싱 분자는 엑손 22, 21, 20, 19 등을 포함하는 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 포함할 수 있음).

[0068] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "기능적"은 단백질의 맥락에서 사용되는 경우 생물학적으로 활성인 단백질을 지칭한다. 용어 "기능적"은 또한 정상적인 세포 기능을 지원하는 데 필요한 단백질의 활성량을 지칭하는 데 사용될 수 있다. ABCA4와 관련하여 "기능적"이라는 용어는 예를 들어, 광수용체 및/또는 망막 상피 세포의 맥락 내에서 정상적인 세포 기능을 지원하기 위해 ABCA4 활성 수준을 회복시키는 데 필요한 ABCA4 단백질 활성의 양을 지칭하는 데 사용될 수 있다. 이러한 수준은 광수용체 및/또는 망막 상피 세포에서 독성 수준의 비스레티노이드 화합물 축적을 줄이거나 예방하기에 충분하다. 보다 구체적으로, 결함이 있는(비기능적인) ABCA4 단백질은 광수용체에서 11-시스 및 올-트랜스-망막과 망막 색소 상피에서 리포푸신의 축적으로 이어진다. 감소되거나 무시할 수 있는 ABCA4 활성과 관련된 상태를 치료하거나 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 치료제를 사용하는 맥락에서, 기능성은 ABCA4 활성 수준이 감소된 상태, 예를 들어, ABCA4-연관 망막 질환의 하나 이상의 증상을 제거하기에 충분한 양의 ABCA4 단백질을 회복시키는 것을 지칭한다. ABCA4-연관 망막 이영양증은 예를 들어, 스타르가르트 황반이영양증 (스타르가르트병), 황반 안저, 및 ABCA4-관련 원뿔세포 막대세포 이영양증을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 방법 또는 사용은 ABCA4 단백질 활성(기능적 생물학적 활성 ABCA4 단백질 활성)의 증가로 이어진다. 일부 실시형태에서, ABCA4 단백질 활성의 이러한 증가는 ABCA4 활성 수준을, ABCA4가 돌연변이되지 않은 ABCA4가 발현되는 세포(예를 들어, 광수용체 및/또는 망막 상피 세포)에 존재하는 것과 같은 정상적인 야생형 수준으로 존재하는 세포의 것에 비해서 ABCA4 활성의 적어도 10%, 적어도 15%, 적어도 20%, 적어도 25%, 적어도 30%, 적어도 35%, 적어도 40%, 적어도 45%, 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90% 또는 적어도

95%(예를 들어, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100%)로 회복시킨다.

[0069] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "교정된 크립틱 스플라이스 부위", "완화된 크립틱 스플라이스 부위" 또는 "내성 크립틱 스플라이스 부위"는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 또는 이의 일부(예를 들어, 내부의 암호 도메인 서열)가 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위에서 발생하는 스플라이싱 빈도를 줄이기 위해 그 안의 개별 뉴클레오타이드를 변경하도록 변형된 것을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 이러한 변형은 그에 의해 암호화된 아미노산 서열의 어떠한 변화도 초래하지 않는다.일부 실시형태에서, 이러한 변형은 이에 의해 암호화된 아미노산 서열의 변형를 초래한다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 내의 크립틱 스플라이스 부위 내성 핵산 서열은 암호 도메인 서열(CDS)이다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 저항성 ABCA4 CDS는 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고, 여기서 크립틱 스플라이스 부위는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 식별되었고, 크립틱 스플라이스 부위 중 적어도 하나는 적어도 하나의 부위에서 스플라이싱 빈도를 줄이도록 변형되었지만, 이에 의해 암호화된 아미노산은 변경되지 않는다. ABCA4 엑손 1 내지 22에서 식별된 예시적인 크립틱 스플라이스 부위와 이러한 부위에서의 스플라이싱 빈도는 표 3에 제시되어 있다. 표에서 rtm_pos 헤더가 있는 열에 표시된 뉴클레오타이드 위치는 ATG 코돈(번역 개시 부위)에 대한 열 3 또는 열 4에 표시된 마지막 뉴클레오타이드의 위치를 이싱 분자에 대한 RT-qPCR 검사 방법론을 나타낸 개략도이다. 5' 태그 트랜스-스플라이지칭하며, 이 코돈의 A는 1번 위치로 지정되어 있다. 예시적인 내성 크립틱 스플라이스 ABCA4 엑손 1 내지 22 서열은 서열번호 56 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 예시적인 내성 크립틱 스플라이스 ABCA4 엑손 1 내지 22 서열은 서열번호 56을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0070] 본 명세서에서 사용되는 "스플라이싱 도메인"은 스플라이소좀에 의해 인식되고 트랜스-스플라이싱을 매개하는 모티프를 갖는 핵산 서열을 지칭한다. 스플라이싱 도메인은 스플라이스 부위(예를 들어, 단일 스플라이스 부위, 즉, 단 하나의 스플라이스 부위)를 포함하며, 이는 3' 스플라이스 부위 또는 5' 스플라이스 부위일 수 있다. 스플라이싱 도메인은 다른 조절 요소를 포함할 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 스플라이싱 도메인은 스플라이싱 인핸서(예를 들어, 엑손 스플라이싱 인핸서(ESE) 및 인트론 스플라이싱 인핸서(ISE))를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스플라이싱 도메인은 GUAAGT 또는 GTAAGT를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 부위는 GUAAGT 또는 GTAAGT로 본질적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 부위는 GUAAGT 또는 GTAAGT로 이루어진다.

[0071] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 트랜스 스플라이싱 분자의 "결합 도메인"은 하이브리디제이션(즉, 결합 부위에 대한 완전 또는 부분적 상보성)을 통해 결합 부위에서 표적 유전자에 결합하는 폴리뉴클레오타이드 서열이다.

[0072] 본 명세서에서 사용되는 용어 "결합 부위"는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 결합 도메인에 의해 결합된 표적 mRNA(예를 들어, 내인성 유전자의 mRNA, 예를 들어, *ABCA4*)의 내인성 폴리뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 결합 부위는 결합 도메인에 의해 결합된 5'-최단부 뉴클레오타이드에서 결합 도메인에 의해 결합된 3'-최단부 뉴클레오타이드까지 연장된다. 일부 실시형태에서, 결합 부위는 결합 도메인과 동일한 길이이다. 다른 실시형태에서, 결합 부위는 결합 도메인보다 1 내지 10개 잔기 더 길거나 더 짧다(즉, 결합 부위 또는 결합 도메인의 일부 잔기는 혼성화되지 않음). 결합 부위에 대해 적어도 80% 상보성을 갖는 적어도 두 개의 비중첩 서열을 갖는 결합 도메인을 포함하는 실시형태에서, 결합 부위는 결합 도메인보다 상당히 더 짧을 수 있다.

[0073] 본 명세서에서 사용되는 "상보성" 및 그 문법적 변형은 주어진 서열의 뉴클레오타이드 염기가 참조 서열과 수소 결합을 통해 쌍을 이루는 백분율을 지칭한다. 주어진 백분율의 상보성이 없는 경우, 용어 "상보성" 및 "상보적"은 100% 상보성을 지칭한다.

[0074] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 주어진 서열(예를 들어, 결합 도메인 서열)은 주어진 서열의 각각의 뉴클레오타이드 염기가 수소 결합을 통해 참조 서열과 쌍을 이루고, 이에 따라 혼성화하여 이중 가닥 서열을 형성하는 경우(예를 들어, 왓슨-크릭 염기 쌍을 통해, 예를 들어, 각각의 A가 T 또는 U와 쌍을 이루고, 각 C가 G와 쌍을 이루는 경우) 참조 서열(예를 들어, 내인성 프리-mRNA 결합 부위)과 "100% 상보적"이거나 "100% 상보성"을 갖는다. 예를 들어, 결합 부위에 대해 안티센스 방향인 결합 도메인은 결합 부위와 상보적이다. RNA 쌍은 G와 U(워블 염기 쌍) 쌍을 포함하기 때문ㅇ, 결합 부위와 G-U 쌍을 이루는 RNA 결합 도메인은 결합 부위와 100% 상보적일 수 있다. 따라서, 결합 부위의 정확히 역상보성인 결합 도메인(즉, 결합 도메인의 A가 결합 부위의 U와 쌍을 이룸)은 결합에 실질적으로 영향을 미치지 않고 하나 이상의 A를 G로 대체하도록 변형될 수 있다.

[0075] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 주어진 서열(예를 들어, 결합 도메인 서열)은 주어진 서열의 뉴클레오타이드 염기의 X%가 수소 결합을 통해 참조 서열과 쌍을 이루는 경우(예를 들어, 왓슨-크릭 염기 쌍을 통해, 예를 들어, A가 T 또는 U와 쌍을 이루고 C가 G와 쌍을 이루는 경우) 참조 서열(예를 들어, 내인성 프리-mRNA 결합 부위)과 "적어도 X% 상보적"이거나 "X% 상보성"을 갖는다. 예를 들어, 150개 염기 길이의 결합 도메인 서열은 150개 염기 길이의 결합 부위와 왓슨-크릭 염기 쌍을 통한 수소 결합을 통해 150개 잔기 중 최소 135개가 결합 부위와 쌍을 이루고, 불일치하는 뉴클레오타이드가 15개 이하인 경우, 그 결합 부위와 90% 이상 상보적이다.

[0076] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 결합 도메인과 인트론 사이의 "결합"은 결합 도메인과 표적 인트론 사이의 수소 결합(예를 들어, 이중 나선 형성 또는 왓슨 크릭 페어링)을 의미하며, 이는 트랜스-스플라이싱 분자를 표적(예를 들어, 프리-mRNA)과 회합시켜 트랜스-스플라이싱을 매개하기에 충분한 정도이다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인과 표적 인트론 사이의 수소 결합은 서로 상보적이고 안티센스 방향으로(예를 들어, 서로 혼성화됨) 있는 뉴클레오타이드 염기 사이에 있다.

[0077] 결합 도메인의 서열은 표적 서열(예를 들어, 프리-mRNA)과 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 99.5% 상보적일 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열과 100% 상보적일 수 있다.

[0078] 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해서 4개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해서 3개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해서 2개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해서 1개 이하의 미스매치를 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 서열은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해서 미스매치가 없을 수 있다.

[0079] 결합 도메인은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 특이적으로 혼성화될 수 있다. 예를 들어, 결합 도메인은 프리-mRNA 전사체의 표적 서열에 대해 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5% 또는 100% 서열 상보성을 가질 수 있다. 일부 실시형태에서, 혼성화는 생리적 혼성화 조건(세포에서, 시험관내에서, 생체내에서)하에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, 혼성화는 높은 엄격성 혼성화 조건하에 있을 수 있다.

[0080] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 프리-mRNA의 표적 서열에 "특이적으로 혼성화"되거나 "특이적"이다. 이러한 혼성화는 일반적으로 37° C보다 상당히 높은 Tm, 보다 구체적으로는 적어도 50° C, 그리고 일반적으로 60° C에서 약 90° C 사이에서 발생한다. 이러한 혼성화는 보다 구체적으로 엄격한 혼성화 조건에 해당한다. 주어진 이온 강도 및 pH에서 Tm은 표적 서열의 50%가 상보적 올리고뉴클레오타이드에 혼성화되는 온도이다.

[0081] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "인공 인트론"은 결합 도메인을 CDS에 (직접 또는 간접적으로) 연결하는 비암호 핵산 서열을 지칭한다. 인공 인트론은 스플라이싱 도메인을 포함하고 하나 이상의 스페이서 서열 및/또는 다른 조절 요소를 추가로 포함할 수 있다.

[0082] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "돌연변이"는 결함이 있는 단백질 생성물(예를 들어, 비기능성 단백질 생성물, 비생물학적으로 활성인 단백질, 기능이 감소된 단백질 생성물, 기능이 비정상적인 단백질 생성물 및/또는 정상보다 적게 생성되거나 정상보다 많은 양으로 생성되는 단백질 생성물)을 유발하는 모든 비정상적인 핵산 서열을 지칭하는 데 사용될 수 있다. 돌연변이는 염기쌍 돌연변이(예를 들어, 단일 뉴클레오타이드 다형성), 미스센스 돌연변이, 프레임시프트 돌연변이, 결손, 삽입 및 스플라이스 돌연변이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 상응하는 야생형 핵산 서열 또는 이의 기능적 변이체와 서열의 하나 이상의 부분에서 다른 핵산 서열을 지칭한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이는 상응하는 야생형 단백질 또는 이의 기능적 변이체와 다른 아미노산 서열을 갖는 단백질을 암호화하는 핵산 서열을 지칭한다. "돌연변이된 엑손"(예를 들어, 돌연변이된 ABCA4 엑손)은 인트론의 돌연변이로 인해 발생하는 크립틱 엑손과 같이 다른 영역의 돌연변이를 반영하는 엑손 서열 또는 돌연변이를 포함하는 엑손을 지칭한다.

[0083] 용어 "ABCA4"(ATP Binding Cassette Subfamily A Member 4)는 영장류(예를 들어, 인간, 아프리카 녹색 원숭이 및 시노몰거스 원숭이) 및 설치류(예를 들어, 마우스 및 래트)와 같은 포유류를 포함한 모든 척추동물 출처의 임의의 천연 ABCA4(ARMD2, CORD3, ABCR, FFM, 망막 특이적 인지질 수송 ATPase ABCA4, 스타가르트병 단백질, RIM ABC 수송체, RIM Proteinv, STGD1, RP19 또는 STGD로도 알려짐)를 지칭하며, 달리 표시되지 않는 한, 기능적으로 동등하거나 개선된 변이체(예를 들어, 자연 또는 합성 변이체), 돌연변이체, 뮤테인, 유사체, 소단위, 수용체 복합체, 아이소타입, 스플라이스 변이체 및 이의 단편을 지칭한다. 기능적으로 동등하거나 개선된 변이

체는 알려진 ABCA4 신호 전달을 기준으로 결정할 수 있다. ABCA4는 전장 미처리 ABCA4뿐만 아니라 세포에서 자연적으로 처리된 결과인 임의의 형태의 ABCA4를 포함한다. 예시적인 인간 ABCA4 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence: NG_009073.1로서 제공된다. 일부 예에서, ABCA4는 서열번호 11과 적어도 95% 서열 동일성(예를 들어, 서열번호 11과 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 치료용 유전자, 이의 기능적 부분 및/또는 이의 코돈 최적화된 변이체에 의해서 암호화된다.

[0084] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "변이체"는 자연 발생 폴리뉴클레오타이드 서열과 같은 참조 폴리뉴클레오타이드 서열과 적어도 하나의 핵산 잔기가 상이한 폴리뉴클레오타이드를 지칭하거나, 자연 발생 폴리펩타이드 서열 또는 예를 들어, 본 명세서에 기재된 rAAV 서열 중 하나와 같은 참조 폴리펩타이드 서열과 적어도 하나의 아미노산 잔기가 다른 폴리펩타이드(예를 들어, AAV 캡시드 서열)를 지칭한다. 이 맥락에서 적어도 하나의 잔기의 차이는 예를 들어, 핵산 잔기의 다른 핵산으로의 치환, 결실 또는 삽입 또는 아미노산 잔기의 다른 아미노산으로의 치환을 포함할 수 있다. 변이체는 본 명세서에서 정의된 바와 같은 폴리뉴클레오타이드의 동족체, 아이소폼 또는 전사체 변이체일 수 있으며, 여기서 동족체, 아이소폼 또는 전사체 변이체는 각각 본 명세서에서 정의된 바와 같은 동일성 또는 상동성의 정도를 특징으로 한다.

[0085] 일부 예에서, 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드의 변이체는 적어도 하나의 핵산 치환(예를 들어, 1 내지 100개의 핵산 또는 아미노산 치환, 1 내지 50개의 핵산 또는 아미노산 치환, 1 내지 20개의 핵산 또는 아미노산 치환, 1 내지 10개의 핵산 또는 아미노산 치환, 예를 들어, 1 핵산 또는 아미노산 치환, 2 핵산 또는 아미노산 치환, 3 핵산 또는 아미노산 치환, 4 핵산 또는 아미노산 치환, 5 핵산 또는 아미노산 치환, 6 핵산 또는 아미노산 치환, 7 핵산 또는 아미노산 치환, 8 핵산 또는 아미노산 치환, 9 핵산 또는 아미노산 치환 또는 10 핵산 또는 아미노산 치환)을 포함한다. 동일한 클래스의 아미노산이 교환된 발현된 폴리펩타이드를 초래하는 핵산 치환은 본 명세서에서 보존적 치환으로 지칭된다. 특히, 이는 지방족 측쇄, 양전하 또는 음전하 측쇄, 측쇄 또는 아미노산에 방향족기 또는 수소 다리를 형성할 수 있는 측쇄, 예를 들어, 하이드록실 작용기를 갖는 측쇄를 갖는 아미노산이다. 보존적 작제에 의해, 예를 들어, 극성 측쇄를 갖는 아미노산은 상응하는 극성 측쇄를 갖는 다른 아미노산으로 대체될 수 있거나, 예를 들어, 소수성 측쇄를 특징으로 하는 아미노산은 상응하는 소수성 측쇄를 갖는 다른 아미노산으로 대체될 수 있다(예를 들어, 세린(트레오닌)은 트레오닌(세린)으로, 류신(이소류신)은 아이소류신(류신)으로).

[0086] 일부 경우에, 삽입, 결손 및/또는 비보존적 치환도 변이체라는 용어에 포함되며, 예를 들어, 단백질의 3차원 구조에 실질적인 변형을 일으키지 않는 위치에서의 변형이 이에 해당한다. 삽입(들) 또는 결실(들)에 의한 3차원 구조의 변형은 예를 들어, CD 스펙트럼(원형 이색성 스펙트럼)을 사용하여 당업자가 쉽게 결정할 수 있다.

[0087] 용어 "상동성"은 2개의 핵산 서열의 서열 간의 동일성의 정도를 지칭한다. 상동성 서열의 상동성은 비교될 서열에 걸쳐 최적의 조건 하에 정렬된 2개의 서열을 비교하는 것에 의해 결정된다. 본 명세서에서 비교될 서열은 2개의 서열의 최적 정렬에서 부가 또는 결실 (예를 들어, 갭 등)이 있을 수 있다. 이러한 서열 상동성은, 예를 들어, ClustalW 알고리즘(Nucleic Acid Res., 1994, 22(22): 4673 4680)을 사용하여 정렬을 생성시키는 것에 의해 계산될 수 있다. 통상적으로 입수 가능한 서열 분석 소프트웨어, 예컨대, Vector NTI, GENETYX, BLAST 또는 공공 데이터베이스가 제공하는 분석 도구가 또한 사용될 수 있다.

[0088] 본 명세서에서 사용되는 용어 "AAV" 또는 "AAV 혈청형"은 수십 개의 자연 발생 및 이용 가능한 아데노 연관 바이러스와 인공 AAV를 지칭한다. 인간 또는 비인간 영장류(NHP)에서 단분리 또는 조작되어 잘 특징규명된 AAV 중에서 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로 개발된 최초의 AAV이고; 이는 다양한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험에 널리 사용되었다.

[0089] 본 명세서에서 AAV와 관련하여 사용되는 용어 변이체는 알려진 AAV 서열에서 유래된 임의의 AAV 서열을 의미하며, 이것은 아미노산 또는 핵산 서열에 걸쳐 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 그 초과의 서열 동일성을 공유하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 임의의 설명되거나 알려진 AAV 캡시드 서열로부터 최대 약 10%의 변형을 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본 명세서에서 제공되고/되거나 당업계에 알려진 AAV 캡시드와 약 90%의 동일성 내지 약 99.9%의 동일성, 약 95% 내지 약 99%의 동일성 또는 약 97% 내지 약 98%의 동일성을 공유한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV 캡시드와 적어도 95%의 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 동일성 백분율을 결정할 때, 비교는 가변 단백질(예를 들어, vp1, vp2 또는 vp3) 중 임의의 것에 대해 이루어질 수 있다.

[0090] ITR 또는 다른 AAV 구성 요소는 당업자에게 이용 가능한 기술을 사용하여 AAV에서 쉽게 분리 또는 조작될 수 있

다. 이러한 AAV는 학술적, 상업적 또는 공공 공급원(예를 들어, American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스 소재)에서 단리, 조작 또는 획득될 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 문헌 또는 GenBank, PubMed 또는 이와 유사한 데이터베이스에서 이용 가능한 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 기타 적합한 수단을 통해 조작될 수 있다. AAV 바이러스는 통상적인 분자 생물학 기술로 조작될 수 있으며, 이를 통해 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성 최소화, 안정성 및 입자 수명 조정, 효율적인 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 이러한 입자를 최적화할 수 있다.

[0091] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "대상체", "개체" 또는 "환자"는 인간과 같은 영장류를 포함하여 이러한 치료 또는 예방 방법을 필요로 하는 임의의 포유동물을 포함한다. 이러한 치료 또는 예방을 필요로 하는 다른 포유동물은 비인간 영장류(NHP; 예를 들어, 시노몰거스 원숭이 및 아프리카 녹색 원숭이), 개, 고양이 또는 기타 가축, 말, 가축, 실험 동물(예를 들어, 마우스, 래트 또는 토끼) 등을 포함한다. 개체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 일 실시형태에서, 개체는 ABCA4 유전자의 돌연변이로 인한 질환 또는 장애(예를 들어, ABCA4-연관 망막 질환)를 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 ABCA4 유전자의 돌연변이로 인한 질환 또는 장애가 발병할 위험이 있다. 또 다른 실시형태에서, 개체는 ABCA4 유전자의 돌연변이로 인한 질환 또는 장애, 예를 들어, ABCA4-연관 망막 질환의 임상 징후를 나타내었다. 개체는 치료 또는 예방 요법이 유익할 수 있는 모든 연령일 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서 개체는 0 내지 5세, 5내지 10세, 10 내지 20세, 20 내지 30세, 30 내지 50세, 50 내지 70세 또는 70세 초과이다. 또 다른 실시형태에서 개체는 12개월 이상, 18개월 이상, 2세 이상, 3세 이상, 4세 이상, 5세 이상, 6세 이상, 7세 이상, 8세 이상, 9세 이상 또는 10세 이상이다. 다른 실시형태에서 개체는 생존 가능한 망막 세포(예를 들어, 부분적 시각 기능 또는 전체 시각 기능을 유지하기에 충분한 생존 가능한 망막 세포)를 갖는다.

[0092] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "돌연변이와 연관된 장애" 또는 "장애와 연관된 돌연변이"는 용어는 장애와 돌연변이 사이의 상관관계를 지칭한다. 일부 실시형태에서, 돌연변이와 연관된 장애는 전체적으로 또는 부분적으로 또는 직접적으로 또는 간접적으로 돌연변이에 의해 야기되는 것으로 공지되어 있거나 또는 예측된다. 예를 들어, 돌연변이를 갖는 개체는 장애가 발생할 위험이 있을 수 있고, 이러한 위험은 다른 요인, 예컨대 다른(예를 들어, 독립적인) 돌연변이(예를 들어, 동일하거나 또는 상이한 유전자 내의 것) 또는 환경적 요인에 추가적으로 의존적일 수 있다.

[0093] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료" 또는 이의 문법적 파생어는 질환의 진행을 감소시키는 것, 질환 증상의 중증도를 감소시키는 것, 질환 증상의 진행을 지연시키는 것, 질환 증상을 제거하는 것 또는 질환 발병을 지연시키는 것으로 정의된다. 일부 실시형태에서, 용어 "치료"는 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기와 같은 치료제의 지속적 또는 지속적인 효과를 지칭하는 데 사용된다. 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기의 지속적인 치료 효과를 입증하는 증거는 예를 들어, 도 22 및 도 31에 제시된다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에서 제공된 치료의 효과는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6개월 이상 지속된다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 평생 동안 단 한 번 투여된다.

[0094] 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 용어 장애의 "예방"은 용어 또는 이의 문법적 파생어는 질환 발병의 위험을 감소시키는 것, 예를 들어, 돌연변이와 연관된 장애가 발병할 위험이 있는 대상체에 대한 예방 요법으로서 정의된다. 대상체는 관련 기술분야에 공지되어 있거나 또는 본 명세서에 기재된 임의의 적절한 방법에 따라 장애와 연관된 돌연변이를 확인하는 것에 의해 장애가 발생할 "위험이 있는" 것으로 특징규명될 수 있다. 일부 실시형태에서, 장애가 발생할 위험이 있는 대상체는 장애와 연관된 하나 이상의 ABCA4 돌연변이가 있다. 추가적으로 또는 대안적으로, 대상체에 장애의 가족력이 있으면 대상체가 장애가 발생할 "위험이 있는" 것으로 특징규명될 수 있다.

[0095] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "ABCA4-관련 망막병증"은 ABCA4의 돌연변이와 연관된 질환/병태를 포함하고, 이것은 예를 들어, 스타르가르트병-1(STGD1); 황반 안저, 망막색소변성증-19(RP19); 원뿔세포 막대세포 이영양증-3(CORD3); 및 노인성 황반 변성-2(ARMD2)를 포함한다.

[0096] 개체에서 장애를 치료 또는 예방하는 것은 (예를 들어, 벡터, 예를 들어, AAV 벡터 또는 AAV 입자 내의) 트랜스-스플라이싱 분자 또는 RNA 엑손 편집기를 대상체에게 직접 투여하는 것에 의해 수행될 수 있다. 대안적으로, 트랜스-스플라이싱 분자를 함유하는 숙주 세포를 개체에게 투여할 수 있다.

[0097] 본 명세서에서 기술하는 방법에서 사용되는 용어 "투여" 또는 이의 문법적 파생어는 (예를 들어, 벡터, 예를 들어, AAV 벡터 또는 AAV 입자 내의) 트랜스-스플라이싱 분자 또는 RNA 엑손 편집기 또는 이의 조성물 또는 생체외 처리된 세포를 이를 필요로 하는 개체, 예를 들어, ABCA4에 돌연변이 또는 결함이 있는 개체에게 전달하는

것을 지칭한다. 예를 들어, 안구 세포(예를 들어, 광수용체)가 표적화된 일 실시형태에서, 방법은 (예를 들어, 벡터, 예를 들어, AAV 벡터 또는 AAV 입자 내의) 트랜스-스플라이싱 분자 또는 RNA 엑손 편집기 이의 조성물을 망막하 주사에 의해 개체에게 전달하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 유리체내 주사 또는 눈꺼풀 정맥을 통한 주사가 투여로서 수행될 수 있다. 다른 실시형태에서, 조성물은 전신적으로(예를 들어, 정맥내) 투여된다. 본 개시내용을 고려하여, 당업자는 여전히 다른 투여 방법을 선택할 수 있다.

[0098] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "ABCA4의 발현 조절"은 내인성 돌연변이(비기능적) ABCA4의 발현을 감소시키고/시키거나 트랜스-스플라이싱된 ABCA4의 발현을 증가시키는 것을 지칭한다. ABCA4의 발현을 조절한다는 것은 예를 들어, 내인성(예를 들어, 돌연변이된) ABCA4의 발현을 감소시키거나 트랜스-스플라이싱된 ABCA4의 발현을 증가시키는 것을 지칭하는 데 사용될 수 있다(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자 매개된 교정된 돌연변이 부위를 내인성 돌연변이 전사체 또는 단백질 생성물에 비해 갖는 ABCA4 전사체 또는 단백질 생성물). 돌연변이 부위를 포함하는 내인성 ABCA4 엑손을 트랜스-스플라이싱을 통해 대체하면 기능적 ABCA4 단백질이 발현된다.

[0099] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, "코돈 최적화"는 암호화된 아미노산에 어떠한 결과적인 변화 없이 개별 핵산을 변경하기 위해 핵산 서열을 변형시키는 것을 지칭한다. 이러한 방식으로 변형된 서열은 본 명세서에서 "코돈-최적화된"으로 지칭된다. 이러한 프로세스는 발현 또는 안정성을 강화하도록 본 명세서에서 기술된 임의의 서열 상에서 수행될 수 있다. 코돈 최적화는, 예를 들어, 미국 특허 번호 제7,561,972호, 제7,561,973호 및 제7,888,112호에 기술된 것과 같은 방식으로 수행될 수 있고, 상기 특허 각각은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 번역 시작 부위 주변의 서열이 공지된 방법에 따라 공통 코작 서열로 변환될 수 있다. 예를 들어, 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된 문헌 [Kozak et al, 1987. Nucleic Acids Res. 15 (20): 8125-8148]을 참조한다.

[0100] 용어 "약제학적으로 허용 가능한"은 포유동물, 예컨대 인간에게 투여하기에 안전한 것을 의미한다. 일부 실시형태에서, 약제학적으로 허용 가능한 조성물은 동물, 보다 특별하게는 인간에서 사용하는 것에 대해 연방 또는 주 정부의 규제 기관에 의해 승인되거나 또는 미국 약전 또는 다른 일반적으로 인정되는 약전에 열거된 것이다.

[0101] 용어 "담체"는 치료용 분자(예를 들어, 본 발명의 트랜스-스플라이싱 분자 또는 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 벡터 또는 세포)가 이와 함께 투여되는 희석제, 아주반트, 부형제 또는 비히클을 지칭한다. 적절한 약제학적 담체의 예가 문헌["Remington's Pharmaceutical Sciences," Mack Publishing Co., Easton, PA., 18th edition]에 기술되어 있다.

[0102] 용어 "하나"는 "하나 이상"을 의미한다. 예를 들어, "유전자"는 하나 이상의 이러한 유전자를 나타내는 것으로 이해된다. 따라서, 용어 "하나", "하나 이상의", 및 "적어도 하나의"는 본 명세서에서 상호 교환 가능하게 사용된다.

[0103] 달리 명시되지 않는 한, 단일 가닥 핵산(예를 들어, 프리-mRNA 전사체, 올리고뉴클레오타이드 등) 서열의 좌측 단부는 5' 단부이고, 단일 또는 이중 가닥 핵산 서열의 좌측 방향은 5' 방향이라고 지칭된다. 마찬가지로, 핵산 서열(단일 또는 이중 가닥)의 우측 단부 또는 방향은 3' 단부 또는 방향이다. 일반적으로, 핵산의 참조 지점에서 5'인 영역 또는 서열은 "상류"라고 지칭하며, 핵산의 참조 지점에서 3'인 영역 또는 서열은 "하류"라고 지칭한다. 일반적으로, mRNA의 5' 방향 또는 단부는 개시 또는 시작 코돈이 위치한 곳이고, 3' 단부 또는 방향은 종결 코돈이 위치한 곳이다.

[0104] 본 명세서에서 사용되는 바와 같이, 용어 "약"은 달리 명시되지 않는 한 참조값으로부터 ±10% 가변성 이내의 값을 지칭한다.

[0105] **II. 트랜스-스플라이싱 분자**

[0106] 엑손 편집기 설계 및 발견은 엑손 편집기 라이브러리의 차세대 서열결정(NGS) 기반 스크리닝 그 다음 계산 분석뿐만 아니라 개별 엑손 편집기의 형질주입 그 다음 RNA 대체 효율을 평가하기 위한 RT-qPCR 분석, 단백질 구제를 평가하기 위한 웨스턴 블롯 분석을 포함하는 조합된 접근법을 사용한다. 전자의 접근법식은 다중 병렬 처리량의 힘과 함께 과거 스크리닝에서 얻은 합리적인 설계와 누적 지식을 활용하고, 후자의 접근법은 새로운 가설을 시험하고 NGS 기반 방법에서 얻은 결론을 검증하는 데 사용된다.

[0107] 본 명세서에는 적어도 하나의 돌연변이된 ABCA4 엑손을 기능적 ABCA4 엑손(예를 들어, 결합 부위의 5'에 있는 ABCA4 엑손, 예를 들어, ABCA4의 엑손 1 내지 22)로 대체함으로써 ABCA4의 돌연변이를 교정하는 데 유용한 핵산 트랜스-스플라이싱 분자가 제공된다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 pre-RNA 트랜스-스플라이싱 분자(RTM)이다. 트랜스-스플라이싱 분자의 설계는 프리-mRNA 엑손(들)의 결함 또는 돌연변이된 부분을

핵산 서열, 예를 들어, 돌연변이가 없는 기능적(예를 들어, 정상) 서열을 갖는 엑손으로 대체하는 것을 허용한다. 기능적 서열은 일부 다른 변형, 예를 들어, 코돈 최적화를 갖는 야생형, 자연 발생 서열 또는 교정된 서열일 수 있다.

[0108] 트랜스-스플라이싱 분자는 결합 도메인, 스플라이싱 도메인 및 CDS를 포함한다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 천연 5' ABCA4 미번역 영역(예를 들어, 서열번호 12 내지 15 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성을 갖느 서열)을 갖는 5' 조절 도메인을 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 GUAAGT 또는 GTAAGT의 스플라이스 부위를 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 25개 초과의 뉴클레오타이드 길이인 링커 도메인을 갖는다. 일부 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인을 갖는다.

[0109] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 미번역 영역, 암호 도메인 서열(예를 들어, CDS, 예를 들어, ABCA4 엑손의 기능적 서열, 예를 들어, 결합 부위의 5'에 있는 ABCA4 엑손의 기능적 서열을 암호화하는 서열), 스플라이싱 도메인(예를 들어, 스플라이스 부위), 링커 도메인, 결합 도메인, 3' 하류 영역 및 종결인자 도메인을 포함한다.

[0110] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 표적 인트론 22에 결합하고, 5' ABCA4 엑손의 기능적 서열을 갖는 CDS가 표적 인트론의 3'에 있는 내인성 ABCA4 엑손으로 트랜스-스플라이싱하는 것을 매개함으로써 ABCA4 유전자(예를 들어, 인트론 22의 5' 영역)의 5' 영역에 위치한 적어도 하나의 돌연변이(예를 들어, 2개의 상이한 돌연변이, 각각의 돌연변이는 대상체에서 ABCA4 유전자의 상이한 대립유전자에 존재함)를 교정하도록 구성된다. 따라서 이러한 트랜스-스플라이싱은 결함이 있는 엑손/들을 대체하고 표적 프리-mRNA의 결함이 있는 부분을 제거함으로써 개체의 표적 세포에서 결함이 있는 ABCA4 유전자를 복구하고, 세포에서 기능적 ABCA4 단백질을 전사할 수 있는 기능적 ABCA4 mRNA를 생성한다.

[0111] 일부 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱 분자는 최대 5,000개 뉴클레오타이드 염기 길이, 예를 들어, 최대 4,900개 뉴클레오타이드 염기 길이, 최대 4,800개 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 최대 4,700개 뉴클레오타이드 염기 길이(예를 들어, 3,000 내지 4,000개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,100 내지 3,800개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,200 내지 3,700개 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 from 3,300 내지 3,500개 뉴클레오타이드 염기 길이, 예를 들어, 3,000 내지 3,100개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,100 내지 3,200개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,200 내지 3,300개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,300 내지 3,400개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,400 내지 3,500개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,500 내지 3,600개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,600 내지 3,700개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,700 내지 3,800개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,800 내지 3,900개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,900 내지 4,000개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,000 내지 4,100개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,100 내지 4,200개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,200 내지 4,300개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,300 내지 4,400개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,400 내지 4,500개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,500 내지 4,600개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,600 내지 4,700개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,700 내지 4,800개 뉴클레오타이드 염기 길이, 4,800 내지 4,900개 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 4,900 내지 5,000개 뉴클레오타이드 염기 길이)이다.

[0112] ABCA4 유전자의 큰 크기 및 AAV 전달의 크기 제약으로 인해 AAV 벡터 내에서 패키징을 위해 구성된 단일 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자 암호화 서열)는 장애와 연관될 수 있는 ABCA4 유전자의 모든 돌연변이를 포괄하지 못할 수 있으며, 따라서 전체 ABCA4 유전자의 길이를 따라 돌연변이를 교정하지 못할 수 있다. 따라서, 본 명세서 설명된 트랜스-스플라이싱 분자는 아래에 기재된 방법의 일부로 적용되어 ABCA4 유전자의 전체 길이를 따라 여러 돌연변이를 교정할 수 있다.

[0113] *ABCA4*

[0114] 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자가 표적으로 하는 ABCA4 유전자는 ABCA4-연관 망막 이영양증과 연관된(스타르가르트병 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증과 같은 질환을 유발하거나 이와 관련된) 하나 또는 다중 돌연변이를 포함할 수 있다. 예시적인 인간 ABCA4 서열은 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Reference Sequence: NG_009073로서 제공된다. 공개된 서열 외에도 나중에 얻은 모든 교정 또는 인간 또는 다른 포유동물 집단에서 발생하는 자연적으로 발생하는 보존적이고 질환을 유발하지 않는 변이체 서열도 포함된다. 추가적인 보존적 뉴클레오타이드 대체 또는 코돈 최적화를 유발하는 것이 또한 포함된다. 데이터베이스 수탁 번호에 의해 제공된 서열은 또한 동일하거나 다른 포유류 유기체에서 상동 서열을 검색하는 데 사용될

수 있다.

[0115] ABCA4 핵산 서열 및 발현된 결과 단백질은 예를 들어 침묵 뉴클레오타이드 염기, 예를 들어 선호 코돈에 대한 변형을 포함하도록 핵산 수준에서 특정 사소한 변형을 허용할 것으로 예상된다. 다른 실시형태에서, 아미노산을 변경하는 핵산 염기 변형, 예를 들어 결과 펩타이드/단백질의 발현을 개선하기 위한 변형(예를 들어, 코돈 최적화)이 구상된다. 일부 실시형태에서, 유전 암호의 자연적 축퇴로 인해 발생하는 대립유전자 변형의 변형이 구상된다.

[0116] 또한 ABCA4 유전자의 변형으로 포함되는 것은 암호화된 아미노산 서열의 유사체 또는 변형된 버전이다. 일반적으로 이러한 유사체는 특별히 식별된 단백질과 단 1 내지 4개의 코돈 변화만 다르다. 보존적 대체는 측쇄 및 화학적 특성이 관련된 아미노산 계열 내에서 발생하는 대체이다.

[0117] 기능적 ABCA4 유전자의 핵산 서열은 기능적 ABCA4 또는 그 동족체를 본래부터 발현하는 모든 포유동물로부터 유래될 수 있다. 다른 실시형태에서, 표적 세포에서의 발현을 강화하기 위해 ABCA4 유전자 서열에 특정 변형이 이루어진다. 이러한 변형은 코돈 최적화를 포함한다.

[0118] 돌연변이, 특히 ABCA4 엑손은 예를 들어, 본 명세서에 참조에 의해 포함된 국제 특허 공개 번호 WO 2017/087900에 열거되어 있다.

[0119] 본 명세서 상기에 기재된 바와 같이, ABCA4 망막병증은 상염색체 열성 방식으로 유전되는 ABCA4 유전자의 병원성 변이체에 의해 발생한다. 이러한 병원성 변이체(돌연변이)는 미스센스, 넌센스, 스플라이싱, 구조적 및 심부 인트론 변이체를 포함한다. 미스센스 변이체는 ABCA4 망막병증과 관련된 대부분의 변이체를 차지한다. ABCA4 망막병증이 있는 개체의 경우, 개체는 각각의 대립유전자에서 ABCA4에 돌연변이가 있다. 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 조성물은 ABCA4 유전자 내의 돌연변이 위치에 관계없이 두 대립유전자 모두의 돌연변이를 교정할 수 있다. 예를 들어, 첫 번째 대립유전자에 돌연변이된 ABCA4 엑손 2가 있고 두 번째 대립유전자에 돌연변이된 ABCA4 엑손 9가 있는 개인의 경우, 엑손 1 내지 22를 암호화하는 단일 5' 트랜스-스플라이싱 분자(5' RNA 편집 분자)를 사용하여 돌연변이된 ABCA4 엑손 2와 돌연변이된 ABCA4 엑손 9를 대체할 수 있다. 예를 들어, 도 14A를 참조한다. 따라서 일부 실시형태에서, 두 개 이상의 돌연변이가 두 개 이상의 돌연변이를 포함하는 동일한 트랜스-스플라이싱 분자로 대체될 수 있는 ABCA4 유전자의 일부에 위치하는 경우, 기능적 ABCA4 엑손/엑손을 포함하는 암호 영역을 갖는 단일 트랜스-스플라이싱 분자는 돌연변이를 포함하는 하나 이상의 엑손을 대체할 수 있다.

[0120] 대안적으로, 일부 실시형태에서, 개체는 ABCA4 유전자 내의 먼 엑손에서 돌연변이를 포함하는 ABCA4 돌연변이를 갖는다. 예를 들어, 개체가 이러한 첫 번째 대립유전자에 돌연변이된 ABCA4 엑손 2를 갖고 두 번째 대립유전자에 돌연변이된 ABCA4 엑손 49를 갖는 경우, 두 RNA 편집 분자를 함께(예를 들어, 조성물에서) 사용하여 돌연변이된 엑손 각각을 대체할 수 있다. 이러한 접근법은 돌연변이된 ABCA4 엑손 2를 대체하기 위해 5' 트랜스-스플라이싱 분자를 사용하고 돌연변이된 ABCA4 엑손 49를 대체하기 위해 3' 트랜스-스플라이싱 분자를 사용하는 것을 포함한다. 이러한 실시형태에서, 두 트랜스-스플라이싱 분자는 동일한 AAV 벡터의 일부로 공동 전달되거나 별도의 AAV 벡터로 전달될 수 있다(예를 들어, 두 트랜스-스플라이싱 분자가 모두 AAV의 패키징 한계를 초과하는 경우).

[0121] 암호 도메인 서열

[0122] 일부 실시형태에서, 5' 트랜스-스플라이싱 분자의 CDS는 표적 ABCA4 인트론(예를 들어, ABCA4 인트론 22)의 5'에 존재하는 모든 ABCA4 엑손(예를 들어, 기능적 ABCA4 엑손)을 포함한다. 예를 들어, 5' 트랜스-스플라이싱 분자가 ABCA4 인트론 22를 표적으로 하는 실시형태에서, CDS는 기능적 ABCA4 엑손 1 내지 22를 포함할 수 있다. 이러한 실시형태에서, CDS는 2,000 내지 4,500bp 길이일 수 있다. 일부 예에서, 표적 유전자의 5' 부분에 대립유전자 돌연변이가 발생하고, 5' 트랜스-스플라이싱 분자는 두 돌연변이 모두를 교정하도록 선택된다. 일 실시형태에서, 결합 도메인은 인트론 22에 결합하고, CDS는 기능적 ABCA4 엑손 1 내지 22를 포함한다.

[0123] 일부 실시형태에서, (예를 들어, RTM을 암호화하는 트랜스진)의 CDS-는 돌연변이된 ABCA4 엑손/들을 대체하기 위해서 ABCA4 엑손(예를 들어, 기능적 ABCA4 엑손)의 cDNA를 포함한다. 예를 들어, CDS 내의 하나 이상의 기능적 ABCA4 엑손은 cDNA 서열일 수 있다. 일부 실시형태에서, 전체 CDS는 cDNA 서열이다. 추가로 또는 대안적으로, CDS 또는 이의 하나 이상의 기능적 ABCA4 엑손의 전부 또는 일부는 자연 발생 서열(예를 들어, 내인성 ABCA4 엑손과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 서열 동일성을 갖는 서열)일 수 있다.

[0124] 일부 실시형태에서, CDS 또는 이의 하나 이상의 기능적 ABCA4 엑손의 전부 또는 일부는 암호화된 아미노산의 변

화를 초래하지 않으면서, 예를 들어, 발현 또는 안정성을 향상시키기 위해서, 핵산 서열이 변형된 코돈 최적화된 서열이다. 코돈 최적화는, 예를 들어, 미국 특허 번호 제7,561,972호, 제7,561,973호 및 제7,888,112호에 기술된 것과 같은 방식으로 수행될 수 있고, 상기 특허 각각은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 재조합 AAV를 통한 전달을 위해서, 일 실시형태에서, CDS는 최대 4,000개 뉴클레오타이드 염기 길이(예를 들어, 3,000 내지 4,000개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,100 내지 3,800개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,200 내지 3,700개 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 3,300 내지 3,500개 뉴클레오타이드 염기 길이, 예를 들어, 3,000 내지 3,100개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,100 내지 3,200개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,200 내지 3,300개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,300 내지 3,400개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,400 내지 3,500개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,500 내지 3,600개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,600 내지 3,700개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,700 내지 3,800개 뉴클레오타이드 염기 길이, 3,800 내지 3,900개 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 3,900 내지 4,000개 뉴클레오타이드 염기 길이, 예를 들어, 약 3,108 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,285 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,375 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,503 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,630개 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,540개 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,363 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,273 뉴클레오타이드 염기 길이, 약 3,145 뉴클레오타이드 염기 길이 또는 약 3,018 뉴클레오타이드 염기 길이)의 핵산 서열일 수 있다.

[0125] 일부 실시형태에서, CDS의 전체 또는 일부 또는 그 중 하나 이상의 기능적 ABCA4 엑손은 내부에 식별된 크립틱 스플라이스 부위를 돌연변이시키도록 변형된다. 본 발명자들은 결과에 대한 광범위한 실험 및 계산 분석을 통해 크립틱 스플라이스 부위가 본 명세서에 기재된 ABCA4 엑손 편집기의 일부 실시형태의 맥락에서 활용된다는 것을 발견하였다. 간략하면, 본 발명자들은 표적외(OFT) 라이브러리의 생성 및 그 생물정보학적 분석을 포함하여 광범위한 실험 및 분석을 수행하였으며, 놀랍게도 크립틱 스플라이싱이 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 발생하는 엑손 1 내지 22를 포함하는 ABCA4 암호 서열(CDS) 내의 수많은 위치를 발견하였다. 이러한 발견은 RNA 엑손 편집기(본 명세서에서 RNA 트랜스-스플라이싱 분자 또는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자라고도 함)가 크립틱 스플라이스 부위에서 스플라이싱을 겪을 수 있다는 이전에는 인식되지 않았던 문제를 밝혀냈는데, 이는 잠재적으로 하류 효과를 갖는 원치 않는 종류의 스플라이싱 변형으로 이어질 수 있다. 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 효율성과 트랜스-스플라이싱 분자의 충실도를 개선하고 크립틱 스플라이스 부위 활용 문제에 대한 해결책을 제공하기 위해, 크립틱 스플라이스 부위의 여러 서열을 동의어 돌연변이를 도입하여 크립틱 스플라이스 부위를 손상 및/또는 비활성화하도록 변형시켰다. 일부 실시형태에서, 변형된 크립틱 스플라이스 부위는 OFT 라이브러리의 생물정보학적 분석에서 검출된 크립틱 스플라이스 부위가 활용된 횟수를 기반으로 식별되었다. 일부 실시형태에서, 변형된 크립틱 스플라이스 부위는 크립틱 스플라이스 부위의 여러 사건을 하였다. 이러한 접근 방식은 암호화된 아미노산의 변화 없이 크립틱 스플라이스 부위 사용을 완화하기 위해 원하는 변형을 도입할 수 있는 유전 암호의 축퇴성을 이용한다. 예를 들어, 표 6 및 도 26을 참조한다.

[0126] 차세대 서열결정(NGS) 접근법을 사용하여, 본 발명자들은 크립틱 스플라이스 부위를 식별하고 엑손 1 내지 22를 포함하는 ABCA4 CDS 내의 각각의 다른 위치에서 크립틱 스플라이스 사용 빈도를 정량화하여, 크립틱 스플라이스 사용의 데이터 중심적, 우선순위화된 완화를 위한 프로토콜을 확립할 수 있었다. 표 3 및 도 26을 참조한다. 표 3에 표시된 바와 같이, 식별된 크립틱 스플라이스 부위는 크립틱 스플라이스 부위를 파괴하는 동의어 돌연변이를 포함하지 않는 서열에 매핑/통합된 백만당 평균 카운트(CPM) 판독으로 결정된 사용 빈도 순으로 정렬된다. 따라서, 그 결과 및 생물정보학적 분석은 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 개선된 특성 및 기능을 갖는 ABCA4 CDS를 생성하기 위해 변형될 수 있는 ABCA4 엑손 1 내지 22의 크립틱 스플라이스 부위의 우선순위화된 목록을 확립한다.

[0127] 본 명세서에 제시된 결과에 따라, 본 발명자들은 크립틱 스플라이스 부위 완화를 위한 분석 및 설계가 가능한 경우 동의어 돌연변이의 도입을 통해 유리하게 구현될 수 있는 사용 빈도 임계값을 확립하였다. 표 6을 참조한다. 일부 실시형태에서, 표 3에 제시된 결과에 따른 임계값은 10CPM 이상이다.

[0128] 또한 NGS 접근법을 구현하여 동의어 돌연변이의 도입 후 크립틱 스플라이스 사용 빈도를 평가하였다. 표 3 및 도 26을 참조한다. 이러한 접근법에 의한 크립틱 스플라이스 부위 완화의 확인은 서열 변형(동의어 돌연변이)의 구조적 변화를 이에 따라 부여된 기능, 즉 크립틱 스플라이스 부위 내성 *ABCA4* CDS의 생성과 관련된다.

[0129] 일부 실시형태에서, RNA 엑손 편집기 분자, 예를 들어 ABCA4 엑손 편집기는 엑손 편집기 분자 내의 표적외 스플라이싱과 관련된 하나 이상의 부위에서 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다. 변경된 뉴클레오타이드 위치 중 하나 또는 전부는 표 3에 식별된 위치에 있을 수 있다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 다음 위치 중 하나 이상에서 뉴클레오타이드 변화를 갖고(예를 들어, 서열번호 56에 따른 넘버링), 아

래에 표시된 뉴클레오타이드 위치는 ATG 코돈의 G(번역 개시 부위)에 대해 완화된 크립틱 스플라이스 부위 뉴클레오타이드 서열의 5' 및 3' 단부 또는 이들의 임의의 조합을 나타낸다. 수행된 뉴클레오타이드 변화는 아래에 열거된 서열에서 밑줄로 표시된다. 또한 표 3을 참조한다.

[0130] 뉴클레오타이드 위치 3066-3086에 걸쳐 있는 서열:

[0131] ACATGCTGTTCTATGCCCAG(서열번호 91)

[0132] ACATGCTGTTCTATGCACAA(서열번호 92)

[0133] 뉴클레오타이드 위치 2911-2931에 걸쳐 있는 서열:

[0134] CACCTTGTCCATCCTCACAG(서열번호 93)

[0135] CACCTTGTCCATCCTCACTG(서열번호 94)

[0136] 뉴클레오타이드 위치 2556-2576에 걸쳐 있는 서열:

[0137] TCGCTTGGTACCTTGATCAG(서열번호 95)

[0138] TCGCTTGGTACCTTGATCAA(서열번호96)

[0139] 뉴클레오타이드 위치 3009-3029(교정된 스플라이스 부위)에 걸쳐 있는 서열:

[0140] GCCTTGGCATGTGTCCACAG(서열번호 97)

[0141] CCCTTGGCATGTGTCCACAA(서열번호 98)

[0142] 뉴클레오타이드 위치 107-127에 걸쳐 있는 서열:

[0143] CTGGTCTTGATCTGGTTAAG(서열번호 99)

[0144] CTGGTCTTGATCTGGTTACG(서열번호 100)

[0145] 뉴클레오타이드 위치 2328-2348에 걸쳐 있는 서열:

[0146] TCCTGTGCTTCGCCTGGCAG(서열번호 101)

[0147] TCCTGTGCTTCGCCTGGCAA(서열번호 102)

[0148] 뉴클레오타이드 위치 1815-1835에 걸쳐 있는 서열:

[0149] GCGGGTTTGCCTATCTGCAG(서열번호 103)

[0150] GCGGGTTTGCATATCTGCAA(서열번호 104)

[0151] 뉴클레오타이드 위치 1198-1218에 걸쳐 있는 서열:

[0152] CACTCCTGATTCACCTGCAG(서열번호 105)

[0153] CACTCCTGATTCACCTGCTG(서열번호 106)

[0154] 뉴클레오타이드 위치 3063 내지 3083에 걸쳐 있는 서열[아래에 표시된 뉴클레오타이드 변화는 위치 3086(위치 3083에 근접) 맥락에서 이루어진 변화의 결과이며 3083 위치의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트(tract) 및/또는 분기점을 교정하지 않음]:

[0155] AGCACATGCTGTTCTATGCC(서열번호 107)

[0156] AGCACATGCTGTTCTATGCA(서열번호 108)

[0157] 뉴클레오타이드 위치 2090-2110에 걸쳐 있는 서열:

[0158] TGTACCTGGTTCCTGGACAG(서열번호 109)

[0159] TGTACCTGGTTCCTGGACTC(서열번호 110)

[0160] 아래 나열된 마지막 뉴클레오타이드는 위치 2608-2628(교정된 분기점)에 상응한다:

[0161] TTGGTACTTTCTTCTACAAG(서열번호 111)

[0162] TTGGTACTTTCTTCTGCAAG(서열번호 112)

[0163] 뉴클레오타이드 위치 3083-3103에 걸쳐 있는 서열[아래에 표시된 뉴클레오타이드 변화는 위치 3086(위치 3103에 근접) 맥락에서 이루어진 변화의 결과이며 3103 위치의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 및/또는 분기점을 교정하지 않음]:

[0164] CAGCTGAAAGGAAAGTCCCA(서열번호 113)

[0165] CAACTGAAAGGAAAGTCCCA(서열번호 114)

[0166] 뉴클레오타이드 위치 3073-3093에 걸쳐 있는 서열[아래에 표시된 뉴클레오타이드 변화는 위치 3086(위치 3093에 근접) 맥락에서 이루어진 변화의 결과이며 3093 위치의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 및/또는 분기점을 교정하지 않음]:

[0167] GTTCTATGCCCAGCTGAAAG(서열번호 115)

[0168] GTTCTATGCACAACTGAAAG(서열번호 116)

[0169] 뉴클레오타이드 위치 681-701에 걸쳐 있는 서열(교정된 스플라이스 부위):

[0170] CCCTGTGCTCCCTCTCCCAG(서열번호 117)

[0171] CCCTGTGCTCCCTCTCCCAA(서열번호 118)

[0172] 뉴클레오타이드 위치 508-528에 걸쳐 있는 서열:

[0173] CATCGGCCTGTCTGACTCAG(서열번호 119)

[0174] CATCGGCCTGTCTGACTCTG(서열번호 120)

[0175] 뉴클레오타이드 위치 1431-1451에 걸쳐 있는 서열(교정된 분기점):

[0176] TCCTAAACTTCCTCTACAAG(서열번호 121)

[0177] TCCTGAACTTCCTCTACAAG(서열번호 122)

[0178] 뉴클레오타이드 위치 1995-2015에 걸쳐 있는 서열(교정된 스플라이스 부위):

[0179] CTGTCTCCATGACTGTGAAG(서열번호 123)

[0180] CTGTCTCCATGACTGTAAAA(서열번호 124)

[0181] 뉴클레오타이드 위치 3159-3179에 걸쳐 있는 서열(비동의어 돌연변이로 교정될 수 있음):

[0182] AGCGGAATGAAGAGGCTCAG(서열번호 125)

[0183] AGCGGAATGAAGAGGCTCAG(서열번호 125)

[0184] 뉴클레오타이드 위치 2234-2254에 걸쳐 있는 서열(교정된 스플라이스 부위):

[0185] ATGCTGTGCTTTCTGCTCAG(서열번호 126)

[0186] ATGCTGTGCTTTCTGCTCTC(서열번호 127)

[0187] 뉴클레오타이드 위치 1104-1124에 걸쳐 있는 서열(스플라이스 부위, 교정된 분기점):

[0188] TTTGTAATGCATTGATCCAG(서열번호 128)

[0189] TTTGTAATGCCTTGATACAA(서열번호 129)

[0190] 뉴클레오타이드 위치 1887-1907에 걸쳐 있는 서열(교정된 스플라이스 부위):

[0191] TTGGAATCTACCTCCAGCAG(서열번호 130)

[0192] TTGGAATCTACCTCCAACAA(서열번호 131)

[0193] 그러나 당업자는 식별된 크립틱 스플라이스 부위를 파괴하기 위해 다른 뉴클레오타이드 변화가 이루어질 수 있다는 것을 인식하고 본 명세서에 제시된 결과에 따라 이러한 변화를 구상하고 설계할 수 있을 것이다. 일부 실시형태에서 ABCA4 엑손 편집기는 상기 위치에서 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화를 갖는다. 또한 표 3을 참조

한다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 서열번호 56 내지 59에 제시된 서열 중 어느 하나와 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 99.9% 서열 동일성을 갖거나 100% 서열 동일성을 갖는 CDS 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 상기 위치(예를 들어, 서열번호 56에 따라서 넘버링됨)의 하나 이상에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖고, 서열번호 56 내지 58에 제시된 서열 중 어느 하나와 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 99.9% 서열 동일성을 갖거나 100% 서열 동일성을 갖는 CDS 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 상기 위치(예를 들어, 서열번호 56에 따라서 넘버링됨)의 하나 이상에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖고, 서열번호 56에 제시된 서열과 적어도 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 또는 99.9% 서열 동일성을 갖거나 100% 서열 동일성을 갖는 CDS 서열을 갖는다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40 또는 45개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다.

[0194] 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 백만당 적어도 10 카운트(본 명세서에서 CPM이라고도 지칭)의 스플라이스 부위 사용 빈도를 갖는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 가지며, 스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외이다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기 분자는 하기 실시예 7에 기재된 검정에 의해서 측정되는 경우 적어도 10 cpm의 사용 빈도를 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 모든 크립틱 스플라이스 부위에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다[스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외].

[0195] 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 백만당 적어도 5 카운트(본 명세서에서 CPM이라고도 지칭)의 스플라이스 부위 사용 빈도를 갖는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 가지며, 스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외이다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기 분자는 하기 실시예 7에 기재된 검정에 의해서 측정되는 경우 적어도 5 cpm의 사용 빈도를 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 모든 크립틱 스플라이스 부위에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다[스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외].

[0196] 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 백만당 적어도 3 카운트(본 명세서에서 CPM이라고도 지칭)의 스플라이스 부위 사용 빈도를 갖는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 가지며, 스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외이다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기 분자는 하기 실시예 7에 기재된 검정에 의해서 측정되는 경우 적어도 3 cpm의 사용 빈도를 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 모든 크립틱 스플라이스 부위에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다[스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외].

[0197] 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 백만당 적어도 2 카운트(본 명세서에서 CPM이라고도 지칭)의 스플라이스 부위 사용 빈도를 갖는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 가지며, 스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외이다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기 분자는 하기 실시예 7에 기재된 검정에 의해서 측정되는 경우 적어도 2 cpm의 사용 빈도를 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 모든 크립틱 스플라이스 부위에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다[스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외].

[0198] 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기는 백만당 적어도 1 카운트(본 명세서에서 CPM이라고도 지칭)의 스플라이스 부위 사용 빈도를 갖는 표 3에 제시된 위치 중 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 중 적어도 하나에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 가지며, 스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외이다. 일부 실시형태에서, ABCA4 엑손 편집기 분자는 하기 실시예 7에 기재된 검정에 의해서 측정되는 경우 적어도 2cpm의 사용 빈도를 갖는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 또는 20개 또는 모든 크립

틱 스플라이스 부위에 크립틱 스플라이스 부위-완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는다[스플라이스 부위(예를 들어, 위치 3083, 3103 또는 3093)를 포함하지 않는 표 3에 열거된 부위는 예외].

[0199] ABCA4 엑손 편집기 외에도, 본 명세서에 기재된 실시형태는 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화를 갖는 다른 유전자 표적에 대한 특정 엑손 편집기를 포함한다. 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 크립틱 스플라이스 부위가 스플라이싱 반응에서 사용될 수 있는 능력을 제거하거나 감소시키는 변화를 포함할 수 있다. 예를 들어, RNA 엑손 편집기의 맥락에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위는 일반적으로 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 및 분기점을 포함한다. 일부 실시형태에서, 하나 이상의 뉴클레오타이드 변화는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 또는 분기점 중 적어도 하나 또는 이들의 임의의 조합에 도입될 수 있다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 변화는 이에 의해 암호화된 단백질에 대한 잠재적 영향을 최소화하도록 결정된다. 당업자라면 크립틱 스플라이스 부위 사용 빈도를 줄이기 위해 수행된 뉴클레오타이드 변화가 트랜스-스플라이싱된 RNA에 의해 암호화된 아미노산도 변경하는 경우, 보존적 아미노산 변화가 비보존적 아미노산 변화보다 선호된다는 것을 이해할 것이다. 더욱이, 이러한 당업자는 기능적 도메인과 그 안의 중요한 서열을 주시하여 단백질 서열과 구조를 쉽게 분석하여 이러한 변화가 트랜스-스플라이싱된 단백질에 의해 암호화된 단백질의 기능을 변경하는 것으로 합리적으로 예상될 수 있는지 평가할 수 있다. 당업자는 또한 이러한 아미노산 변화를 포함하는 단백질을 시험하여 당업계에 알려진 검정법을 사용하여 생물학적 활성이 변경되는지 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, 식별된 크립틱 스플라이스 부위 내에서 하나 이상의 뉴클레오타이드가 변경된다. 어떤 상황에서는, 얼마나 많은 뉴클레오타이드를 변경해야 하는지에 대한 결정은 실리코 예측 및/또는 실험 결과에 따라 경험적으로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 하나 이상(본 명세서에서 적어도 하나라고도 함)의 동의어 돌연변이가 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 또는 분기점 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나에 도입될 수 있다. 동의어 돌연변이는 트랜스-스플라이싱된 RNA에 의해 암호화된 단백질의 아미노산 서열을 변경하지 않는다. 일부 실시형태에서, 2개 초과의 동의어 돌연변이가 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위의 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 영역 또는 분기점 중 하나 이상 또는 이들의 조합에 도입될 수 있다.

[0200] 위에 더하여, 본 발명자들은 일반적으로 다음과 같이 실험 결과와 서열 정보를 분석하였다. 실험적으로 식별된 크립틱 스플라이스 부위를 제거하기 위한 변경은 스플라이스 공여체 부위의 특정 요소를 검색하여 대체함으로써 이루어졌다. 스플라이스 공여체 부위의 단부에 있는 AG 부위(그리고 더 강하게는 CAG 부위)는 뉴클레오타이드 변경 도입을 위해 우선순위가 지정되었다. AG 부위가 발견되지 않았거나 비동의적 돌연변이를 도입하지 않고는 변경할 수 없는 경우, 스플라이스 부위 상류의 42-4 염기쌍 서열을 분기점(YNAH와 일치하는 서열)에 대해 스캔하였다. 그런 다음 식별된 그러한 분기점 서열을 분석하여 실험적으로 식별된 크립틱 스플라이스 부위에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 줄이기 위해 뉴클레오타이드 돌연변이를 도입하는 것을 고려하였다. 또한, 서열을 스캔하여 폴리피리미딘 트랙트(말단 AG 바로 상류의 여러 Y)의 존재 여부도 확인하였다. 일반적으로 이러한 폴리피리미딘 트랙트는 스플라이스 부위 상류의 10개 염기쌍 내에 최소 5개의 피리미딘을 포함한다. 이러한 폴리피리미딘 트랙트를 식별한 후 분석하여 실험적으로 식별된 크립틱 스플라이스 부위에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 줄이기 위해 뉴클레오타이드 돌연변이를 도입하는 것이 고려되었다.

[0201] 일부 실시형태에서, 표적외 스플라이싱을 완화하기 위해 변경된 크립틱 스플라이스 부위 또는 표적외 스플라이스 부위는 경험적으로 표적외 스플라이싱 부위로 식별된 부위이다. 이러한 부위는 예를 들어, 아래 실시예 6 및 7에 설명된 기술을 사용하여 식별할 수 있다. 일부 실시형태에서, 미리 정해진 임계값 이상의 사용 빈도를 갖는 모든 크립틱 스플라이스 부위는 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화에 의해 변경된다.

[0202] 일부 실시형태에서, 표적외 스플라이싱을 완화하기 위해 변경된 크립틱 스플라이스 부위 또는 표적외 스플라이스 부위는 표적외 스플라이싱 부위로 예측된 부위이다. 이러한 예측은 서열 분석을 기반으로 하여 정규 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 및/또는 추정 크립틱 스플라이스 부위의 분기점을 식별할 수 있다. 크립틱 스플라이스 부위는 인간 게놈에서 진짜 스플라이스 부위보다 10배나 많고 진짜 스플라이스 부위와 동일한 스플라이싱 인식 서열을 가질 수 있지만 일반적으로 지금까지 잘 이해되지 않은 분자 메커니즘에 의해 억제된다. 크립틱 5' 스플라이스 부위는 종종 공통 NNN/GUNNNN 또는 NNN/GCNNNN을 갖는데, 여기서 N은 임의의 뉴클레오타이드이고 "/"는 엑손-인트론 경계이다. 암호화된 3' 스플라이스 부위는 종종 공통 NAG/N을 갖다. 크립틱 스플라이스 부위의 활성화는 주변 뉴클레오타이드에 의해 긍정적인 영향을 받는데, 이는 크립틱 스플라이스 부위가 진짜 스플라이스 부위의 전형적인 공통, 즉 MAG/GURAGU 및 YAG/G(여기서 M은 C 또는 A, R은 G 또는 A, Y는 C 또는 U)와 더 유사해 보이도록 만들 수 있다.

[0203] 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 공통 스플라이스 부위 공통 서열과 일치하는 뉴클레오타이드 서열이 더 이상 정식 서열과 일치하지 않게 한다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 잠재적인 스플라이스 부위 뉴클레오타이드를 제거한다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 잠재적인 폴리피리미딘 트랙트 뉴클레오타이드를 제거한다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 잠재적인 분기점 뉴클레오타이드를 제거한다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 동의어 뉴클레오타이드 변화이다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위 완화 뉴클레오타이드 변화는 엑손 편집기에 의해 암호화된 아미노산의 변화를 일으킨다. 일부 실시형태에서, 아미노산 변화는 보존적 아미노산 치환이다.

[0204] 예를 들어, 표 3 및 실시예 6 및 7에 설명된 바와 같이, 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 실험적으로 관찰하였다. 국소화/식별된 크립틱 스플라이스 부위에 대한 추가 분석을 통해 실험적으로 식별된 크립틱 스플라이스 부위 내의 추정 스플라이스 부위, 폴리피리미딘 트랙트 및 분기점을 식별할 수 있었고, 이는 크립틱 스플라이스 부위 참여를 완화하기 위해 어느 서열을 변형해야 하는지에 대한 지침을 제공하였다. 이러한 결과는 일반적으로 RNA 엑손 편집기에 광범위하게 적용할 수 있다.

[0205] 일부 실시형태에서, RNA 분자가 본 명세서에 기재되는데, 이것은 5'에서 3' 방향으로 (a) cDNA 암호 도메인 서열; (b) 스플라이스 공여체 서열; 및 (c) 내인성 RNA 분자의 인트론에 결합하도록 구성된 결합 도메인 서열을 포함하되; 암호 도메인 서열은 내인성 RNA 분자 서열에 대한 뉴클레오타이드 돌연변이를 포함하고, 뉴클레오타이드 돌연변이는 암호 도메인 서열 내의 크립틱 스플라이스 부위를 파괴한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 돌연변이는 동의어 뉴클레오타이드 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 실험적으로 확인된다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 인실리코 분석을 기반으로 예측된다.

[0206] 또한, 본 명세서에는 세포에서 RNA 분자를 변형시키는 방법이 포함되며, 이 방법은 5'에서 3' 방향으로, (a) 세포 내의 내인성 표적 RNA 분자와 다른 뉴클레오타이드 돌연변이를 포함하는 cDNA 암호 도메인 서열; (b) 내인성 표적 RNA 분자의 스플라이스 수용체 서열에 스플라이스하도록 구성된 스플라이스 공여체 서열; 및 (c) 내인성 표적 RNA 분자의 인트론에 결합하도록 구성된 결합 도메인 서열을 포함하는 외인성 RNA 분자를 세포에 제공하는 단계를 포함하되; 뉴클레오타이드 돌연변이는 외인성 RNA 분자의 암호 도메인 서열 내의 크립틱 스플라이스 부위를 파괴한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 돌연변이는 동의어 뉴클레오타이드 돌연변이이다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 실험적으로 확인된다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 인실리코 분석을 기반으로 예측된다.

[0207] 또한, RNA 엑손 편집기의 트랜스-스플라이싱 효율을 증가시키는 방법이 본 명세서에 포함되며, 이 방법은 RNA 엑손 편집기의 암호 도메인 서열에 돌연변이를 도입하는 단계를 포함하되, 돌연변이는 RNA 엑손 편집기의 암호 도메인 서열에서 크립틱 스플라이스 부위를 파괴한다. 일부 실시형태에서, 뉴클레오타이드 돌연변이는 동의어 뉴클레오타이드 돌연변이이다. 예를 들어, 표 6을 참조한다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 실험적으로 확인된다. 일부 실시형태에서, 크립틱 스플라이스 부위는 실리코 분석을 기반으로 예측된다.

[0208] *결합 도메인*

[0209] 본 명세서에 기재된 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자는 표적 ABCA4 인트론 및/또는 엑손에 결합/어닐링하도록 구성된 결합 도메인(BD)을 특징으로 한다. 일부 예에서, 표적 ABCA4 인트론은 ABCA4 인트론 22이다. 일 실시형태에서, 결합 도메인은 표적 ABCA4 인트론 프리-mRNA(예를 들어, 표적 ABCA4 인트론)의 서열과 적어도 80% 상보적(예를 들어, 적어도 85% 상보적, 적어도 90% 상보적, 적어도 91% 상보적, 적어도 92% 상보적, 적어도 93% 상보적, 적어도 94% 상보적, 적어도 95% 상보적, 적어도 96% 상보적, 적어도 97% 상보적, 적어도 98% 상보적, 적어도 99% 상보적 또는 100% 상보적)인 핵산 서열이고, 이것은 (예를 들어, 내인성 ABCA4 mRNA의 일부 및 야생형 ABCA4 아미노산 서열을 암호화하는 하나 이상의 기능적 ABCA4 엑손을 갖는 암호 도메인 서열을 갖는 키메라 분자를 생성함으로써) 내인성 표적 시스-스플라이싱을 억제하면서트랜스-스플라이싱 분자와 표적 ABCA4 프리-mRNA 간의 트랜스-스플라이싱을 향상시킬 수 있다. 트랜스-스플라이싱 분자-암호화 서열(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 벡터)과 관련된 일 실시형태에서, 결합 도메인-암호화 서열은 표적 ABCA4 인트론 프리-mRNA의 서열과 적어도 80% 상보적(예를 들어, 적어도 85% 상보적, 적어도 86% 상보적, 적어도 87% 상보적, 적어도 88% 상보적, 적어도 89% 상보적, 적어도 90% 상보적, 적어도 91% 상보적, 적어도 92% 상보적, 적어도 93% 상보적, 적어도 94% 상보적, 적어도 95% 상보적, 적어도 96% 상보적, 적어도 97% 상보적, 적어도 98% 상보적, 적어도 99% 상보적 또는 100% 상보적)인 핵산 서열을 암호화한다.

[0210] 일부 예에서, 본 발명은 인트론 22에서 ABCA4에 결합하는 트랜스-스플라이싱 분자(또는 이의 벡터)를 제공하되, 예를 들어, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS를 내인성 ABCA4 엑손 23으로 트랜스-스플라이싱하도록 구성된다. 특히, 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자는 결합 도메인이 서열번호 16의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 중 임의의 하나 이상(예를 들어, 6개 이상, 8개 이상, 10개 이상 또는 12개 이상)을 갖는 결합 부위에 결합하는 것을 포함한다.

[0211] 일부 예에서, 결합 도메인은 ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 6개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드(예를 들어, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 8개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 10 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 12개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 20개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 30개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 40개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 50개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 100개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 150개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 200개 이상의 연속적인 핵산 또는 ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 250개 이상의 연속적인 핵산)를 포함한다.

[0212] 일부 예에서, 결합 부위는 ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 6개 이상의 연속적인 뉴클레오타이드(예를 들어, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 8개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 10 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 12개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 20개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 30개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 40개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 50개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 100개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 1 내지 510 또는 880 내지 1,350 내에 임의의 150개 이상의 연속적인 핵산, ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 200개 이상의 연속적인 핵산 또는 ABCA4 인트론 22의 뉴클레오타이드 880 내지 1,350 내에 임의의 250개 이상의 연속적인 핵산)를 포함한다.

[0213] 일부 예에서, 결합 도메인은 결합 부위와 적어도 80% 상보성을 갖는 적어도 2개의 비중첩 서열을 갖는다.

[0214] 일부 예에서, 결합 도메인은 UUGUUGGUAAAGGGUGUACAGCAAUUUCCUGGCUAUAUAGUUGCAAAAAUCAGGAGUUAACUAAAAAAAAAAAACCCAAGGGAACUAAUUCAGCAGCAAAUUCCAGCAUAUUGGGACAAUAAUAACCAACAUUUCAUAGCUUCCUACAUAC(서열번호 17)와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0215] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 18 TTGTTGGTAAAGGGTGTACAGCAATTTCCTGGCTATATAGTTGCAAAAATCAGGAGTTAACTAAAAAAAAAAAACCCAAGGGAACTAATTCAGCAGCAAATTCCAGCATATTGGGACAATAATAACCAACATTTCATAGCTTCCTACATAC(서열번호 18)과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 DNA 서열이다.

[0216] 일부 예에서, 결합 도메인은 서열번호 19와 적어도 80% 동일성(적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0217] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 20과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 DNA 서열이다.

[0218] 일부 예에서, 결합 도메인은 서열번호 21과 적어도 80% 동일성(적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0219] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 22와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 DNA 서열이다.

[0220] 일부 예에서, 결합 도메인은 서열번호 23과 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0221] 일부 실시형태에서, 결합 도메인은 서열번호 24와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 81%, 적어도 82%, 적어도 83%, 적어도 84%, 적어도 85%, 적어도 86%, 적어도 87%, 적어도 88%, 적어도 89%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 적어도 99% 또는 100% 동일성; 예를 들어, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 또는 99% 동일성)을 갖는 DNA 서열이다.

[0222] 결합 도메인은 스플라이싱 도메인의 3'에 작동 가능하게 연결될 수 있다(예를 들어 스플라이싱 도메인에 직접 연결되거나 스플라이싱 도메인의 3' 말단과 결합 도메인의 5' 말단을 연결하는 개입 서열을 갖는다).

[0223] 본 명세서에서 자세히 기재된 바와 같이 ABCA4 엑손 편집기 설계의 첫 번째 단계는 표적 프리-mRNA 인트론을 보완하는 고효율 BD 서열의 스크리닝 및 선택으로 시작되었다. 높은 CDS 대체 가능성을 달성하고 AAV 패키징 용량(약 4.7Kb)의 한계 내에서 ABCA4 관련 망막병증 환자 집단의 높은 비율에서 돌연변이를 교정하는 데 유용한 엑손 편집기를 제공하기 위해 ABCA4 유전자의 인트론 22가 BD 스크리닝을 위해 선택되었다. 본 발명자들은 NGS-기반 BD 라이브러리 접근법과 생물발광 기반 접근법을 모두 적용하여 BD 서열과 다른 엑손 편집기 변형체로 인트론 22 서열을 따라 스캔하였다. 두 방법 모두의 결과는 RNA 엑손 편집에 적합한 인트론 내의 영역을 정렬하고 성공적으로 식별하여 일부 실시형태에서 BD117을 선택하였다. 도 16을 참조한다.

[0224] *스플라이싱 도메인*

[0225] 스플라이싱 도메인은 트랜스-스플라이싱을 매개하기 위해 스플라이스 부위, 분기점 및/또는 폴리피리미딘 트랙트(PPT)를 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 스플라이싱 도메인은 단일 스플라이스 부위를 갖는데, 이는 스플라이스 부위가 해당 스플라이스 부위가 없기 때문에 우선적 트랜스-스플라이싱을 위해 설계되었지만 시스-스플라이싱을 위해 설계되지 않았음을 나타낸다.

[0226] 대체 스플라이싱 도메인은 알려진 방법 및 원리에 따라 당업자에 의해 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, 5' 스플라이스 부위 공통 서열은 핵산 서열 AG/GURAGU(여기서 /는 스플라이스 부위를 나타냄)이다. 또 다른 실시형태에서, 스플라이스 부위에 인접한 엑손 및 인트론에 해당하는 내인성 스플라이스 부위는 모든 스플라이싱 조절 신호를 유지하는 데 사용될 수 있다.

[0227] 일 실시형태에서, 스페이서를 갖는 적합한 5' 스플라이스 부위는 5'- GTA AGA GAG CTC GTT GCG ATA TTA T-3'(서열번호 25)이다. 일 실시형태에서, 적합한 5' 스플라이스 부위는 AGGT이다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 부위(예를 들어, 5' 스플라이스 부위)는 GTAAGT 또는 GUAAGT이거나 이를 포함한다. 일부 실시형태에서, 스플라이스 부위(예를 들어, 5' 스플라이스 부위)는 GTAAGG, GUAAGG, GTAAGC, GUAAGC, GTAACT, GUAACU, CAAAGT 또

는 CAAAGU이거나 이를 포함한다.

[0228] 스플라이싱 도메인은 종결인자 도메인에 5' 방향으로 작동적으로 연결될 수 있다(예를 들어 종결인자 도메인에 직접 연결되거나 스플라이싱 도메인의 3' 말단과 종결인자 도메인의 5' 말단을 연결하는 개입 서열, 예를 들어 링커 도메인 및/또는 3' 하류 서열).

[0229] 5' 미번역 영역

[0230] 일부 예에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 5' 미번역 영역을 포함한다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역 영역은 천연 5' ABCA4 미번역 영역을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 일부 실시형태에서, 5' 미번역 영역은 서열번호 12-13 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 86% 서열 동일성, 적어도 87% 서열 동일성, 적어도 88% 서열 동일성, 적어도 89% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 서열을 포함한다.

[0231] 일부 실시형태에서, 5' 미번역 영역은 5'에서 CDS에 작동 가능하게 연결될 수 있다(예를 들어, CDS에 직접 연결되거나 5' 미번역 영역의 3' 단부와 CDS의 5' 말단을 연결하는 개입 서열을 갖는다).

[0232] *5' 조절 도메인*

[0233] 일부 예에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 CDS에 5'로 작동 가능하게 연결된 5' 조절 도메인에 작동 가능하게 연결된다(예를 들어, CDS에 직접 연결되거나 중간 도메인, 예를 들어, 미번역 영역을 통해 연결됨). 5' 조절 도메인에는 프로모터(예를 들어, 구성적 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터 또는 EF1-알파 프로모터)가 포함될 수 있다. 일부 경우에, 5' 조절 도메인은 천연 5' ABCA4 미번역 영역에 작동적으로 연결된 프로모터(예를 들어, 구성적 프로모터, 예를 들어, CMV 프로모터)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 천연 5' ABCA4 미번역 영역에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인은 서열번호 14 내지 15 중 어느 하나와 적어도 80% 서열 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 86% 서열 동일성, 적어도 87% 서열 동일성, 적어도 88% 서열 동일성, 적어도 89% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 서열을 포함한다.

[0234] 일부 실시형태에서, 5' 조절 도메인은 5'에서 CDS에 작동 가능하게 연결될 수 있다(예를 들어, CDS에 직접 연결되거나 5' 조절 도메인의 3' 단부와 CDS의 5' 말단을 연결하는 개입 서열을 갖는다).

[0235] *링커 도메인*

[0236] 본 명세서에서 논의된 바와 같이, 트랜스-스플라이싱 효율을 증가시키는 것은 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 치료제로 구현하기 위한 중요한 목표로 남아 있다. 치료적 개입에 사용하기 위한 요건을 충족시킬 수 있는 트랜스-스플라이싱 효율을 갖는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 설계하기 위한 노력으로, 본 발명자들은 스플라이스 도메인(SD)과 결합 도메인(BD) 사이의 수천 개의 링커 서열을 시험하고, 전구체 링커(LinkD)에 비해 통계적으로 유의미한 수준으로 성능을 개선한 40량체라는 예시적인 링커를 식별하였다. 예를 들어, 도 17A 및 17B를 참조한다.

[0237] 위의 내용에 더하여, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 분자와 함께 하나 이상의 위치에 링커 도메인을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 도메인은 스플라이싱 도메인 또는 스플라이스 부위에 3'으로 작동 가능하게 연결된다(예를 들어 스플라이싱 도메인 또는 스플라이스 부위에 직접 연결됨). 링커 도메인은 임의의 적합한 크기일 수 있다. 일부 실시형태에서, 링커 도메인은 25개 초과의 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 25 내지 50개 뉴클레오타이드 길이, 35 내지 45개 뉴클레오타이드 길이 또는 약 40개 뉴클레오타이드 길이(예를 들어, 40량체 링커))이다. 일부 예에서, 링커 도메인은 CUGGUGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGUUGGGGGCAUGUAC(서열번호 26) 또는 CTGGTGCCCGCGGGCCGCGGAACCGGTTGGGGGCATGTAC(서열번호 27)와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 86% 서열 동일성, 적어도 87% 서열 동일성, 적어도 88% 서열 동일성, 적어도 89% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0238] 위에 기재된 바와 같이, 서열번호 26(RNA) 또는 서열번호 27(DNA)을 포함하는 40량체 링커는 수천 개의 다른 요소가 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 기능에 대해 평가되는 라이브러리 스크린에서 선택되었다. 40량체 링커의 우수성은 예를 들어, 요소의 다른 조합의 맥락에서 세 가지 다른 링커를 비교하는 도 1에서 명백하다. 각각의 맥락에서, 40량체 링커의 존재(가장 밝은 회색조 톤에 해당하는 링커로 표시됨; 각 ss의 맥락에서 왼쪽에서 오른쪽으로 세 번째 링커 표시됨)는 가장 높은 상대적 트랜스-스플라이싱 효율과 관련이 있었다. 링커 서열은 트랜스-스플라이싱 분자에 자주 포함되며, 여기서 스플라이스 공여체와 결합 도메인 사이에 위치하여 각 요소에 유연성과 접근성을 제공한다. 본 명세서에 기재된 바와 같이, 다른 요소의 기능적 기여는 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 부여된 활성에 대해 다른 조합에서 평가되었다. 40량체 링커는 트랜스 스플라이싱 분자의 맥락에서 향상된 트랜스 스플라이싱 활성을 부여하는 주요 후보 요소로 이 스크리닝을 통해 출현하였으며, 이는 ABCA4 RNA의 표적내(ONT) 교체%에서 통계적으로 유의미한 증가(도 17A)와 트랜스 스플라이싱된 ABCA4 단백질(ONT) 수치에서 유의미한 증가, 그리고 LinkD에 비해 비스플라이싱된 단백질(NSP) 수준에서 유의미한 감소(도 17B)에서 입증되었다.

[0239] 다른 예에서, 링커 도메인은 CCGAAUACGACACGUACAAGAUCU(서열번호 28) 또는 CCGAATACGACACGTACAAGATCT(서열번호 29)와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 86% 서열 동일성, 적어도 87% 서열 동일성, 적어도 88% 서열 동일성, 적어도 89% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다. 다른 예에서, 링커 도메인은 GCUGCUGCUCAGUCUCCUGGGCUGG(서열번호 30) 또는 GCTGCTGCTCAGTCTCCTGGGCTGG(서열번호 31)와 적어도 80% 동일성(예를 들어, 적어도 85% 서열 동일성, 적어도 86% 서열 동일성, 적어도 87% 서열 동일성, 적어도 88% 서열 동일성, 적어도 89% 서열 동일성, 적어도 90% 서열 동일성, 적어도 91% 서열 동일성, 적어도 92% 서열 동일성, 적어도 93% 서열 동일성, 적어도 94% 서열 동일성, 적어도 95% 서열 동일성, 적어도 96% 서열 동일성, 적어도 97% 서열 동일성, 적어도 98% 서열 동일성, 적어도 99% 서열 동일성 또는 100% 서열 동일성)을 갖는 핵산 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진다.

[0240] *RNA 엑손 편집기 활성의 증진제*

[0241] 본 발명자들은 치료적 개입에 사용하기에 유리한 특성을 갖는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 설계하기 위해 다각적인 실험적 접근 방식을 사용하였다. 따라서 본 발명자들은 예를 들어, 표적내(ONT) 트랜스-스플라이싱을 증가시키거나, ONT ABCA4 트랜스-스플라이싱된 단백질 수준을 증가시키거나, 비-스플라이싱된 단백질(NSP) 수준을 감소시키거나 또는 이들의 임의의 조합을 통해 RNA 엑손 편집기 활성을 향상시킬 수 있는 추가 요소를 식별하고자 하였다. 따라서 다양한 요소를 시험하여 시험된 요소의 존재가 시험된 요소가 없는 RNA 엑손 편집기에서 관찰된 것과 관련하여 RNA 엑손 편집기의 활성을 강화하는지 여부를 확인하였다. 다양한 요소와 이들의 다양한 조합을 개별 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 평가하는 광범위한 시행착오 절차를 통해, 본 발명자들은 UBS를 추가 요소로 포함하는 RNA 엑손 편집기에 UBS가 없는 RNA 엑손 편집기에 비해 ONT 트랜스-스플라이싱의 증가와 NSP 수준의 감소를 모두 부여하는 서열 요소인 U1 결합 부위(UBS)를 식별하였다. 예를 들어, 도 13(3xU1) 및 도 19A 및 19B(3xUBS)를 참조한다. 일부 실시형태에서, 3xUBS(3xU1이라고도 함)는 서열번호 62를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3xUBS(3xU1이라고도 함)는 GTAAGT 또는 GGTAAGTAGAGTG(서열번호 61) 또는 GGTGAGTAGAGTG(서열번호 83)를 포함하는 적어도 하나의 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 3xUBS는 링커 도메인의 3'에 위치한다. 특정 실시형태에서, 3xUBS는 링커 도메인의 3' 및 결합 도메인의 5'에 위치한다. 특정 실시형태에서, 3xUBS는 GGTAAGT를 포함하는 적어도 하나의 서열을 포함하는데, 여기서 GGTAAGT를 포함하는 적어도 하나의 서열 각각은 측접 서열을 더 포함한다. 이의 실시형태에서, 3xUBS는 GGTAAGTAGAGTG(서열번호 61) 또는 GGTGAGTAGAGTG(서열번호 83) 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3xUBS는 CGT GGTAAGT AGAGTG(서열번호 74; UBS1); ATG GGTAAGT AGAGTG(서열번호 75; UBS2); 또는 TGG GGTAAGT AGAGTG(서열번호 76; UBS3) 또는 이들의 임의의 조합 중 적어도 하나를 포함한다.

[0242] 따라서 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 UBS를 포함하는 RNA 엑손 편집기는 GGTAAGT 또는 GGTAAGTAGAGTG(서열번호 61)를 포함하는 적어도 하나의 서열을 포함한다. 특정 실시형태에서, 3xUBS는 RNA 엑손 편집기에서 링커 도메인의 3'에 위치한다. 특정 실시형태에서, 3xUBS는 RNA 엑손 편집기에서 링커 도메인의 3' 및 결합 도메인의 5'에 위치한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 UBS를 포함하는 RNA 엑손 편집기는 CGT GGTAAGT AGAGTG(UBS1; 서열번호 74); ATG GGTAAGT AGAGTG(UBS2; 서열번호 75); 또는 TGG GGTAAGT AGAGTG (UBS3; 서열번호 76); 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 UBS를 포함

하는 RNA 엑손 편집기는 적어도 하나의 CGT GGTAAGT AGAGTG(UBS1; 서열번호 74)를 포함한다. 일부 실시형태에서, 적어도 하나의 UBS를 포함하는 RNA 엑손 편집기는 CGT GGTAAGT AGAGTG(서열번호 74; UBS1), ATG GGTAAGT AGAGTG(서열번호 75; UBS2), 및 TGG GGTAAGT AGAGTG(서열번호 76; UBS3)를 포함한다.

[0243] 본 명세서에 제시된 결과에 따라, 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 존재하는 적어도 하나의 UBS를 본 명세서에서 증진제라고 지칭한다. 본 명세서에 기재된 예시적인 증진제는 CGT GGTAAGT AGAGTG(UBS1; 서열번호 74), ATG GGTAAGT AGAGTG(UBS2; 서열번호 75) 또는 TGG GGTAAGT AGAGTG (UBS3; 서열번호 76) 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 예시적인 증진제는 적어도 하나의 CGT GGTAAGT AGAGTG(UBS1; 서열번호 74)를 포함하는 적어도 하나의 UBS를 포함한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된예시적인 증진제는 CGT GGTAAGT AGAGTG(UBS1; 서열번호 74), ATG GGTAAGT AGAGTG(UBS2; 서열번호 75), 및 TGG GGTAAGT AGAGTG (UBS3; 서열번호 76)를 포함하는 UBS를 포함한다.

[0244] UBS(RNA 엑손 편집기에 추가 요소로 포함되고 링커에 대해 3', BD에 대해 5'에 위치함; 도 13 참조)가 RNA 엑손 편집기 활성을 향상시키는 능력은 적어도 잠재적으로 대체 5' 스플라이스 부위로 작용할 수 있는 하나 이상의 추가 요소의 존재가 RNA 엑손 편집기의 스플라이스 도메인(예를 들어 도 13 참조; SD; 기존의 진짜 5' 스플라이스 부위)과 경쟁하고/하거나 간섭함으로써 ONT 트랜스-스플라이싱을 감소시킬 수 있다는 것을 예측하는 것이 합리적이었기 때문에 놀랍다. 이러한 경쟁/간섭은 ONT 트랜스-스플라이싱을 감소시킬 것이다. 따라서 RNA 엑손 편집기에서 증진제(예를 들어 UBS1, UBS2 또는 UBS3 중 하나 이상 또는 이들의 임의의 조합)의 존재에 의해 부여되는 것으로 관찰된 ONT 트랜스-스플라이싱의 증가는 예상치 못한 놀라운 일이었다. 또한, 증진제는 NSP를 통계적으로 유의미하게 감소시켰는데, 이러한 관찰 결과는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 이 요소의 놀라운 기능적 특성을 더욱 강조하였다.

[0245] 본 명세서에 기재된 증진제의 기능적 특성은 ABCA4 프리-mRNA가 아닌 다른 표적 프리-mRNA에서 다른 인트론을 결합/표적하는 다른 결합 도메인을 포함하는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서도 입증되었다. 예시적인 RNA 엑손 편집기의 결과는 3xUBS를 포함하는 증진제가 비-ABCA4 프리-mRNA에서 인트론 A 및 인트론 B를 표적으로 하는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 놀라운 유익한 특성을 부여한다는 것을 나타낸다. 보다 구체적으로, 40량체 + 3xUBS(서열번호 62)의 조합을 포함하는 비-ABCA4 프리-mRNA를 표적으로 하는 RNA 엑손 편집기는 40량체만 포함하는 RNA 엑손 편집기(서열번호 27)에 비해 상당히 감소된 수준의 NSP를 나타내었다. 예를 들어, 도 27B 및 28B를 참조한다. NSP를 감소시키는 동안, 40량체 + 3xUBS(서열번호 62)의 조합은 40량체 단독에 비해 유사한 수준의 ONT 트랜스-스플라이스 단백질을 유지하였다. 비교를 위해, 3xUBS가 NSP를 감소시키는 것으로 나타난 각 RNA 엑손 편집기[ABCA4 프리-mRNA를 표적으로 하는 인트론 22(도 19B); 인트론 A(도 27B); 및 인트론 B(도 28B)]는 동일한 40량체 + 3xUBS 서열 카세트를 포함하였며, 이는 3xUBS 서열(서열번호 62)의 존재에 의해 부여된 기능이 RNA 엑손 편집기의 표적 인트론 및/또는 표적 프리-mRNA와 무관하게 일관적이라는 결론을 뒷받침한다.

[0246] 핵산 트랜스-스플라이싱 분자에서 3xUBS 서열(서열번호 62)의 존재에 의해 부여된 기능성은 또한 % RNA 트랜스-스플라이싱 수준에서도 명백하였다. 도 19A(ABCA4 프리-mRNA를 표적으로 하는 인트론 22), 도 28A(인트론 B), 및 도 29(인트론 C)는 3xUBS 서열(서열번호 62)의 존재가 RNA의 대체% 증가 경향에 반영된 바와 같이 RNA 트랜스-스플라이싱%의 증가를 부여할 수 있음을 나타낸다. 사실, 인트론 C를 표적으로 하는 예시적인 트랜스-스플라이싱 분자에서 3xUBS 서열(서열번호 62)의 존재는 대체% 수준에서 3배 증가를 부여하였다. 이러한 결과는 3xUBS 서열(서열번호 62)의 이러한 추가적인 기능적 특성이 증가된 % 치환 경향을 촉진하는 것이 RNA 엑손 편집기의 표적 인트론 및/또는 표적 프리-mRNA와 무관하게 일관됨을 시사한다. 인트론 C를 표적으로 하는 결합 도메인(BD34)을 포함하는 RNA 엑손 편집기가 ABCA4 프리-mRNA의 인트론 22, 인트론 A 및 인트론 B를 표적으로 하는 결합 도메인을 포함하는 각 RNA 엑손 편집기에서 사용되는 5' 스플라이스 부위와 다른 대체 5' 스플라이스 부위를 포함한다는 점이 주목할 만하다. 이러한 결과는 3xUBS 증진제가 결합 도메인 및 프리-mRNA 표적 특이성 외에도 요소에 관해서 다른 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 기능을 부여할 수 있음을 나타낸다.

[0247] 따라서 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 같은 증강제(예를 들어 서열번호 62)가 결합 도메인 및 표적 독립적인 방식으로 기능하며 따라서 일반적으로 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 사용될 수 있다는 증거를 제시하였며, 증강제의 존재가 RNA 대체%에 반영된 바와 같이 감소된 NSP 수준 및 잠재적으로 증가된 트랜스-스플라이싱 활성을 포함하는 유리한 특성을 부여할 것으로 기대한다.

[0248] *RNA 엑손 편집기 활성의 번역 증진제*

[0249] 표적내(ONT) 트랜스-스플라이싱을 증가시키거나, ONT ABCA4 트랜스-스플라이싱된 단백질 수준을 증가시키거나, 비-스플라이싱된 단백질(NSP) 수준을 감소시키거나 또는 이들의 임의의 조합을 통해 RNA 엑손 편집기 활성을 향

상시킬 수 있는 추가 요소에 대한 검색은 또한 본 발명자들이 AU-풍부 요소(ARE)가 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 놀라운 기능적 특성을 나타낸다는 것을 발견하게 하였다. ARE의 놀라운 특성은 광범위한 시행착오 절차를 통해 발견되었으며, 이를 통해 다양한 요소와 이들의 다양한 조합이 개별 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 평가되었다. 본 발명자들은 ARE의 존재가 ARE를 추가 요소로 포함하는 RNA 엑손 편집기(40량체 + ARE)에 ARE가 없는 편집기(예를 들어 40량체만 포함)에 비해 NSP 수준이 감소함을 발견하였다. 일부 실험에서 ARE의 존재는 또한 ARE를 추가 요소로 포함하는 RNA 엑손 편집기(40량체 + ARE)에 ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질이 ARE가 없는 편집기(예를 들어 40량체만 포함)에 비해 증가함을 발견하였다. 예를 들어, 도 13(ARE) 및 도 19B(40량체 + ARE)를 참조한다. ARE는 NSP 수준을 감소시키고 ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질 수치를 증가시켰으므로, 본 명세서에서 이를 "번역 증진제"라고 한다.

[0250] 일부 실시형태에서, 예시적인 ARE는 ATTTATATATTTATATTTTTAAAATATTTATTTATTTATTTATTTA(서열번호 63) 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 포함하는 서열을 포함하는 과립구-대식세포 집락자극인자(GM-CSF) ARE이다. 일부 실시형태에서, 번역 증진제는 서열번호 63과 적어도 91% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 92% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 93% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 94% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 95% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 96% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 97% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 98% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 99% 동일성을 갖는다. 일부 실시형태에서, 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열은 증진제(예를 들어, 서열번호 62)의 3'에 작동 가능하게 연결된다. 코어 서열은 일반적으로 AUUUA(RNA; 이를 암호화하는 DNA 벡터의 ATTTA)이고 이 코어 AUUUA 요소의 반복은 종종 기능에 필요한다. ARE 요소는 일반적으로 약 50개 염기 이상이다. 따라서 일부 실시형태에서 ARE는 약 50개 염기 이상인 코어 AUUUA 요소의 반복을 포함한다.

[0251] RNA 엑손 편집기의 추가 요소로 포함되는 ARE(도 13 참조)의 RNA 엑손 편집기 활성을 향상시키는 능력은 적어도 ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질 수준을 증가시키고 NSP 수준을 감소시키기 때문에 놀랍다. 따라서, 이에 의해 암호화된 단백질 수준에 대한 ARE 매개 효과는 치료용 단백질 수준(ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질 수준)을 우선적으로 증가시키고 NSP 수준을 감소시킴으로써 RNA 엑손 편집기의 치료적 잠재력을 촉진한다.

[0252] 또한, 예시적인 증진제의 카세트와 예시적인 번역 증진제(40량체 + 3XUBS + ARE; 서열번호 73)를 조합하면 40량체만, 40량체 + 3XUBS 또는 40량체 + ARE를 포함하는 RNA 엑손 편집기에 비해 NSP 수준이 훨씬 더 크게 감소한다는 점도 주목할 만하다. 따라서 이러한 요소의 조합(40량체 + 3XUBS + ARE; 서열번호 73)은 본 명세서에 기재된 것과 같은 트랜스 스플라이싱 분자의 맥락에서 특히 유리한 특성을 나타낸다.

[0253] 본 명세서에 기재된 번역 증진제의 기능적 특성은 ABCA4 프리-mRNA가 아닌 다른 표적 프리-mRNA에서 다른 인트론을 결합/표적하는 다른 결합 도메인을 포함하는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서도 입증되었다. 예시적인 RNA 엑손 편집기의 결과는 ARE(서열번호 63)를 포함하는 번역 증진제가 비-ABCA4 프리-mRNA에서 인트론 A 및 B를 표적으로 하는 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 놀라운 유익한 특성을 부여한다는 것을 나타낸다. 보다 구체적으로, 40량체 + ARE(서열번호 63)의 조합을 포함하는 비-ABCA4 프리-mRNA를 표적으로 하는 RNA 엑손 편집기는 40량체만 포함하는 RNA 엑손 편집기(서열번호 27)에 비해 상당히 감소된 수준의 NSP를 나타내었다. 예를 들어, 도 27B 및 도28B를 참조한다. 40량체 + ARE(서열번호 63)의 조합은 NSP를 감소시키는 동안 40량체만을 사용했을 때와 비교하여 유사한 수준의 ONT 트랜스 스플라이스 단백질을 유지하였다. 비교를 위해, ARE가 NSP를 감소시키는 것으로 나타난 각각의 RNA 엑손 편집기[ABCA4 프리-mRNA를 표적으로 하는 인트론 22(도 19B); 인트론 A(도 27B); 및 인트론 B(도 28B)]는 동일한 40량체 + ARE 서열 카세트(서열번호 86의 서열 3444 내지 3529)를 포함하였으며, 이는 ARE 서열(서열번호 63)의 존재에 의해 부여된 기능이 RNA 엑손 편집기의 표적 인트론 및/또는 표적 프리-mRNA와 무관하게 일관적이라는 결론을 뒷받침한다. NSP 수준의 감소는 40량체 + 3xUBS + ARE(서열번호 73)의 카세트에서 훨씬 더 두드러졌으며, 이는 이러한 요소의 결합 효과를 나타낸다. 이러한 결과는 ARE 번역 증진제가 결합 도메인과 프리-mRNA 표적 특이성이 다른 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 기능성을 부여할 수 있으며 다른 요소들과 결합적으로 작용하여 RNA 엑손 편집기 효능을 증진시킬 수 있음을 나타낸다.

[0254] 따라서 본 발명자들은 본 명세서에 기재된 것과 같은 번역 증진제(예를 들어 서열번호 63)가 결합 도메인 및 표적 독립적인 방식으로 기능하며 따라서 일반적으로 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 사용될 수 있다는 증거를 제시하였으며, 번역 증진제의 존재가 감소된 NSP 수준을 포함한 유리한 특성을 부여할 것으로 기대한다.

[0255] *추가 구성 요소 또는 변형*

[0256] 일부 예에서, 트랜스-스플라이싱 분자는 3' 전사 종결인자 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 이러한 3' 전사 종결인자 도메인은 트랜스-스플라이싱 분자의 3' 단부를 효과적으로 캡핑하는 삼중 나선 구조를 형성한다.

일부 예에서, 3' 전사 종결인자 도메인은 인간 긴 비암호 RNA MALAT1(예를 들어 야생형 MALAT1)에서 유래한다. 일부 실시형태에서, 3' 전사 종결인자 도메인은 tRNA 유사 도메인을 포함한다. 본 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 일부로서 유용한 3' 전사 종결인자 도메인은 국제 특허 공개 번호 WO 2020/214973에 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조에 의해 전체적으로 포함된다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 3' 단부에 작동적으로 연결된 RTM의 영역은 야생형 MALAT1+mascRNA 도메인, 예를 들어 서열번호 32 또는 서열번호 33을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 종결인자 도메인을 포함한다. 일부 실시형태에서, 결합 도메인의 3' 말단에 작동 가능하게 연결된 RNA 엑손 편집기의 영역은 돌연변이된 MALAT1+masc RNA(항-Mut1 masc RNA) 도메인, 예를 들어 서열번호 66(DNA) 또는 서열번호 67(RNA)을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 종결인자 도메인을 포함한다.

[0257] 일부 예에서, 트랜스-스플라이싱 분자는 결합 도메인의 하류(즉, 3'에 작동적으로 연결됨) 및/또는 종결 도메인의 상류(즉, 5'에 작동적으로 연결됨)에 3' 하류(DS) 영역을 포함한다. 어떤 경우, 3' DS 영역은 종결 도메인의 일부이다. 3' DS 영역은 결합 도메인을 종결 도메인에 직접 연결할 수 있다. 일부 실시형태에서, 3' DS 영역은 길이가 6 내지 10개 뉴클레오타이드(예를 들어 길이가 8개 뉴클레오타이드)이다. 일부 실시형태에서, 3' DS 영역은 3' DS- MALAT1 측접 8량체 RNA, AGGGUCAU; 3' DS- MALAT1 측접 8량체 DNA, AGGGTCAT; 3' DS- 무작위 8량체 RNA, CGAGCCUC; 3' DS- 무작위 8량체 DNA, CGAGCCTC; 3' DS- MALAT1 측접 8량체 RNA 중 첫 번째 6개, AGGGU; 및 3' DS- MALAT1 측접 8량체 DNA 중 첫 번째 6개, AGGGT 중 어느 하나를 포함한다. 일부 실시형태에서, 3' DS 영역은 3' DS- MALAT1 측접 8량체 RNA, AGGGUCAU; 3' DS- MALAT1 측접 8량체 DNA, AGGGTCAT; 3' DS- 무작위 8량체 RNA, CGAGCCUC; 3' DS- 무작위 8량체 DNA, CGAGCCTC; 3' DS- MALAT1 측접 8량체 RNA 중 첫 번째 6개, AGGGU; 및 3' DS- MALAT1 측접 8량체 DNA 중 첫 번째 6개, AGGGT 중 어느 하나로 이루어진다.

[0258] 일부 실시형태에서, 표적 프리-mRNA에 대한 트랜스-스플라이싱 분자의 결합은 상보성 백분율(즉, 핵산의 염기쌍 특성에 기반함), 삼중 나선 형성 또는 단백질-핵산 상호작용(본 명세서에 인용된 문서에 기술된 바와 같음)에 의해 매개된다. 일 실시형태에서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 DNA, RNA 또는 DNA/RNA 혼성 분자를 포함하는데, 여기서 DNA 또는 RNA는 단일 가닥 또는 이중 가닥이다. 또한, 본 명세서에 포함되는 것은 위에 언급된 RNA 또는 DNA 중 하나와 혼성화할 수 있는 RNA 또는 DNA이며, 바람직하게는 엄격한 조건, 예를 들어 60° C에서 2.5x SSC 완충액에서, 그리고 더 낮은 완충액 농도, 예를 들어 0.5x SSC 완충액에서 37° C에서 여러 번 세척한다. 이러한 핵산은 지질 인산 인산가수분해효소 활성 및/또는 세포막과의 결합을 나타내는 단백질을 암호화할 수 있다. 트랜스-스플라이싱 분자가 시험관 내에서 합성될 때, 이러한 트랜스-스플라이싱 분자는 염기 부분, 당 부분 또는 인산 골격에서 변형되어 분자의 안정성, 표적 mRNA와의 혼성화, 세포 내로의 수송, 효소적 절단에 대한 세포 내 안정성 등을 개선할 수 있다. 예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자를 변형하여 전체 전하를 줄이면 분자의 세포 흡수를 향상시킬 수 있다. 또한, 변형을 가하여 뉴클레아제 또는 화학적 분해에 대한 감수성을 줄일 수 있다. 핵산 분자는 다른 분자, 예를 들어 펩타이드, 혼성화 촉발 가교제, 수송제, 혼성화 촉발 절단제 등에 접합되도록 합성될 수 있다.

[0259] 핵산 분자에 대한 다양한 다른 잘 알려진 변형은 세포 내 안정성과 반감기를 증가시키는 수단으로 도입될 수 있다(올리고뉴클레오타이드에 대해서도 위 참조). 가능한 변형은 당업계에 알려져 있다. 합성 트랜스-스플라이싱 분자의 구조에 대해 이루어질 수 있는 변형은 골격 변형을 포함한다.

[0260] *예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기 카세트 맵 및 개요*

[0261] 일반적으로 ABCA4 RNA 엑손 편집 카세트(ABCA4 REEC)는 RNA 엑손 편집기의 발현을 유도하는 조절 구성 요소, 해당 천연 서열과 표적 천연 서열 내에 존재할 수 있는 돌연변이를 대체하는 5' UTR 및 CDS, 천연 스플라이스 수용체(SA)와 상호 작용하는 스플라이스 공여체(SD), 이 상호 작용이 발생할 수 있는 유연성과 접근성을 가능하게 할 수 있는 링커, 트랜스 스플라이싱(TS)을 향상시키는 조절 요소, 프리-mRNA에서 올바른 위치를 표적으로 삼는 BD, TS와 안정성을 촉진하는 종결인자 서열로 구성된다. 이러한 특징은 도 13과 아래 표 1에 표시되고 간략하게 설명되어 있으며, 이는 예시적인 ABCA4 REEC를 제시한다.

표 1

1	*ABCA4* 엑손 편집기 카세트의 AAV 패키징에 필수적인 AAV2-기반 역위 말단 반복 서열(ITR).
2	사이토메갈로바이러스(CMV) 프로모터는 *ABCA4* 엑손 편집기 발현을 유도한다.
3	인간 *ABCA4* mRNA로부터의 천연 5' 미번역 영역(UTR)은 천연 5' 조절을 유지한다.
4	RNA 엑손 편집을 통해 상응하는 내인성 암호 서열을 대체하도록 설계된 동의어 코돈 변경을 포함하는 *ABCA4* 엑손 1 내지 21. 동의어 코돈 변경은 크립틱 스플라이스 수용체 부위를 제거하여 잠재적인 대체 스플라이싱 반응을 완화시킨다.
5	서열-기반 정량화를 가능하게 하는 동의어 코돈 변경을 포함하는 *ABCA4* 엑손 22.
6	스플라이스 공여체(SD)는 내인성 *ABCA4* 인트론 22 스플라이스 수용체 부위 내에서 트랜스-스플라이싱하여 내인성 *ABCA4* 프리-mRNA 상류 서열이 엑손 22를 포함하는 *ABCA4* 엑손 편집기 암호 도메인 서열(CDS)로 대체된다.
7	이중 정지 코돈은 엑손 22의 하류(예를 들어, 링커, 3x U1, AU-Rich Element [ARE], BD 도메인 영역)에서 *ABCA4* 엑손 편집기로부터 아미노산이 번역되는 것을 방지한다.
8	링커는 스플라이스 공여체 부위에 구조적 유연성 및 접근성을 제공한다.
9	U1 snRNP와 연관되는 것으로 추정되는 3개의 탠덤 U1 결합 부위(3x U1); RNA 엑손 편집 효율을 증가시키는 것으로 입증되었음.
10	임의의 스플라이싱되지 않은 *ABCA4* 엑손 편집기가 세포질에 들어갈 때 안정성을 감소시키는 것으로 추정되는 ARE.
11	결합 도메인(BD)은 서열 상보성을 통해서 내인성 *ABCA4* 프리-mRNA 인트론 22에 대한 *ABCA4* 엑손 편집기의 표적화를 매개한다.
12	MALAT1 종결인자(예를 들어, MALAT1-MascRNA 항-mut1)는 효율적인 RNA 엑손 편집을 촉진한다.
13	엑손 편집기 카세트의 AAV 패키징에 필수적인 AAV2-기반 ITR.

[0262]

[0263] *ABCA4 REEC 특징*

[0264] 도 13에 제시된 예시적인 ABCA4 REEC 실시형태의 특징에 대한 세부 사항 및 배경은 아래에 설명되어 있다.

[0265] 역위 말단 반복(ITR) 서열: 5' 및 3' ITR 서열은 예시적인 RNA 엑손 편집기 서열에 측접하며, 트랜스진의 아데노 연관 바이러스(AAV) 패키징에 필수적이다. 예시적인 ABCA4 REEC는 유전자 치료에 일반적으로 사용되는 AAV2에서 유래된 "플롭 방향" 130개 뉴클레오타이드 ITR 서열을 포함한다.

[0266] CMV/CMV 프로모터: 이 조절 서열은 예시적인 엑손 편집기 전사체의 발현을 구동한다. 여기에는 사이토메갈로바이러스(CMV) 극초기 인핸서와 CMV 극초기 인핸서가 포함되며, 이는 비인간 영장류(NHP) 광수용체에서 높은 발현을 구동하는 것으로 나타났으며, 여기에서는 NHP 망막 및 인간 망막에서 높은 발현을 구동하는 것으로 나타났다. 예를 들어, 도 8, 9, 31 및 32를 참조한다.

[0267] 5' UTR: 예시적인 엑손 편집기 RNA 분자의 5' 말단은 천연 ABCA4 5' UTR 서열로 시작하며, 이는 TS에서 발생하는 최종 ONT mRNA 분자의 천연 RNA 서열을 유지한다. UTR 서열은 엑손 편집기 전사체 간의 시스-스플라이싱 또는 TS의 잠재적 발생을 완화하기 위해 의심되거나 데이터 구동되는 크립틱 스플라이스 수용체 부위를 제거하는 5개의 점 돌연변이로 변형되었다.

[0268] 암호 서열(CDS): 예시적인 ABCA4 REEC는 TS 다음에 해당하는 천연 서열을 대체하기 위해 ABCA4 mRNA 서열의 엑손 1 내지 22를 암호화한다(엑손 22에 대한 추가 세부 사항은 아래에 제시됨). 엑손 1~21은 40개 이상의 동의어 점 돌연변이로 벼형되어 의심되거나 데이터 구동되는 크립틱 스플라이스 수용체 부위를 제거하여 엑손 편집기 전사체 간의 시스-스플라이싱 또는 TS의 잠재적 발생을 완화한다.

[0269] 말단 엑손 22: 예시적인 ABCA4 REEC의 암호화된 CDS에는 말단 엑손이라고 하는 엑손 22가 포함된다. 엑손 편집기 서열에서 스플라이스 공여체(SD) 부위 바로 앞에 있고 나중에 TS를 통해 천연 엑손 23에 연결되어 올바른 엑손 22-23 접합을 형성하기 때문이다. TS에 의해 형성된 ONT 분자의 식별 및 정량화를 용이하게 하기 위해, 엑손 22는 29개의 동의어 점 돌연변이로 변형되었다. 이러한 돌연변이는 단백질 서열에 아미노산 변화를 유발하지 않고 RT-qPCR 분석(정량화)을 위한 선택적 프라이머/프로브 설계와 차세대 서열분석(NGS) 기반 분석(식별 및 정량화)을 용이하게 함으로써 트랜스-스플라이싱된 전사체와 내인성 전사체를 구별할 수 있는 기회를 제공한다.

[0270] 스플라이스 공여체 부위(스플라이싱 도메인; SD): 스플라이스 공여체 부위(스플라이싱 도메인; SD): 예시적인 ABCA4 REEC는 말단 엑손 22 바로 하류에 위치한 합의된 U1 스플라이스 공여체 부위(SD)로 구성된다. 이 SD는 스플라이소좀을 매개로 하는 TS 반응 동안 내인성 인트론 22 스플라이스 수용체(SA) 부위와 상호 작용하며, 그렇지 않으면 내인성 인트론 22 스플라이스 공여체 부위와 SA 부위 사이에서 발생할 자연스러운 시스-스플라이싱 반응 대신 상호 작용한다. 이 TS 사건의 결과는 상류 영역이 엑손 편집기에서 유래하고 하류 영역이 기본 ABCA4 프리-mRNA의 나머지로 구성되는 정밀하게 형성된 엑손 22 내지 23 접합부이며, 이는 자연스러운 시스-스플라이싱 사건을 거쳐 성숙한 mRNA 분자를 형성한다.

[0271] 정지 코돈: 예시적인 ABCA4 REEC는 SD 부위 바로 뒤에 이중 정지 코돈을 포함한다. 사실, GTAAGT SD 부위의 마지막 뉴클레오타이드는 TAGTGA 이중 정지 코돈의 첫 번째 뉴클레오타이드 역할을 한다. 이 의도적인 정지 코돈의 한 가지 목적은 사전 스플라이싱된 엑손 편집기 전사체가 핵을 빠져나와 세포질로 들어가 절단되고 스플라이싱되지 않은 단백질(NSP)을 생성하는 번역을 거치는 상황에서 C-말단에서 이질 아미노산이 추가되는 것을 제거하는 것이다. NSP의 C-말단에 있는 이러한 이질 아미노산은 정지 코돈을 포함시킴으로써 피할 수 있는 잠재적인 면역원성 위험을 초래할 수 있다. 정지 코돈은 또한 AU 풍부 요소(ARE) 매개 붕괴에 기여할 수 있으며, 본 발명자들은 하기에 논의된 바오 같이 이것이 세포질로 빠져나가는 사전 스플라이싱된 엑손 편집기 RNA를 분해하는 데 사용될 것이라고 가정하였다.

[0272] 40량체 링커: SD 부위와 하류 요소 사이에 위치한 링커 서열은 RNA 구조에 유연성을 제공하고 SD에 대한 접근성을 제공할 수 있으며, 이는 효과적인 TS에 유리할 수 있다. 40량체 링커는 수천 개의 링커 후보에 대한 포괄적인 스크린에서 매우 효과적인 서열로 나타났다. 예를 들어, 도 1을 참조한다. 40량체 링커를 포함하는 엑손 편집기의 관련 영역에 대한 예측된 2차 구조는 40량체 링커의 존재가 개방적이고 접근 가능한 SD를 초래함을 시사한다.

[0273] 3X U1 부위: 예시적인 ABCA4 REEC는 40량체 링커 하류에 있는 3개의 탠덤 U1 부위를 포함하는 증진제를 포함한다. U1 부위는 스플라이소좀 매개 스플라이싱 과정 동안 U1 snRNP에 의해 결합된다. 이 엑손 편집기에 1차 SD 부위 하류에 있는 3개의 탠덤 U1 부위를 포함시키면 RNA TS가 증가하고 관찰된 NSP 수치가 감소한다. 본 발명자들은 이러한 결과가 스플라이소좀과의 결합 증가와 TS가 발생하는 핵에서의 유지로 인한 것일 수 있다고 가정하였다.

[0274] AU 풍부 요소(ARE): 예시적인 ABCA4 REEC는 과립구-대식세포 집락 자극 인자(GM-CSF) 유전자의 mRNA에서 유래한 AU 풍부 요소(ARE)를 포함한다. 상류 정지 코돈과 함께 이 ARE의 존재는 3' UTR 유사 서열을 모방하도록 설계되었다. 본 발명자들은 미리 스플라이싱된 엑손 편집기 RNA가 세포질에 들어가는 경우, ARE RNA 결합 단백질이 ARE 서열을 인식하고 분자의 빠른 분해로 이어져 NSP 수준을 감소시킬 수 있다고 가정하였다.

[0275] 결합 도메인(BD): 예시적인 ABCA4 REEC의 암호화된 BD는 엑손 편집기 RNA를 천연 ABCA4 프리-mRNA와 직접 연관시킨다. 150개 뉴클레오타이드(nt) 서열은 프리-mRNA의 인트론 22(chr1:94041452-94041601) 내의 동일한 길이의 영역과 상보적이다. BD의 인트론 위치는 BD 서열과 관련하여 서로 다른 인트론 위치에서 분기되는 엑손 편집기 배열로 인트론 22를 스캐닝하는 반복적 프로세스를 통해 선택되었다. 이 스캐닝 프로세스는 인트론 22를 표적으로 하는 수천 개의 BD를 평가하는 대규모 병렬 라이브러리 NGS 기반 접근 방식과 생물 발광 또는 qPCR을 판독으로 사용하는 개별 엑손 편집기 수준에서의 평가를 모두 수반하였다. 예를 들어, 도 16을 참조한다.

[0276] MALAT1 삼중 나선 종결인자: 예시적인 ABCA4 REEC에는 또한 MALAT1 긴 비암호 RNA(lncRNA)에서 유래된 종결인자 서열이 포함된다. MALAT1 lncRNA의 이 부분은 엑손 편집기 RNA에 안정성과 핵 유지를 부여할 수 있는 삼중 나선 구조를 포함한다. MALAT1 종결인자는 자가 절단 리보자임과 같은 대체 종결인자를 적용할 때 달성되는 것보다 훨씬 더 높은 TS 효율로 이어진다. 예를 들어, 도 20A를 참조한다. 삼중 나선 뒤에는 Rnase P 절단 부위와 아래에서 논의되는 MALAT1 관련 소세포질 RNA(mascRNA)를 포함하는 짧은 서열이 따른다. 삼중 나선 하류의 Rnase P 절단은 엑손 편집기 전사체의 3' 단부를 정의한다.

[0277] MascRNA: 예시적인 ABCA4 REEC의 MascRNA 서열은 상류 Rnase P 절단 부위와 하류 Rnase Z 절단 부위가 측접되며, 일단 처리되면 핵을 빠져나가는 반면 엑손 편집기 전사체는 남아서 TS에 관여하는 것으로 생각된다. MascRNA는 Rnase P 절단 후 엑손 편집기 전사체 내에 더 이상 존재하지 않지만, 자연 발생 MALAT1 삼중 나선의 하류 서열을 포함하여 매우 효율적인 TS 결과를 달성하는 데 기여할 수 있다. 세포질에서 MascRNA는 다중 tRNA 합성효소 복합체 구성 요소인 글루타미닐-tRNA 합성효소(QARS)와의 상호 작용 및 상향 조절을 통해 전반적인 단백질 번역 및 세포 증식을 촉진하는 것으로 생각된다. 이러한 잠재적 위험을 완화하기 위해, 예시적인 ABCA4 REEC에 암호화된 mascRNA 서열은 항코돈 스템 루프 내에 점 돌연변이를 포함하도록 돌연변이되었으며, 이를 항-

Mut1이라고 하며, 이는 QARS와의 상호작용과 그에 따른 글로벌 단백질 합성 속도의 증가를 제거한다. 두 번째 점 돌연변이는 항-Mut1 돌연변이와 염기쌍을 이루어 mascRNA의 자연스러운 클로버리프 구조를 유지하는 데 도움이 된다. 중요한 점은, 항-Mut1을 mascRNA 서열에 도입해도 TS 효율성이 손상되지 않는다는 것이다. 예를 들어, 도 20B를 참조한다.

[0278] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 예시적인 ABCA4 REEC는 내인성 스플라이소좀에 의해 매개되는 5' 트랜스-스플라이싱 반응에서 기능하는 예시적인 ABCA4 5' 엑손 편집기 RNA 분자를 암호화한다. 도 14A에 도시된 바와 같이, 엑손 편집기 RNA의 전사 후, 천연 ABCA4 프리-mRNA의 인트론 22에 상보적인 엑손 편집기 내의 RNA 서열(결합 도메인; BD)은 엑손 편집기 RNA를 프리-mRNA에 국한시킨다. 다음으로, 트랜스-스플라이싱(TS) 반응이 엑손 편집기의 스플라이스 공여체 부위(SD)와 프리-mRNA의 인트론 22 스플라이스 수용체 부위(SA) 사이에서 발생한다. 이 반응은 엑손 1에서 엑손 22까지의 천연 내인성 프리-mRNA의 서열을 엑손-편집기 RNA가 제공하는 해당 암호 서열(CDS)로 대체하는 결과를 초래하며, 이로써 천연 내인성 프리-mRNA의 해당 영역 내에 존재할 수 있는 돌연변이를 교정한다. 생성된 표적내(ONT) 분자는 번역을 거쳐 생물학적으로 활성인 ABCA4 단백질을 형성한다. 예를 들어, 도 14A를 참조한다.

[0279] 상기에 더하여, 이론에 얽매이고자 함은 아니지만, 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기는 스플라이소좀 매개 트랜스-스플라이싱을 통해 작동하는 것으로 생각되며, 이는 시스-스플라이싱과 유사한 메커니즘을 통해 진행된다. 전사 후, 엑손 편집기 RNA는 핵 내에서 확산되고, U1 snRNP는 짝이 없는 SD에 침전된다. 또한 핵 내에서, 내인성(천연) 프리-mRNA 표적은 게놈 위치에서 전사되고, 측접 SD와 스플라이스 수용체(SA) 부위 사이의 시스-스플라이싱을 통해 인트론이 제거되는 것은 각각의 인트론의 SA가 나타난 후 몇 초 이내에 발생한다. 트랜스-스플라이싱 프로세스는 엑손 편집기의 결합 도메인(BD)이 내인성 ABCA4 프리-mRNA의 인트론 22 내에 위치한 상보적 서열과 염기 쌍을 이루어 시작되며, 이는 시스-스플라이싱을 통해 인트론이 제거되기 전에 발생해야 한다. 이 시점에서 스플라이소좀은 (1) 내인성 SD 및 SA 부위를 사용하여 시스-스플라이싱을 향해 라리아트 형성을 진행하거나 (2) 내인성 SA와 페어링된 엑손 편집기의 SD를 사용하여 트랜스-스플라이싱을 향해 "Y 분기" 형성을 진행할 수 있다. 후자의 경우, 엑손 편집기 SD(구아닌)의 첫 번째 뉴클레오타이드는 일반적으로 SA의 상류 15-50bp에 있는 인트론의 분기점과 공유 결합을 형성한다. 이 결합이 형성되면 엑손 편집기의 하류 부분이 엑손 22로 끝나는 CDS 부분에서 분리되고, 이 부분은 스플라이소좀과 상호 작용한다. 다음으로, 스플라이소좀은 인트론이 분리된 동안 엑손 편집기의 엑손 22를 내인성 pre mRNA의 엑손 23에 연결하여 올바른 엑손 22-23 접합을 생성한다. 마지막으로, 엑손 편집기 RNA의 하류 부분과 분리된 인트론 서열로 구성된 Y 브랜치 RNA는 시스 스플라이싱 중에 형성된 라리아트 RNA의 운명과 유사하게 빠르게 분해된다. 예를 들어, 도 14B를 참조한다.

[0280] ABCA4 엑손 편집기는 상기 표 1에 제시된 하나 이상의 구성 요소를 포함하거나 제외할 수 있다. 개별 기능 구성 요소는 표 1에 제시된 모든 구성 요소를 포함하지 않고도 ABCA4 엑손 편집기에 유리하게 포함될 수 있다. 예를 들어, 요소 3, 7, 8, 9, 10 및 12가 ABCA4 엑손 편집기에 이점을 제공하는 반면, 효과적인 ABCA4 엑손 편집기는 이러한 요소 중 하나 이상 없이 만들어질 수 있다.

[0281] *세포주 검정*

[0282] 일부 경우에, 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자가 배양 세포주에서 시험된다. RNA 엑손 편집기의 기능을 스크리닝, 선택 및 개선하기 위해, 배양 세포주는 충분한 수준에서 표적 ABCA4 프리-mRNA를 발현하도록 획득되거나 조작될 수 있다. ABCA4 발현은 일반적이고 견고하며 쉽게 형질전환/형질전환 가능한 형질전환 세포주에서 극히 낮기 때문에, B6라고 하는 HEK293T 기반 세포주는 높은 ABCA4 RNA 및 단백질 수준을 모두 발현하도록 조작되었다. 이는 CRISPR-매개 동족성 지향 복구(HDR)를 통해 내인성 ABCA4 프로모터와 엑손 1 사이에 구성적 CAGGS 프로모터의 노크인(KI)을 통해 달성되었다. 게놈 DNA에 대한 PCR은 B6 세포에서 적어도 하나의 대립유전자에 CAG 프로모터가 삽입되었음을 보여주었다. 그런 다음 ABCA4 RNA 발현은 4가지 다른 qPCR 검정을 사용하여 B6 세포에서 확인되었다. 이는 ABCA4를 발현하지 않는 부모 HEK293T 세포와 대조된다. 단백질 번역은 웨스턴 블롯을 통해 B6 세포에서 확인되었다. 도 3C를 참조한다.

[0283] 표적 천연 프리-mRNA를 효과적으로 교정하는 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 능력을 특징규명하기 위해, 결과적으로 트랜스-스플라이싱된 표적내(ONT) RNA가 번역을 거쳐 전체 길이의 ABCA4 단백질을 생성하는 능력을 평가하였다. 이를 위해 B6 세포주를 기반으로 넉아웃(KO) 세포주(17+06이라 함)를 설계하였다. 17+06 세포는 계속해서 높은 수준의 ABCA4 RNA를 생산하였지만, B6 세포주와 달리 17+06 세포는 ABCA4 단백질을 생산하지 않았다. 17+06 세포 조작은 CRISPR 및 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA)를 사용하여 ABCA4 유전자 암호 서열에 돌연변이를 도입하여 달성하였다. B6 세포는 높은 돌연변이 효율을 달성하고 ABCA4 유전자 서열을 파괴하기 위해

두 번의 연속적인 형질주입 라운드를 거쳤다. 먼저 엑손 3을 표적으로 하는 gRNA를 적용한 다음 엑손 3을 표적으로 하는 gRNA와 엑손 4를 표적으로 하는 gRNA의 혼합물을 적용하였다. 돌연변이는 17+06 게놈 DNA와 cDNA에서 생성된 PCR 앰플리콘에 적용된 생어 서열분석을 통해 확인하였, 후자는 모체 세포주인 B6를 생성하는 과정에서 성공적인 CAG 삽입을 거친 대립유전자 내에서 돌연변이가 발생하였다는 것을 확인하는 역할을 하였다. RT-qPCR은 17+06 세포주에서 ABCA4 RNA 발현의 지속성을 확인하였고, 웨스턴 블롯 분석은 ABCA4 단백질 번역이 폐지되었음을 나타냈다. 도 3C를 참조한다.

[0284] *RNA 엑손 편집기 스크리닝 플랫폼*

[0285] 도 13에 기재된 바와 같이, 5' RNA 엑손 편집기는 프리-mRNA 표적화를 위한 결합 도메인(BD) 및 스플라이스 공여체(SD) 부위에 대한 접근을 가능하게 하는 링커와 같은 여러 기능적 서열 요소를 포함한다. 주어진 유전자 표적에 대한 RNA 엑손 편집기를 조작할 때, 이러한 각 요소에 대한 다양한 서열 옵션이 높은 트랜스-스플라이싱(TS) 효율성에 기여하는 능력에 대해 시험된다. 이러한 시험은 (A) 개별 RNA 엑손 편집기 변형을 클로닝 및 형질주입하고 RT-qPCR/ddPCR 및 웨스턴 블롯을 통해 효율성을 분석하거나 (B) 차세대 서열분석(NGS) 및 계산 분석에 의존하여 효율성을 평가하는 고처리량(HT) 라이브러리 기반 접근 방식에서 RNA 엑손 편집기를 클로닝 및 풀링시켜 달성할 수 있다. ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 예인 ABCA4 REEC는 이러한 접근 방식을 조합하여 개발되었다. 두 접근 방식 모두 아래에 설명되어 있다

[0286] *개별 포맷에서 RNA 엑손 편집기 스크리닝*

[0287] 이 접근법은 라이브러리 기반 멀티플렉스 스크리닝을 시작하기 전에 RNA 엑손 편집기 서열 내의 소량의 가변 요소를 시험하고, 멀티플렉스 스크리닝에서 식별된 RNA 엑손 편집기의 성능을 검증하고, 리드 후보의 성능을 개선하는 데 적용될 수 있다. TS 효율성 평가는 RNA 및 단백질 수준에서 발생한다.

[0288] RNA 수준에서 TS 활동은 세포에서 총 RNA를 분리한 다음 역전사 및 실시간 정량 PCR(RT-qPCR)을 통해 평가하여 예를 들어 다음 표적의 RNA 카피 수를 측정한다. RNF20(정규화를 위한 하우스키핑 유전자); 천연(ABCA4) mRNA; 엑손 편집기 RNA; 양성 TS의 산물인 표적내, 엑손 편집 RNA(ONT); ONT+엑손 편집기+OFT(표적외) - 이 세 가지 표적을 모두 포착하는 단일 분석. OFT는 RNA 엑손 편집기가 트랜스 스플라이싱할 수 있는 잘못된 RNA 분자를 나타낸다.

[0289] ONT TS 효율성은 대체 백분율이라고도 하며, 성공적인 TS를 거친 전체 ABCA4 mRNA 집단의 부분을 나타내며, 다음 방정식을 통해 계산된다: ONT TS% = 100*(ONT 카피 수/(ONT 카피 수 + 천연 카피 수)).

[0290] RNA 엑손 편집기 TS 효율성은 ABCA4 RNA로 올바르게 트랜스-스플라이싱된 RNA 엑손 편집기 전사체 집단의 부분이며, 다음 방정식을 통해 계산된다: 엑손 편집기 TS% = 100*(ONT 카피 수/(ONT 카피 수 + 엑손 편집기 카피 수 + OFT 카피 수)).

[0291] 단백질 수준에서, TS 활성은 ABCA4의 경우 막 단백질을 풍부하게 하는 프로토콜을 통해 세포 또는 조직 샘플에서 추출한 단백질에 적용된 웨스턴 블롯 분석을 통해 측정된다. 막 단백질인 Na+/K+ ATPase는 로딩 대조군으로 사용된다. ONT 단백질의 수준은 ABCA4-특이적 항체(Ab)를 통해 측정된다. 태그(예를 들어 N-말단에 V5 태그)를 포함하는 작제물의 경우, 태그에 대한 특이적 Ab(예를 들어 V5 특이적 Ab)를 사용하여 웨스턴 블롯을 조사하여 ONT 단백질 수준을 평가할 수 있다.

[0292] *라이브러리 포맷에서 RNA 엑손 편집기 스크리닝*

[0293] 상기 내용에 더하여, RNA 엑손 편집기는 BD 또는 링커와 같은 엑손 편집기의 특정 기능에 초점을 맞출 수 있는 DNA 올리고 라이브러리의 합성에 의존하는 고속대량처리 라이브러리 형식으로 스크리닝될 수 있다.

[0294] *전장 엑손-편집된 ABCA4 mRNA 서열의 확인:*

[0295] 엑손 편집으로부터 생성된 ABCA4 성숙 mRNA가 정확한 트랜스-스플라이싱 반응, 정확한 엑손 22-엑손 23 접합부에서 발생할 것으로 예측되는 서열을 가지고 있는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 ABCA4-01 엑손 편집기를 암호화하는 플라스미드로 일시적으로 형질주입된 ABCA4 KO 세포로부터 편집된 ABCA4 RT-PCR 생성물을 분리시키고 서열분석하였다. 생어 서열분석은 무작위로 선택된 여러 클론에서 정확한 성숙 mRNA 서열을 확인하였다. 이러한 서열분석 결과는 올바른 엑손 22-엑손 23 접합을 확인하는 것 외에도 전체 길이의 엑손 편집된 ABCA4 성숙 mRNA 분자가 엑손 1 내지 22에 걸친 엑손 편집기 유래 CDS와 엑손 23~50에 걸쳐 있는 내인성 서열을 포함하여 전체 길이에 걸쳐 예상되는 서열을 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 ABCA4-01 처리를 매개로 한 ABCA4 엑손

편집이 의도한 올바른 ABCA4 성숙 mRNA 서열을 생성한다는 추가적인 확신을 제공한다.

[0296] *엑손 편집된 ABCA4 단백질의 ATPase 기능적 활성 평가:*

[0297] ABCA4 단백질은 ATP-결합 카세트(ABC) 수송체의 슈퍼패밀리의 구성원이며, 광수용체 외측 분절 디스크 막의 림 영역을 따라 우선적으로 국소화된다. ABC 수송체는 ATP 가수분해의 에너지를 이용하여 이온에서 지질 및 펩타이드에 이르기까지 다양한 기질 세트를 세포막을 가로질러 단방향으로 이동시킨다. ABCA4 단백질은 눈에 들어오는 빛이 전기 신호(광전도)로 변환되면 활성화된다. 광전도 중에 잠재적으로 독성이 있는 비타민 A 유도체가 형성되고, ABCA4 단백질은 광수용체 외측 분절에서 이러한 물질 중 최소 두 가지(모두 트랜스 레티날 및 11-시스 레티날)를 제거하는 데 도움이 된다. 이 광수용체 클리어런스 메커니즘은 광수용체와 망막 색소 상피 세포를 이러한 분자에 의해 유도될 수 있는 축적 및 2차 손상으로부터 보호하는 데 도움이 된다. 위에서 설명한 바와 같이, 열성적으로 유전되는 기능 상실 ABCA4 돌연변이는 이러한 비타민 A 유도체의 축적을 초래하여 리포푸신에서 발견되는 비스 레티노이드 피리디늄염 N-레티닐리덴-N-레티닐에탄올아민 형광체인 A2E를 포함한 리포푸신이 축적되도록 하고, 이로 인해 망막에서 세포 독성이 발생하고 결국에는 시력이 점진적으로 상실된다.

[0298] 기질 결합으로 인한 활성 증가를 포함한 ATPase 활성은 ABCA4 단백질 기능에 중요한다. 따라서 엑손 편집을 통해 생성된 ABCA4 mRNA에서 번역된 ABCA4 단백질의 ATPase 활성을 평가하는 것은 ABCA4 생물학적 활성의 전반적인 지표 역할을 한다. 이전 보고서에 따르면 정제된 야생형(WT) ABCA4 단백질과 40 μM의 모든 트랜스 레티날(ATR)을 배양하면 ATPase 활성이 1.8 내지 2.5배 증가한다. 이 정보를 염두에 두고 엑손 편집된 ABCA4 단백질의 생물학적 활성을 평가하기 위한 실험을 설계하였다.

[0299] ABCA4-01(서열번호 81)의 RNA 엑손 편집기의 N-말단 V5-에피토프 태그 버전을 암호화하는 과잉발현 플라스미드로 형질주입된 ABCA4 KO 세포에서 구제된 ABCA4 단백질의 ATPase 활성을 확립된 방법을 사용하여 ABCA4 단백질 면역침전 후 40 μM 전-트랜스 레티날(ATR)이 없거나 있는 상태에서 평가하였다. 초기 데이터는 40 μM 올-트랜스 레티날을 첨가하면 증가하는 기저 수준의 ATPase 활성을 나타낸다. 도 24를 참조한다. ABCA4가 없는 형질주입되지 않은 샘플에서 최소한의 배경 ATPase 활성이 검출되었다. 이러한 결과는 ABCA4-01(서열번호 90) 처리에서 생성된 엑손 편집된 ABCA4 단백질이 광수용체 외측 부분에서 올-트랜스 레티날과 과도한 11-시스 레티날을 운반하는 데 필요한 기능적 ATPase 활성을 나타낼 것이라는 증거를 제공한다. 일부 실시형태에서, 서열번호 90의 단편(예를 들어 서열번호 69)은 다른 5' UTR과 결합되어 동일한 결과를 얻을 수 있다. 이러한 결과는 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 발현에 따른 ABCA4 생물학적 활성의 회복을 나타낸다.

[0300] *ABCA4-관련 망막병증 환자를 위한 ABCA4 엑손 편집기 치료제의 용도를 뒷받침하는 생체내 NHP 연구의 개요:*

[0301] 실시예 4는 AAV8 기반 V5 에피토프 태그 ABCA4 엑손 편집기가 1E11 vg/주사를 단일 망막하 투여한 후 1개월 후에 아프리카 녹색 원숭이(AGM)에서 치료적으로 관련성 있는 엑손 편집 활성을 초래한다는 것을 입증하는 증거를 제시한다. 주목할 점은 이 연구에서 시험한 Early Lead 벡터(서열번호 42)를 포함하는 것이 ABCA4-01(서열번호 90)에 존재하는 요소의 추가 최적화 및 최종 선택을 위한 기초로 사용되었으며, 이는 서열번호 78을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함한다. 예를 들어, 도 4 내지 도 12; 표 1 및 2를 참조한다.

[0302] 실시예 8은 ABCA4-01(서열번호 90)의 선택된 조절 요소가 AGM에서 3개월 시점까지 지속적인 발현 및 엑손 편집 활성을 부여한다는 것을 입증하는 증거를 제시한다. 이 연구에서 시험한 AAV8 작제물은 서열번호 77(첫 번째 104개 뉴클레오타이드는 천연 ABCA4 5' UTR과 번역 개시를 위한 ATG 시작 코돈으로 구성됨)을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함하는데, 이는 Early Lead 벡터(서열번호 42)를 포함하는 것과 매우 유사하지만 V5 에피토프 태그가 없고 스플라이스 도메인 다음에 이중 종료 코돈을 포함하고 ABCA4-01(서열번호 90)과 비교했을 때 시험관내에서 더 높은 수준의 절단된 ABCA4 비-스플라이스 단백질(NSP)을 생성한다는 점에서 다르다. 특히, 이 연구에서 시험한 AAV8 작제물은 Early Lead 벡터를 포함하는(서열번호 42)와 매우 유사한 엑손 편집기(서열번호 77)를 포함하는데, 이는 단일 망막하 투여량 4.3E10 vg/눈을 투여한 후 모든 동물에서 1개월 및 3개월 후에 잘 견디었으며, 이는 관련 작제물 ABCA4-01(서열번호 90)을 사용하는 임상적 접근 방식을 더욱 뒷받침한다. 도 22를 참조한다. 서열번호 90을 포함하는 ABCA4-01 RNA 엑손 편집기(이는 서열번호 78을 포함함)는 이 연구에서 사용된 서열번호 77을 포함하는 RNA 엑손 편집기와 다른데, 서열번호 77에는 증강제(예를 들어 서열번호 62) 또는 번역 증강제(예를 들어 서열번호 63)가 포함되지 않기 때문이다. 그러나 서열번호 77과 서열번호 78은 각각 동일한 조절 요소와 이중 정지 코돈을 공유한다.

[0303] 실시예 10은 ABCA4-01(서열번호 90)이 NHP에서 6개월 시점까지 지속적인 발현 및 엑손 편집 활성을 부여한다는 것을 입증하는 증거를 제시한다. 보다 구체적으로, 도 30A 내지 30C는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물

(ABCA4-01; 서열번호 90)로 처리한 후 6개월(6) 후에 NHP에서 생체내 강력한 ABCA4 RNA 및 단백질 대체를 입증하는 결과를 제시한다. 간략하면, 야생형 원숭이를 ABCA4-01의 단일 망막하 투여량으로 치료하였다(3.5E11 vg/눈의 예시적인 투여량에 대한 결과가 제시됨). 이 ABCA4-01 투여량의 RNA 대체율은 약 40% 내지 60% 범위였다. 이는 적격 IA-MS 분석(도 30C)으로 측정한 결과 결과적인 인간-NHP 키메라 ABCA4 단백질의 치료 수준을 초래하였다. 보다 구체적으로, 이러한 동물에서 ABCA4 RNA 편집으로 인해 발생하는 인간 NHP 키메라 ABCA4 단백질은 시험된 샘플에서 총(인간-NHP + NHP) ABCA4 단백질의 20 내지 40%로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 단일 망막하 주사를 통해 전달된 고용량 ABCA4-01(1E12 vg/눈)로 치료한 야생형 원숭이에서 최대 66%의 RNA 대체와 최대 45%의 인간/NHP 키메라 ABCA4 단백질이 검출되었다. 이러한 결과는 ABCA4-01이 NHP에서 편집된 ABCA4 단백질 발현의 치료적으로 관련 있는 수준을 달성한다는 것을 나타내며, 이는 이전에 *Abca4* KO 마우스 모델에서 치료적 이점을 제공하는 것으로 나타난 구제된 ABCA4 단백질 수준을 초과한다.

[0304] 실시예 12는 서열번호 90을 포함하는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물인 ABCA4-01이 인간 광수용체의 맥락에서 기능한다는 증거를 제시한다. 간략하면, 다수의 인간 공여자로부터 얻은 공여자 유래 망막 이식편을 ABCA4-01(3.9E11 vg)로 처리하여 인간 광수용체에서 ABCA4-01의 활성을 평가하였다. ABCA4-01 처리로 인해 내인성 엑손 1 내지 22가 ABCA4-01에 의해 암호화된 동일한 해당 엑손으로 약 20 내지 30% RNA가 대체되었다(도 31). 주목할 점은 동일한 로트의 ABCA4-01이 실시예 10에서 언급된 조사적 NHP 연구에서도 사용되었으며, 이는 ABCA4-01 결과가 NHP에서 인간 대상체에게 번역될 수 있음을 더욱 입증한다.

[0305] **III. 벡터**

[0306] 트랜스-스플라이싱 분자는 다양한 기술을 사용하여, 예를 들어 재조합 아데노-연관 바이러스(AAV) 벡터 또는 비바이러스 벡터와 같은 다른 벡터 양상을 사용하여 개체의 표적 세포에 전달될 수 있다. 따라서, 트랜스-스플라이싱 분자를 포함/암호화하는 벡터(예를 들어 트랜스-스플라이싱 분자를 포함/암호화하는 바이러스 또는 비바이러스 벡터, 예를 들어 트랜스-스플라이싱 분자를 포함/암호화하는 DNA 벡터)가 본 명세서에서 제공된다. 모든 적합한 핵산 벡터는 트랜스-스플라이싱 분자 및 재조합 AAV의 구성 요소를 설계하고 조립하기 위해 본 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 벡터는 개체의 선택된 세포에서 트랜스-스플라이싱 분자를 발현하는 프로모터에 의해 구동되는 트랜스-스플라이싱 분자를 운반하는 재조합 AAV이다. 재조합 벡터의 조립 방법은 당업계에 공지되어 있다. 예를 들어, 문헌[Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, 1989; Kay, M. A. et al., *Nat. Medic*, 2001, 7(1):33-40; 및 Walther W. and Stein U., *Drugs* 2000, 60(2):249-71]을 참조한다.

[0307] 본 명세서에 기재된 특정 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱 분자는 AAV 벡터를 통해 치료가 필요한 선택된 세포, 예를 들어 광수용체 세포에 전달된다. 다양한 자연적으로 발생하는 AAV 혈청형이 이용 가능하다. AAV 캡시드에는 많은 자연적 변이체가 존재하여 눈 또는 달팽이관 세포에 특별히 적합한 특성을 가진 AAV를 식별하고 사용할 수 있다. 인공 AAV 벡터는 통상적인 분자 생물학 기술에 의해 조작될 수 있으며, 이러한 입자를 트랜스-스플라이싱 분자 핵산 서열의 세포 특이적 전달, 면역원성 최소화, 안정성 및 입자 수명 조정, 효율적인 분해, 핵으로의 정확한 전달 등을 위해 최적화할 수 있다. 예를 들어, 이러한 인공 캡시드는 선택된 AAV 서열(예를 들어 vp1 캡시드 단백질의 단편)을 다른 선택된 AAV, 동일한 AAV의 비인접 부분, 비-AAV 바이러스 공급원 또는 비바이러스 공급원에서 얻을 수 있는 이종 서열과 조합하여 사용하는 모든 적합한 기술에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는 제한 없이 유사형 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드 또는 "인간화된" AAV 캡시드일 수 있다. 한 AAV의 캡시드가 이종 캡시드 단백질로 대체된 유사형 벡터는 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자를 전달하는 데 유용하다.

[0308] 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자의 발현은 재조합적으로 조작된 AAV 또는 원하는 트랜스-스플라이싱 분자를 포함/암호화하는 서열을 함유하는 인공 AAV에 의한 전달을 통해 선택된 세포에서 달성될 수 있다. AAV의 사용은 비교적 무독성이고 효율적인 유전자 전달을 제공하며 특정 목적에 맞게 쉽게 최적화될 수 있기 때문에 DNA의 외인성 전달의 일반적인 모드이다. 인간 또는 비인간 영장류에서 분리된 AAV의 잘 특징규명된 혈청형 중에서 인간 혈청형 2는 다양한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험에 널리 사용되어 왔다.

[0309] 일부 실시형태에서, AAV는 AAV1 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 6 또는 64 또는 US20150159173의 서열번호 11 또는 27), AAV2 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 7 또는 70, US20150159173의 서열번호 7 또는 23 또는 US20150159173의 서열번호 7), AAV2G9 또는 이의 변이체, AAV3 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 8 또는 71), AAV3a 또는 이의 변이체, AAV3b 또는 이의 변이체(예를 들어, 미국 특허 제6,156,303호의 서열번호 1 및 10), AAV3-3 또는 이의 변이체(예를 들어,

WO2005033321의 서열번호 200 및 217), AAV4 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 63), AAV4-4 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 201 또는 218), AAV5 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 114), AAV6 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 65), AAV6.1 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 29), AAV6.2 또는 이의 변이체, AAV6.1.2 또는 이의 변이체, AAV7 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 1 내지 3), AAV7.2 또는 이의 변이체, AAV8 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 4 및 95 또는 AAV8(b)(야생형 AAV8에 비해서 아미노산 위치 587 내지 595에 Pro-Glu-Arg-Thr-Ala-Met-Ser-Leu-Pro(서열번호 132)의 아미노산 서열을 가짐, 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된 미국 특허 제9,567,376호에 기재된 바와 같음)), AAV9 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 5 및 100), AAV9.9 또는 이의 변이체, AAV9.11 또는 이의 변이체, AAV9.13 또는 이의 변이체, AAV9.16 또는 이의 변이체, AAV9.24 또는 이의 변이체, AAV9.45 또는 이의 변이체, AAV9.47 또는 이의 변이체, AAV9.61 또는 이의 변이체, AAV9.68 또는 이의 변이체, AAV9.84 또는 이의 변이체(예를 들어, 전문이 참조에 의해 본 명세서에 포함된 문헌[N. Pulicherla et al. *Molecular Therapy* 19(6):1070-1078 (2011)] 참조), AAV10 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 117), AAV11 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 118), AAV12 또는 이의 변이체(예를 들어, US20030138772의 서열번호 119), AAV16.3 또는 이의 변이체, AAV24.1 또는 이의 변이체, AAV27.3 또는 이의 변이체, AAV42.12 또는 이의 변이체, AAV42-1b 또는 이의 변이체, AAV42-2 또는 이의 변이체, AAV42-3a 또는 이의 변이체, AAV42-3b 또는 이의 변이체, AAV42-4 또는 이의 변이체, AAV42-5a 또는 이의 변이체, AAV42-5b 또는 이의 변이체, AAV42-6b 또는 이의 변이체, AAV42-8 또는 이의 변이체, AAV42-10 또는 이의 변이체, AAV42-11 또는 이의 변이체, AAV42-12 또는 이의 변이체, AAV42-13 또는 이의 변이체, AAV42-15 또는 이의 변이체, AAV42-aa 또는 이의 변이체, AAV43-1 또는 이의 변이체, AAV43-12 또는 이의 변이체, AAV43-20 또는 이의 변이체, AAV43-21 또는 이의 변이체, AAV43-23 또는 이의 변이체, AAV43-25 또는 이의 변이체, AAV43-5 또는 이의 변이체, AAV44.1 또는 이의 변이체, AAV44.2 또는 이의 변이체, AAV44.5 또는 이의 변이체, AAV223.1 또는 이의 변이체, AAV223.2 또는 이의 변이체, AAV223.4 또는 이의 변이체, AAV223.5 또는 이의 변이체, AAV223.6 또는 이의 변이체, AAV223.7 또는 이의 변이체, AAV1-7/rh.48 또는 이의 변이체, AAV1-8/rh.49 또는 이의 변이체, AAV2-15/rh.62 또는 이의 변이체, AAV2-3/rh.61 또는 이의 변이체, AAV2-4/rh.50 또는 이의 변이체, AAV2-5/rh.51 또는 이의 변이체, AAV3.1/hu.6 또는 이의 변이체, AAV3.1/hu.9 또는 이의 변이체, AAV3-9/rh.52 또는 이의 변이체, AAV3-11/rh.53 또는 이의 변이체, AAV4-8/rh.64 또는 이의 변이체, AAV4-9/rh.54 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 116), AAV4-19/rh.55 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 117), AAV5-3/rh.57 또는 이의 변이체, AAV5-22/rh.58 또는 이의 변이체, AAV7.3/hu.7 또는 이의 변이체, AAV16.8/hu.10 또는 이의 변이체, AAV16.12/hu.11 또는 이의 변이체, AAV29.3/bb.1 또는 이의 변이체, AAV29.5/bb.2 또는 이의 변이체, AAV106.1/hu.37 또는 이의 변이체, AAV114.3/hu.40 또는 이의 변이체, AAV127.2/hu.41 또는 이의 변이체, AAV127.5/hu.42 또는 이의 변이체, AAV128.3/hu.44 또는 이의 변이체, AAV130.4/hu.48 또는 이의 변이체, AAV145.1/hu.53 또는 이의 변이체, AAV145.5/hu.54 또는 이의 변이체, AAV145.6/hu.55 또는 이의 변이체, AAV161.10/hu.60 또는 이의 변이체, AAV161.6/hu.61 또는 이의 변이체, AAV33.12/hu.17 또는 이의 변이체, AAV33.4/hu.15 또는 이의 변이체, AAV33.8/hu.16 또는 이의 변이체, AAV52/hu.19 또는 이의 변이체, AAV52.1/hu.20 또는 이의 변이체, AAV58.2/hu.25 또는 이의 변이체, AAVA3.3 또는 이의 변이체, AAVA3.4 또는 이의 변이체, AAVA3.5 또는 이의 변이체, AAVA3.7 또는 이의 변이체, AAVC1 또는 이의 변이체, AAVC2 또는 이의 변이체, AAVC5 또는 이의 변이체, AAV-DJ 또는 이의 변이체(예를 들어, 서열번호 2 또는 3 of US20140359799), AAV-DJ8 또는 이의 변이체, AAVF3 또는 이의 변이체, AAVF5 또는 이의 변이체, AAVH2 또는 이의 변이체, AAVH6 또는 이의 변이체, AAVLK03 또는 이의 변이체, AAVH-1/hu.1 또는 이의 변이체, AAVH-5/hu.3 또는 이의 변이체, AAVLG-10/rh.40 또는 이의 변이체, AAVLG-4/rh.38 또는 이의 변이체, AAVLG-9/hu.39 또는 이의 변이체, AAVN721-8/rh.43 또는 이의 변이체, AAVCh.5 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 46), AAVCh.5R1 또는 이의 변이체, AAVcy.2 또는 이의 변이체, AAVcy.3 또는 이의 변이체, AAVcy.4 또는 이의 변이체, AAVcy.5 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 8 및 24), AAVCy.5R1 또는 이의 변이체, AAVCy.5R2 또는 이의 변이체, AAVCy.5R3 또는 이의 변이체, AAVCy.5R4 또는 이의 변이체, AAVcy.6 또는 이의 변이체, AAVhu.1 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 144), AAVhu.2 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 143), AAVhu.3 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 145), AAVhu.4 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 141), AAVhu.5 또는 이의 변이체, AAVhu.6 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 84), AAVhu.7 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 150), AAVhu.9 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 155), AAVhu.10 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 156), AAVhu.11 또는 이의 변

이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 153), AAVhu.13 또는 이의 변이체(US20150159173의 서열번호 16 및 32), AAVhu.15 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 147), AAVhu.16 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 148), AAVhu.17 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 83), AAVhu.18 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 149), AAVhu.19 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 133), AAVhu.20 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 134), AAVhu.21 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 135), AAVhu.22 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 138), AAVhu.23.2 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 137), AAVhu.24 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 136), AAVhu.25 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 146), AAVhu.26 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 17 및 33), AAVhu.27 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 140), AAVhu.28 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 42), AAVhu.29 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 132), AAVhu.29R 또는 이의 변이체, AAVhu.31 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 121), AAVhu.32 또는 이의 변이체(WO2005033321의 서열번호 122), AAVhu.34 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 125), AAVhu.35 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 164), AAVhu.37 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 18 및 34), AAVhu.39 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 102), AAVhu.40 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 87), AAVhu.41 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 91), AAVhu.42 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 85), AAVhu.43 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 160), AAVhu.44 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 45), AAVhu.44R1 또는 이의 변이체, AAVhu.44R2 또는 이의 변이체, AAVhu.44R3 또는 이의 변이체, AAVhu.45 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 127), AAVhu.46 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 159), AAVhu.47 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 128), AAVhu.48 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 38), AAVhu.48R1 또는 이의 변이체, AAVhu.48R2 또는 이의 변이체, AAVhu.48R3 또는 이의 변이체, AAVhu.49 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 189), AAVhu.51 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 190), AAVhu.52 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 191), AAVhu.53 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 19 및 35), AAVhu.54 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 188), AAVhu.55 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 187), AAVhu.56 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 192), AAVhu.57 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 193), AAVhu.58 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 194), AAVhu.60 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 184), AAVhu.61 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 185), AAVhu.63 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 195), AAVhu.64 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 196), AAVhu.66 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 197), AAVhu.67 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 198), AAVhu.14/9 또는 이의 변이체, AAVhu.t 19 또는 이의 변이체, AAVrh.2 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 39), AAVrh.2R 또는 이의 변이체, AAVrh.8 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 41), AAVrh.8R 또는 이의 변이체, AAVrh.10 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 9 및 25), AAVrh.12 또는 이의 변이체, AAVrh.13 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 10 및 26), AAVrh.13R 또는 이의 변이체, AAVrh.14 또는 이의 변이체, AAVrh.17 또는 이의 변이체, AAVrh.18 또는 이의 변이체, AAVrh.19 또는 이의 변이체, AAVrh.20 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 1), AAVrh.21 또는 이의 변이체, AAVrh.22 또는 이의 변이체, AAVrh.23 또는 이의 변이체, AAVrh.24 또는 이의 변이체, AAVrh.25 또는 이의 변이체, AAVrh.31 또는 이의 변이체, AAVrh.32 또는 이의 변이체, AAVrh.33 또는 이의 변이체, AAVrh.34 또는 이의 변이체, AAVrh.35 또는 이의 변이체, AAVrh.36 또는 이의 변이체, AAVrh.37 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 40), AAVrh.37R2 또는 이의 변이체, AAVrh.38 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 86), AAVrh.39 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 3, 20 또는 36), AAVrh.40 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 92), AAVrh.43 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 21 및 37), AAVrh.46 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 4 및 22), AAVrh.48 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 44), AAVrh.48.1 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 44), AAVrh.48.1.2 또는 이의 변이체, AAVrh.48.2 또는 이의 변이체, AAVrh.49 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 103), AAVrh.50 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 108), AAVrh.51 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 104), AAVrh.52 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 96), AAVrh.53 또는 이의 변이체(예를 들어,

WO2005033321의 서열번호 97), AAVrh.54 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 49), AAVrh.56 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 152), AAVrh.57 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 105), AAVrh.58 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 48), AAVrh.61 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 107), AAVrh.62 또는 이의 변이체(예를 들어, WO2005033321의 서열번호 114), AAVrh.64 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 43), AAVrh.64R1 또는 이의 변이체, AAVrh.64R2 또는 이의 변이체, AAVrh.67 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 47), AAVrh.73 또는 이의 변이체(예를 들어, US20150159173의 서열번호 5) 또는 AAVrh.74 또는 이의 변이체(예를 들어, US2015015917의 서열번호 6). 변이체의 비제한적 예는 US20030138772의 서열번호 9, 27 내지 45, 47 내지 62, 66 내지 69, 73 내지 81, 84 내지 94, 96, 97, 99, 및 101 내지 113 및 WO2005033321의 서열번호 1, 2, 4 내지 82, 89, 90, 93 내지 95, 98, 100, 101, 109 내지 113, 118 내지 120, 124, 126, 131, 139, 142, 151, 154, 158, 161, 162, 165 내지 183, 202, 204 내지 212, 215, 219, 및 224 내지 236을 포함하며 이들의 내용은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. 일 실시형태에서, AAV 혈청형은 미국 특허 제2021/0189430호에 기술된 혈청형 중 하나이며, 이의 내용은 전문이 본 명세서에 참조에 의해 포함된다. AAV의 아미노산 서열은 헤파린 황산 프로테오글리칸과 상호 작용하는 하나 이상의 위치 또는 AAV2의 VP1 넘버링에 기반한 넘버링인 아미노산 484, 487, 527, 532, 585 또는 588에 해당하는 하나 이상의 위치에서 AAV 캡시드 단백질의 하나 이상의 아미노산 치환을 포함할 수 있다.

[0310] 달리 명시되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 AAV ITR 및 기타 선택된 AAV 구성 요소는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 또는 기타 알려진 및 알려지지 않은 AAV 혈청형을 포함하지만 이에 제한되지 않는 모든 AAV 혈청형 중에서 쉽게 선택될 수 있다. 일 실시형태에서, ITR은 AAV2에서 유래한다. 이러한 ITR 또는 기타 AAV 구성 요소는 당업자에게 이용 가능한 기술을 사용하여 AAV 혈청형에서 쉽게 단리될 수 있다. 이러한 AAV는 학술적, 상업적 또는 공공 소스(예를 들어 American Type Culture Collection, 미국 버지니아주 매나서스 소재)에서 단리되거나 획득될 수 있다. 또는 AAV 서열은 문헌이나 GenBank, PubMed 또는 이와 유사한 데이터베이스에서 이용 가능한 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 기타 적합한 수단을 통해 획득될 수 있다.

[0311] 벡터 내로의 조립에 바람직한 AAV 단편은 vp1, vp2, vp3, 및 초가변 영역을 포함하는 cap 단백질, rep 78, rep 68, rep 52, 및 rep 40을 포함하는 rep 단백질, 및 이러한 단백질을 암호화하는 서열을 포함한다. 이러한 단편은 다양한 벡터 시스템 및 숙주 세포에서 용이하게 활용될 수 있다. 이러한 단편은 단독으로, 다른 AAV 혈청형 서열 또는 단편과 조합되어 또는 다른 AAV 또는 비-AAV 바이러스 서열로부터의 요소와 조합되어 사용될 수 있다. 본 명세서에서 사용된 바와 같이, 인공 AAV 혈청형은, 비제한적으로, 비-자연 발생 캡시드 단백질이 있는 AAV를 포함한다. 이러한 인공 캡시드는, 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 상이한 선택된 AAV 혈청형, 동일한 AAV 혈청형의 비-인접 부분, 비-AAV 바이러스 공급원 또는 비-바이러스 공급원으로부터 수득될 수 있는 이종 서열과 조합하여 사용하여, 임의의 적절한 기술에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV 혈청형은, 비제한적으로, 슈도타입 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드 또는 "인간화" AAV 캡시드일 수 있다. 하나의 AAV의 캡시드가 상이한 캡시드 단백질을 갖는 AAV로부터의 ITR과 함께 활용되는 슈도타입 벡터가 본 발명에서 유용하다. 일 실시형태에서, AAV는 AAV2/5(즉, AAV2 ITR 및 AAV5 캡시드를 갖는 AAV)이다. 또 다른 실시형태에서, AAV는 AAV2/8(즉, AAV2 ITR 및 AAV8 캡시드를 갖는 AAV)이다. 일 실시형태에서, AAV는 AAV8 캡시드를 포함한다. 이러한 AAV8 캡시드는 NCBI 참조 서열: YP_077180.1하에 확인되는 아미노산 서열을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, AAV8 캡시드는 진뱅크 수탁: AF513852.1의 nt 2121 내지 4337에 의해 암호화되는 캡시드를 포함한다.

[0312] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에서 유용한 벡터는, 최소한, 선택된 AAV 혈청형 캡시드, 예를 들어, AAV2 캡시드 또는 이의 단편을 암호화하는 서열을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 유용한 벡터는, 최소 한, 선택된 AAV 혈청형 rep 단백질, 예를 들어, AAV2 rep 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 서열을 함유한다. 선택적으로, 이러한 벡터는 AAV cap 및 rep 단백질 둘 모두를 함유할 수 있다. AAV rep 및 cap 둘 모두가 제공되는 벡터에서, AAV rep 및 AAV cap 서열은 둘 모두 하나의 혈청형에서 기원하는 것, 예를 들어, AAV2 기원일 수 있다.

[0313] 대안적으로, rep 서열이 cap 서열을 제공하는 것과 상이한 AAV 혈청형으로부터의 것인 벡터가 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, rep 및 cap 서열은 별개의 공급원(예를 들어, 별개의 벡터 또는 숙주 세포 및 벡터)으로부터 발현된다. 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 참조에 의해 포함된 미국 특허 번호 7,282,199에 기술된 키메라 AAV 벡터가 형성되도록 이러한 rep 서열이 상이한 AAV 혈청형의 cap 서열에 인-프레임으로 융합된다.

[0314] 적합한 재조합 AAV(rAAV)는 본 명세서에 정의한 바와 같이 AAV 세로타입 캡시드 단백질 또는 그 단편을 암호화

하는 핵산 서열, 기능적 rep 유전자, 예를 들어 AAV ITR과 트랜스 스플라이싱 분자 핵산 서열로 구성된 미니 유전자, 그리고 미니 유전자를 AAV 캡시드 단백질로 패키징하는 것을 허용하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하여 생성된다. AAV 캡시드에 AAV 미니유전자를 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양하는 데 필요한 성분은 트랜스로 숙주 세포에 제공될 수 있다. 또는, 필요한 구성 요소(예를 들어, 미니유전자, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능) 중 하나 이상은 당업자자에게 알려진 방법을 사용하여 필요한 구성 요소 중 하나 이상을 포함하도록 설계된 안정적인 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다.

[0315] 일 실시형태에서, AAV는 프로모터 (또는 프로모터의 기능성 단편)을 포함한다. rAAV에서 사용될 프로모터는 원하는 표적 세포에서 선택된 트랜스진을 발현시킬 수 있는 다수의 구성적 또는 유도성 프로모터로부터 선택될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 참조로 포함된 국제 특허 공개 WO 2014/012482에서 확인되는 프로모터의 목록을 참조한다. 일 실시형태에서, 프로모터는 세포-특이적이다. "세포-특이적"이라는 용어는 재조합 벡터에 대해 선택된 특정 프로모터가 특정 세포 유형에서 선택된 트랜스진의 발현을 지시할 수 있다는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 프로모터는 광수용체 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 간상체 및/또는 원추체에서의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 망막 색소 상피(RPE) 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 신경절 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 뮐러 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 양극 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 수평 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 무축삭 세포에서의 트랜스진의 발현에 대해 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 트랜스진은 위에 언급된 세포 중 임의의 것에서 발현된다.

[0316] 또 다른 실시형태에서, 프로모터는 발현될 표적 유전자에 대한 천연 프로모터이다. 유용한 프로모터는, 비제한적으로, 간상체 옵신 프로모터, 적색-녹색 옵신 프로모터, 청색 옵신 프로모터, cGMP-포스포다이에스터라제 프로모터, 마우스 옵신 프로모터, 로돕신 프로모터, 원추체 형질도입의 알파-소단위, 베타 포스포다이에스터라제(PDE) 프로모터, 망막색소변성증 프로모터, NXNL2/NXNL 1 프로모터, RPE65 프로모터, 망막 변성 둔화/페리페린 2(Rds/perph2) 프로모터 및 VMD2 프로모터를 포함한다.

[0317] 미니유전자 또는 rAAV 내에 함유되는 다른 통상적인 조절 서열이 문서, 예컨대, 본 명세서에서 인용되고 참조에 의해 포함된 WO 2014/124282 등에서 또한 개시된다. 당업자는 본 명세서에 기재된 범주를 벗어나지 않으면서 이러한 발현 제어 서열 및 다른 발현 제어 서열 중에서 선택할 수 있다.

[0318] 선택된 유전 요소는 본 명세서에 기재된 것을 포함하여 임의의 적절한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 명세서에 기재된 임의의 실시형태를 구축하는 데 사용되는 방법이 핵산 조작의 숙련된 기술자에게 공지되어 있고, 유전 공학, 재조합 공학 및 합성 기술을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성시키는 방법이 널리 공지되어 있고, 적절한 방법의 선택은 본 발명에 기재된 방법 및 작제물에 제한하되 않는다. 예를 들어, 각각 본 명세서에 참조에 의해 포함된 문헌[K. Fisher et al., *J. Virol.*, 1993 70: 520-532] 및 미국 특허 5,478,745를 참조한다.

[0319] 또 다른 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱 분자 미니유전자는 프로바이러스 플라스미드, 예컨대 본 명세서에 참조에 의해 포함된 국제 특허 공개 WO 2012/158757에 개시된 것에서 제조된다. 이러한 프로바이러스 플라스미드는 작동 가능하게 회합된 하기의 것을 포함하는 모듈형 재조합 AAV 게놈을 함유한다: ITR의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 측접된 야생형 5' AAV2 ITR 서열; 전체 프로모터 서열의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 프로모터에 측접되고, 프로모터 서열로부터 상류 CMV 또는 인핸서 서열만 즉시 교체 또는 제거하는 것을 허용하는 특유한 제한 부위가 상류 서열에 측접된, 사이토메갈로바이러스(CMV)-닭 베타 액틴 서열의 상류의 49-핵산 사이토메갈로바이러스 서열을 포함하는 프로모터 또는 광수용체-특이적프로모터/인핸서. 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자는 멀티-클로닝 폴리 링커의 부위 내로 삽입될 수 있고, 여기서 트랜스-스플라이싱 분자는 프로모터에 작동 가능하게 연결되고, 프로모터의 조절 제어 하에 있다. 폴리A 서열의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 측접된 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열; 및 3' ITR의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 측접된 야생형 3' AAV2 ITR 서열이 또한 이러한 플라스미드의 일부이다. 플라스미드 골격은 박테리아 세포에서의 복제에 필요한 요소, 예를 들어, 카나마이신 저항성 유전자를 포함하고, 그 자체에 전사 종결인자/인슐레이터(insulator) 서열이 측접된다.

[0320] 일 실시형태에서, 프로바이러스 플라스미드는 (a) 작동적으로 연관된 (i) ITR의 즉시 제거 또는 교체를 허용하

는 특유한 제한 부위가 측접된 야생형 5' AAV2 ITR 서열; (ii) (A) CMV-닭 베타 액틴 서열의 상류의 49-핵산 CMV 서열을 포함하는 프로모터를 포함하는 모듈형 재조합 AAV 게놈; (b) 광수용체-특이적 프로모터/인핸서; 또는 (c) 뉴런 세포-특이적 프로모터/인핸서를 포함한다. 전체 프로모터 서열의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 프로모터에 측접되고, 프로모터 서열로부터 상류 CMV 또는 인핸서 서열만 즉시 교체 또는 제거하는 것을 허용하는 특유한 제한 부위가 상류 서열에 측접된다. 본 명세서에 기재된 것 중 임의의 것을 포함하는 트랜스-스플라이싱 분자 서열의 삽입을 허용하는 멀티클로닝 폴리링커 서열 (여기서 트랜스-스플라이싱 분자는 프로모터에 작동적으로 연결되고, 이의 조절 제어 하에 있다); 폴리A 서열의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 측접된 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 서열; 및 3' ITR의 즉시 제거 또는 교체를 허용하는 특유한 제한 부위가 측접된 야생형 3' AAV2 ITR 서열이 또한 이러한 프로바이러스 플라스미드의 일부이다. 프로바이러스 플라스미드는 박테리아 세포에서의 복제에 필요한 요소를 포함하고 카나마이신 저항성 유전자를 또한 포함하는 플라스미드 골격을 또한 함유하고, 상기 플라스미드 골격에는 전사 종결인자/인슐레이터 서열이 측접된다. 본 명세서에 기술된 프로바이러스 플라스미드는 골격 길이를 증가시키고 비-기능성 AAV 게놈의 역-패키징을 방지하기 위해 플라스미드 골격 내에 비-암호 람다 파지 5.1kb 스터퍼 서열을 또한 함유할 수 있다.

[0321] 추가 측면에서, 프로바이러스 플라스미드의 프로모터는 더 큰 트랜스-스플라이싱 분자 서열이 rAAV 내에 삽입되는 것을 허용하기 위해 프로모터의 크기를 감소시키도록 변형된다. 일 실시형태에서, 전문이 본 명세서에 참조로 포함된 국제 특허 공개 번호 WO 2017/087900에 기술된 바와 같이, 정상적으로는 총계로 약 1,000개의 염기쌍인 비-암호 엑손 및 인트론을 포함하는 CMV/CBA 하이브리드 프로모터가 130-염기 쌍의 키메라 인트론으로 교체된다.

[0322] 그 후, 이러한 프로바이러스 플라스미드를 현재의 통상적인 패키징 방법에서 사용하여, 프로바이러스 플라스미드에 의해 운반되는 트랜스-스플라이싱 분자 트랜스진을 발현하는 재조합 바이러스가 생성된다. 적절한 생산 세포주는 당업자에 의해 용이하게 선택된다. 예를 들어, 원핵생물(예를 들어, 박테리아) 세포, 및 곤충 세포, 효모 세포 및 포유동물 세포를 포함하는 진핵생물 세포를 포함하는 임의의 생물학적 생물체로부터 적절한 숙주 세포가 선택될 수 있다. 간략하게, 프로바이러스 플라스미드가 선택된 패키징 세포 내로 형질주입되고, 여기에서 일시적으로 존재할 수 있다. 대안적으로, ITR이 측접되어 있는 미니유전자 또는 유전자 발현 카세트가 염색체로 또는 에피솜으로서 숙주 세포의 게놈 내로 안정하게 통합된다. 적절한 형질주입 기술이 공지되어 있고, 재조합 AAV 게놈을 숙주 세포 내로 전달하는 데 용이하게 이용될 수 있다. 전형적으로, 프로바이러스 플라스미드는 cap 및/또는 rep 단백질을 발현하는 숙주 세포에서 배양된다. 이러한 숙주 세포에서, AAV ITR이 측접된 트랜스-스플라이싱 분자로 이루어진 미니유전자가 구제되고, 캡시드 단백질 또는 외피 단백질 내로 패키징되어, 감염성 바이러스 입자를 형성한다. 따라서, 유전자 발현 카세트 바이러스 게놈을 감염성 AAV 외피 또는 캡시드 내로 패키징하는 것을 허용하기에 충분한 바이러스 서열의 존재 하에 프로바이러스 플라스미드를 보유하는 패키징 세포를 배양하는 것에 의해 재조합 AAV 감염성 입자가 생산된다.

[0323] 대안적으로, 트랜스-스플라이싱 분자는 비-AAV 벡터, 예를 들어 비-바이러스 벡터를 사용하여 전달될 수 있다. 당업계에 알려져 있거나 본 명세서 기재된 모든 적합한 비-바이러스 벡터 기술을 사용할 수 있다. 트랜스-스플라이싱 분자의 전달에 적합한 이러한 비바이러스 벡터에는 리포좀(예를 들어, 양이온성 리포좀, 단층 리포좀 또는 다중층 리포좀), 나노입자(예를 들어, 중합체 나노입자, 지질 나노입자(LNP), PEG화된 나노입자(예를 들어, PEG화된 LNP), 펩타이드 나노입자, 금속 나노입자 등), 덴드리머(예를 들어, 양이온성 덴드리머, 예를 들어, 폴리프로필렌이민 덴드리머), 엑소좀(예를 들어, 면역학적으로 불활성 및/또는 표적화된 엑소좀, 예를 들어, 문헌 [Alvarez-Erviti, et al., 2011, Nat. Biotechnol. 29:341]에 기술된 기술을 사용하여 제조) 및 미세소포가 포함된다. 어떤 경우에, 본 명세서에 기재된 트랜스 스플라이싱 분자는 세포 침투 펩타이드(CPP)를 사용하여 전달될 수 있는데, 이는 표적 세포의 세포막을 전위시켜 표적 세포 내부로 트랜스 스플라이싱 분자를 전달하는 것을 용이하게 할 수 있다.

[0324] **IV. 약제학적 조성물 및 키트**

[0325] 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 프로바이러스 플라스미드 또는 본 명세서에 기재된 ABCA4 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 rAAV를 포함하는 약제학적 조성물이 본 명세서에서 제공된다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 본 명세서에 기재된 5' 트랜스-스플라이싱 분자 중 임의의 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, 약제학적 조성물은 5' 트랜스-스플라이싱 분자 및 3' 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하며, 예를 들어 여기서 5' 트랜스-스플라이싱 분자 및 3' 트랜스-스플라이싱 분자가 함께 기능적 ABCA4 엑손을 함유하고, 동일한 표적 ABCA4 인트론(예를 들어, 인트론 22)에 결합한다.

[0326] 이러한 약제학적 조성물은 오염이 없고 생체 내 투여에 적합하도록 제조될 수 있다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물을 통상적인 방법에 의해 오염에 대해 평가한 후, 적절한 투여 경로용으로 의도되는 약제학적 조성물로 제형화할 수 있다. 트랜스-스플라이싱 분자, 예를 들어, 네이키드 DNA 또는 단백질을 함유하는 또 다른 조성물이 유사하게 적절한 담체와 함께 제형화될 수 있다. 이러한 제형화는 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 허용 가능한 비히클 또는 담체, 특히 표적 세포로의 투여에 대해 지시된 것의 사용을 수반한다. 일 실시형태에서, 표적 세포로의 투여에 적절한 담체는 pH를 적합한 생리학적 수준으로 유지하기 위한 완충 염수, 등장성 염화나트륨 용액 또는 기타 완충제, 예를 들어, HEPES를 포함하고, 임의적으로, 다른 의약 작용제, 약제학적 작용제, 안정화제, 완충제, 담체, 아주반트, 희석제 등을 포함한다.

[0327] 일부 실시형태에서, 담체는 주사용 액체이다. 예시적인 생리학적으 허용 가능한 담체는 발열원이 없는 멸균수, 및 발열원이 없는 멸균 포스페이트 완충 염수를 포함한다. 다양한 이러한 공지된 담체가 본 명세서에 참조에 의해 포함된 미국 특허 제7,629,322호에서 제공된다. 일 실시형태에서, 담체는 등장성 염화나트륨 용액이다. 또 다른 실시형태에서, 담체는 평형 염 용액이다. 일 실시형태에서, 담체는 트윈을 포함한다. 바이러스가 장기간 보관되어야 하는 경우, 이를 글리세롤 또는 TWEEN20의 존재 하에 냉동시킬 수 있다.

[0328] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자를 함유하는 조성물은 계면활성제를 포함한다. AAV가 불활성 계면에 점착되는 것을 방지하고, 따라서 원하는 용량의 전달을 보장하기 때문에, 유용한 계면활성제, 예컨대 Pluronic F68(Poloxamer 188, 일명 LUTROL®F68)이 포함될 수 있다. 예를 들어, 본 명세서에 기재된 안구 질환의 치료용으로 디자인된 한 예시적인 조성물은 트랜스-스플라이싱 분자를 포유동물 대상체의 안구 세포에서 발현시키는 조절 서열의 제어하에 본 명세서에 기재된 5 트랜스-스플라이싱 분자 또는 3' 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 핵산 서열을 보유하는 재조합 아데노-연관 벡터, 및 제약상 허용되는 담체를 포함한다. 담체는 등장성 염화나트륨 용액이고, 계면활성제 플루로닉 F68을 포함한다. 일 실시형태에서, 트랜스-스플라이싱 분자는 본 명세서에 기술된 것 중 임의의 것이다.

[0329] 또 다른 예시적인 실시형태에서, 조성물은 ABCA4 유전자 교정을 위해 본 명세서에 기재된 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자 중 하나를 포함하는 rAAV 바이러스를 포함하고, 핵산 서열은 광수용체 세포에서 트랜스-스플라이싱 분자의 발현을 지시하는 프로모터의 제어하에 있으며, 조성물은 담체 및 망막하 주입에 적합한 추가 성분과 함께 제형화된다. 또 다른 실시형태에서, 담체, rAAV 입자, 계면활성제 및/또는 rAAV를 생성하기 위한 성분을 포함하여 이 조성물의 생산 또는 조립을 위한 조성물 또는 성분과 조성물을 제조하기 위한 적합한 실험실 하드웨어가 키트에 통합될 수 있다. 이러한 키트에는 또한 개체에게 조성물을 투여하기 위한 지침이 포함될 수 있다. 예를 들어, 스타가르트 병 또는 어셔 증후군과 같은 안과 질환을 치료하는 데 사용하는 지침이 포함될 수 있다.

[0330] 또한, 본 명세서에는 5' 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 약제학적 조성물을 함유하는 키트가 제공된다(예를 들어, 트랜스-스플라이싱 분자가 본 명세서에 기재된 AAV 벡터에 패키징되어 있음). 일부 구현예에서, 키트는 투여 전에 약제학적 조성물을 혼합하기 위한 지침을 포함한다.

[0331] **V. 방법 및 용도**

[0332] ABCA4 관련 망막병증 환자는 유사하지만 동일하지는 않은 임상적 특징을 나타낸다. 대다수는 리포푸신 축적과 양측 시력 상실이 있다. ABCA4 관련 스타가르트 질환은 일반적으로 안저 검사에서 종종 폭행당한 청동색 외관을 보이는 특징적인 황반 위축을 나타낸다. 안저 황반은 유사하지만 황반 위축이 덜하고 황반에 황백색 반점이 더 많이 나타나며 주변부 중간까지 확장된다. ABCA4 관련 원뿔세포 막대세포 이영양증이 있는 대상체는 시력 상실, 색각 장애, 중심 암점과 같은 시각 증상을 나타낸다.

[0333] ABCA4 관련 스타가르트 질환의 임상적 증상은 소아기 발병, 성인 초기 발병 및 성인 후기 발병으로 나눌 수 있다. 이러한 각각의 그룹은 특정 ABCA4 변이와 상관관계가 있는 표현형의 고유한 변이체를 가질 수 있다.

[0334] 소아기 발병: 이중 대립유전자 중증 ABCA4 변이가 있는 소아는 황반부 기능 장애 단독 또는 원뿔세포 막대세포 이영양증과 함께 기인한 보다 공격적인 중앙 시력 상실을 나타내며, 일반적으로 5세에서 11세 사이에 나타난다.

[0335] 성인 초기 발병: 성인 초기 발병: 이러한 환자는 일반적으로 20대 또는 30대에 황반 위축으로 인한 중앙 시력 상실을 나타낸다. 진찰 시 안저 검사는 일반적으로 수많은 황반 주위 및 주변 반점과 함께 눈에 띄는 황반 위축을 나타낸다. 이러한 환자는 종종 ABCA4 기능에 중간 정도의 영향을 미치는 ABCA4 변이(예를 들어 c.6079C>T 및 c.[2588G>C;5603A>T])를 두 대립유전자 모두에서 또는 null/중증 ABCA4 변이와 복합 이형 접합체 조합으로 갖는다.

[0336] 후기 성인 발병: 후기 성인 발병: "후기" 발병 질환의 정의는 35세 이상에서 50세 이상까지 다양한다. 따라서 환자는 40대부터 나타날 수 있다. 환자는 종종 망막 검사를 통해 우연히 발견되는데, 이는 중심와를 보존한 위축으로 설명될 수 있는 비교적 잘 보존된 최적 교정 시력(BCVA) 때문이다.

[0337] ABCA4 관련 망막병증 환자의 대부분은 생후 20대에 진단/증상이 나타나며, 이는 발달, 독립, 교육 및 전반적인 삶의 질에 상당한 영향을 미칠 수 있다. 또한 원뿔세포 막대세포 이영양증과 같은 더 심각한 형태 중 일부는 5세라는 어린 나이에 어린 시절에 시작된다. 스타가르트 질환이 있는 95명의 환자에서의 연구에서는 시력(VA)이 20/40 이하로 떨어지면 시력 손실이 20/200으로 빠르게 진행되었음을 발견하였다. 또한, 적어도 한쪽 눈에서 20/40 이상의 VA를 유지할 확률은 19세 때 52%였지만 39세에는 22%로 낮아졌다. 조기 발병 및 더 심각한 원뿔-막대 변이증과 일반적으로 소아기 발병 스타가르트병은 ABCA4의 이대립 유전자 결손 변이와 관련이 있다. 이러한 소아기/조기 발병 형태는 증상성 중심 암점과 빠르게 진행되는 위축으로 나타나며, 대부분의 소아 환자는 진단 시 막대 세포 광수용체 관련성을 나타내는데, 이는 더 나쁜 예후를 나타내는 지표이다. 또 다른 고려 사항은 ABCA4 망막병증이 있는 젊은 환자에서 약시가 발생하는 것이다. 약시는 시각 발달의 초기 결함으로 인해 발생하며 시력 손상, 입체시 감소 및 융합 장애로 이어지며, 이는 생후 첫 7~9년의 중요한 시기에 교정하지 않으면 영구적으로 지속되는 것으로 알려져 있다. 청소년도 신경가소성에 대한 잠재력을 어느 정도 유지할 수 있다는 것을 나타내는 연구가 있다. 이를 통해 본 발명자들은 임계 기간이 완료되기 전에 망막증에 대해 본 명세서에 기재된 ABCA4 엑손 편집기로 치료받는 소아 대상체에게 더 큰 효능이 있을 것으로 기대한다.

[0338] 위에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 및 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 암호화 벡터) 및 조성물은 본 명세서에서 기재된 질환과 관련된 증상을 지연 또는 개선하는 것을 포함하는, 예를 들어, ABCA4 유전자 돌연변이와 관련된 질환 또는 장애(예를 들어, ABCA4 관련 망막 이영양증, 예를 들어, 스타가르트병 및 원뿔세포 막대세포 이영양증)를 치료하는 방법에서 개체의 표적 세포(예를 들어, 안구 세포, 망막 세포, 광수용체 및/또는 RPE 세포)에서 기능적 ABCA4를 발현시키고/하거나 ABCA4의 발현을 조절하는 데 유용하다. 위에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자(예를 들어, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 및 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 암호화 벡터) 및 조성물은, 적용되는 경우, 예를 들어, 본 명세서에 기재된 질환과 관련된 증상을 지연 또는 개선하는 것을 포함하는, 예를 들어, ABCA4 유전자 돌연변이와 관련된 질환 또는 장애, 예를 들어, ABCA4 관련 망막 이영양증, 예를 들어, 스타가르트병 및 원뿔세포 막대세포 이영양증을 치료하기 위한 용도, 또는 본 명세서에서 기재된 질환과 관련된 증상을 지연 또는 개선하는 것을 포함하는, ABCA4 유전자 돌연변이와 관련된 질환 또는 장애, 예를 들어, ABCA4 관련 망막 이영양증, 예를 들어, 스타가르트병 및 원뿔세포 막대세포 이영양증의 치료를 위한 의약의 제조에서의 이의 용도에서 개체의 표적 세포(예를 들어, 안구 세포, 망막 세포, 광수용체 및/또는 RPE 세포)에서, 기능적 ABCA4를 발현시키고/하거나 ABCA4의 발현을 조절하는 데 추가로 유용하다. 이러한 방법 및 용도는 표적 ABCA4 유전자(예를 들어, ABCA4 프리-mRNA)를 본 명세서에서 기재된 바와 같은 트랜스-스플라이싱 분자[예를 들어, 5' 트랜스-스플라이싱 분자 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 3' 및 5' 트랜스-스플라이싱 분자의 혼합물, 이를 포함하는 조성물(예를 들어, 약제학적 조성물) 또는 이를 포함하는 약물]와 접촉시키는 단계를 포함하되, 트랜스-스플라이싱 분자의 CDS가 표적 ABCA4 프리-mRNA에 스플라이싱되어 하나 이상의 결함 또는 돌연변이를 갖는 표적 프리-mRNA의 일부를 표적 유전자의 기능적(즉, 건강한) 또는 정상 또는 야생형 또는 교정된 mRNA로 대체하여 표적 세포에서 ABCA4의 발현을 교정하는 조건이 적용된다. 따라서, 본 방법 및 조성물은 특정 돌연변이 및/또는 유전자 발현과 관련된 안구 질환/병리를 치료하는 데 사용된다.

[0339] 일부 경우, 본 명세서에서는 표적 세포에서 기능적 ABCA4를 발현하는 방법을 제공하는데, 표적 세포를 본 명세서에 기재된 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 벡터(예를 들어 AAV 벡터) 또는 조성물 중 하나로 접촉(예를 들어 형질도입)시킴으로써 수행된다. 일 실시형태에서, 접촉은 영향을 받는 개인에게 조성물(예를 들어 약제학적 조성물)을 직접 투여하는 것을 포함한다. 다른 실시형태에서, 접촉은 배양된 세포와 처리된 안구 세포를 개인에게 재이식하여 체외에서 발생할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이 방법은 본 명세서에 기재된 5' ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자 중 하나를 운반하는 rAAV를 투여하는 것을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 이 방법은 3' 트랜스-스플라이싱 분자를 운반하는 rAAV와 5' 트랜스-스플라이싱 분자를 운반하는 rAAV의 혼합물을 투여하는 것을 포함한다. 이러한 방법은 본 명세서에 기재된 것 중 하나의 조성물을 효과적인 농도로 필요로 하는 개체에게 투여하는 것을 포함한다.

[0340] 일부 실시형태에서, 이 방법은 ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 가진 개체를 치료하기 위한 하나 이상의 트랜스-스플라이싱 분자를 선택하는 것을 포함한다. 일부 실시형태에서, ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 하나 이상의 트랜스-스플라이싱 분자의 사용 또는 ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 갖는

개체를 치료하기 위한 약물의 제조에 동일한 것을 사용하는 것이 여기에 포함된다. 이러한 방법 및 용도에는 ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 하나 이상의 트랜스-스플라이싱 분자를 선택하거나, ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 이러한 선택된 하나 이상의 트랜스-스플라이싱 분자의 사용 또는 ABCA4의 돌연변이와 관련된 장애를 갖는 개체를 치료하기 위한 약물의 제조에 이러한 선택된 하나 이상의 트랜스-스플라이싱 분자의 사용이 포함된다. 이러한 선택은 개인의 유전자형을 기반으로 할 수 있다. 일부 실시형태에서, ABCA4와 관련된 장애는 상염색체 열성 장애일 수 있다. 어떤 경우에, 개체는 ABCA4의 돌연변이에 대해 동형접합자이거나 복합 이형접합자이다. ABCA4의 특정 돌연변이를 스크리닝하고 식별하는 방법은 당업계에 알려져 있다.

[0341] 본 발명의 방법은 ABCA4의 단일 돌연변이 위치(예를 들어 개체의 한 대립유전자의 돌연변이)에 따라 단일 트랜스-스플라이싱 분자를 선택하는 것을 포함한다. 상염색체 열성 돌연변이의 맥락에서 일부 경우에 두 돌연변이 중 하나만을 교정하는 것만으로도 기능적 단백질 활성을 회복하기에 충분할 수 있다. 예를 들어, 두 번째 대립유전자가 ABCA4 유전자의 반대 부분에 돌연변이를 가지며, 첫 번째 돌연변이를 교정하도록 구성된 단일 AAV 전달 트랜스-스플라이싱 분자의 범위를 벗어난 경우이다. 따라서, 일부 실시형태에서, 본 발명의 방법은 예를 들어, 다른 대립유전자의 돌연변이 위치와 관계없이, 표적 유전자의 5' 부분에 있는 단일 돌연변이를 교정하기 위해 단일 트랜스-스플라이싱 분자를 투여하는 것을 포함한다.

[0342] 또한, 본 발명은 ABCA4 유전자의 5' 부분에서 두 개 이상의 돌연변이를 교정하기 위해 단일 트랜스-스플라이싱 분자를 선택하는 방법을 제공하며, AAV 벡터에 패키징될 수 있는 단일 트랜스-스플라이싱 분자가 두 개 또는 모든 돌연변이를 포괄할 수 있고, 따라서 두 개 또는 모든 돌연변이를 교정할 수 있다.

[0343] 다른 실시형태에서, 본 명세서에서는 두 개의 트랜스-스플라이싱 분자, 즉 5' 트랜스-스플라이싱 분자와 3' 트랜스-스플라이싱 분자를 사용하여 ABCA4 유전자 내의 여러 돌연변이를 교정하는 방법을 제공한다. 일부 실시형태에서, 전체 ABCA4 유전자는 두 개의 트랜스-스플라이싱 분자의 결합 및 트랜스-스플라이싱 시 대체되며, 예를 들어, 5' 트랜스-스플라이싱 분자와 3' 트랜스-스플라이싱 분자가 동일한 표적 ABCA4 인트론에 결합하고 표적 인트론의 상류 및 하류에 있는 엑손을 각각 대체한다.

[0344] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 제공된 조성물은 질환 또는 장애를 치료하는 방법으로서 개인에게 투여된다. 일부 실시형태에서, 개체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ABCA4 관련 망막병증과 같은 유전적 질환을 갖는다. 일부 실시형태에서, 개체는 본 명세서에 기재된 바와 같은 ABCA4 관련 망막병증과 같은 질환을 가질 위험이 있다. 일부 실시형태에서, 개체는 단백질(예를 들어 ABCA 단백질)의 양이 부족하거나 단백질(예를 들어 ABCA 단백질)의 활성이 부족하여 질환 또는 장애를 가질 위험이 증가한다. 개인이 단백질의 양이 부족하거나 단백질의 활성이 부족하여 질환 또는 장애를 가질 "위험이 증가"한 경우, 이 방법은 예방적 또는 예방적 치료를 포함한다. 예를 들어, 개체는 질환의 가족력으로 인해 그러한 질환 또는 장애를 가질 위험이 증가할 수 있다. 일반적으로 이러한 질환이나 장애에 걸릴 위험이 높은 개체는 예방적 치료(예를 들어 질환이나 장애의 발병 또는 진행을 예방하거나 지연)를 통해 이익을 얻는다.

[0345] 본 명세서에 기재된 바와 같이 트랜스-스플라이싱 분자를 운반하는 재조합 아데노 연관 바이러스의 효과적인 농도는 밀리리터당 약 10^{8} 내지 10^{13}벡터 게놈(vg/mL)의 범위이다. rAAV 감염 단위는 문헌[McLaughlin et al., *J. Virol*. 1988, 62: 1963]에 기재된 바와 같이 측정된다. 또 다른 실시형태에서, 농도 범위는 10^{9} 내지 10^{13}vg/mL 범위이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.5×10^{11}vg/mL이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 5×10^{11}vg/mL이다. 일 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.5×10^{10}vg/mL이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 2.8×10^{11}vg/mL이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.5×10^{12}vg/mL이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.5×10^{13}vg/mL이다.

[0346] 일부 실시형태에서, 농도는 4.0×10^{10} 내지 1×10^{12}vg/눈이다. 일부 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.0×10^{11}vg/눈이다. 일부 실시형태에서, 유효 농도는 약 4.3×10^{10}vg/눈이다.

[0347] 바이러스의 가장 낮은 효과적인 투여량(전달된 총 게놈 카피)을 사용하여 독성 및 눈에 투여하는 것과 관련된 다른 문제, 예를 들어 망막 이형성증 및 박리와 같은 바람직하지 않은 효과의 위험을 줄이는 것이 바람직하다. 본 명세서에 기재된 바와 같이 트랜스-스플라이싱 분자를 운반하는 재조합 아데노 연관 바이러스의 효과적인 투여량은 투여량 당(즉, 주사당) 약 10^{8} 내지 10^{13}vg의 범위이다. 일 실시형태에서, 용량 범위는 10^{9} 내지

10^{13}vg/mL 범위이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 용량은 약 1.5×10^{11}vg이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 용량은 약 5×10^{11}vg이다. 일 실시형태에서, 유효 용량은 약 1.5×10^{10}vg이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 용량은 약 2.8×10^{11}vg이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 유효 용량은 약 1.5×10^{12}vg이다. 또 다른 실시형태에서, 유효 농도는 약 1.5×10^{13}vg이다. 주치의는 치료받는 개체의 신체 상태, 즉 개체의 나이, 투여되는 조성물, 특정 질환, 표적 세포, 질환이 진행되는 정도 등을 고려하여 이러한 범위 또는 다른 단위의 다른 용량을 선택할 수 있다.

[0348] 조성물은 치료할 영역의 크기, 사용된 바이러스 역가, 투여 경로 및 방법의 원하는 효과에 따라 약 50 μL에서 약 1 mL까지의 양으로 전달될 수 있으며, 여기에는 모든 숫자가 범위 내에 포함된다. 일 실시형태에서, 부피는 약 50 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 70 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 100 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 125 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 150 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 175 μL이다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 200 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 250 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 300 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 350 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 400 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 450 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 500 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 600 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 750 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 850 μL이다. 또 다른 실시형태에서, 부피는 약 1,000 μL이다.

[0349] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기를 포함하는 조성물(예를 들어 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69를 포함하는 RNA 엑손 편집기)은 주입에 적합한 현탁액으로 공급될 수 있다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 RNA 엑손 편집기(예를 들어 서열번호 90, 서열번호 78 또는 서열번호 69를 포함하는 RNA 엑손 편집기)는 300 μL의 고정된 부피로 소형 게이지 캐뉼라를 통해 유리체 절제술 후 망막하 주사로 투여될 수 있다.

[0350] 일 실시형태에서, rAAV 조성물의 부피 및 농도는 표적 세포가 있는 특정 해부학적 영역만 영향을 받도록 선택된다. 다른 실시형태에서, rAAV 조성물의 부피 및/또는 농도는 눈의 더 넓은 부분에 도달하기 위해 더 큰 양이다. 마찬가지로, 투여량은 다른 기관에 투여하기 위해 조정된다.

[0351] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료 및 용도는 표적 세포에서 표적 ABCA4 mRNA의 10% 이상(예를 들어, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 11% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 12% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 13% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 14% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 15% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 16% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 17% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 18% 이상 또는 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 19% 이상)을 대체한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료 및 용도는 표적 세포에서 표적 ABCA4 mRNA의 20% 이상[예를 들어, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 21% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 22% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 23% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 24% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 25% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 26% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 27% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 28% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 29% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 30% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 31% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 32% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 33% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 34% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 35% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 36% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 37% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 38% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 39% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 40% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 41% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 42% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 43% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 44% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 45% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 46% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 47% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 48% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 49% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 50% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 51% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 52% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 53% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 54% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 55% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 56% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 57% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 58% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 59% 이상, 표적

세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 60% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 61% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 62% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 63% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 64% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 65% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 66% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 67% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 68% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 69% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 70% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 75% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 80% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 85% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 90% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 95% 이상]을 대체한다.

[0352] 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료 및 용도는 표적 세포에서 표적 ABCA4 단백질의 5% 또는 10% 이상(예를 들어, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 mRNA의 11% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 12% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 13% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 14% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 15% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 16% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 17% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 18% 이상 또는 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 19% 이상)을 대체한다. 일부 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 치료 및 용도는 표적 세포에서 표적 ABCA4 단백질의 20% 이상[예를 들어, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 21% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 22% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 23% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 24% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 25% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 26% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 27% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 28% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 29% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 30% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 31% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 32% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 33% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 34% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 35% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 36% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 37% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 38% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 39% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 40% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 41% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 42% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 43% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 44% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 45% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 46% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 47% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 48% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 49% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 50% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 51% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 52% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 53% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 54% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 55% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 56% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 57% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 58% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 59% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 60% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 61% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 62% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 63% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 64% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 65% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 66% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 67% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 68% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 69% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 70% 이상, 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 75% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 80% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 85% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 90% 이상; 표적 세포(들)에서 표적 ABCA4 단백질의 95% 이상]을 대체한다.

[0353] 기능적 ABCA4 단백질 수치가 증가하는 것에 대한 언급이 있는 경우, 증가는 임상적으로 중요할 수 있다. 증가는 치료를 받지 않은 대상자의 기능적 ABCA4 단백질 수치에 대한 상대적이거나 유사한 대상체 집단의 기능적 ABCA4 단백질 양에 대한 상대적일 수 있다 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 10% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 20% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 40% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 50% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 80% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 100% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어

도 200% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다. 증가는 치료전 대상체 또는 유사한 대상체의 집단에 비해서 적어도 500% 이상의 기능적 ABCA4 단백질일 수 있다.

[0354] 일부 예에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 용도는 대상체(예를 들어, ABCA4-연관 망막 이영양증을 갖는 대상체)에서 ABCA4-연관 리포푸신을 감소시킨다. 다른 예에서, 본 명세서에 기재된 방법 및 용도는 대상체(예를 들어, ABCA4-연관 망막 이영양증을 갖는 대상체)에서 A2E 축적을 감소시킨다.

[0355] 설명된 방법 및 용도 각각에 대해, 치료 또는 용도는 추가 손상의 발생을 예방하거나 경미, 중등도 또는 진행된 질환이 있는 조직을 구제하는 데 사용될 수 있다. 여기에서 사용된 용어 "구제"는 질환의 진행을 예방하고, 손상되지 않은 세포로의 손상 확산을 예방하고, 손상된 세포의 손상을 개선하는 것을 의미한다.

[0356] 따라서, 일 실시형태에서, 조성물은 질환 발병 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 증상 발병 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 증상 발병 후에 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 예를 들어, 참조 조직과 비교할 때 표적 세포의 90% 미만이 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 예를 들어, 참조 조직과 비교할 때 표적 세포의 10% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 20% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 30% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 40% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 50% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 60% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 70% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 80% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 90% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다. 추가의 또 다른 실시형태에서, 조성물은 표적 세포의 95% 초과가 기능적이고 남아있을 때 투여된다.

[0357] 또 다른 실시형태에서, 위에 기재된 방법 또는 용도 중 어느 것이든 다른 또는 2차 요법과 함께 수행된다. 이 요법은 이러한 돌연변이 또는 결함 또는 이와 관련된 효과를 예방, 정지 또는 개선하는 데 도움이 되는 현재 알려져 있거나 아직 알려지지 않은 요법일 수 있다. 2차 요법은 위에 기재된 약제학적 조성물의 투여 전, 동시에 또는 후에 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 2차 요법은 신경 영양 인자, 항산화제 및/또는 항세포 사멸제의 투여와 같이 망막 세포의 건강을 유지하기 위한 비특이적 접근 방식을 포함한다. 비특이적 접근 방식은 단백질, 재조합 DNA, 재조합 바이러스 벡터, 줄기 세포, 태아 조직 또는 유전자 변형 세포의 주입을 통해 달성된다. 후자는 캡슐화된 유전자 변형 세포를 포함할 수 있다.

[0358] 다른 실시형태에서, 이 방법은 치료의 효능을 결정하기 위해 기능 및 영상 연구를 수행하는 것을 포함한다. 이러한 연구에는 미국 특허 제8,147,823호에 기재된 바와 같이 ERG 및 생체내 망막 영상이 포함된다. 국제 특허 공개 번호 WO 2014/011210 또는 WO 2014/124282에 기술되어 있으며, 이는 본 명세서에 참조로 포함된다. 또한, 시야 연구, 시야 측정(예를 들어 운동 시야 측정 또는 전체 시야 정적 시야 측정) 및 미세 시야 측정, 슬릿 램프 검사, 안구 내압 측정, 확장된 안저 검안경 검사, 이동성 검사, 시력 및/또는 색각 검사를 수행할 수 있다. 효능은 본 명세서에 기재된 바와 같이 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 및 이에 의해 암호화된 RNA 엑손 편집기 또는 이를 포함하는 조성물(예를 들어 약제학적 조성물)을 투여한 후의 시간 지점에서 측정하여 ABCA4 관련 망막 병증의 증상이 예를 들어 치료된 대상에서 치료되지 않은 대상에 비해 감소하는지 여부를 확인할 수 있다. 일부 실시형태에서, 효능은 예를 들어 시력 및/또는 색각의 개선 또는 A2E 축적을 포함한 리포푸신의 감소에 의해 측정될 수 있다.

[0359] 특정 실시형태에서는 비침습적 망막 영상 및 기능 연구를 수행하여 치료를 위해 표적화할 유지된 광수용체 영역을 식별하는 것이 바람직하다. 이러한 실시형태에서는 임상 진단 시험를 사용하여 하나 이상의 망막하 주입에 대한 정확한 위치를 결정한다. 이러한 시험에는 ERG, 시야계, 망막 층의 지형적 매핑 및 공초점 주사 레이저 검안경(cSLO) 및 광 간섭 단층 촬영(OCT)을 통한 망막 층의 두께 측정, 적응 광학(AO)을 통한 원뿔 밀도의 지형적 매핑, 기능적 눈 검사 등이 포함될 수 있다. 영상 및 기능 연구를 고려하여 일부 실시형태에서는 유지된 광수용체의 다른 영역을 표적화하기 위해 동일한 눈에서 하나 이상의 주입을 수행한다.

[0360] 이러한 방법에서 사용하기 위해 각각의 주입의 양과 바이러스 역가는 개별적으로 결정되며 동일하거나 대측 눈에서 수행된 다른 주입과 동일하거나 다를 수 있다. 다른 실시형태에서는, 눈 전체를 치료하기 위해 단일의 더 큰 용량의 주사가 이루어진다. 투여량, 투여 및 요법은 본 개시내용의 교시를 고려하여 주치의가 결정할 수 있다.

[0361] 다음의 실시예는 본 명세서에 기재된 실시형태의 범위를 제한하지 않는다. 당업자라면 발명의 정신 및 범위에 포함되도록 의도된 다음 실시예에서 변형이 이루어질 수 있음을 이해할 것이다.

[0362] **실시예**

[0363] 다음 실시예는 상기에 기재된 조성물을 생성하고 상기에 기재된 조성물을 사용하기 위한 비제한적인 방법을 제공한다.

[0364] **실시예 1. 배양된 인간 세포에서 트랜스-스플라이싱 효율**

[0365] ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 다양한 순열이 각각의 트랜스-스플라이싱 분자에서 시험된 고속대량처리 NGS 기반 검정을 사용하여 배양된 인간 세포에서 시험하였다. 결과를 도 1에 도시한다. 본 실시예에서 각각의 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자는 CMV 프로모터 및 기본 5' UTR 및 기능적 ABCA4 CDS를 포함하는 5' 조절 도메인을 포함하였다. 트랜스-스플라이싱 분자에서 다양하게 나타난 도메인은 링커 도메인, 결합 도메인(BD), 3' DS 및 종결인자였다. 본 실시예에서 트랜스-스플라이싱 분자는 플라스미드로 세포에 형질주입되었고 알려진 RNA-seq 방법에 따라 고유 분자 식별자(UMI)로 검출되었다. 트랜스-스플라이싱 효율 판독은 특정 도메인이 많은 순열 또는 모든 순열에서 개선된 트랜스-스플라이싱을 나타내었다는 것을 나타낸다. 예를 들어, 본 실시예에서 서열번호 27의 40량체 링커는 서열번호 29 및 31의 짧은 링커에 비해 예상치 못하게 가장 높은 트랜스-스플라이싱 효율을 나타내었다. 또한, 서열번호 18을 갖는 결합 도메인은 시험된 모든 결합 도메인 중에서 가장 높은 트랜스-스플라이싱 효율을 나타내었다. 링커 도메인, BD 및 스플라이스 부위(SS)의 특정 조합이 놀라운 수준의 상대적 트랜스-스플라이싱 효율을 부여하였다는 점도 주목할 만하다.

[0366] **실시예 2. 스플라이스 부위 평가**

[0367] 스플라이스 부위는 총 550개의 링커 서열을 갖는 ABCA4 핵산 트랜스-스플라이싱 분자 라이브러리에서 차세대 서열분석을 사용하여 시험되었다. 시험된 5개의 스플라이스 부위는 CAAAGT, GTAACT, GTAAGC, GTAAGG 및 GTAAGT였다. 이에 의해 암호화된 RNA 서열은 각각 GUAAGU, GUAAGG, GUAAGC 및 GUAACU로 본 명세서에서 지칭된다. 도 2는 임의의 단위로 트랜스-스플라이싱 활성(엑손 편집 활성)을 나타낸다. 이러한 결과는 GTAAGT를 포함하는 스플라이스 부위가 시험된 5개의 스플라이스 부위 중에서 가장 높은 트랜스-스플라이싱 활성을 부여했음을 나타낸다. 따라서 본 명세서에 기재된 예시적인 스플라이싱 도메인은 GTAAGT에 의해 암호화된 GUAAGT를 포함한다.

[0368] **실시예 3. 배양된 인간 세포에서 ABCA4 트랜스-스플라이싱**

[0369] 배양된 인간 세포(HEK-293T)는 MOI = 100,000에서 다양한 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자(RNA 엑손 편집기)를 암호화하는 AAV로 전환되었으며 세포 수확 전 3일 동안 배양되었다. AAV-56은 서열번호 40을 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 AAV 벡터이다. AAV-274는 서열번호 41을 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 AAV 벡터이다. AAV-443은 서열번호 42를 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 AAV 벡터이다. AAV-497은 서열번호 43을 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 AAV 벡터이다. AAV-505는 서열번호 44를 갖는 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자를 암호화하는 AAV 벡터이다.

[0370] 막 단백질 추출은 기존 방법을 사용하여 수행되었다. 간략하면, 투과성 완충액과 프로테아제/포스파타제 저해제를 세포에 첨가하고, 교반하고, 4° C에서 10분 동안 인큐베이션시켰다. 투과성 세포를 원심분리하고, 펠릿을 프로테아제/포스파타제 저해제가 있는 가용화 완충액에 재현탁시켰다. 샘플을 원심분리하기 전에 4° C에서 30분 동안 인큐베이션시켰다. 막 단백질이 포함된 상청액을 옮겨 -80° C에 보관하였다.

[0371] RNA는 기존 방법으로 추출하고 RT-qPCR로 정량화하였다. 표적 ABCA4 트랜스-스플라이싱의 백분율을 트랜스-스플라이싱 분자 카피 번호로 정규화하였다. 각 트랜스-스플라이싱 분자(엑손 편집)로 대체된 ABCA4 mRNA의 백분율을 나타내는 RNA 결과는 도 3A에 도시되어 있다. 웨스턴 블롯은 도 3B에 도시되어 있으며, 항-ABCA4 C-말단 항체를 사용하고 로딩 대조군의 경우 항-NaK/ATPase 항체를 사용하였다.

[0372] AAV-274, AAV-443, AAV-497 및 AAV-505는 각각 AAV-56에 비해 향상된 트랜스-스플라이싱 효율을 나타내었다(각각 37.3%, 38.7%, 28.5% 및 28.5%, 23.8% 대비). AAV-274 및 AAV-443은 각각 AAV-56에 비해 상당히 높은 표적 카피 수를 나타냈다.

[0373] ABCA4 knock-in 세포를 양성 대조군으로, 미처리 HEK293T 세포를 음성 대조군으로 사용하여 AAV-443-2(서열번호 45)와 AAV-652(서열번호 46) 사이의 트랜스-스플라이싱 효율을 비교하기 위해 유사한 검정을 수행하였다. 도 3C는 AAV-443-2와 AAV-652 각각의 반복에서 단백질 발현을 나타내는 웨스턴 블롯을 나타낸다. 결과는 도 3D에서

배수 변화로 제공된다. 놀랍게도 ABCA4 knockout 세포에서 ABCA4 단백질 수치가 완전히 회복되었다(도 3D).

[0374] **실시예 4. 비인간 영장류에서 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 평가**

[0375] ABCA4의 열성 유전 돌연변이는 스타가르트 질환 1형 및 원뿔세포 막대세포 이영양증 3형을 포함한 진행성 실명 형태의 발병에 원인이 된다. ABCA4의 6882bp 암호 서열은 단일 AAV 벡터로 전체를 전달하기에는 너무 크다. 더욱이 유전자 전체에서 수백 개의 질환 유발 돌연변이가 발견되면서 단일 염기 편집 접근법으로는 상당수의 환자를 다룰 수 없다. 대규모 엑손 편집 해결책은 내인성 ABCA4 프리-mRNA로 트랜스-스플라이싱할 수 있는 치료용 RNA 작제물을 전달하도록 설계되어 트랜스-스플라이싱을 통해 전달된 기능적 엑손에 국한된 수많은 돌연변이를 교정하는 기능적 엑손을 도입하였다. 실제로 단일 AAV 기반 구조를 사용한 RNA 트랜스-스플라이싱은 모든 환자 돌연변이의 약 60%를 다룰 수 있다. 이 예에서는 망막하 주사 후 건강한 아프리카 녹색 원숭이(AGM) 비인간 영장류(NHP)에서 AAV-ABCA4 엑손 편집기의 생체내 편집 효율성과 내약성을 보고한다.

[0376] 엑손 편집기 443(서열번호 47), 274(서열번호 48), 497(서열번호 49), 및 505(서열번호 50)는 AAV8 벡터에 패키징되었다. AAV8 벡터 제제를 공유 조절 요소의 qPCR을 사용하여 역가, 전체 및 빈 캡시드 측정을 위한 스터너, 엔도톡신 수준 측정을 사용하여 특징규명하였다. 결과를 아래 표 2에 제시한다.

표 2

[0377]

AAV 특징규명

엑손 편집기	역가(vg/mL)	전체%	엔도톡신(EU/mL)
443	$1x10^{12}$	41.5	<0.5
274	$1x10^{12}$	46.0	<0.5
497	$1x10^{12}$	43.0	<0.5
505	$1x10^{12}$	23.9	<0.5

[0378] 각각의 제제의 VP1, VP2 및 VP3 단백질을 검출하여 5x10 vg/웰에서 SDS 겔 런에서 시각화하였다(도 4).

[0379] 서열번호 15의 5' 조절 도메인을 포함하는 GFP 암호화 AAV 벡터(즉, CMV 프로모터와 기본 5' ABCA4 미번역 영역 포함)를 아프리카 녹색 원숭이(AGM) 비인간 영장류(NHP)에 망막하 투여하였다. GFP 단백질 발현은 도 5A 내지 5C에 도시한다. 도 5A는 GFP 단백질을 나타내는 라이브 영상이다. 도 5B는 음성 대조군에서 제28일에 망막 절편(감광세포와 맥락막이 표지됨)의 항-GFP 면역조직화학(IHC) 염색을 나타내는 현미경 사진이다. 도 5B 및 도 5C는 GFP 엑손 편집기로 처리한 동물의 28일차 망막 절편(감광 수용체와 맥락막이 표지됨)의 항-GFP IHC 염색을 나타내는 현미경 사진이다. 이 결과는 5' 조절 도메인이 생체내 감광 수용체에서 강력한 단백질 발현을 부여한다는 것을 나타낸다.

[0380] ABCA4 엑손 편집기를 AAV8로 제형화하고 AGM NHP에서 눈당 2개의 방울로 망막하 투여하였다. 각각의 주사는 $1x10^{11}$vg를 포함하는 100μl였다. 기준선, 망막하 주사 후, 14일 및 28일의 cSLO 및 OCT 영상을 도 6에 도시한다. 주사 후 상위 및 하위 수포가 관찰되었다. 물집 영역의 약간의 '음영'이 28일 동안 관찰되었다. 제28일에 임상 점수는 비히클, 엑손 편집기 443 및 트랜스 스플라이싱 분자 274에 대한 컬러 안저 영상을 사용하여 수행되었다(도 7). 비히클, 엑손 편집기 443 및 트랜스 스플라이싱 분자 274에 대한 총 임상 점수는 각각 17, 0 및 1이었다.

[0381] ABCA4 엑손 편집기에 의한 엑손 편집은 RNA를 정량화하기 위한 정량적 RT-PCR과 ABCA4 단백질을 정량화하기 위한 웨스턴 블롯을 사용하여 AGM NHP 망막에서 평가되었다. 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 mRNA를 측정하기 위해, 정량적 RT-PCR을 사용하여 도 8A에 표시된 바와 같이 인간과 AGM 서열 사이의 키메라 mRNA에서 접합부를 검출하였다. 각각의 ABCA4 엑손 편집기에 대해, 트랜스-스플라이싱된 mRNA를 10ng RNA당 편집된 카피로 정량하였다(도 8B 및 표 4).

표 4

편집된 카피/10ng RNA

엑손 편집기	평균	표준 편차
(비히클)	0	0
443	464880.29	464880.29
274	45380.29	45380.29
497	328749.88	328749.88
505	30594.16	30594.16

[0382]

[0383] 각각의 ABCA4 엑손 편집기에 대해, 태그가 붙은 전체 길이의 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질을 태그의 웨스턴 블롯을 통해 망막의 막 추출물에서 정량화하였다. 엑손 편집기 443, 274, 497 및 505에 대한 전체 길이의 ABCA4 발현을 나타내는 대표적인 웨스턴 블롯이 도 9에 나타낸다.

[0384] 발현된 단백질이 키메라 인간/AGM(따라서 트랜스-스플라이싱된 제품)인지 확인하기 위해 질량 분석 실험을 수행하였다. 완전한 AGM NHP ABCA4와 키메라 편집된 ABCA4를 구별하는 고유한 펩타이드는 MRM-MS와 면역 친화성 농축을 결합하여 식별하였다. 펩타이드의 아이덴터티은 표준을 스파이크하여 확인하였다. 비히클로 처리한 망막(도 10A)에서는 NHP 펩타이드만 관찰되었다. 엑손 편집기로 처리한 망막(도 10B)에서는 인간과 NHP 펩타이드가 모두 검출되었다. 이 결과는 전체 길이의 엑손 편집된 mRNA가 번역되었음을 확인해준다.

[0385] 연구 기간 내내 안과 건강을 모니터링하였다. 일반적으로 안과 건강은 망막 두께(도 11A), 안구 내압(도 11B), 총 임상 점수(도 11C), 유리체 세포 점수(도 11D), 수성 세포 점수(도 11E) 및 염증성 각막 입자(도 11F)로 측정된 바와 같이 AAV8 망막하 전달 엑손 편집기로 치료한 후에도 유지되었다. 망막 두께는 연구 기간 내내 정상을 유지하였다(도 11A). 안압계는 비히클로 치료한 눈에서 제7일에 안구 내압이 감소하였고, 이후 시점에서 안정화되었음을 나타내었다(도 11B). 안구 내압은 엑손 편집기로 치료한 눈에서 건강한 범위를 유지하였다. 눈 염증은 슬릿 램프 생체 현미경 및 안저 검사로 평가하였다(도 11C 내지 11F). 엑손 편집기로 치료한 개별 눈은 경미한에서 중간 정도의 염증 징후를 나타내었지만 특정 편집기 또는 AAV 제제에 대해서는 일관되지 않아 이러한 관찰이 개별 눈의 시술 때문이라고 시사하였다.

[0386] 연구에 참여한 모든 동물은 건강한 상태를 유지하였다. 체중(도 12A)과 심박수(도 12B) 측정 결과 엑손 편집기 투여로 인한 부작용을 나타내는 임상적 징후는 나타나지 않았다. 케이지 측면 관찰은 매일 수행되었고 음식 소비량은 모니터링되었으며 변화는 발견되지 않았다.

[0387] 본 명세서에 기재된 연구는 NHP 망막에서 임상적으로 관련 있는 효율성에서 최초의 트랜스 스플라이싱 보고서를 구성한다. 엑손 편집 및 대체는 망막하 주사 후 아프리카 녹색 원숭이 비인간 영장류에서 생체내에서 효율성과 내약성을 입증하였다. 망막하 전달된 모든 AAV 매개 엑손 편집 분자는 내약성이 우수하였다. 이러한 연구는 ABCA4 관련 망막증을 치료하기 위한 RNA 엑손 편집의 잠재력을 강조한다.

[0388] **실시예 5. 시험관내에서 예시적인 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 평가**

[0389] *ABCA4 단백질 KO 세포주에서의 형질주입 후 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 활성*

[0390] 위에 기재된 바와 같이, B6이라 명명된 HEK293T 기반 세포주는 높은 ABCA4 RNA와 단백질 수준을 모두 발현하도록 설계되었다. 이는 CRISPR 매개 동족성 지향 복구(HDR)를 통해 내인성 ABCA4 프로모터와 엑손 1 사이에 구성적 CAGGS 프로모터를 노크인(KI)하여 달성되었다.

[0391] ABCA4 RNA 엑손 편집기가 표적 천연 프리-mRNA를 교정하고, 트랜스-스플라이싱된 표적내(ONT) RNA를 생성하고, 전체 길이의 ABCA4 단백질을 암호화하는 능력을 특징규명하기 위한 모델 시스템을 만들기 위해, 단백질 넉아웃(KO) 세포주(17+06이라 명명)가 B6 세포주를 기반으로 설계되었다. 17+06 세포는 계속해서 높은 수준의 ABCA4 RNA를 생산했지만, B6 세포주와 달리 17+06 세포는 ABCA4 단백질을 생산하지 않았다. 17+06 세포 조작은 CRISPR 및 엑손 3 및 4를 표적으로 하는 가이드 RNA(gRNA)를 사용하여 ABCA4 유전자 암호 서열에 돌연변이를 도입하여 달성되었다. RT-qPCR은 17+06 세포주에서 ABCA4 RNA 발현의 지속성을 확인하였고, 웨스턴 블롯 분석은 ABCA4 단

백질 번역이 폐지되었음을 나타냈다. 도 3C을 참조한다.

[0392] ABCA4 KO(17+06) 세포는 여러 ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물로 형질주입되어 트랜스-스플라이싱 효율성 및 ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질의 결과 발현을 평가하였다. 작제물은 동일하였지만 도 19A 및 19B의 4개 레인에 대한 표시에 반영된 바와 같이 각각을 구별하는 것으로 표시된 요소는 상이하였다. 도 19A에 도시된 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 포함하는 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물. 13 (MALAT1-MascRNA(anti-mut1; 서열번호 78)의 끝까지 5' UTR)은 다른 시험된 작제물에 비해 NSP 수준을 감소시키는 반면, 높은 수준의 트랜스-스플라이싱(ABCA4 RNA의 ~20% 교체)과 높은 수준의 ONT 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질을 유도하기 때문에 이 분석에서 주요 후보로 떠올랐다. 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 활성은 도 19A 및 19B의 레인 4에 나타나 있다. 도 19A 및 19B에 표시된 바와 같이, 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기는 본 명세서에서 자세히 설명하는 40량체 링커 + 3XUBS + ARE 요소를 포함한다.

[0393] 상기에 더하여, 도 19A 및 19B는 예시적인 ABCA4 5' 작제물의 맥락에서 단독으로 및 조합하여 표시된 RNA 엑손 편집기(RTM) 요소 각각의 활성을 설명한다. 도 19A는 표시된 각 구조에 대한 ABCA4 RNA의 대체 백분율을 나타내는 히스토그램을 나타낸다. 대체 백분율은 각 구조에 대해 약 20-30%이다. 흥미롭게도, U1 결합 부위(3XUBS)의 40량체 + 3x 반복의 조합(서열번호 72)은 40량체 단독(서열번호 27)에 비해 ABCA4 RNA의 대체 백분율이 증가하는 경향을 나타낸다. 도 19B는 40량체(서열번호 27), 40량체 + 3XUBS(서열번호 72), 40량체 + AU-풍부 요소(서열번호 86의 서열 3444 내지 3529), 40량체 + 3XUBS + ARE(서열번호 73)를 포함하는 표시된 작제물이 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질(ONT)을 발현하고, 이러한 RTM 요소가 조합되어 40량체 단독에 비해 ONT 수준이 증가하는 경향을 보인다는 것을 나타내는 웨스턴 블롯을 제시한다. 또한 웨스턴 블롯은 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 40량체 + 3XUBS + ARE의 각각의 조합이 40량체 단독에 비해 스플라이싱되지 않은 단백질(NSP) 감소에 대한 조합 효과를 나타낸다는 것을 나타낸다. NSP 감소에 대한 조합 효과는 40량체(서열번호 27) 단독에 비해 40량체 + 3XUBS + ARE(서열번호 73)에서 특히 두드러진다. 최소한의 NSP 컨텍스트(엑손 편집기에서 슬라이스 공여체 서열 바로 뒤에 종료 코돈 포함)에서 NSP 수준을 독립적으로 감소시키는 두 가지 전략(3x UBS 및 AU가 풍부한 요소 포함)의 조합은 NSP 수준 감소에 대해 협력 효과를 보였다. 이 조합은 40량체에 비해 NSP 수준을 약 70% 감소시켰으며, 이는 중단 없는 엑손 편집기에서 볼 수 있는 수준까지 감소시켰다.

[0394] 40량체 + 3XUBS + ARE(서열번호 73)의 카세트는 40량체만, 40량체 + 3XUBS 또는 40량체 + ARE를 포함하는 RNA 엑손 편집기에 비해 NSP 수치에서 훨씬 더 상당한 감소를 제공한다는 점이 주목할 만하다. 따라서 이러한 요소의 조합(40량체 + 3XUBS + ARE; 서열번호 73)은 본 명세서에 기재된 것과 같은 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 특히 유리한 특성을 나타낸다.

[0395] ABCA4 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 제시된 결과는 ABCA4 이외의 유전자의 표적 프리-mRNA에서 다른 인트론을 표적으로 하는 다른 RNA 엑손 편집기의 맥락에서 요약되었다. 예를 들어, 아래에서 더 자세히 설명하는 도 27 및 28을 참조한다. 여기서 40량체 + 3XUBS(서열번호 72), 40량체 + ARE(서열번호 86의 서열 3444 내지 3529), 및 40량체 + 3XUBS + ARE(서열번호 73) 각각의 능력이 40량체만(서열번호 27)과 비교했을 때 NSP 수준을 감소시키는 능력이 도시되어 있다. 40량체 + 3XUBS(서열번호 72), 40량체 + ARE(서열번호 86의 서열 3444 내지 3529), 그리고 40량체 + 3XUBS +ARE(서열번호 73)의 다양한 RNA 엑손 편집기의 배열 및 위치는 본 명세서에 기재되고 도 13에 나타낸 ABCA4 엑손 편집기의 배열 및 위치와 일치한다

[0396] 도 27B에 도시된 바와 같이, NSP는 결과가 도시된 인트론 A-표적화 RNA 엑손 편집기에 3X UBS와 ARE를 포함시킴으로써 조합적인 방식으로 감소되었다. 인트론 A-표적화 RNA 엑손 편집기는 ABCA4와 다른 프리-mRNA의 인트론을 표적으로 한다. 간략하면, HEK293 세포는 지정된 RNA 엑손 편집기 요소(40량체, 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 및 40량체 + 3XUBS + ARE)를 포함하도록 링커 영역에서 변하는 인트론 A-표적화 RNA 엑손 편집기로 형질주입되었다. 세포는 형질주입 후 48시간에 수거되어 RT-qPCR(도 27A)로 트랜스-스플라이싱 효율을 검정하거나 웨스턴 블롯 분석(도 28B)을 거쳤다. 인트론 A를 표적화하는 엑손 편집기에서, 본 발명자들은 40량체 + 3X UBS가 40량체만을 사용한 경우에 비해 NSP 수준을 약 75%만큼 감소시키고, 40량체 + ARE가 40량체만을 사용한 경우에 비해 NSP 수준을 약 40%만큼 감소시키고, 40량체 + 3XUBS +ARE가 40량체만을 사용한 경우에 비해 NSP 수준을 88%만큼 감소시켰음을 나타낸다(도 27B).

[0397] 도 28B에 도시된 바와 같이, NSP는 결과가 도시된 인트론 B-표적화 RNA 엑손 편집기에 3X UBS와 ARE를 포함시킴으로써 조합적인 방식으로 감소되었다. 인트론 B-표적화 RNA 엑손 편집기는 ABCA4와 인트론-A 표적화 RNA 엑손 편집기가 표적화하는 프리-mRNA와 다른 프리-mRNA의 인트론을 표적화한다. 간략하면, HEK293 세포는 지정된 RNA 엑손 편집기 요소(40량체, 40량체 + 3XUBS, 40량체 + ARE, 및 40량체 + 3XUBS + ARE)를 포함하도록 링커 영역

에서 변하는 인트론 B-표적화 RNA 엑손 편집기로 형질주입되었다. 세포는 형질주입 후 48시간에 수확하여 RT-qPCR(도 28A)로 트랜스-스플라이싱 효율을 검정하거나 웨스턴 블롯 분석(도 28B)을 실시하였다. 인트론 B-표적화 엑손 편집기에서 본 발명자들은 40량체 + 3X UBS가 40량체 단독에 비해 NSP 수치를 약 38% 감소시키고, 40량체 + ARE가 40량체 단독에 비해 NSP 수치를 약 33% 감소시키고, 40량체 + 3XUBS +ARE가 40량체 단독에 비해 NSP 수치를 66% 감소시킨다는 것을 나타낸다(도 28B).

[0398] *ABCA4 KO 세포주의 형질도입 후 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기의 용량 반응 평가*

[0399] ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 약리학 및 작용 기전에 대한 확신을 입증하기 위해, 본 발명자들은 도 13에 도시된 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 포함하는 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물(ABCA4-01)(서열번호 90, 서열번호 78 포함)을 대체 AAV2 캡시드에 패키징하고 ABCA4 KO 세포주에서 용량 반응을 평가하였다. ABCA4 KO 세포는 도 13에 도시된 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 포함하는 AAV2-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물(서열번호 90, 서열번호 78 포함)의 MOI를 1×10^{3}에서 1×10^{6}(1e3-1e6)으로 증가시켜 형질도입한 다음, 막 단백질을 분리하고 ABCA4-특이적 Ab로 웨스턴 블로팅하였다. 도 13에 도시된 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기를 포함하는 AAV2-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 MOI 증가(서열번호 90)는 표적내(ONT) ABCA4 단백질 발현 및 RNA 대체%에 반영된 엑손 편집 수준의 증가를 초래하였다. 도 21A 및 21B를 참조한다.

[0400] **실시예 6. 표적외(OFT) 발견 차세대 서열(NGS) 방법(OFT-seq)**

[0401] OFT RNA 서열분석(OFT-seq)은 본 발명자들이 개발한 글로벌 표적외 발견 방법이다. 이 방법은 플라스미드로 형질도입되었거나 ABCA4 엑손 편집기 또는 관련 대조군을 암호화하는 AAV로 형질도입된 세포, NHP 신경 망막 샘플 또는 인간 망막 이식편에서 추출한 RNA를 활용한다. 엑손 22의 3' 상류에 있는 엑손 편집기 특정 코돈 최적화된 CDS는 표적 프라이머(유전자 특정 프라이머: GSP) 영역으로 사용된다. 이 방법은 엑손 편집기의 상류 서열만 표적화하므로 편향되지 않은 글로벌 표적외 비-ABCA4 RNA 서열을 캡처하는 데 사용할 수 있다. 따라서 이 방법은 스플라이싱되지 않은 엑손 편집기, 자가 스플라이싱된 엑손 편집기 및 의도된 ONT 편집된 ABCA4 RNA 및 OFT를 캡처할 수 있다(도 25). 그런 다음 이러한 서열은 Illumina 짧은 판독 NGS 플랫폼으로 서열분석된다. 출력 NGS 판독은 사내에서 개발한 독점적인 계산 생물정보학 분석 도구로 처리된다. 이 분석은 전반적인 서열분석 품질과 표적 접합 서열, 그리고 각각의 변형 서열에 대한 정량적 정보를 제공한다.

[0402] 간략하면, RNA 샘플은 먼저 DNase로 처리하여 잔류 게놈 DNA, 플라스미드 DNA/AAV DNA, 그리고 가능한 오염 DNA를 제거하였다. 그 다음 리보솜 RNA(rRNA) 고갈 또는 PolyA 농축을 통해 RNA 농축을 수행하였다. 농축된 RNA 샘플은 그런 다음 단편화되었다. Illumina 어댑터 결찰 및 cDNA 준비 후, GSP 표적화 ABCA4 코돈 최적화 서열와 어댑터 표적화 프라이머를 PCR에 사용하였다. 이 단계는 ABCA4 코돈 최적화 서열을 포함하는 표적 서열을 증폭한다. 여기에는 엑손 편집기, ONT, OFT 및 자체 스플라이스 엑손 편집기가 포함된다.

[0403] **실시예 7. 크립틱 스플라이스 부위 내성 ABCA4 CDS의 생성**

[0404] 본 발명자들은 시험관 내 및 생체내(NHP) 결과에 대한 광범위한 실험 및 계산 분석을 통해 크립틱 스플라이스 부위가 본 명세서에 기재된 ABCA4 엑손 편집기의 맥락에서 활용된다는 것을 발견하였다. 본 발명자들은 표적외(OFT) 라이브러리 생성 및 이의 생물정보학적 분석을 포함한 광범위한 실험 및 분석을 수행했으며, 놀랍게도 크립틱 스플라이싱이 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 발생하는 엑손 1 내지 22를 포함하는 ABCA4 암호 서열(CDS) 내의 수많은 위치를 발견하였다. 본 명세서에 기재된 트랜스-스플라이싱 효율 및 트랜스-스플라이싱 분자의 충실도를 개선하기 위해, 크립틱 스플라이스 부위의 여러 서열을 수정하여 동의어 돌연변이를 도입하여 크립틱 스플라이스 부위를 손상 및/또는 비활성화하였다. 이러한 접근 방식은 유전 암호의 축퇴성을 이용하는데, 이를 통해 암호화된 아미노산을 변경하지 않고도 크립틱 스플라이스 부위 사용을 완화하기 위한 원하는 변형을 도입할 수 있다.

[0405] 상기에 더하여, 차세대 서열분석(NGS) 접근법을 사용하여, 본 발명자들은 크립틱 스플라이스 부위를 식별하고 엑손 1 내지 22를 포함하는 ABCA4 CDS 내의 각각의 다른 위치에서 크립틱 스플라이스 사용 빈도를 정량화하여, 크립틱 스플라이스 사용의 데이터 기반, 우선순위 완화를 위한 프로토콜을 확립하였다. 표 3 및 도 26을 참조한다. 표 3에 표시된 바와 같이, 식별된 크립틱 스플라이스 부위는 동의어 돌연변이를 도입하기 전에 통합된 평균 카운트/백만 판독(CPM)에 의해 결정된 사용 빈도 순으로 정렬된다. 따라서, 이의 결과 및 생물정보학적 분석은 ABCA4 엑손 1 내지 22의 크립틱 스플라이스 부위의 우선순위 목록을 확립하며, 이는 트랜스-스플라이싱 분자의 맥락에서 개선된 특성(예를 들어 크립틱 스플라이스 부위 내성 ABCA4 CDS) 및 기능을 갖는 ABCA4 CDS를 생성하기 위해 변형될 수 있다.

[0406] 또한 NGS 접근법을 구현하여 동의어 돌연변이의 도입 후 크립틱 스플라이스 사용 빈도를 평가하였다. 표 3 및 도 26을 참조한다. 이러한 접근법에 의한 크립틱 스플라이스 부위 완화의 확인은 서열 변형(동의어 돌연변이)의 구조적 변화를 이에 따라 부여된 기능, 즉 크립틱 스플라이스 부위 내성 ABCA4 CDS의 생성과 관련된다. 도 26은 예시적인 ABCA4 엑손 편집기에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위에 동의어 돌연변이를 도입함으로써 부여된 기능을 나타내며, 식별된 크립틱 스플라이스 부위에 동의어 돌연변이를 도입하기 전(위쪽 패널)과 식별된 크립틱 스플라이스 부위에 동의어 돌연변이를 도입한 후(아래쪽 패널; 스플라이스 부위 내성 서열)의 크립틱 스플라이스 부위 절단 빈도를 나타낸다. 도 26은 크립틱 스플라이스 부위 완화 후 스플라이싱 빈도가 상당히 감소한 것을 나타낸다.

표 3

ABCA4 암호 도메인 서열(CDS)에서 식별된 크립틱 스플라이스 부위와 스플라이스 부위 완화 전후에 식별된 각각의 스플라이스 부위에서의 스플라이싱 빈도를 열거한다. 서열번호 46 은 동의어 돌연변이를 도입하기 전의 대표적인 서열을 나타내고; 서열번호 79 는 동의어 돌연변이를 도입한 후의 대표적인 서열을 나타내고; rtm_pos 열에 표시된 뉴클레오타이드 위치는 ATG 코돈(번역 개시 부위)의 G 에 대한 열 2 또는 열 3 에 표시된 마지막 뉴클레오타이드의 위치를 나타낸다. 약어 "not"은 표시된 서열(서열번호 79)에서 뉴클레오타이드 변경이 이루어지지 않았음을 나타내는 데 사용되고; 분기점의 약어는 "bp"이다.

rtm_pos	ABCA4 CDS 스플라이스 부위 완화 전	ABCA4 CDS 스플라이스 부위 완화 후	교정	ABCA4 CDS 스플라이스 부위 완화 전_avg_cpm	ABCA4 CDS 스플라이스 부위 완화 후_avg_cpm	주석
3086	ACATGCTGTTCTATGCCCAG (서열번호 133)	ACATGCTGTTCTATGCACAA (서열번호 92)	스플라이스-부위	1480.814745	1.742685513	ABCA4 ex21
2931	CACCTTGTCCATCCTCACAG (서열번호 134)	CACCTTGTCCATCCTCACTG (서열번호 94)	스플라이스-부위	256.3165696	0	ABCA4 ex20
2576	TCGCTTGGTACCTTGATCAG (서열번호 135)	TCGCTTGGTACCTTGATCAA (서열번호 96)	스플라이스-부위	142.1908763	0.9618899213	ABCA4 ex16
3029	GCCTTGGCATGTGTCCACAG (서열번호 136)	GCCTTGGCATGTGTCCACAG (서열번호 97)	not	87.63236171	183.2327206	ABCA4 ex20
127	CTGGTCTTGATCTGGTTAAG (서열번호 137)	CTGGTCTTGATCTGGTTACG (서열번호 100)	스플라이스-부위	48.27688581	0	ABCA4 ex1
2348	TCCTGTGCTTCGCCTGGCAG (서열번호 138)	TCCTGTGCTTCGCCTGGCAA (서열번호 102)	스플라이스-부위	46.3682731	0	ABCA4 ex15
1835	GCGGGTTTGCCTATCTGCAG (서열번호 139)	GCGGGTTTGCATATCTGCAA (서열번호 104)	스플라이스-부위,분기점	40.54486027	0	ABCA4 ex13
1218	CACTCCTGATTCACCTGCAG (서열번호 140)	CACTCCTGATTCACCTGCTG (서열번호 106)	스플라이스-부위	34.906711	0.9618899213	ABCA4 ex9
3083	AGCACATGCTGTTCTATGCC (서열번호 141)	AGCACATGCTGTTCTATGCA (서열번호 108)	not	29.045423778	0	ABCA4 ex21
2110	TGTACCTGGTTCCTGGACAG (서열번호 142)	TGTACCTGGTTCCTGGACTC (서열번호 110)	스플라이스-부위	27.632901445	0.8713427566	ABCA4 ex14
2628	TTGGTACTTTCTTCTACAAG (서열번호 143)	TTGGTACTTTCTTCTACAAG (서열번호 111)	not	23.568657955	25.48416316	ABCA4 ex17

[0407]

3103	CAGCTGAAAGGAAAGTCCCA (서열번호 144)	CAACTGAAAGGAAAGTCCCA (서열번호 114)	not	20.91693678	26.29908764	ABCA4 ex21
3093	GTTCTATGCCCAGCTGAAAG (서열번호 145)	GTTCTATGCACAACTGAAAG (서열번호 116)	not	20.02438495	64.52533239	ABCA4 ex21
701	CCCTGTGCTCCCTCTCCCAG (서열번호 146)	CCCTGTGCTCCCTCTCCCAG (서열번호 117)	not	18.78518611	15.44665702	ABCA4 ex6
528	CATCGGCCTGTCTGACTCAG (서열번호 147)	CATCGGCCTGTCTGACTCTG (서열번호 120)	스플라이스-부위	15.56367999	0	ABCA4 ex5
1451	TCCTAAACTTCCTCTACAAG (서열번호 148)	TCCTAAACTTCCTCTACAAG (서열번호 121)	not	14.49780466	0	
2015	CTGTCTCCATGACTGTGAAG (서열번호 149)	CTGTCTCCATGACTGTGAAG (서열번호 123)	not	12.29235941	12.23292748	
3179	AGCGGAATGAAGAGGCTCAG (서열번호 150)	AGCGGAATGAAGAGGCTCAG (서열번호 125)	not	11.33805306	9.16616339	
2254	ATGCTGTGCTTTCTGCTCAG (서열번호 151)	ATGCTGTGCTTTCTGCTCAG (서열번호 126)	not	9.194362328	44.59728553	
1124	TTTGTAATGCATTGATCCAG (서열번호 152)	TTTGTAATGCATTGATCCAG (서열번호 128)	not	8.574762912	14.84695575	
1907	TTGGAATCTACCTCCAGCAG (서열번호 153)	TTGGAATCTACCTCCAGCAG (서열번호 130)	not	8.178301454	24.70336757	
1090	CCTATCTATTCTTATGACAG (서열번호 154)	CCTATCTATTCTTATGACAG (서열번호 671)	not	6.939102621	22.96068206	
555	CCTTCTGATCAACTCTCAAG (서열번호 155)	CCTTCTGATCAACTCTCAAG (서열번호 672)	not	6.542641163	27.31739584	
2801	GGGTATGCGTGAAGAATCTG (서열번호 156)	GGGTGTGCGTGAAGAATCTG (서열번호 673)	not	6.146179706	0	
3104	AGCTGAAAGGAAAGTCCCAG (서열번호 157)	AACTGAAAGGAAAGTCCCAG (서열번호 674)	not	6.034610726	0.8713427566	

[0408]

[0409]

3147	AGCCATGTTGGAGGACACAG (서열번호 158)	AGCCATGTTGGAGGACACAG (서열번호 675)	not	5.861287227	7.332930712	
1333	TGGTACTTCTTTGACAACAG (서열번호 159)	TGGTACTTCTTTGACAACAG (서열번호 676)	not	5.749718248	11.96128599	
3116	AGTCCCAGGAGGAGGCCCAG (서열번호 160)	AGTCCCAGGAGGAGGCCCAG (서열번호 677)	not	5.130118831	0.961889921 3	
2082	TCAGGGTGTCTCCAATGCAG (서열번호 161)	TCAGGGTGTCTCCAATGCAG (서열번호 678)	not	5.130118831	9.075616225	
3084	GCACATGCTGTTCTATGCCC (서열번호 162)	GCACATGCTGTTCTATGCAC (서열번호 679)	not	5.130118831	0	
1904	CAGTTGGAATCTACCTCCAG (서열번호 163)	CAGTTGGAATCTACCTCCAG (서열번호 680)	not	4.906980872	7.932631974	
2874	CTTCTACGAGAACCAGATCA (서열번호 164)	CTTCTACGAGAACCAGATCA (서열번호 681)	not	4.510519415	5.409150869	
3088	ATGCTGTTCTATGCCCAGCT (서열번호 165)	ATGCTGTTCTATGCACAACT (서열번호 682)	not	4.287381456	1.833232678	
3040	TGTCCACAGCACAACATCCT (서열번호 166)	TGTCCACAGCACAACATCCT (서열번호 683)	not	3.890919998	0.871342756 6	
250	AACAATCCCTGTTTTCAAAG (서열번호 167)	AACAATCCCTGTTTTCAAAG (서열번호 684)	not	3.890919998	2.61402827	
2820	GGTAAAGATTTTTGAGCCCT (서열번호 168)	GGTGAAGATTTTTGAGCCCT (서열번호 685)	분기점	3.779351019	2.795122599	
3160	GACACAGGCCTCCACCACAA (서열번호 169)	GACACAGGCCTCCACCACAA (서열번호 686)	not	3.60602752	2.704575435	
1936	CCCTGCTTCGTGGACGATTC (서열번호 170)	CCCTGCTTCGTGGACGATTC (서열번호 687)	not	3.382889561	2.795122599	
1396	GTAAAAGACTTTTTGAATAG (서열번호 171)	GTAAAAGACTTTTTGAATAG (서열번호 688)	not	3.382889561	4.628355277	

2703	AAAGACCGAGCCCCTAACAG (서열번호 172)	AAAGACCGAGCCCCCTAACAG (서열번호 689)	not	3.382889561	2.885669764	
2959	CCTCCAACCTCTGGGACTGT (서열번호 173)	CCTCCAACCTCTGGGACTGT (서열번호 690)	not	3.382889561	0.8713427566	
783	TGTGCTTCCCACACTCCTAG (서열번호 174)	TGTGCTTCCCACACTCCTAG (서열번호 691)	not	3.271320582	2.795122599	
2522	GCTTCCTGCTGTCCATGCAG (서열번호 175)	GCTTCCTGCTGTCCATGCAG (서열번호 692)	not	3.048182623	21.03690221	
3097	TATGCCCAGCTGAAAGGAAA (서열번호 176)	TATGCACAACTGAAAGGAAA (서열번호 693)	not	3.048182623	2.795122599	
176	AATGCCATTTCCCCAACAAG (서열번호 177)	AATGCCATTTCCCCAACAAG (서열번호 694)	not	3.048182623	0.8713427566	
3085	CACATGCTGTTCTATGCCCA (서열번호 178)	CACATGCTGTTCTATGCACA (서열번호 695)	not	2.986428103	0	
649	GAGCGCTTCATCATCTTCAG (서열번호 179)	GAGCGCTTCATCATCTTCAG (서열번호 696)	not	2.986428103	0.8713427566	
3118	TCCCAGGAGGAGGCCCAGCT (서열번호 180)	TCCCAGGAGGAGGCCCAGCT (서열번호 697)	not	2.763290145	0.8713427566	
3098	ATGCCCAGCTGAAAGGAAAG (서열번호 181)	ATGCACAACTGAAAGGAAAG (서열번호 698)	not	2.763290145	1.923779843	
3128	AGGCCCAGCTGGAGATGGAA (서열번호 182)	AGGCCCAGCTGGAGATGGAA (서열번호 699)	not	2.763290145	1.833232678	
1982	TCCCTATCTTCATGGTGCTG (서열번호 183)	TCCCTATCTTCATGGTGCTG (서열번호 700)	not	2.651721165	0.9618899213	
2586	CCTTGATCAGGTGTTTCCAG (서열번호 184)	CCTTGATCAAGTGTTTCCAG (서열번호 701)	not	2.540152186	0.8713427566	
2845	CGGCCAGCTGTGGACCGTCT (서열번호 185)	CGGCCAGCTGTGGACCGTCT (서열번호 702)	not	2.540152186	0	

[0410]

1782	TTGGGATTCTGGTCCCAGAG (서열번호 186)	TTGGGATTCTGGTCCCAGAG (서열번호 703)	not	2.366828687	0	
2901	CCTGGGCCACAATGGAGCTG (서열번호 187)	CCTGGGCCACAATGGAGCTG (서열번호 704)	not	2.255259707	3.757012521	
310	AACAACTCCATCTTGGCAAG (서열번호 188)	AACAACTCCATCTTGGCAAG (서열번호 705)	not	2.255259707	8.204273468	
2137	ATCATGTCGATGAGCATCTT (서열번호 189)	ATCATGTCGATGAGCATCTT (서열번호 706)	not	2.255259707	0	
3067	CACCTCACGGTGGCTGAGCA (서열번호 190)	CACCTCACGGTGGCTGAGCA (서열번호 707)	not	2.255259707	0	
3090	GCTGTTCTATGCCCAGCTGA (서열번호 191)	GCTGTTCTATGCACAACTGA (서열번호 708)	not	2.143690728	0.871342756	
3133	CAGCTGGAGATGGAAGCCAT (서열번호 192)	CAGCTGGAGATGGAAGCCAT (서열번호 709)	not	2.143690728	0.961889213	
3066	CCACCTCACGGTGGCTGAGC (서열번호 193)	CCACCTCACGGTGGCTGAGC (서열번호 710)	not	2.143690728	0	
3152	TGTTGGAGGACACAGGCCTC (서열번호 194)	TGTTGGAGGACACAGGCCTC (서열번호 711)	not	2.032121748	0	
554	ACCTTCTGATCAACTCTCAA (서열번호 195)	ACCTTCTGATCAACTCTCAA (서열번호 712)	not	2.032121748	0	
2870	TCACCTTCTACGAGAACCAG (서열번호 196)	TCACCTTCTACGAGAACCAG (서열번호 713)	not	1.85879825	1.833232678	
352	CTCCTCATGAATGCACCAGA (서열번호 197)	CTCCTCATGAATGCACCAGA (서열번호 714)	not	1.85879825	0	
1203	GGGAAAAATCCTGTACACTC (서열번호 198)	GGGAAAAATCCTGTACACTC (서열번호 715)	not	1.85879825	0	
1966	ATCCTGAACCGCTGTTTCCC (서열번호 199)	ATCCTGAACCGCTGTTTCCC (서열번호 716)	not	1.85879825	0	

[0411]

3057	CCTGTTCCACCACCTCACGG (서열번호 200)	CCTGTTCCACCACCTCACGG (서열번호 717)	not	1.85879825	0.8713427566	
2996	ACATTGAAACCAGCCTGGAT (서열번호 201)	ACATTGAAACCAGCCTGGAT (서열번호 718)	not	1.85879825	0	
2372	GCATGACCGCTGAGCTGAAG (서열번호 202)	GCATGACCGCTGAGCTGAAG (서열번호 719)	not	1.85879825	0	
2966	CCTCTGGGACTGTGCTCGTT (서열번호 203)	CCTCTGGGACTGTGCTCGTT (서열번호 720)	not	1.85879825	0	
2818	CTGGTAAAGATTTTTGAGCC (서열번호 204)	CTGGTGAAGATTTTTTGAGCC (서열번호 721)	분기점	1.74722927	1.923779843	
2811	GAAGAATCTGGTAAAGATTT (서열번호 205)	GAAGAATCTGGTGAAGATTT (서열번호 722)	분기점	1.74722927	0	
3080	CTGAGCACATGCTGTTCTAT (서열번호 206)	CTGAGCACATGCTGTTCTAT (서열번호 723)	not	1.74722927	0	
3081	TGAGCACATGCTGTTCTATG (서열번호 207)	TGAGCACATGCTGTTCTATG (서열번호 724)	not	1.74722927	0.9618899213	
2832	TGAGCCCTGTGGCCGGCCAG (서열번호 208)	TGAGCCCTGTGGCCGGCCAG (서열번호 725)	not	1.74722927	0	
3125	AGGAGGCCCAGCTGGAGATG (서열번호 209)	AGGAGGCCCAGCTGGAGATG (서열번호 726)	not	1.74722927	0	
1860	GGTTGAACAGGGGATCACAA (서열번호 210)	GGTTGAACAGGGGATCACAA (서열번호 727)	not	1.74722927	0	
3123	GGAGGAGGCCCAGCTGGAGA (서열번호 211)	GGAGGAGGCCCAGCTGGAGA (서열번호 728)	not	1.74722927	0	
2774	AGAGAGAACACCCCGGGTGG (서열번호 212)	AGAGAGAACACCCCCGGGTGG (서열번호 729)	not	1.636560291	7.932631974	
3071	TCACGGTGGCTGAGCACATG (서열번호 213)	TCACGGTGGCTGAGCACATG (서열번호 730)	not	1.636560291	0.9618899213	

[0412]

2600	TTCCAGGAGACTATGGAACC (서열번호 214)	TTCCAGGAGACTATGGAACC (서열번호 731)	not	1.635660291	0	
3119	CCCAGGAGGAGGCCCAGCTG (서열번호 215)	CCCAGGAGGAGGCCCAGCTG (서열번호 732)	not	1.635660291	0	
2713	CCCCTAACAGAGGAAACGGA (서열번호 216)	CCCCTAACAGAGGAAACGGA (서열번호 733)	not	1.635660291	0	
2721	AGAGGAAACGGAGGATCCAG (서열번호 217)	AGAGGAAACGGAGGATCCAG (서열번호 734)	not	1.635660291	0	
2857	GACCGTCTGAACATCACCTT (서열번호 218)	GACCGTCTGAACATCACCTT (서열번호 735)	not	1.635660291	0	
3046	CAGCACAACATCCTGTTCCA (서열번호 219)	CAGCACAACATCCTGTTCCA (서열번호 736)	not	1.635660291	0	
3087	CATGCTGTTCTATGCCCAGC (서열번호 220)	CATGCTGTTCTATGCACAAC (서열번호 737)	not	1.635660291	0	
2676	TTCAACCAGAGAAGAAAGAG (서열번호 221)	TTCAACCAGAGAAGAAAGAG (서열번호 738)	not	1.635660291	0	
2831	TTGAGCCCTGTGGCCGGCCA (서열번호 222)	TTGAGCCCTGTGGCCGGCCA (서열번호 739)	not	1.524091311	3.847559685	
148	AATGCCAACCCGCTCTACAG (서열번호 223)	AATGCCAACCCGCTCTACAG (서열번호 740)	not	1.524091311	2.61402827	
580	CCAGAGCAGTTCGCTCATGG (서열번호 224)	CCAGAGCAGTTCGCTCATGG (서열번호 741)	not	1.524091311	0	
643	CTCCTGGAGCGCTTCATCAT (서열번호 225)	CTCCTGGAGCGCTTCATCAT (서열번호 742)	not	1.524091311	0	
703	CTGTGCTCCCTCTCCCAGGG (서열번호 226)	CTGTGCTCCCTCTCCCAGGG (서열번호 743)	not	1.524091311	0	
3070	CTCACGGTGGCTGAGCACAT (서열번호 227)	CTCACGGTGGCTGAGCACAT (서열번호 744)	not	1.524091311	0.9618899213	

[0413]

2783	ACCCCGGGTGG GTTCCTGGG (서열번호 228)	ACCCCGGGTG GGTTCCTGGG (서열번호 745)	not	1.524091311	0	
3075	GGTGGCTGAGC ACATGCTGT (서열번호 229)	GGTGGCTGAG CACATGCTGT (서열번호 746)	not	1.524091311	0	
2852	CTGTGGACCGTC TGAACATC (서열번호 230)	CTGTGGACCG TCTGAACATC (서열번호 747)	not	1.524091311	0	
3107	TGAAAGGAAAGT CCCAGGAG (서열번호 231)	TGAAAGGAAA GTCCCAGGAG (서열번호 748)	not	1.524091311	2.795122599	
2270	TCAGCACCTTCT TCTCCAAG (서열번호 232)	TCAGCACCTT CTTCTCCAAG (서열번호 749)	not	1.524091311	1.833232678	
2988	GGGAAGGGACA TTGAAACCA (서열번호 233)	GGGAAGGGA CATTGAAACC A (서열번호 750)	not	1.239198833	0	
3149	CCATGTTGGAGG ACACAGGC (서열번호 234)	CCATGTTGGA GGACACAGGC (서열번호 751)	not	1.239198833	0	
698	ATGCCCTGTGCT CCCTCTCC (서열번호 235)	ATGCCCTGTG CTCCCTCTCC (서열번호 752)	not	1.239198833	0	
3106	CTGAAAGGAAAG TCCCAGGA (서열번호 236)	CTGAAAGGAA AGTCCCAGGA (서열번호 753)	not	1.239198833	0	
2691	AAGAGCCCTGGA AAAGACCG (서열번호 237)	AAGAGCCCTG GAAAAGACCG (서열번호 754)	not	1.239198833	0	
3135	GCTGGAGATGG AAGCCATGT (서열번호 238)	GCTGGAGATG GAAGCCATGT (서열번호 755)	not	1.239198833	0.871342756 6	
3115	AAGTCCCAGGAG GAGGCCCA (서열번호 239)	AAGTCCCAGG AGGAGGCCCA (서열번호 756)	not	1.239198833	1.923779843	
2974	ACTGTGCTCGTT GGGGGAAG (서열번호 240)	ACTGTGCTCG TTGGGGGAAG (서열번호 757)	not	1.239198833	0	
2789	GGTGGGTTCCTG GGGTATGC (서열번호 241)	GGTGGGTTCC TGGGGTGTGC (서열번호 758)	not	1.239198833	0	

[0414]

2134	TCCATCATGTCGATGAGCAT (서열번호 242)	TCCATCATGTCGATGAGCAT (서열번호 759)	not	1.239198833	0	
2700	GGAAAAGACCGAGCCCCTAA (서열번호 243)	GGAAAAGACCGAGCCCCTAA (서열번호 760)	not	1.239198833	0	
566	ACTCTCAAGTCCGTCCAGAG (서열번호 244)	ACTCTCAAGTCCGTCCAGAG (서열번호 761)	not	1.239198833	0	
3137	TGGAGATGGAAGCCATGTTG (서열번호 245)	TGGAGATGGAAGCCATGTTG (서열번호 762)	not	1.239198833	0.9618899213	
3096	CTATGCCCAGCTGAAAGGAA (서열번호 246)	CTATGCACAACTGAAAGGAA (서열번호 763)	not	1.239198833	0.8713427566	
19	AGCGGCTTCGTGAGACAGAT (서열번호 247)	TCCGGCTTCGTGAGACAGAT (서열번호 764)	not	1.239198833	0	
3092	TGTTCTATGCCCAGCTGAAA (서열번호 248)	TGTTCTATGCACAACTGAAA (서열번호 765)	not	1.239198833	0	
1877	CAAGGAGCCAGGTGCAGGCG (서열번호 249)	CAAGGAGCCAGGTGCAGGCG (서열번호 766)	not	1.239198833	0	
857	TGTCACCAAGAATTCAAGAG (서열번호 250)	TGTCACCAAGAATTCAAGAG (서열번호 767)	not	1.127629854	0.9618899213	
2846	GGCCAGCTGTGGACCGTCTG (서열번호 251)	GGCCAGCTGTGGACCGTCTG (서열번호 768)	not	1.127629854	0	
2977	GTGCTCGTTGGGGGAAGGGA (서열번호 252)	GTGCTCGTTGGGGAAGGGA (서열번호 769)	not	1.127629854	0	
616	CTGAAGGACATCGCCTGCAG (서열번호 253)	CTGAAGGACATCGCCTGCAG (서열번호 770)	not	1.127629854	0	
2729	CGGAGGATCCAGAGCACCCA (서열번호 254)	CGGAGGATCCAGAGCACCCA (서열번호 771)	not	1.127629854	0	
2834	AGCCCTGTGGCCGGCCAGCT (서열번호 255)	AGCCCTGTGGCCGGCCAGCT (서열번호 772)	not	1.127629854	0	

[0415]

3140	AGATGGAAGCCATGTTGGAG (서열번호 256)	AGATGGAAGCCATGTTGGAG (서열번호 773)	not	1.127629854	0	
2989	GGAAGGGACATTGAAACCAG (서열번호 257)	GGAAGGGACATTGAAACCAG (서열번호 774)	not	1.127629854	0	
2938	TCCATCCTCACAGGCCTGCT (서열번호 258)	TCCATCCTCACTGGCCTGCT (서열번호 775)	not	1.127629854	0	
2972	GGACTGTGCTCGTTGGGGGA (서열번호 259)	GGACTGTGCTCGTTGGGGGA (서열번호 776)	not	1.127629854	0.9618899213	
3127	GAGGCCCAGCTGGAGATGGA (서열번호 260)	GAGGCCCAGCTGGAGATGGA (서열번호 777)	not	1.127629854	0	
192	CAAGGCGATGCCCTCAGCAG (서열번호 261)	CAAGGCGATGCCCTCAGCAG (서열번호 778)	not	1.127629854	0.8713427566	
2652	GTATTGGCTTGGCGGTGAAG (서열번호 262)	GTATTGGCTTGGCGGTGAAG (서열번호 779)	not	1.127629854	3.757012521	
1469	AGGGCCCTCGGGAAAGCCAG (서열번호 263)	AGGGCCCTCGGGAAAGCCAG (서열번호 780)	not	1.127629854	0	
3162	CACAGGCCTCCACCACAAGC (서열번호 264)	CACAGGCCTCCACCACAAGC (서열번호 781)	not	1.127629854	2.885669764	
2705	AGACCGAGCCCCTAACAGAG (서열번호 265)	AGACCGAGCCCCTAACAGAG (서열번호 782)	not	1.127629854	0	
2665	GGTGAAGGGTGTTCAACCAG (서열번호 266)	GGTGAAGGGTGTTCAACCAG (서열번호 783)	not	1.127629854	0.9618899213	
2927	CCACCACCTTGTCCATCCTC (서열번호 267)	CCACCACCTTGTCCATCCTC (서열번호 784)	not	1.127629854	0	
2822	TAAAGATTTTTGAGCCCTGT (서열번호 268)	TGAAGATTTTTGAGCCCTGT (서열번호 785)	분기점	1.127629854	0	
3124	GAGGAGGCCCAGCTGGAGAT (서열번호 269)	GAGGAGGCCCAGCTGGAGAT (서열번호 786)	not	1.127629854	0	

[0416]

3129	GGCCCAGCTGGAGATGGAAG (서열번호 270)	GGCCCAGCTGGAGATGGAAG (서열번호 787)	not	1.127629854	0	
2993	GGGACATTGAAACCAGCCTG (서열번호 271)	GGGACATTGAAACCAGCCTG (서열번호 788)	not	1.016060874	0	
3101	CCCAGCTGAAAGGAAAGTCC (서열번호 272)	CACAACTGAAAGGAAAGTCC (서열번호 789)	not	1.016060874	0	
2650	TCGTATTGGCTTGGCGGTGA (서열번호 273)	TCGTATTGGCTTGGCGGTGA (서열번호 790)	not	1.016060874	0	
2816	ATCTGGTAAAGATTTTTGAG (서열번호 274)	ATCTGGTGAAGATTTTTGAG (서열번호 791)	분기점	1.016060874	3.757012521	
2361	CTGGCAGGACCGCATGACCG (서열번호 275)	CTGGCAAGACCGCATGACCG (서열번호 792)	not	1.016060874	0	
592	GCTCATGGAGTCCCGGACCT (서열번호 276)	GCTCATGGAGTCCCGGACCT (서열번호 793)	not	1.016060874	0	
490	AAAGATGAAGAAACACTGAC (서열번호 277)	AAAGATGAAGAAACACTGAC (서열번호 794)	not	1.016060874	0	
2260	TGCTTTCTGCTCAGCACCTT (서열번호 278)	TGCTTTCTGCTCAGCACCTT (서열번호 795)	not	1.016060874	0	
2104	ATTTGGTGTACCTGGTTCCT (서열번호 279)	ATTTGGTGTACCTGGTTCCT (서열번호 796)	not	1.016060874	0	
2285	CCAAGGCCAGTCTGGCAGCA (서열번호 280)	CCAAGGCCAGTCTGGCAGCA (서열번호 797)	not	1.016060874	0	
2806	TGCGTGAAGAATCTGGTAAA (서열번호 281)	TGCGTGAAGAATCTGGTGAA (서열번호 798)	not	1.016060874	1.833232678	
2808	CGTGAAGAATCTGGTAAAGA (서열번호 282)	CGTGAAGAATCTGGTGAAGA (서열번호 799)	not	1.016060874	0.9618899213	
2257	CTGTGCTTTCTGCTCAGCAC (서열번호 283)	CTGTGCTTTCTGCTCAGCAC (서열번호 800)	not	1.016060874	0.9618899213	

[0417]

2778	AGAACACCCCG GGTGGGTTC (서열번호 284)	AGAACACCCC GGGTGGGTTC (서열번호 801)	not	1.016060874	0.8713427566	
3049	CACAACATCCTG TTCCACCA (서열번호 285)	CACAACATCC TGTTCCACCA (서열번호 802)	not	1.016060874	1.923779843	
2052	GGAGTTGCGACT GAAGGAGA (서열번호 286)	GGAGTTGCGA CTGAAGGAGA (서열번호 803)	not	1.016060874	0	
3121	CAGGAGGAGGC CCAGCTGGA (서열번호 287)	CAGGAGGAG GCCCAGCTGG A (서열번호 804)	not	1.016060874	0	
767	TCTTCAAGCTCT TCCGTGTG (서열번호 288)	TCTTCAAGCT CTTCCGTGTG (서열번호 805)	not	1.016060874	0.8713427566	
1861	GTTGAACAGGG GATCACAAG (서열번호 289)	GTTGAACAGG GGATCACAAG (서열번호 806)	not	1.016060874	0	
702	CCTGTGCTCCCT CTCCCAGG (서열번호 290)	CCTGTGCTCC CTCTCCCAGG (서열번호 807)	not	1.016060874	0	
3000	TGAAACCAGCCT GGATGCAG (서열번호 291)	TGAAACCAGC CTGGATGCAG (서열번호 808)	not	1.016060874	0.8713427566	
2098	GCAGTGATTTGG TGTACCTG (서열번호 292)	GCAGTGATTT GGTGTACCTG (서열번호 809)	not	1.016060874	1.742685513	
2782	CACCCCGGGTG GGTTCCTGG (서열번호 293)	CACCCCGGGT GGGTTCCTGG (서열번호 810)	not	1.016060874	0.8713427566	
2862	TCTGAACATCAC CTTCTACG (서열번호 294)	TCTGAACATC ACCTTCTACG (서열번호 811)	not	1.016060874	0	
2273	GCACCTTCTTCT CCAAGGCC (서열번호 295)	GCACCTTCTT CTCCAAGGCC (서열번호 812)	not	1.016060874	0	
569	CTCAAGTCCGTC CAGAGCAG (서열번호 296)	CTCAAGTCCG TCCAGAGCAG (서열번호 813)	not	1.016060874	0.9618899213	
676	CGCGGGGCAAA GACGGTGCG (서열번호 297)	CGCGGGGCA AAGACGGTGC G (서열번호 814)	not	1.016060874	0	

[0418]

3141	GATGGAAGCCATGTTGGAGG (서열번호 298)	GATGGAAGCCATGTTGGAGG (서열번호 815)	not	1.016060874	0	
2627	CTTGGTACTTTCTTCTACAA (서열번호 299)	CTTGGTACTTTCTTCTACAA (서열번호 816)	not	1.016060874	1.923779843	
2009	TCTACTCTGTCTCCATGACT (서열번호 300)	TCTACTCTGTCTCCATGACT (서열번호 817)	not	1.016060874	0	
1850	TGCAGGACATGGTTGAACAG (서열번호 301)	TGCAAGACATGGTTGAACAG (서열번호 818)	not	1.016060874	0	
1887	GGTGCAGGCGGAGGCTCCAG (서열번호 302)	GGTGCAGGCGGAGGCTCCAG (서열번호 819)	not	1.016060874	0	
2315	GTGTCATCTATTTCACCCTC (서열번호 303)	GTGTCATCTATTTCACCCTG (서열번호 820)	not	1.016060874	0	
1359	GATGAACATGATCAGAGATA (서열번호 304)	GATGAACATGATCAGAGATA (서열번호 821)	not	1.016060874	0	
2787	CGGGTGGGTTCCTGGGGTAT (서열번호 305)	CGGGTGGGTTCCTGGGGTGT (서열번호 822)	not	1.016060874	0.9618899213	
2953	CTGCTGCCTCCAACCTCTGG (서열번호 306)	CTGCTGCCTCCAACCTCTGG (서열번호 823)	not	1.016060874	0	
2924	AAACCACCACCTTGTCCATC (서열번호 307)	AAACCACCACCTTGTCCATC (서열번호 824)	not	0.6195994166	0	
3100	GCCCAGCTGAAAGGAAAGTC (서열번호 308)	GCACAACTGAAAGGAAAGTC (서열번호 825)	not	0.6195994166	0	
2687	AAGAAAGAGCCCTGGAAAAG (서열번호 309)	AAGAAAGAGCCCTGGAAAAG (서열번호 826)	not	0.6195994166	0	
2446	GTTCGCTTTGAAGAGCAAGG (서열번호 310)	GTTCGCTTTGAAGAGCAAGG (서열번호 827)	not	0.6195994166	0	
3113	GAAAGTCCCAGGAGGAGGCC (서열번호 311)	GAAAGTCCCAGGAGGAGGCC (서열번호 828)	not	0.6195994166	0	

[0419]

2661	TGGCGGTGAAGGGTGTTCAA (서열번호 312)	TGGCGGTGAAGGGTGTTCAA (서열번호 829)	not	0.6195994166	0	
2681	CCAGAGAAGAAAGAGCCCTG (서열번호 313)	CCAGAGAAGAAAGAGCCCTG (서열번호 830)	not	0.6195994166	0	
2786	CCGGGTGGGTTCCTGGGGTA (서열번호 314)	CCGGGTGGGTTCCTGGGGTG (서열번호 831)	not	0.6195994166	0	
1880	GGAGCCAGGTGCAGGCGGAG (서열번호 315)	GGAGCCAGGTGCAGGCGGAG (서열번호 832)	not	0.6195994166	0	
2632	TACTTTCTTCTACAAGAGTC (서열번호 316)	TACTTTCTTCTACAAGAGTC (서열번호 833)	not	0.6195994166	0	
1999	CTGGCATGGATCTACTCTGT (서열번호 317)	CTGGCATGGATCTACTCTGT (서열번호 834)	not	0.6195994166	0	
3284	CAAGCGGCGTGGACCCTTAC (서열번호 318)	CAAGCGGCGTGGACCCTTAC (서열번호 835)	not	0.6195994166	0	
2543	TGATGCTCCTTGATGCTGCT (서열번호 319)	TGATGCTCCTTGATGCTGCT (서열번호 836)	not	0.6195994166	0	
2792	GGGTTCCTGGGGTATGCGTG (서열번호 320)	GGGTTCCTGGGGTGTGCGTG (서열번호 837)	not	0.6195994166	0	
2853	TGTGGACCGTCTGAACATCA (서열번호 321)	TGTGGACCGTCTGAACATCA (서열번호 838)	not	0.6195994166	0.8713427566	
714	CTCCCAGGGCACCCTACAGT (서열번호 322)	CTCCCAGGGCACCCTACAGT (서열번호 839)	not	0.6195994166	0	
2158	CTCCTGACGATATTCATCAT (서열번호 323)	CTCCTGACGATATTCATCAT (서열번호 840)	not	0.6195994166	0	
1158	TCCTTTAACCAAAATCGCTT (서열번호 324)	TCCTTTAACCAAAATCGCTT (서열번호 841)	not	0.6195994166	0	
2869	ATCACCTTCTACGAGAACCA (서열번호 325)	ATCACCTTCTACGAGAACCA (서열번호 842)	not	0.6195994166	0.8713427566	

[0420]

2772	CGAGAGAGAACACCCCGGGT (서열번호 326)	CGAGAGAGAACACCCCGGGT (서열번호 843)	not	0.6195994166	2.61402827	
3158	AGGACACAGGCCTCCACCAC (서열번호 327)	AGGACACAGGCCTCCACCAC (서열번호 844)	not	0.6195994166	0	
3230	GCGTGGCCATTGCCTTCGTG (서열번호 328)	GCGTGGCCATTGCCTTCGTG (서열번호 845)	not	0.6195994166	0	
2825	AGATTTTTGAGCCCTGTGGC (서열번호 329)	AGATTTTTGAGCCCTGTGGC (서열번호 846)	not	0.6195994166	0	
3156	GGAGGACACAGGCCTCCACC (서열번호 330)	GGAGGACACAGGCCTCCACC (서열번호 847)	not	0.6195994166	0	
978	TGACCTCCTGTGTGGCTACC (서열번호 331)	TGACCTCCTGTGTGGCTACC (서열번호 848)	not	0.6195994166	0	
2663	GCGGTGAAGGGTGTTCAACC (서열번호 332)	GCGGTGAAGGGTGTTCAACC (서열번호 849)	not	0.6195994166	0	
189	CAACAAGGCGATGCCCTCAG (서열번호 333)	CAACAAGGCGATGCCCTCAG (서열번호 850)	not	0.6195994166	0	
2201	GCGACCCATTCATCCTCTTC (서열번호 334)	GCGACCCATTCATCCTCTTC (서열번호 851)	not	0.6195994166	0	
332	TATATCGAGATTTTCAAGAA (서열번호 335)	TATATCGAGATTTTCAAGAA (서열번호 852)	not	0.6195994166	0	
1873	ATCACAAGGAGCCAGGTGCA (서열번호 336)	ATCACAAGGAGCCAGGTGCA (서열번호 853)	not	0.6195994166	0	
1291	AGGAAGTTGGTCAAAGCCTG (서열번호 337)	CGGAAGTTGGTCAAAGCCTG (서열번호 854)	not	0.6195994166	0	
1413	TAGGCAGCTTGGTGAAGAAG (서열번호 338)	TAGGCAGCTTGGTGAAGAAG (서열번호 855)	not	0.6195994166	0	
2826	GATTTTTGAGCCCTGTGGCC (서열번호 339)	GATTTTTGAGCCCTGTGGCC (서열번호 856)	not	0.6195994166	0.9618899213	

[0421]

661	ATCTTCAGCCAGAGGCGCGG (서열번호 340)	ATCTTCAGCCAGAGGCGCGG (서열번호 857)	not	0.6195994166	0	
670	CAGAGGCGCGGGGCAAAGAC (서열번호 341)	CAGAGGCGCGGGGCAAAGAC (서열번호 858)	not	0.6195994166	0	
2550	CCTTGATGCTGCTGTCTATG (서열번호 342)	CCTTGATGCTGCTGTGTATG (서열번호 859)	not	0.6195994166	0	
2304	AGCCTGTAGTGGTGTCATCT (서열번호 343)	AGCCTGTAGTGGTGTCATCT (서열번호 860)	not	0.6195994166	0	
1633	CTCTCTCTACTGGAGGAAAA (서열번호 344)	CTCTCTCTACTGGAGGAAAA (서열번호 861)	not	0.6195994166	0	
1546	CTCCGCCTGGTCAATCAATA (서열번호 345)	CTCCGCCTGGTCAATCAATA (서열번호 862)	not	0.6195994166	0.9618899213	
212	GAATGCTGCCGTGGCTCCAG (서열번호 346)	GAATGCTGCCGTGGCTCCAG (서열번호 863)	not	0.6195994166	0	
2575	CTCGCTTGGTACCTTGATCA (서열번호 347)	CTCGCTTGGTACCTTGATCA (서열번호 864)	not	0.6195994166	0	
1498	ATGGCCAACTTCGACTGGAG (서열번호 348)	ATGGCCAACTTCGACTGGAG (서열번호 865)	not	0.6195994166	0	
1759	ACCAATAAGATTAAAGACAG (서열번호 349)	ACCAATAAGATTAAAGACAG (서열번호 866)	not	0.6195994166	0	
2975	CTGTGCTCGTTGGGGGAAGG (서열번호 350)	CTGTGCTCGTTGGGGGAAGG (서열번호 867)	not	0.6195994166	0	
3012	GGATGCAGTCCGGCAGAGCC (서열번호 351)	GGATGCAGTCCGGCAGAGCC (서열번호 868)	not	0.6195994166	0	
3142	ATGGAAGCCATGTTGGAGGA (서열번호 352)	ATGGAAGCCATGTTGGAGGA (서열번호 869)	not	0.6195994166	0	
2690	AAAGAGCCCTGGAAAAGACC (서열번호 353)	AAAGAGCCCTGGAAAAGACC (서열번호 870)	not	0.6195994166	0.9618899213	

[0422]

642	CCTCCTGGAGC GCTTCATCA (서열번호 354)	CCTCCTGGAG CGCTTCATCA (서열번호 871)	not	0.6195994166	0	
2028	TGTGAAGAGCAT CGTCTTGG (서열번호 355)	TGTGAAGAGC ATCGTCTTGG (서열번호 872)	not	0.6195994166	0	
2364	GCAGGACCGCA TGACCGCTG (서열번호 356)	GCAAGACCGC ATGACCGCTG (서열번호 873)	not	0.6195994166	0	
2716	CTAACAGAGGAA ACGGAGGA (서열번호 357)	CTAACAGAGG AAACGGAGGA (서열번호 874)	not	0.6195994166	0	
3024	GCAGAGCCTTG GCATGTGTC (서열번호 358)	GCAGAGCCTT GGCATGTGTC (서열번호 875)	not	0.6195994166	0	
1820	TCCGGTACATCT GGGGCGGG (서열번호 359)	TCCGGTACAT CTGGGGCGG G (서열번호 876)	not	0.6195994166	0	
3039	GTGTCCACAGCA CAACATCC (서열번호 360)	GTGTCCACAG CACAACATCC (서열번호 877)	not	0.6195994166	0	
2645	AAGAGTCGTATT GGCTTGGC (서열번호 361)	AAGAGTCGTA TTGGCTTGGC (서열번호 878)	not	0.6195994166	0	
2696	CCCTGGAAAAGA CCGAGCCC (서열번호 362)	CCCTGGAAAA GACCGAGCCC (서열번호 879)	not	0.6195994166	0	
2759	ACGACTCCTTCT TCGAGAGA (서열번호 363)	ACGACTCCTT CTTCGAGAGA (서열번호 880)	not	0.6195994166	0.8713427566	
2362	TGGCAGGACCG CATGACCGC (서열번호 364)	TGGCAAGACC GCATGACCGC (서열번호 881)	not	0.6195994166	0	
983	TCCTGTGTGGCT ACCCCGAG (서열번호 365)	TCCTGTGTGG CTACCCCGAG (서열번호 882)	not	0.6195994166	0	
740	AAGACACTCTGT ATGCCAAC (서열번호 366)	AAGACACTCT GTATGCCAAC (서열번호 883)	not	0.6195994166	0	
907	CTGTGGGTGACC AGGCCCCT (서열번호 367)	CTGTGGGTGA CCAGGCCCCT (서열번호 884)	not	0.6195994166	0	

[0423]

750	GTATGCCAACGTGGACTTCT (서열번호 368)	GTATGCCAACGTGGACTTCT (서열번호 885)	not	0.6195994166	0	
2788	GGGTGGGTTCCTGGGGTATG (서열번호 369)	GGGTGGGTTCCTGGGGTGTG (서열번호 886)	not	0.6195994166	0.9618899213	
3248	TGGGCGACGCCAAGGTTGTG (서열번호 370)	TGGGCGACGCCAAGGTTGTG (서열번호 887)	not	0.6195994166	0	
2798	CTGGGGTATGCGTGAAGAAT (서열번호 371)	CTGGGGTGTGCGTGAAGAAT (서열번호 888)	not	0.6195994166	0	
3143	TGGAAGCCATGTTGGAGGAC (서열번호 372)	TGGAAGCCATGTTGGAGGAC (서열번호 889)	not	0.6195994166	0	
2138	TCATGTCGATGAGCATCTTC (서열번호 373)	TCATGTCGATGAGCATCTTC (서열번호 890)	not	0.6195994166	0	
2940	CATCCTCACAGGCCTGCTGC (서열번호 374)	CATCCTCACTGGCCTGCTGC (서열번호 891)	not	0.6195994166	0	
3300	TTACAGCAGAAGATCCATCT (서열번호 375)	TTACAGCAGAAGATCCATCT (서열번호 892)	not	0.6195994166	0	
2091	CTCCAATGCAGTGATTTGGT (서열번호 376)	CTCCAATGCAGTGATTTGGT (서열번호 893)	not	0.6195994166	0	
591	CGCTCATGGAGTCCCGGACC (서열번호 377)	CGCTCATGGAGTCCCGGACC (서열번호 894)	not	0.6195994166	0	
2532	GTCCATGCAGATGATGCTCC (서열번호 378)	GTCCATGCAGATGATGCTCC (서열번호 895)	not	0.6195994166	0	
3110	AAGGAAAGTCCCAGGAGGAG (서열번호 379)	AAGGAAAGTCCCAGGAGGAG (서열번호 896)	not	0.6195994166	3.575918191	
288	TCCTGGAATTGTGTCAAACT (서열번호 380)	TCCTGGAATTGTGTCAAACT (서열번호 897)	not	0.6195994166	0	
1758	AACCAATAAGATTAAAGACA (서열번호 381)	AACCAATAAGATTAAAGACA (서열번호 898)	not	0.6195994166	0	

[0424]

2314	GGTGTCATCTATTTCACCCT (서열번호 382)	GGTGTCATCTATTTCACCCT (서열번호 899)	not	0.6195994166	0.8713427566	
2710	GAGCCCCTAACAGAGGAAAC (서열번호 383)	GAGCCCCTAACAGAGGAAAC (서열번호 900)	not	0.6195994166	0	
2192	TACATTACAGCGACCCATTC (서열번호 384)	TACATTACAGCGACCCATTC (서열번호 901)	not	0.6195994166	0	
1868	AGGGGATCACAAGGAGCCAG (서열번호 385)	AGGGGATCACAAGGAGCCAG (서열번호 902)	not	0.6195994166	0	
2809	GTGAAGAATCTGGTAAAGAT (서열번호 386)	GTGAAGAATCTGGTGAAGAT (서열번호 903)	not	0.6195994166	0	
3091	CTGTTCTATGCCCAGCTGAA (서열번호 387)	CTGTTCTATGCACAACTGAA (서열번호 904)	not	0.6195994166	0.9618899213	
753	TGCCAACGTGGACTTCTTCA (서열번호 388)	TGCCAACGTGGACTTCTTCA (서열번호 905)	not	0.6195994166	0	
980	ACCTCCTGTGTGGCTACCCC (서열번호 389)	ACCTCCTGTGTGGCTACCCC (서열번호 906)	not	0.6195994166	0	
1461	CCTCTACAAGGGCCCTCGGG (서열번호 390)	CCTCTACAAGGGCCCTCGGG (서열번호 907)	not	0.6195994166	0	
2413	CCGGTGGCATTTGGATTTGG (서열번호 391)	CCGGTGGCATTTGGATTTGG (서열번호 908)	not	0.6195994166	0	
3213	CATGCAGAGAAAACTGAGCG (서열번호 392)	CATGCAGAGAAAACTGAGCG (서열번호 909)	not	0.6195994166	0	
3089	TGCTGTTCTATGCCCAGCTG (서열번호 393)	TGCTGTTCTATGCACAACTG (서열번호 910)	not	0.6195994166	0	
2860	CGTCTGAACATCACCTTCTA (서열번호 394)	CGTCTGAACATCACCTTCTA (서열번호 911)	not	0.6195994166	0	
3068	ACCTCACGGTGGCTGAGCAC (서열번호 395)	ACCTCACGGTGGCTGAGCAC (서열번호 912)	not	0.6195994166	0	

[0425]

[0426]

2841	TGGCCGGCCAG CTGTGGACC (서열번호 396)	TGGCCGGCCA GCTGTGGACC (서열번호 913)	not	0.6195994166	0.8713427566	
2965	ACCTCTGGGACT GTGCTCGT (서열번호 397)	ACCTCTGGGA CTGTGCTCGT (서열번호 914)	not	0.5080304371	0.9618899213	
2859	CCGTCTGAACAT CACCTTCT (서열번호 398)	CCGTCTGAAC ATCACCTTCT (서열번호 915)	not	0.5080304371	0	
2283	CTCCAAGGCCAG TCTGGCAG (서열번호 399)	CTCCAAGGCC AGTCTGGCAG (서열번호 916)	not	0.5080304371	0.8713427566	
3131	CCCAGCTGGAG ATGGAAGCC (서열번호 400)	CCCAGCTGGA GATGGAAGCC (서열번호 917)	not	0.5080304371	0	
2946	CACAGGCCTGCT GCCTCCAA (서열번호 401)	CACTGGCCTG CTGCCTCCAA (서열번호 918)	not	0.5080304371	0	
2730	GGAGGATCCAG AGCACCCAG (서열번호 402)	GGAGGATCCA GAGCACCCAG (서열번호 919)	not	0.5080304371	0	
2971	GGGACTGTGCTC GTTGGGGG (서열번호 403)	GGGACTGTGC TCGTTGGGGG (서열번호 920)	not	0.5080304371	0	
1797	CAGAGCTGATCC CGTGGAAG (서열번호 404)	CAGAGCTGAT CCCGTGGAAG (서열번호 921)	not	0.5080304371	0	
2624	TTCCTTGGTACT TTCTTCTA (서열번호 405)	TTCCTTGGTA CTTTCTTCTA (서열번호 922)	not	0.5080304371	0	
1472	GCCCTCGGGAA AGCCAGGCT (서열번호 406)	GCCCTCGGGA AAGCCAGGCT (서열번호 923)	not	0.5080304371	1.923779843	
1765	AAGATTAAAGAC AGGTATTG (서열번호 407)	AAGATTAAAG ACAGATATTG (서열번호 924)	not	0.5080304371	0	
1385	GGAACCCAACAG TAAAAGAC (서열번호 408)	GGAACCCAAC AGTAAAAGAC (서열번호 925)	not	0.5080304371	0	
1553	TGGTCAATCAAT ACCTGGAG (서열번호 409)	TGGTCAATCA ATACCTGGAG (서열번호 926)	not	0.5080304371	0	

2824	AAGATTTTTGAGCCCTGTGG (서열번호 410)	AAGATTTTTGAGCCCTGTGG (서열번호 927)	not	0.5080304371	0.9618899213	
273	CACCCCAGGAGAATCTCCTG (서열번호 411)	CACCCCAGGAGAATCTCCTG (서열번호 928)	not	0.5080304371	0	
3060	GTTCCACCACCTCACGGTGG (서열번호 412)	GTTCCACCACCTCACGGTGG (서열번호 929)	not	0.5080304371	0	
2149	AGCATCTTCCTCCTGACGAT (서열번호 413)	AGCATCTTCCTCCTGACGAT (서열번호 930)	not	0.5080304371	0	
2881	GAGAACCAGATCACCGCATT (서열번호 414)	GAGAACCAGATCACCGCATT (서열번호 931)	not	0.5080304371	0	
2797	CCTGGGGTATGCGTGAAGAA (서열번호 415)	CCTGGGGTGTGCGTGAAGAA (서열번호 932)	not	0.5080304371	0	
2733	GGATCCAGAGCACCCAGAAG (서열번호 416)	GGATCCAGAGCACCCAGAAG (서열번호 933)	not	0.5080304371	0	
798	CCTAGACAGCCGTTCTCAAG (서열번호 417)	CCTAGACAGCCGTTCTCAAG (서열번호 934)	not	0.5080304371	0	
2849	CAGCTGTGGACCGTCTGAAC (서열번호 418)	CAGCTGTGGACCGTCTGAAC (서열번호 935)	not	0.5080304371	0	
3117	GTCCCAGGAGGAGGCCCAGC (서열번호 419)	GTCCCAGGAGGAGGCCCAGC (서열번호 936)	not	0.5080304371	2.795122599	
1780	TATTGGGATTCTGGTCCCAG (서열번호 420)	TATTGGGATTCTGGTCCCAG (서열번호 937)	not	0.5080304371	0	
2817	TCTGGTAAAGATTTTTGAGC (서열번호 421)	TCTGGTGAAGATTTTTGAGC (서열번호 938)	분기점	0.5080304371	0.8713427566	
2894	CCGCATTCCTGGGCCACAAT (서열번호 422)	CCGCATTCCTGGGCCACAAT (서열번호 939)	not	0.5080304371	1.833232678	
2807	GCGTGAAGAATCTGGTAAAG (서열번호 423)	GCGTGAAGAATCTGGTGAAG (서열번호 940)	not	0.5080304371	0	

[0427]

[0428]

3008	GCCTGGATGCA GTCCGGCAG (서열번호 424)	GCCTGGATGC AGTCCGGCAG (서열번호 941)	not	0.5080304371	0	
2785	CCCGGGTGGGT TCCTGGGGT (서열번호 425)	CCCGGGTGG GTTCCTGGGG T (서열번호 942)	not	0.5080304371	0	
608	ACCTGGCGCTGA AGGACATC (서열번호 426)	ACCTGGCGCT GAAGGACATC (서열번호 943)	not	0.5080304371	0	
1713	CCACGTGAAGTA TAAGATCC (서열번호 427)	CCACGTGAAG TATAAGATCC (서열번호 944)	not	0.5080304371	0	
2944	CTCACAGGCCTG CTGCCTCC (서열번호 428)	CTCACTGGCC TGCTGCCTCC (서열번호 945)	not	0.5080304371	0	
2066	AGGAGACTTTGA AAAATCAG (서열번호 429)	AGGAGACATT GAAAAATCAG (서열번호 946)	not	0.5080304371	0.8713427566	
2639	TTCTACAAGAGT CGTATTGG (서열번호 430)	TTCTACAAGA GTCGTATTGG (서열번호 947)	not	0.5080304371	0	
237	CTTCTGCAATGT GAACAATC (서열번호 431)	CTTCTGCAAT GTGAACAATC (서열번호 948)	not	0.5080304371	0	
1870	GGGATCACAAG GAGCCAGGT (서열번호 432)	GGGATCACAA GGAGCCAGGT (서열번호 949)	not	0.5080304371	0	
3099	TGCCCAGCTGAA AGGAAAGT (서열번호 433)	TGCACAACTG AAAGGAAAGT (서열번호 950)	not	0.5080304371	0	
1841	TTGCCTATCTGC AGGACATG (서열번호 434)	TTGCATATCT GCAAGACATG (서열번호 951)	분기점	0.5080304371	0	
17	GCAGCGGCTTC GTGAGACAG (서열번호 435)	GATCCGGCTT CGTGAGACAG (서열번호 952)	not	0.5080304371	82.58601767	
3151	ATGTTGGAGGAC ACAGGCCT (서열번호 436)	ATGTTGGAGG ACACAGGCCT (서열번호 953)	not	0.5080304371	0	
1400	AAGACTTTTTGA ATAGGCAG (서열번호 437)	AAGACTTTTTG AATAGGCAG (서열번호 954)	not	0.5080304371	3.575918191	

3062	TCCACCACCTCACGGTGGCT (서열번호 438)	TCCACCACCTCACGGTGGCT (서열번호 955)	not	0.5080304371	0	
2769	CTTCGAGAGAGAACACCCCG (서열번호 439)	CTTCGAGAGAGAACACCCCG (서열번호 956)	not	0.5080304371	0.8713427566	
2032	AAGAGCATCGTCTTGGAGAA (서열번호 440)	AAGAGCATCGTCTTGGAGAA (서열번호 957)	not	0.5080304371	0	
181	CATTTCCCCAACAAGGCGAT (서열번호 441)	CATTTCCCCAACAAGGCGAT (서열번호 958)	not	0.5080304371	0	
854	ATATGTCACCAAGAATTCAA (서열번호 442)	ATATGTCACCAAGAATTCAA (서열번호 959)	not	0.5080304371	0	
1899	GGCTCCAGTTGGAATCTACC (서열번호 443)	GGCTCCAGTTGGAATCTACC (서열번호 960)	not	0.5080304371	0	
2426	GATTTGGCACTGAGTACCTG (서열번호 444)	GATTTGGCACTGAGTACCTG (서열번호 961)	not	0.5080304371	0	
3077	TGGCTGAGCACATGCTGTTC (서열번호 445)	TGGCTGAGCACATGCTGTTC (서열번호 962)	not	0.5080304371	0	
2286	CAAGGCCAGTCTGGCAGCAG (서열번호 446)	CAAGGCCAGTCTGGCAGCAG (서열번호 963)	not	0.5080304371	0	
3308	GAAGATCCATCTGGGATCTG (서열번호 447)	GAAGATCCATCTGGGATCTG (서열번호 964)	not	0.5080304371	0	
927	CATGCAGAATGGTGGTCCAG (서열번호 448)	CATGCAGAATGGTGGTCCAG (서열번호 965)	not	0.5080304371	0.8713427566	
3114	AAAGTCCCAGGAGGAGGCCC (서열번호 449)	AAAGTCCCAGGAGGAGGCCC (서열번호 966)	not	0.5080304371	0	
908	TGTGGGTGACCAGGCCCCTC (서열번호 450)	TGTGGGTGACCAGGCCCCTC (서열번호 967)	not	0.5080304371	0	
2127	CAGCTTCTCCATCATGTCGA (서열번호 451)	CTCCTTCTCCATCATGTCGA (서열번호 968)	not	0.5080304371	0	

[0429]

1886	AGGTGCAGGCG GAGGCTCCA (서열번호 452)	AGGTGCAGGC GGAGGCTCCA (서열번호 969)	not	0.5080304371	0	
2603	CAGGAGACTATG GAACCCCA (서열번호 453)	CAGGAGACTA TGGAACCCCA (서열번호 970)	not	0.5080304371	0	
3109	AAAGGAAAGTCC CAGGAGGA (서열번호 454)	AAAGGAAAGT CCCAGGAGGA (서열번호 971)	not	0.5080304371	0.8713427566	
2851	GCTGTGGACCGT CTGAACAT (서열번호 455)	GCTGTGGACC GTCTGAACAT (서열번호 972)	not	0.5080304371	0	
3108	GAAAGGAAAGTC CCAGGAGG (서열번호 456)	GAAAGGAAAG TCCCAGGAGG (서열번호 973)	not	0.5080304371	0	
738	AGAAGACACTCT GTATGCCA (서열번호 457)	AGAAGACACT CTGTATGCCA (서열번호 974)	not	0.5080304371	0	
2614	GGAACCCCACTT CCTTGGTA (서열번호 458)	GGAACCCCAC TTCCTTGGTA (서열번호 975)	not	0.5080304371	0	
3095	TCTATGCCCAGC TGAAAGGA (서열번호 459)	TCTATGCACA ACTGAAAGGA (서열번호 976)	not	0.5080304371	0	
3016	GCAGTCCGGCA GAGCCTTGG (서열번호 460)	GCAGTCCGGC AGAGCCTTGG (서열번호 977)	not	0.5080304371	0	
448	GAGAGAATTGCA GGAAGAGG (서열번호 461)	GAGAGAATTG CAGGAAGAGG (서열번호 978)	not	0.5080304371	0	
1510	GACTGGAGGGA CATATTTAA (서열번호 462)	GACTGGAGGG ACATATTTAA (서열번호 979)	not	0.5080304371	0	
2503	ACGGAAGGGGA CGAATTCAG (서열번호 463)	ACGGAAGGG GACGAATTCA G (서열번호 980)	not	0.5080304371	0	
2781	ACACCCCGGGT GGGTTCCTG (서열번호 464)	ACACCCCGGG TGGGTTCCTG (서열번호 981)	not	0.5080304371	0	
607	GACCTGGCGCT GAAGGACAT (서열번호 465)	GACCTGGCGC TGAAGGACAT (서열번호 982)	not	0.5080304371	0	

[0430]

3201	CCTATCAGGCGGCATGCAGA (서열번호 466)	CCTATCAGGCGGCATGCAGA (서열번호 983)	not	0.5080304371	0	
1298	TGGTCAAAGCCTGGGAAGAA (서열번호 467)	TGGTCAAAGCCTGGGAAGAA (서열번호 984)	not	0.5080304371	0	
1243	AGGATACTGAAGAATGCCAA (서열번호 468)	AGGATACTGAAGAATGCCAA (서열번호 985)	not	0.5080304371	0	
1570	GAGTGCTTGGTCCTGGATAA (서열번호 469)	GAGTGCTTGGTCCTGGATAA (서열번호 986)	not	0.5080304371	0	
2920	GGGAAAACCACCACCTTGTC (서열번호 470)	GGGAAAACCACCACCTTGTC (서열번호 987)	not	0.5080304371	0	
2914	GGAGCTGGGAAAACCACCAC (서열번호 471)	GGAGCTGGGAAAACCACCAC (서열번호 988)	not	0.5080304371	0.8713427566	
1819	TTCCGGTACATCTGGGGCGG (서열번호 472)	TTCCGGTACATCTGGGGCGG (서열번호 989)	not	0.5080304371	0	
2601	TCCAGGAGACTATGGAACCC (서열번호 473)	TCCAGGAGACTATGGAACCC (서열번호 990)	not	0.5080304371	0	
3047	AGCACAACATCCTGTTCCAC (서열번호 474)	AGCACAACATCCTGTTCCAC (서열번호 991)	not	0.5080304371	0	
2800	GGGGTATGCGTGAAGAATCT (서열번호 475)	GGGGTGTGCGTGAAGAATCT (서열번호 992)	not	0.5080304371	0	
1834	GGCGGGTTTGCCTATCTGCA (서열번호 476)	GGCGGGTTTGCATATCTGCA (서열번호 993)	분기점	0.5080304371	0	
309	TAACAACTCCATCTTGGCAA (서열번호 477)	TAACAACTCCATCTTGGCAA (서열번호 994)	not	0.5080304371	0	
2823	AAAGATTTTTGAGCCCTGTG (서열번호 478)	GAAGATTTTTGAGCCCTGTG (서열번호 995)	not	0.5080304371	0	
3229	AGCGTGGCCATTGCCTTCGT (서열번호 479)	AGCGTGGCCATTGCCTTCGT (서열번호 996)	not	0.5080304371	0	

[0431]

2564	TCTATGGCTTACTCGCTTGG (서열번호 480)	TGTATGGCTTGCTCGCTTGG (서열번호 997)	분기점	0.5080304371	0	
713	TCTCCCAGGGCACCCTACAG (서열번호 481)	TCTCCCAGGGCACCCTACAG (서열번호 998)	not	0.5080304371	0.9618899213	
1433	GTATTACTGCTGAAGCCATC (서열번호 482)	GCATTACTGCGGAGGCCATC (서열번호 999)	분기점	0.5080304371	0	
2714	CCCTAACAGAGGAAACGGAG (서열번호 483)	CCCTAACAGAGGAAACGGAG (서열번호 1000)	not	0.5080304371	0	
23	GCTTCGTGAGACAGATACAG (서열번호 484)	GCTTCGTGAGACAGATACAG (서열번호 1001)	not	0.5080304371	0	
1597	AGCTACAATGATGAAACTCA (서열번호 485)	AGCTACAATGATGAAACTCA (서열번호 1002)	not	0.5080304371	0	
2343	ACACATCCTGTGCTTCGCCT (서열번호 486)	CCACATCCTGTGCTTCGCCT (서열번호 1003)	not	0.5080304371	0	
2351	TGTGCTTCGCCTGGCAGGAC (서열번호 487)	TGTGCTTCGCCTGGCAAGAC (서열번호 1004)	not	0.5080304371	0	
2642	TACAAGAGTCGTATTGGCTT (서열번호 488)	TACAAGAGTCGTATTGGCTT (서열번호 1005)	not	0.5080304371	0	
2239	TCCACTGCCACCATCATGCT (서열번호 489)	TCCACTGCCACCATCATGCT (서열번호 1006)	not	0.5080304371	0	
2223	GTTCTTGTTGGCTTTCTCCA (서열번호 490)	GTTCTTGTTGGCTTTCTCCA (서열번호 1007)	not	0.5080304371	0	
441	TCACCCGGAGAGAATTGCAG (서열번호 491)	TCACCCGGAGAGAATTGCAG (서열번호 1008)	not	0.5080304371	0.8713427566	
1189	AAGCCTTTGCTGATGGGAAA (서열번호 492)	AAGCCTTTGCTGATGGGAAA (서열번호 1009)	not	0.5080304371	0	
2555	ATGCTGCTGTCTATGGCTTA (서열번호 493)	ATGCTGCTGTGTATGGCTTG (서열번호 1010)	분기점	0.5080304371	0	

[0432]

1636	TCTCTACTGGAGGAAAACAT (서열번호 494)	TCTCTACTGGAGGAAAACAT (서열번호 1011)	not	0.5080304371	0	
229	CAGGGGATCTTCTGCAATGT (서열번호 495)	CAGGGGATCTTCTGCAATGT (서열번호 1012)	not	0.5080304371	0.8713427566	
705	GTGCTCCCTCTCCCAGGGCA (서열번호 496)	GTGCTCCCTCTCCCAGGGCA (서열번호 1013)	not	0.5080304371	0	
1747	GTGGTGGAGAAAACCAATAA (서열번호 497)	GTGGTGGAGAAAACCAATAA (서열번호 1014)	not	0.5080304371	0	
1318	GTAGGGCCCCAGATCTGGTA (서열번호 498)	GTGGGGCCCCAGATCTGGTA (서열번호 1015)	not	0.5080304371	0.9618899213	
3015	TGCAGTCCGGCAGAGCCTTG (서열번호 499)	TGCAGTCCGGCAGAGCCTTG (서열번호 1016)	not	0.5080304371	0.9618899213	
2103	GATTTGGTGTACCTGGTTCC (서열번호 500)	GATTTGGTGTACCTGGTTCC (서열번호 1017)	not	0.5080304371	0	
3122	AGGAGGAGGCCCAGCTGGAG (서열번호 501)	AGGAGGAGGCCCAGCTGGAG (서열번호 1018)	not	0.5080304371	1.833232678	
1555	GTCAATCAATACCTGGAGTG (서열번호 502)	GTCAATCAATACCTGGAGTG (서열번호 1019)	not	0.5080304371	0	
1725	TAAGATCCGAATGGACATAG (서열번호 503)	TAAGATCCGAATGGACATAG (서열번호 1020)	not	0.5080304371	0	
3078	GGCTGAGCACATGCTGTTCT (서열번호 504)	GGCTGAGCACATGCTGTTCT (서열번호 1021)	not	0.5080304371	0	
1681	GACATGTATCCCTGGACCAG (서열번호 505)	GACATGTATCCCTGGACCAG (서열번호 1022)	not	0.5080304371	1.833232678	
2023	ATGACTGTGAAGAGCATCGT (서열번호 506)	ATGACTGTGAAGAGCATCGT (서열번호 1023)	not	0.5080304371	0	
3082	GAGCACATGCTGTTCTATGC (서열번호 507)	GAGCACATGCTGTTCTATGC (서열번호 1024)	not	0.5080304371	0	

[0433]

[0434]

103	CTCGTGTGGCCTTTATCTTT (서열번호 508)	CTCGTGTGGCCTTTATCTTT (서열번호 1025)	not	0.5080304371	0	
2935	TTGTCCATCCTCACAGGCCT (서열번호 509)	TTGTCCATCCTCACTGGCCT (서열번호 1026)	not	0.5080304371	0	
51	CTGGAAGAACTGGACCCTGC (서열번호 510)	CTGGAAGAACTGGACCCTGC (서열번호 1027)	not	0.5080304371	0	
175	GAATGCCATTTCCCCAACAA (서열번호 511)	GAATGCCATTTCCCCAACAA (서열번호 1028)	not	0.5080304371	0	
2630	GGTACTTTCTTCTACAAGAG (서열번호 512)	GGTACTTTCTTCTACAAGAG (서열번호 1029)	not	0.5080304371	0	
2308	TGTAGTGGTGTCATCTATTT (서열번호 513)	TGTAGTGGTGTCATCTATTT (서열번호 1030)	not	0	1.742685513	
1272	TGAAGAACTGGAACACGTTA (서열번호 514)	TGAAGAACTGGAACACGTTC (서열번호 1031)	not	0	0.8713427566	
644	TCCTGGAGCGCTTCATCATC (서열번호 515)	TCCTGGAGCGCTTCATCATC (서열번호 1032)	not	0	0.8713427566	
1162	TTAACCAAAATCGCTTGGAG (서열번호 516)	TTAACCAAAATCGCTTGGAG (서열번호 1033)	not	0	0.8713427566	
2917	GCTGGGAAAACCACCACCTT (서열번호 517)	GCTGGGAAAACCACCACCTT (서열번호 1034)	not	0	0.8713427566	
2889	GATCACCGCATTCCTGGGCC (서열번호 518)	GATCACCGCATTCCTGGGCC (서열번호 1035)	not	0	0.8713427566	
3004	ACCAGCCTGGATGCAGTCCG (서열번호 519)	ACCAGCCTGGATGCAGTCCG (서열번호 1036)	not	0	1.742685513	
2349	CCTGTGCTTCGCCTGGCAGG (서열번호 520)	CCTGTGCTTCGCCTGGCAAG (서열번호 1037)	not	0	7.242383547	
3002	AAACCAGCCTGGATGCAGTC (서열번호 521)	AAACCAGCCTGGATGCAGTC (서열번호 1038)	not	0	0.8713427566	

3076	GTGGCTGAGCACATGCTGTT (서열번호 522)	GTGGCTGAGCACATGCTGTT (서열번호 1039)	not	0	2.704575435	
2813	AGAATCTGGTAAAGATTTTT (서열번호 523)	AGAATCTGGTGAAGATTTTT (서열번호 1040)	분기점	0	0.8713427566	
2773	GAGAGAGAACACCCCGGGTG (서열번호 524)	GAGAGAGAACACCCCGGGTG (서열번호 1041)	not	0	3.575918191	
619	AAGGACATCGCCTGCAGCGA (서열번호 525)	AAGGACATCGCCTGCAGCGA (서열번호 1042)	not	0	2.61402827	
2957	TGCCTCCAACCTCTGGGACT (서열번호 526)	TGCCTCCAACCTCTGGGACT (서열번호 1043)	not	0	1.742685513	
2949	AGGCCTGCTGCCTCCAACCT (서열번호 527)	TGGCCTGCTGCCTCCAACCT (서열번호 1044)	not	0	1.833232678	
2929	ACCACCTTGTCCATCCTCAC (서열번호 528)	ACCACCTTGTCCATCCTCAC (서열번호 1045)	not	0	4.537808112	
2320	ATCTATTTCACCCTCTACCT (서열번호 529)	ATCTATTTCACCCTGTACCT (서열번호 1046)	not	0	0.8713427566	
2814	GAATCTGGTAAAGATTTTTG (서열번호 530)	GAATCTGGTGAAGATTTTTG (서열번호 1047)	분기점	0	0.8713427566	
2297	TGGCAGCAGCCTGTAGTGGT (서열번호 531)	TGGCAGCAGCCTGTAGTGGT (서열번호 1048)	not	0	0.8713427566	
3073	ACGGTGGCTGAGCACATGCT (서열번호 532)	ACGGTGGCTGAGCACATGCT (서열번호 1049)	not	0	2.795122599	
1785	GGATTCTGGTCCCAGAGCTG (서열번호 533)	GGATTCTGGTCCCAGAGCTG (서열번호 1050)	not	0	0.8713427566	
3094	TTCTATGCCCAGCTGAAAGG (서열번호 534)	TTCTATGCACAACTGAAAGG (서열번호 1051)	not	0	0.8713427566	
173	ATGAATGCCATTTCCCCAAC (서열번호 535)	ATGAATGCCATTTCCCCAAC (서열번호 1052)	not	0	0.8713427566	

[0435]

2194	CATTACAGCGACCCATTCAT (서열번호 536)	CATTACAGCGACCCATTCAT (서열번호 1053)	not	0	1.742685513	
2795	TTCCTGGGGTATGCGTGAAG (서열번호 537)	TTCCTGGGGTGTGCGTGAAG (서열번호 1054)	not	0	2.61402827	
13	GGTGGCAGCGGCTTCGTGAG (서열번호 538)	GGTGGATCCGGCTTCGTGAG (서열번호 1055)	not	0	0.8713427566	
2242	ACTGCCACCATCATGCTGTG (서열번호 539)	ACTGCCACCATCATGCTGTG (서열번호 1056)	not	0	0.8713427566	
2863	CTGAACATCACCTTCTACGA (서열번호 540)	CTGAACATCACCTTCTACGA (서열번호 1057)	not	0	1.833232678	
2435	CTGAGTACCTGGTTCGCTTT (서열번호 541)	CTGAGTACCTGGTTCGCTTT (서열번호 1058)	not	0	0.8713427566	
1225	GATTCACCTGCAGCACGAAG (서열번호 542)	GATTCACCTGCTGCACGAAG (서열번호 1059)	not	0	2.61402827	
901	GACTTGCTGTGGGTGACCAG (서열번호 543)	GACTTGCTGTGGGTGACCAG (서열번호 1060)	not	0	0.8713427566	
1123	TTTTGTAATGCATTGATCCA (서열번호 544)	TTTTGTAATGCATTGATCCA (서열번호 1061)	not	0	0.8713427566	
2130	CTTCTCCATCATGTCGATGA (서열번호 545)	CTTCTCCATCATGTCGATGA (서열번호 1062)	not	0	0.8713427566	
3011	TGGATGCAGTCCGGCAGAGC (서열번호 546)	TGGATGCAGTCCGGCAGAGC (서열번호 1063)	not	0	0.8713427566	
2081	ATCAGGGTGTCTCCAATGCA (서열번호 547)	ATCAGGGTGTCTCCAATGCA (서열번호 1064)	not	0	0.8713427566	
1092	TATCTATTCTTATGACAGAA (서열번호 548)	TATCTATTCTTATGACAGAA (서열번호 1065)	not	0	1.742685513	
3120	CCAGGAGGAGGCCCAGCTGG (서열번호 549)	CCAGGAGGAGGCCCAGCTGG (서열번호 1066)	not	0	1.833232678	

[0436]

3111	AGGAAAGTCCCAGGAGGAGG (서열번호 550)	AGGAAAGTCCCAGGAGGAGG (서열번호 1067)	not	0	1.742685513	
2839	TGTGGCCGGCCAGCTGTGGA (서열번호 551)	TGTGGCCGGCCAGCTGTGGA (서열번호 1068)	not	0	0.8713427566	
2677	TCAACCAGAGAAGAAAGAGC (서열번호 552)	TCAACCAGAGAAGAAAGAGC (서열번호 1069)	not	0	0.8713427566	
2821	GTAAAGATTTTTGAGCCCTG (서열번호 553)	GTGAAGATTTTTGAGCCCTG (서열번호 1070)	분기점	0	0.8713427566	
2784	CCCCGGGTGGGTTCCTGGGG (서열번호 554)	CCCCGGGTGGGTTCCTGGGG (서열번호 1071)	not	0	0.8713427566	
1129	AATGCATTGATCCAGAGCCT (서열번호 555)	AATGCATTGATCCAGAGCCT (서열번호 1072)	not	0	0.8713427566	
918	CAGGCCCCTCATGCAGAATG (서열번호 556)	CAGGCCCCTCATGCAGAATG (서열번호 1073)	not	0	0.8713427566	
351	ACTCCTCATGAATGCACCAG (서열번호 557)	ACTCCTCATGAATGCACCAG (서열번호 1074)	not	0	0.8713427566	
2540	AGATGATGCTCCTTGATGCT (서열번호 558)	AGATGATGCTCCTTGATGCT (서열번호 1075)	not	0	0.8713427566	
3056	TCCTGTTCCACCACCTCACG (서열번호 559)	TCCTGTTCCACCACCTCACG (서열번호 1076)	not	0	1.742685513	
1465	TACAAGGGCCCTCGGGAAAG (서열번호 560)	TACAAGGGCCCTCGGGAAAG (서열번호 1077)	not	0	0.8713427566	
2838	CTGTGGCCGGCCAGCTGTGG (서열번호 561)	CTGTGGCCGGCCAGCTGTGG (서열번호 1078)	not	0	0.8713427566	
3065	ACCACCTCACGGTGGCTGAG (서열번호 562)	ACCACCTCACGGTGGCTGAG (서열번호 1079)	not	0	0.8713427566	
1150	GAGTCAAATCCTTTAACCAA (서열번호 563)	GAGTCAAATCCTTTAACCAA (서열번호 1080)	not	0	0.8713427566	

[0437]

1959	CATGATCATCCTGAACCGCT (서열번호 564)	CATGATCATCCTGAACCGCT (서열번호 1081)	not	0	0.8713427566	
2656	TGGCTTGGCGGTGAAGGGTG (서열번호 565)	TGGCTTGGCGGTGAAGGGTG (서열번호 1082)	not	0	0.8713427566	
101	AACTCGTGTGGCCTTTATCT (서열번호 566)	AACTCGTGTGGCCTTTATCT (서열번호 1083)	not	0	0.8713427566	
1807	CCCGTGGAAGATTTCCGGTA (서열번호 567)	CCCGTGGAAGATTTCCGGTA (서열번호 1084)	not	0	0.8713427566	
1270	TTTGAAGAACTGGAACACGT (서열번호 568)	TTTGAAGAACTGGAACACGT (서열번호 1085)	not	0	0.8713427566	
2738	CAGAGCACCCAGAAGGAATA (서열번호 569)	CAGAGCACCCAGAAGGAATA (서열번호 1086)	not	0	0.8713427566	
2827	ATTTTTGAGCCCTGTGGCCG (서열번호 570)	ATTTTTGAGCCCTGTGGCCG (서열번호 1087)	not	0	0.8713427566	
2074	TTGAAAAATCAGGGTGTCTC (서열번호 571)	TTGAAAAATCAGGGTGTCTC (서열번호 1088)	not	0	0.8713427566	
1414	AGGCAGCTTGGTGAAGAAGG (서열번호 572)	AGGCAGCTTGGTGAAGAAGG (서열번호 1089)	not	0	0.8713427566	
2383	GAGCTGAAGAAGGCTGTGAG (서열번호 573)	GAGCTGAAGAAGGCTGTGAG (서열번호 1090)	not	0	0.8713427566	
2961	TCCAACCTCTGGGACTGTGC (서열번호 574)	TCCAACCTCTGGGACTGTGC (서열번호 1091)	not	0	0.8713427566	
1355	CACAGATGAACATGATCAGA (서열번호 575)	CACAGATGAACATGATCAGA (서열번호 1092)	not	0	0.8713427566	
987	GTGTGGCTACCCCGAGGGAG (서열번호 576)	GTGTGGCTACCCCGAGGGAG (서열번호 1093)	not	0	0.8713427566	
2195	ATTACAGCGACCCATTCATC (서열번호 577)	ATTACAGCGACCCATTCATC (서열번호 1094)	not	0	0.8713427566	

[0438]

2072	CTTTGAAAAATCAGGGTGTC (서열번호 578)	CATTGAAAAATCAGGGTGTC (서열번호 1095)	not	0	0.8713427566	
2899	TTCCTGGGCCACAATGGAGC (서열번호 579)	TTCCTGGGCCACAATGGAGC (서열번호 1096)	not	0	0.8713427566	
2674	TGTTCAACCAGAGAAGAAAG (서열번호 580)	TGTTCAACCAGAGAAGAAAG (서열번호 1097)	not	0	0.8713427566	
1987	ATCTTCATGGTGCTGGCATG (서열번호 581)	ATCTTCATGGTGCTGGCATG (서열번호 1098)	not	0	0.8713427566	
498	AGAAACACTGACACTATTTC (서열번호 582)	AGAAACACTGACACTATTTC (서열번호 1099)	not	0	0.8713427566	
1955	CTTTCATGATCATCCTGAAC (서열번호 583)	CTTTCATGATCATCCTGAAC (서열번호 1100)	not	0	0.8713427566	
2777	GAGAACACCCCGGGTGGGTT (서열번호 584)	GAGAACACCCCGGGTGGGTT (서열번호 1101)	not	0	0.8713427566	
96	GGTGGAACTCGTGTGGCCTT (서열번호 585)	GGTGGAACTCGTGTGGCCTT (서열번호 1102)	not	0	0.8713427566	
1146	CCTGGAGTCAAATCCTTTAA (서열번호 586)	CCTGGAGTCAAATCCTTTAA (서열번호 1103)	not	0	0.8713427566	
121	TTATTTCTGGTCTTGATCTG (서열번호 587)	TTATTTCTGGTCTTGATCTG (서열번호 1104)	not	0	0.8713427566	
2495	ACAGTCCCACGGAAGGGGAC (서열번호 588)	ACAGTCCCACGGAAGGGGAC (서열번호 1105)	not	0	0.8713427566	
2203	GACCCATTCATCCTCTTCCT (서열번호 589)	GACCCATTCATCCTCTTCCT (서열번호 1106)	not	0	0.8713427566	
3170	TCCACCACAAGCGGAATGAA (서열번호 590)	TCCACCACAAGCGGAATGAA (서열번호 1107)	not	0	0.9618899213	
3169	CTCCACCACAAGCGGAATGA (서열번호 591)	CTCCACCACAAGCGGAATGA (서열번호 1108)	not	0	2.885669764	

[0439]

2086	GGTGTCTCCAATGCAGTGAT (서열번호 592)	GGTGTCTCCAATGCAGTGAT (서열번호 1109)	not	0	0.9618899213	
240	CTGCAATGTGAACAATCCCT (서열번호 593)	CTGCAATGTGAACAATCCCT (서열번호 1110)	not	0	1.923779843	
2653	TATTGGCTTGGCGGTGAAGG (서열번호 594)	TATTGGCTTGGCGGTGAAGG (서열번호 1111)	not	0	0.9618899213	
2268	GCTCAGCACCTTCTTCTCCA (서열번호 595)	GCTCAGCACCTTCTTCTCCA (서열번호 1112)	not	0	0.9618899213	
353	TCCTCATGAATGCACCAGAG (서열번호 596)	TCCTCATGAATGCACCAGAG (서열번호 1113)	not	0	1.923779843	
2073	TTTGAAAAATCAGGGTGTCT (서열번호 597)	ATTGAAAAATCAGGGTGTCT (서열번호 1114)	not	0	0.9618899213	
2271	CAGCACCTTCTTCTCCAAGG (서열번호 598)	CAGCACCTTCTTCTCCAAGG (서열번호 1115)	not	0	1.923779843	
2970	TGGGACTGTGCTCGTTGGGG (서열번호 599)	TGGGACTGTGCTCGTTGGGG (서열번호 1116)	not	0	0.9618899213	
2815	AATCTGGTAAAGATTTTTGA (서열번호 600)	AATCTGGTGAAGATTTTTGA (서열번호 1117)	분기점	0	0.9618899213	
3132	CCAGCTGGAGATGGAAGCCA (서열번호 601)	CCAGCTGGAGATGGAAGCCA (서열번호 1118)	not	0	0.9618899213	
2097	TGCAGTGATTTGGTGTACCT (서열번호 602)	TGCAGTGATTTGGTGTACCT (서열번호 1119)	not	0	0.9618899213	
1894	GCGGAGGCTCCAGTTGGAAT (서열번호 603)	GCGGAGGCTCCAGTTGGAAT (서열번호 1120)	not	0	0.9618899213	
617	TGAAGGACATCGCCTGCAGC (서열번호 604)	TGAAGGACATCGCCTGCAGC (서열번호 1121)	not	0	2.885669764	
3027	GAGCCTTGGCATGTGTCCAC (서열번호 605)	GAGCCTTGGCATGTGTCCAC (서열번호 1122)	not	0	1.923779843	

[0440]

1977	CTGTTTCCCTATCTTCATGG (서열번호 606)	CTGTTTCCCTATCTTCATGG (서열번호 1123)	not	0	1.923779843	
2835	GCCCTGTGGCCGGCCAGCTG (서열번호 607)	GCCCTGTGGCCGGCCAGCTG (서열번호 1124)	not	0	0.9618899213	
205	TCAGCAGGAATGCTGCCGTG (서열번호 608)	TCAGCAGGAATGCTGCCGTG (서열번호 1125)	not	0	0.9618899213	
3161	ACACAGGCCTCCACCACAAG (서열번호 609)	ACACAGGCCTCCACCACAAG (서열번호 1126)	not	0	1.923779843	
2864	TGAACATCACCTTCTACGAG (서열번호 610)	TGAACATCACCTTCTACGAG (서열번호 1127)	not	0	1.923779843	
3055	ATCCTGTTCCACCACCTCAC (서열번호 611)	ATCCTGTTCCACCACCTCAC (서열번호 1128)	not	0	0.9618899213	
1931	CCTACCCCTGCTTCGTGGAC (서열번호 612)	CCTACCCCTGCTTCGTGGAC (서열번호 1129)	not	0	0.9618899213	
2872	ACCTTCTACGAGAACCAGAT (서열번호 613)	ACCTTCTACGAGAACCAGAT (서열번호 1130)	not	0	1.923779843	
2950	GGCCTGCTGCCTCCAACCTC (서열번호 614)	GGCCTGCTGCCTCCAACCTC (서열번호 1131)	not	0	0.9618899213	
92	TTGTGGTGGAACTCGTGTGG (서열번호 615)	TTGTGGTGGAACTCGTGTGG (서열번호 1132)	not	0	1.923779843	
3050	ACAACATCCTGTTCCACCAC (서열번호 616)	ACAACATCCTGTTCCACCAC (서열번호 1133)	not	0	0.9618899213	
1874	TCACAAGGAGCCAGGTGCAG (서열번호 617)	TCACAAGGAGCCAGGTGCAG (서열번호 1134)	not	0	0.9618899213	
2984	TTGGGGGAAGGGACATTGAA (서열번호 618)	TTGGGGGAAGGGACATTGAA (서열번호 1135)	not	0	1.923779843	
2107	TGGTGTACCTGGTTCCTGGA (서열번호 619)	TGGTGTACCTGGTTCCTGGA (서열번호 1136)	not	0	0.9618899213	

[0441]

33	ACAGATACAGCTTTTGCTCT (서열번호 620)	ACAGATACAGCTTTTGCTCT (서열번호 1137)	not	0	1.923779843	
2999	TTGAAACCAGCCTGGATGCA (서열번호 621)	TTGAAACCAGCCTGGATGCA (서열번호 1138)	not	0	0.9618899213	
2836	CCCTGTGGCCGGCCAGCTGT (서열번호 622)	CCCTGTGGCCGGCCAGCTGT (서열번호 1139)	not	0	0.9618899213	
2262	CTTTCTGCTCAGCACCTTCT (서열번호 623)	CTTTCTGCTCAGCACCTTCT (서열번호 1140)	not	0	0.9618899213	
2640	TCTACAAGAGTCGTATTGGC (서열번호 624)	TCTACAAGAGTCGTATTGGC (서열번호 1141)	not	0	1.923779843	
2717	TAACAGAGGAAACGGAGGAT (서열번호 625)	TAACAGAGGAAACGGAGGAT (서열번호 1142)	not	0	0.9618899213	
3038	TGTGTCCACAGCACAACATC (서열번호 626)	TGTGTCCACAGCACAACATC (서열번호 1143)	not	0	0.9618899213	
1579	GTCCTGGATAAGTTTGAAAG (서열번호 627)	GTCCTGGATAAGTTTGAAAG (서열번호 1144)	not	0	0.9618899213	
2307	CTGTAGTGGTGTCATCTATT (서열번호 628)	CTGTAGTGGTGTCATCTATT (서열번호 1145)	not	0	0.9618899213	
3138	GGAGATGGAAGCCATGTTGG (서열번호 629)	GGAGATGGAAGCCATGTTGG (서열번호 1146)	not	0	0.9618899213	
2892	CACCGCATTCCTGGGCCACA (서열번호 630)	CACCGCATTCCTGGGCCACA (서열번호 1147)	not	0	0.9618899213	
1558	AATCAATACCTGGAGTGCTT (서열번호 631)	AATCAATACCTGGAGTGCTT (서열번호 1148)	not	0	1.923779843	
2955	GCTGCCTCCAACCTCTGGGA (서열번호 632)	GCTGCCTCCAACCTCTGGGA (서열번호 1149)	not	0	0.9618899213	
3146	AAGCCATGTTGGAGGACACA (서열번호 633)	AAGCCATGTTGGAGGACACA (서열번호 1150)	not	0	1.923779843	

[0442]

2799	TGGGGTATGCGTGAAGAATC (서열번호 634)	TGGGGTGTGCGTGAAGAATC (서열번호 1151)	not	0	0.9618899213	
91	TTTGTGGTGGAACTCGTGTG (서열번호 635)	TTTGTGGTGGAACTCGTGTG (서열번호 1152)	not	0	0.9618899213	
1495	GACATGGCCAACTTCGACTG (서열번호 636)	GACATGGCCAACTTCGACTG (서열번호 1153)	not	0	0.9618899213	
1969	CTGAACCGCTGTTTCCCTAT (서열번호 637)	CTGAACCGCTGTTTCCCTAT (서열번호 1154)	not	0	0.9618899213	
2340	GCCACACATCCTGTGCTTCG (서열번호 638)	GCCCCACATCCTGTGCTTCG (서열번호 1155)	not	0	1.923779843	
578	GTCCAGAGCAGTTCGCTCAT (서열번호 639)	GTCCAGAGCAGTTCGCTCAT (서열번호 1156)	not	0	0.9618899213	
2491	GGGAACAGTCCCACGGAAGG (서열번호 640)	GGGAACAGTCCCACGGAAGG (서열번호 1157)	not	0	0.9618899213	
1826	ACATCTGGGGCGGGTTTGCC (서열번호 641)	ACATCTGGGGCGGGTTTGCA (서열번호 1158)	not	0	0.9618899213	
563	TCAACTCTCAAGTCCGTCCA (서열번호 642)	TCAACTCTCAAGTCCGTCCA (서열번호 1159)	not	0	0.9618899213	
1535	CTGATCGCACCCTCCGCCTG (서열번호 643)	CTGATCGCACCCTCCGCCTG (서열번호 1160)	not	0	0.9618899213	
1444	GAAGCCATCCTAAACTTCCT (서열번호 644)	GAGGCCATCCTAAACTTCCT (서열번호 1161)	not	0	0.9618899213	
3223	AAACTGAGCGTGGCCATTGC (서열번호 645)	AAACTGAGCGTGGCCATTGC (서열번호 1162)	not	0	0.9618899213	
1500	GGCCAACTTCGACTGGAGGG (서열번호 646)	GGCCAACTTCGACTGGAGGG (서열번호 1163)	not	0	1.923779843	
3200	ACCTATCAGGCGGCATGCAG (서열번호 647)	ACCTATCAGGCGGCATGCAG (서열번호 1164)	not	0	0.9618899213	

[0443]

787	CTTCCCACACTC CTAGACAG (서열번호 648)	CTTCCCACAC TCCTAGACAG (서열번호 1165)	not	0	0.9618899213	
2213	TCCTCTTCCTGT TCTTGTTG (서열번호 649)	TCCTCTTCCT GTTCTTGTTG (서열번호 1166)	not	0	0.9618899213	
2411	CTCCGGTGGCAT TTGGATTT (서열번호 650)	CTCCGGTGGC ATTTGGATTT (서열번호 1167)	not	0	0.9618899213	
3035	GCATGTGTCCAC AGCACAAC (서열번호 651)	GCATGTGTCC ACAGCACAAC (서열번호 1168)	not	0	0.9618899213	
2812	AAGAATCTGGTA AAGATTTT (서열번호 652)	AAGAATCTGG TGAAGATTTT (서열번호 1169)	분기점	0	0.9618899213	
626	TCGCCTGCAGC GAGGCCCTC (서열번호 653)	TCGCCTGCAG CGAGGCCCTC (서열번호 1170)	not	0	0.9618899213	
2005	TGGATCTACTCT GTCTCCAT (서열번호 654)	TGGATCTACT CTGTCTCCAT (서열번호 1171)	not	0	0.9618899213	
65	CCCTGCGGAAAA GGCAAAAG (서열번호 655)	CCCTGCGGAA AAGGCAAAAG (서열번호 1172)	not	0	0.9618899213	
2928	CACCACCTTGTC CATCCTCA (서열번호 656)	CACCACCTTG TCCATCCTCA (서열번호 1173)	not	0	0.9618899213	
2758	CACGACTCCTTC TTCGAGAG (서열번호 657)	CACGACTCCT TCTTCGAGAG (서열번호 1174)	not	0	0.9618899213	
2295	TCTGGCAGCAGC CTGTAGTG (서열번호 658)	TCTGGCAGCA GCCTGTAGTG (서열번호 1175)	not	0	0.9618899213	
3139	GAGATGGAAGC CATGTTGGA (서열번호 659)	GAGATGGAAG CCATGTTGGA (서열번호 1176)	not	0	1.923779843	
169	CATCATGAATGC CATTTCCC (서열번호 660)	CATCATGAAT GCCATTTCCC (서열번호 1177)	not	0	0.9618899213	
2964	AACCTCTGGGAC TGTGCTCG (서열번호 661)	AACCTCTGGG ACTGTGCTCG (서열번호 1178)	not	0	0.9618899213	

[0444]

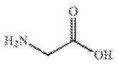
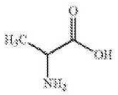
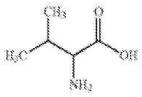
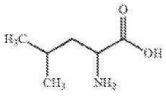
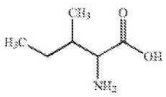
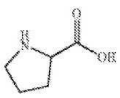
1354	ACACAGATGAACATGATCAG (서열번호 662)	ACACAGATGAACATGATCAG (서열번호 1179)	not	0	0.9618899213	
1416	GCAGCTTGGTGAAGAAGGTA (서열번호 663)	GCAGCTTGGTGAAGAAGGCA (서열번호 1180)	not	0	0.9618899213	
2902	CTGGGCCACAATGGAGCTGG (서열번호 664)	CTGGGCCACAATGGAGCTGG (서열번호 1181)	not	0	0.9618899213	
954	TACAAAGCTGATGGGCATCC (서열번호 665)	TACAAAGCTGATGGGCATCC (서열번호 1182)	not	0	0.9618899213	
2942	TCCTCACAGGCCTGCTGCCT (서열번호 666)	TCCTCACTGGCCTGCTGCCT (서열번호 1183)	not	0	0.9618899213	
94	GTGGTGGAACTCGTGTGGCC (서열번호 667)	GTGGTGGAACTCGTGTGGCC (서열번호 1184)	not	0	0.9618899213	
3064	CACCACCTCACGGTGGCTGA (서열번호 668)	CACCACCTCACGGTGGCTGA (서열번호 1185)	not	0	0.9618899213	
2232	GGCTTTCTCCACTGCCACCA (서열번호 669)	GGCTTTCTCCACTGCCACCA (서열번호 1186)	not	0	0.9618899213	
2660	TTGGCGGTGAAGGGTGTTCA (서열번호 670)	TTGGCGGTGAAGGGTGTTCA (서열번호 1187)	not	0	0.9618899213	

[0445]

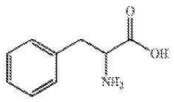
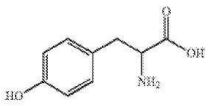
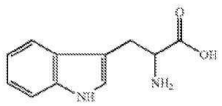
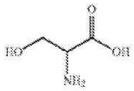
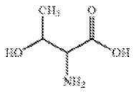
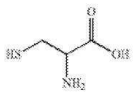
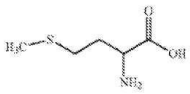
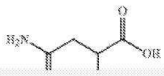
[0446] "정규 아미노산"은 아래 표 6에 나타난 인체에서 자연적으로 발견되는 20가지 아미노산을 지칭한다.

표 6

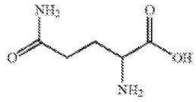
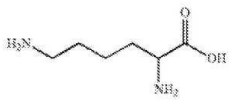
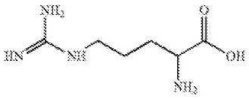
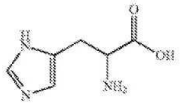
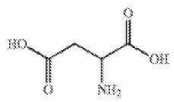
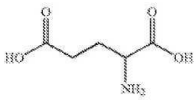
글자 약어, 1글자 약어, 구조 및 해당 코돈을 포함한 표준 아미노산을 나타낸다:

비극성, 지방족 잔기				
글리신	Gly	G		GGU GGC GGA GGG
알라닌	Ala	A		GCU GCC GCA GCG
발린	Val	V		GUU GUC GUA GUG
류신	Leu	L		UUA UUG CUU CUC CUA CUG
아이소류신	Ile	I		AUU AUC AUA
프롤린	Pro	P		CCU CCC CCA CCG

[0447]

방향족 잔기				
페닐알라닌	Phe	F		UUU UUC
티로신	Tyr	Y		UAU UAC
트립토판	Trp	W		UGG
극성 비하전 잔기				
세린	Ser	S		UCU UCC UCA UCG AGU AGC
트레오닌	Thr	T		ACU ACC ACA ACG
시스테인	Cys	C		UGU UGC
메티오닌	Met	M		AUG
아스파라긴	Asn	N		AAU AAC

[0448]

글루타민	Gln	Q		CAA CAG
양으로 하전된 잔기				
라이신	Lys	K		AAA AAG
아르기닌	Arg	R		CGU CGC CGA CGG AGA AGG
히스티딘	His	H		CAU CAC
음으로 하전된 잔기				
아스파테이트	Asp	D		GAU GAC
글루타메이트	Glu	E		GAA GAG

[0449]

[0450] **실시예 8. 생체내에서 예시적인 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 평가**

[0451] 본 연구의 주요 목적은 아프리카 녹색 원숭이(AGM)에서 4.3×10^{10}(4.3E10) vg/양쪽 눈(OU; 양쪽 눈)의 용량으로 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물을 망막하 투여한 후 1개월 및 3개월 시점에서 지속적인 엑손 편집기 발현 및 효능을 확인하는 것이다. 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물은 서열번호 77을 포함한다. 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물에 의해 암호화된 엑손 편집기는 SD를 넘어 NSP 번역을 방지하는 이중 정지 코돈을 포함하여 도 13에 도시된 것과 동일한 조절 요소(인핸서, 프로모터 및 5' UTR)를 포함하지만 3xU1 및 ARE 기능을 포함하지 않으므로 증진제(3xU1) 및 번역 증진제(ARE)를 포함하는 작제물에 비해 상당히 높은 수준의 NSP를 생성한다. AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 역가는 엑손 편집기의 ABCA4 CDS 내의 말단 엑손 22를 표적으로 하는 전방 프라이머와 프로브, 그리고 엑손 편집기 작제물의 40량체 링커와 이중 정지 코돈 서열을 포함하는 역방향 프라이머를 사용하여 ddPCR 검정을 사용하여 측정하였다. 이 동일한 ddPCR 검정은 다른 예시적인 ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 역가를 계산하는 데 사용되었다.

[0452] RT-qPCR은 편집된 ABCA4 RNA, 천연 NHP ABCA4 RNA 및 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 발현을 측정하는 데 사용되었으며, 모두 하우스키핑 유전자 RNF20에 대해 정규화되었다. 4주(1개월)에 ABCA4 RNA 대체물의 백분율은 14.4% 내지 31.5%였고, 12주(3개월)에 26.3% 내지 37.8%였다. 4주에 10ng RNA당 엑손 편집기 카피 수의 범위는 1.3E6 내지 0.6E6였고, 12주에 2.1E6 내지 3.0E6이었다. 이러한 결과는 본 명세서에 기재된 AAV 패키지 ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 형질도입이 암호화된 RNA 엑손 편집기의 지속적인 발현과 관찰된 대체%에 반영된 지속적인 활성을 초래한다는 것을 나타낸다. 실제로 대체%는 시간이 지남에 따라 증가하고 있다. 도 22A 및 도 22B를 참조한다.

[0453] 슬릿 램프 현미경을 통한 생전 안구 평가는 망막하 주사와 관련된 몇몇 동물에서 경미한 내지 중간 정도의 염증을 나타내었으며, 이는 제7일에 최고조에 달했고 대부분 제28일에 해소되었다. 안저 이미지는 망막하 주사와 일치하는 안구 변화를 나타내었다. 안구 내압(IOP), 망막 두께 및 망막 부피는 연구 기간 동안 모든 동물에서 안정적으로 유지되었다. 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 또는 비히클로 치료한 눈의 공초점 주사 레이저 검안경(cSLO) 및 컬러 안저 사진은 주사 부위에서 비슷한 정도의 변화를 나타내었다.

[0454] 1일 2회 실시하는 일반 관찰은 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물의 부작용을 나타내는 임상적 징후를 나타내지 않았다. 체중, 호흡수, 심박수 및 체온은 연구 기간 동안 안정적이었고 발생한 변화 중에서 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 관련 패턴은 나타나지 않았다. AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 구조 투여에 의한 임상병리학적 이상[임상화학, 전혈구수(CBC), 응고 프로필]은 나타나지 않았다.

[0455] 조직병리학적 분석 결과 모든 동물의 외측 무릎상핵, 시신경로, 시교차, 비장 및 간 샘플이 정상 범위 내에 있음을 확인하였다. 어떤 비히클 또는 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물로 처리한 동물에서도 안구 조직병리학적 분석에서 면역 침윤 또는 망막 해부학적 이상 징후가 관찰되지 않았다. AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물로 처리한 두 마리의 동물과 비히클로 처리한 한 마리의 동물에서 망막 거상연(ora serrata)(유리체 절제술 부위) 수준에서 망막 색소 상피(RPE)의 최소에서 경미한 비대 및 이동이 관찰되었다. 이러한 결과는 주입 절차와 일치하며 시험품(작제물)과 관련이 없는 것으로 간주된다.

[0456] 본 연구는 선택된 조절 요소 및 ABCA4-01과 공통적으로 공유하는 40량체 링커 및 BD(예를 들어 실시예 8 내지 10 참조)가 AGM에서 3개월 시간 지점까지 지속적인 발현 및 엑손 편집 활성을 부여한다는 것을 입증하였다. 도 22A 및 도 22B를 참조한다.

[0457] **실시예 9. 조사 독성학 연구: 생체내에서 예시적인 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자 ABCA4-01의 평가**

[0458] 조사 독성학 연구: 3.5E11 또는 1E12 vg/눈의 단일 망막하 투여 후 1개월 및 6개월에 시노몰거스 마카크에서 엑손 편집 효율성 및 조사 안전성 평가와 관련하여 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 ABCA4-01(서열번호 90)(서열번호 78을 포함하는 RNA 엑손 편집기 포함)의 평가를 완료하였다.

[0459] 본 연구의 주요 목적은 1개월 및 6개월 시점에서 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기(ABCA4-01; 서열번호 90)(서열번호 78 포함)의 생체내 안전성 및 효능을 확인하는 것이었다. 본 연구에서는 두 가지 용량 수준을 평가하였다. 3.5E11 및 1E12vg/눈, 수컷 원숭이 눈당 단일 망막하 주사(OU)로 투여. 1개월 그룹은 각각의 용량 수준에 대해 n=2, 비히클 그룹에 대해 n=2였다. 6개월 그룹은 각각의 용량 수준에 대해 n=3, 비히클에 대해 n=2였다. 본 연구에 대한 모든 투여를 완료하였다.

[0460] 본 명세서에 기재된 바와 같이 ABCA4-01 벡터 게놈 DNA 카피(VGC) 생물 분포, RNA 발현, 엑손 편집 활성(RNA 대

체%) 및 편집된 인간-NHP 키메라 ABCA4 단백질을 신경 망막 샘플에서 측정하였다.

[0461] 또한 VGC를 시교차, 시신경로, 시신경에서 평가하였다. 다음의 비안구 조직을 수집하였다: 뇌, 등근신경절(요추), 심장, 신장, 간, 담낭, 외측무릎핵, 폐, 림프절(하악 및 장간막), 비장 및 고환. 초기 계획은 1개월 시점에 1E12 vg/눈 용량 그룹의 모든 비안구 조직을 분석하여 하류 및 미래 분석 요구 사항의 필요성을 평가하는 것이었다.

[0462] 본 명세서에 기재된 바와 같이, RT-qPCR(또는 ddPCR)을 사용하여 편집된 ABCA4 RNA, 기본 NHP ABCA4 RNA 및 ABCA4-01 엑손 편집기 RNA 발현을 측정하였으며, 모두 하우스키퍼 RNF20으로 정규화하였다. 신경 망막 샘플을 넘어 ABCA4-01 VGC에 대해 양성인 조직만 ABCA4-01 엑손 편집기 RNA 발현에 대해 평가하였다.

[0463] 각각의 동물의 한쪽 눈을 인증된 병리학자가 평가하고 서명된 조직병리학 보고서를 작성하였다. 비임상 독성학 평가를 뒷받침하는 모든 표준 전신 조직(부신, 모든 총 병변, 대동맥(상행), 골수, 뇌, 식도, 담낭, 심장(좌심실 벽), 신장, 대장, 외측 무릎상핵, 간, 폐, 장간막 림프절, 시교차, 시신경로, 췌장, 좌골신경, 골격근, 피부, 소장(공장), 척수, 비장, 위, 하악 림프절, 고환, 흉선 및 방광 포함)을 수집하여 고정하고 파라핀 블록에 넣었다. 모든 동물에서 모든 총 병변, 골수 도말(갈비뼈), 등근신경절, 심장, 신장, 외측 무릎상핵, 간, 폐, 시교차, 시신경, 시신경로, 비장을 슬라이드로 옮겨서 H&E로 염색하고 인증된 병리학자가 평가하도록 하였다. 다른 모든 조직학적 샘플은 필요한 경우 잠재적인 미래 조사를 위해 보관하였다.

[0464] 조사 독성학 연구의 예비 관찰:

[0465] ABCA4-01의 3.5E11 용량에서 주입 후 1개월의 결과는 생체내에서 54%의 대체를 나타냈다. 이러한 결과는 적어도 관찰된 대체% 수준이 광수용체 및 RPE 세포의 맥락에서 치료적으로 효과적인 양의 트랜스-스플라이싱된 ABCA4 단백질이 생성되어 내인성 ABCA4 활동이 감소하거나 없는 세포에서 야생형 ABCA4 기능을 회복했음을 시사하기 때문에 ABCA4-01의 치료 효능에 대한 잠재력을 강조한다.

[0466] 지금까지 두 용량 모두의 ABCA4-01은 내약성이 우수하였다. 연구 35일까지의 안구 검사의 예비적 소견을 본 명세서에 요약하였다. 각 눈은 투여 후 2 내지 3일, 1주일, 2주일, 4주일 또는 5주일에 염증 징후를 모니터링하였다. 수성 세포, 유리체 세포, 결막 상태, 홍채 충혈, 결막 부종, 분비물, 눈꺼풀, PLR, 각막 불투명도, 각막 침전물, 각막 혈관 형성, 수성 플레어, 수성 세포 색상, 유리체 세포 색상, 유리체 탁도, 수정체 및 안저를 검사하였다. 또한 안압을 측정하였다.

[0467] 일부 눈과 망막하 수술에 기인하는 일부 시점에서 경미하거나 중간 정도의 눈 염증을 관찰하였다. 안구 검사 결과에 따라 항염제로 치료하는 치료 계획을 수립하였다. 낮은 임계값(수성 세포 점수 >3 또는 수성 플레어가 있는 3, 유리체 전세포 또는 유리체 혼탁 징후 없음)은 데카사메타손(10mg/ml의 0.1ml)으로 결막하 주사를 수행하였고, 높은 임계값(수성 세포 점수가 3 또는 3보다 크고 수성 플레어와 유리체 전세포 또는 유리체 혼탁 징후 있음)은 트리암시놀론으로 유리체내 주사를 수행하였다. ABCA4-01의 3.5E11vg/눈 용량을 투여받은 동물에서는 지금까지 치료가 필요하지 않았다. 비히클로 처리한 한 마리의 동물에서 트리암시놀론을 72시간에 투여하였다(OD만). 1E12 용량/눈 그룹에서 한 동물은 제2일에 덱사메타손이 필요하였고 제7일에 트리암시놀론(OS만 해당)과 제29일에 덱사메타손 치료(OD만 해당)가 필요하였고, 두 번째 동물은 제8일에 OU 트리암시놀론 치료가 필요하였고, 세 번째 동물은 제29일에 트리암시놀론을 투여받았다(OD만 해당). 각 경우 추적 안구 검사에서 염증이 감소한 것으로 나타났다. 주목할 점은 본 연구의 동물은 특히 ABCA4-01 암호화 엑손 편집기에 대한 불리한 면역 반응을 가리는 것을 방지하기 위해 예방적 코르티코스테로이드 도는 기타 면역 억제 요법을 투여받지 않았다는 것이다. 위에서 설명한 염증은 망막하 주사와 더 높은 AAV8 용량에 대한 반응과 일치하였다. 따라서 본 조사 연구는 후속 연구에서 고용량 수준을 정의하는 데 매우 적합하였다.

[0468] 모든 그룹에서 연구 내내 안구 내압이 안정적으로 유지되었다. cSLO/OCT로 눈을 영상화한 결과 망막하 주사와 일치하는 안저 변화가 나타났으며 ABCA4-01 투여에 기인한 변화는 나타나지 않았다(연구 진행 중, 제8일 데이터 평가).

[0469] 모든 동물에서 ABCA4-01 투여 전에 항-AAV8 NAb를 평가하였다. 이러한 역가는 1:10 미만 내지 ≥1:100까지였다. 기존 NAb 역가 데이터를 사용하여 동물을 3개의 그룹으로 분포시켰다. 제4주 또는 제5주에, 비히클 투여 동물은 ≥1:10 내지 ≥1:100의 범위 내의 NAb 역가를 갖는 반면, ABCA4-01을 어느 용량으로 투여한 동물은 ≥1:100 내지 1≥1:1000의 범위에 있었으며, 이는 망막하수포에서 전신 순환으로 누출될 수 있는 소량의 AAV8 캡시드에 대한 예상 적응 면역 반응과 일치하였다.

[0470] 동물 건강에 대한 케이지 측면 모니터링과 체중 측정은 부작용의 징후를 보이지 않았다.

[0471] **실시예 10. 확정적 GLP 독성 연구: 생체내에서 예시적인 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 평가**

[0472] 3.5E11 또는 1E12 vg/눈의 단일 망막하 투여 후 1개월 및 6개월에 시노몰거스 마카크에서 엑손 편집 효율성 및 조사 안전성 평가와 관련하여 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 작제물 ABCA4-01(서열번호 90)(서열번호 78 포함)의 평가를 완료하였다.

[0473] 확정적 GLP 독성학 연구: 이 연구의 목표는 4E10에서 1E12vg/눈의 다양한 용량의 ABCA4-01을 단일 망막하 투여한 후 3개월 및 6개월에 시노몰거스 마카크에서 예시적인 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 ABCA4-01(서열번호 90)(서열번호 78 포함)의 망막하 내성을 평가하는 것이었다. 이 연구를 위해 선택된 용량은 3.5E11 또는 1E12 vg/눈이었다. 수컷과 암컷 NHP가 모두 등록되었고 망막하수포, OU 당 100㎕를 투여하였다. 본 연구는 각각의 AAV8-ABCA4 RNA 엑손 편집기 ABCA4-01(서열번호 90) 및 용량 수준 그룹에 대해 n=3 동물/시점, n=2 비히클 동물/시점에 대해 평가하도록 설계되었다.

[0474] 평가변수는 생전 및 부검 시 수집된 샘플 모두의 눈 및 전신 안전성 평가를 포함하였다. 일반 및 안구 건강에 대한 생전 평가를 다음과 같이 수행하였다: 자세한 관찰(주간), 체중(사전 검사, 제-1일 및 그 이후 주), 음식 소비(주간), 안과(사전 검사, 제1주 및 제5주 및 최종 부검 이전; 간접 검안경 검사 및 슬릿 램프 생체현미경), 안구 내압 측정(사전 검사, 제1주 및 제5주 및 최종 부검 이전), 공초점 레이저 검안경 검사(사전 검사, 제5주 및 최종 부검 이전), 광 간섭 단층촬영(사전 검사, 제5주 및 최종 부검 이전), 임상 병리학(혈액학, 응고, 임상 화학: 검사 전 2회, 투여 전 제1일, 제2일, 제8일, 제15일, 제22일, 제29일, 제35일, 제43일, 제50일, 제57일 및 그 이후 부검까지 매달).

[0475] 각 동물에 대해 한쪽 눈을 조직 병리학 검사에 사용하였다. 대측 눈을 절개하고 신경 망막 샘플과 RPE/맥락막 샘플을 급속 동결하였다. 망막의 치료 부위에 매핑된 신경 망막 샘플을 ABCA4-01 VGC 생물 분포, RNA 발현 및 엑손 편집 활동(RNA 대체%)에 대해 분석하였다. 신경 망막 샘플 가용성이 보류되는 동안(필요한 분석을 위해 충분한 DNA 및 RNA 추출이 확인된 후), 편집된 인간-NHP 키메라 ABCA4 단백질을 적격 IA-LC-MS/MS 분석으로 평가하였다.

[0476] 또한, VGC는 상기 기술된 조사 독성학 연구로부터 1개월 후 1E12 vg/눈 용량 그룹에서 ABCA4-01 VGC에 대해 양성인 조직에서만 평가하였다. 마찬가지로, ABCA4-01 RNA 발현을 ABCA4-01 VGC에 대해 양성인 조직에서 측정하였다.

[0477] 비임상 독성학 평가를 뒷받침하는 모든 표준 전신 조직(부신, 모든 총 병변, 대동맥, 골수, 뇌, 식도, 담낭, 심장(좌심실 벽), 신장, 대장, 측절상핵, 간, 폐, 장간막 림프절, 시교차, 시신경로, 췌장, 좌골신경, 골격근, 피부, 소장(공장), 척수, 비장, 위, 하악 림프절, 고환 또는 난소, 흉선 및 방광 포함)을 수집하여 고정하고 파라핀 블록에 포매하였다.

[0478] 모든 동물의 눈은 인증된 병리학자가 평가하였다. 조사 독성학 연구에서 ABCA4-01 VGC에 대해 양성으로 나타난 동일한 비안구 조직 유형을 슬라이드에 장착하고 H&E로 염색하여 평가하였다. 나머지 모든 샘플은 필요한 경우 향후 평가를 위해 보관하였다.

[0479] 위에 설명된 조사 및 확정적 GLP 연구에서는 다음과 같은 평가를 수행하였다: ABCA4-01 DNA 생체 분포 및 RNA 발현, 엑손 편집된 ABCA4 RNA 및 단백질, 임상 병리학(화학, 혈액학, 응고), 생전 안구 측정(슬릿 램프, 광 간섭 단층 촬영(OCT)/cSLO, 안압) 및 조직병리학. 모든 면역 반응 위험에 대해 조사 및 GLP 독성학 연구 모두에서 항-AAV8 중화 항체를 기준선 및 투여 후 혈청에서 측정하였다. 또한 GLP 연구에서 기준선, 생전 및 말단 순환 사이토카인 및 보체를 평가하고 ABCA4-01 DNA 생체 분포가 확인된 모든 조직에서 조직병리학 평가를 수행하였다. 이 연구의 결과는 ABCA4-01로 치료하는 것이 안전하며 어떠한 부작용과도 관련이 없음을 나타낸다.

[0480] 상기에 더하여, 도 30A 내지 도 30C는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물(ABCA4-01; 서열번호 90)로 치료한 후 6개월(6) 후에 NHP에서 강력한 ABCA4 RNA 및 단백질 대체를 입증하는 결과를 제시한다. 바이러스 게놈 카피(VGC)(x축) 및 엑손 편집기 RNA 카피 수(y축)를 도 30A에 나타낸다. ABCA4 RNA 대체%는 도 30B에 나타낸다. ABCA4 단백질 대체는 도 30C에 ABCA4-01로 치료한 후 6개월 후에 시노몰거스 동물(n = 3)에 대해 나타낸다(3.5E11 vg/눈의 예시적인 용량에 대한 결과가 표시됨). DNA 및 RNA 수준은 Droplet Digital Polymerase Chain Reaction(ddPCR) 기반 검정을 사용하여 평가하였다. 총 단백질 비율(편집된 ABCA4를 편집된 단백질과 NHP 천연 단백질의 합에 대한 비율)은 IA-MS(qualified immuno-affinity mass spectrometry) 분석을 사용하여 정량화하

였다. 이러한 생체내 연구에 사용된 대표적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물은 서열번호 90을 포함하는 RNA 엑손 편집기를 포함한다. 4개의 NHP에 대한 결과를 나타내고, (B)와 (C)에 1 내지 4로 표시하였다: 1(비히클 처리); 2 내지 4(3.5E11vg/눈으로 처리).

[0481] 간단히 말해서, 본 발명자들은 야생형 시노몰거스 마카크에게 ABCA4-01(3.5E11 vg/눈)의 단일 망막하 용량을 처리하였다. 그런 다음 6개월 시점에서 AAV 벡터 게놈 DNA 카피(VGC) 생체 분포, 엑손 에디터 RNA 발현 및 편집된 ABCA4 RNA 및 단백질의 백분율을 평가했다. 엑손 에디터 RNA 발현은 VGC와 양호한 상관관계가 있었고(도 30A) 강력한 RNA 대체%(천연 ABCA4 RNA 카피를 편집된 카피로 변환)를 초래했으며, 신경 망막 샘플에 존재하는 총(편집된 + 천연) ABCA4 RNA 집단에서 편집된 ABCA4 RNA의 백분율로 계산되었다(도 30B). 도 30B에 표시된 대로, RNA 대체 백분율은 이 ABCA4-01 용량에 대해 약 40% 내지 60% 범위였다. 이는 적격 IA-MS 분석(도 30C)으로 측정한 결과 생성된 인간-NHP 키메라 ABCA4 단백질의 치료 수준을 초래하였다. 보다 구체적으로, 이러한 동물에서 ABCA4 RNA 편집으로 인해 생성된 인간 NHP 키메라 ABCA4 단백질은 시험된 샘플에서 총(인간-NHP + NHP) ABCA4 단백질의 20 내지 40%로 존재하는 것으로 밝혀졌다. 본 발명자들은 또한 단일 망막하 주사를 통해 전달된 고용량 ABCA4-01로 처리된 야생형 시노몰거스 마카크에서 최대 66%의 RNA 대체 및 최대 45%의 인간/NHP 키메라 ABCA4 단백질을 입증하였다. 이러한 결과는 ABCA4-01이 NHP에서 편집된 ABCA4 단백질 발현의 치료적으로 관련성 있는 수준을 달성한다는 것을 나타내며, 이 수준은 이전에 Abca4 KO 마우스 모델에서 치료적 이점을 제공하는 것으로 나타난 구제된 ABCA4 단백질 수준을 초과한다.

[0482] **실시예 11: RNA 엑손 편집기 서열번호 78을 포함하는 AAV 벡터 플라스미드**

[0483] ABCA4-01을 암호화하는 플라스미드(서열번호 82)는 AAV2 ITR(서열번호 90)가 측접한 RNA 엑손 편집기(서열번호 78)를 포함하는 13,232개 염기쌍(bp) AAV 벡터 플라스미드이다. 플라스미드 골격은 카나마이신 저항성(KanR) 유전자, 박테리아 복제 기점 및 옵신 1 인트론 1에서 유래된 두 개의 비암호 영역을 포함한다. 이러한 후자의 서열은 '스터퍼' 서열로 설명되며 AAV에 대한 패키징 한계를 넘어 플라스미드의 크기를 증가시키고 따라서 가능한 캡슐화된 플라스미드 DNA 골격 구성 요소의 수준을 줄이도록 설계되었다. AAV 벡터 플라스미드의 개략적 표현을 도 23에 나타내었으며, 이에 대한 추가 세부 사항은 표 5에 제시되어 있다.

표 5

서열번호 82를 포함하는 AAV 벡터 플라스미드 내의 유전 요소

특징	플라스미드 내의 위치	길이(bp)
KanR	810-1	810
스터퍼: 인간 옵신 1 인트론 1(제 2 절반부)	1185-4127	2943
5' AAV2 ITR	4284-4413	130
CMV 극초기 인핸서	4486-4789	304
CMV 극초기 프로모터	4790-4993	204
ABCA4 5' UTR	4994-5099	106
ABCA4 암호 서열 (CDS) 엑손 1 내지 22	5100-8427	3328
스플라이스 공여체(SD)	8428-8433	6
이중 정지 코돈	8433-8438	6
40량체 링커	8439-8478	40
3xU1 부위	8479-8549	71
GM-CSF ARE	8550-8595	46
결합 도메인(BD)	8596-8745	150
MALAT1 삼중 나선 종결인자	8746-8847	102
항-Mut1_mascRNA	8848-8905	58
3' AAV2 ITR	8944-9073	130
Stuffer: 인간 옵신 1 인트론 1(제 1 절반부)	9091-12040	2950
Ori	12467-13055	589

[0484]

[0485] **실시예 12. 생체외에서 예시적인 ABCA4 트랜스-스플라이싱 분자의 평가**

[0486] 인간 광수용체에서 ABCA4 엑손 편집을 평가하기 위해, 본 발명자들은 인간 공여자 망막 이식편을 서열번호 90을 포함하는 예시적인 AAV8 RNA 엑손 편집기 작제물인 ABCA4-01로 처리하였다. 본 발명자들은 다수의 공여자로부터

얻은 이식편을 ABCA4-01(3.9E11 vg)과 함께 21일 동안 인큐베이션시키면 내인성 엑손 1 내지 22가 ABCA4-01에 의해 암호화된 동일한 해당 엑손으로 약 20 내지 30RNA 대체%되는 것을 발견하였다(도 31). 본 실험에서 공여자 이식편은 이전에 진단된 망막 질환이 없는 개체로부터 얻었다. 주목할 점은 동일한 로트의 ABCA4-01이 위에서 언급한 조사적 NHP 연구에서도 사용되었다는 것이다(도 30). 이는 NHP에서 인간 대상체에게 ABCA4-01 결과가 전달될 수 있다는 본 발명자들의 확신을 더욱 강화하였다.

[0487] **실시예 13. 엑손-편집된 ABCA4 mRNA의 서열 확인**

[0488] 엑손 편집에서 생성된 ABCA4 성숙 mRNA가 정확한 트랜스-스플라이싱 반응, 정확한 엑손 22-엑손 23 접합부에서 발생할 것으로 예측되는 서열을 가지고 있는지 확인하기 위해, 본 발명자들은 ABCA4-01 엑손 편집기를 암호화하는 서열번호 78을 포함하는 플라스미드로 일시적으로 형질주입된 ABCA4 KO 세포에서 편집된 ABCA4 RT PCR 생성물을 단리시키고 서열분석하였다. 간략하면, 전체 길이의 엑손 편집된 mRNA의 확인은 형질주입된 ABCA4 KO 세포에서 분리된 RNA에 대한 RT-PCR을 통해 달성한 다음 TOPO 클로닝 및 서열분석을 수행하였다. 생어 서열분석은 무작위로 선택된 여러 클론에서 올바른 성숙 mRNA 서열을 확인하였다. 이러한 서열분석 결과는 올바른 엑손 22-엑손 23 접합을 확인하는 것 외에도 전체 길이의 엑손 편집된 ABCA4 성숙 mRNA 분자가 엑손 1 내지 22에 걸친 엑손 편집기 유래 CDS와 엑손 23 내지 50에 걸친 내인성 서열을 포함하여 전체 길이에 걸쳐 예상되는 서열을 가지고 있음을 확인하였다. 이러한 결과는 ACDN-01 처리로 매개된 ABCA4 엑손 편집이 의도한 올바른 ABCA4 성숙 mRNA 서열을 생성한다는 추가적인 확신을 제공한다.

[0489] **넘버링된 실시형태 I**

[0490] 1. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0491] (a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

[0492] (b) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인; 및

[0493] (c) 선택적으로, ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(CDS);

[0494] (d) 선택적으로, 스플라이싱 도메인;

[0495] (e) 선택적으로, GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 GGTAAGT 또는 서열번호 61과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 중 적어도 하나를 포함하는 증진제;

[0496] 및

[0497] (f) 선택적으로, 서열번호 63으로 이루어진 서열 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 번역 증진제,

[0498] 를 포함하되, CDS; 존재하는 경우 스플라이싱 도메인; 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0499] 2. 실시형태 1에 있어서, 결합 도메인은 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론에 어닐링된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0500] 3. 실시형태 2에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론은 인트론 22인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0501] 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0502] 5. 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0503] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, 결합 도메인은 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루

어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0504] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 CDS는 ABCA4 엑손 1 내지 22 또는 이의 변이체를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0505] 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, CDS는 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0506] 9. 실시형태 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서,

[0507] (a) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0508] (b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

[0509] (c) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0510] (d) 선택적으로, 서열번호 4, 6, 8 또는 10 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 스플라이싱 도메인;

[0511] (e) 선택적으로, 5' 미번역 영역;

[0512] (f) 선택적으로, 3' 전사 종결인자 도메인; 및

[0513] (g) 선택적으로, 스플라이싱 도메인의 3'에 작동적으로 연결된 적어도 하나의 정지 코돈

[0514] 을 포함하되, 존재하는 경우 5' 미번역 영역; CDS; 존재하는 경우 스플라이싱 도메인; 존재하는 경우 적어도 하나의 정지 코돈; 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 결합 도메인; 및 존재하는 경우 3' 전사 종결인자 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0515] 10. 실시형태 9에 있어서, 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하되, 3개의 서열 각각은GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 GGTAAGT 또는 서열번호 61과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0516] 11. 실시형태 9 또는 10에 있어서, 증진제는 서열번호 62 또는 서열번호 62와 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0517] 12. 실시형태 9 내지 11 중 어느 하나에 있어서, 스플라이싱 도메인은 서열번호 4(GTAAGT)를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0518] 13. 실시형태 9 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0519] 14. 실시형태 9 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 트랜스-스플라이싱 분자의 3' 단부를 캡핑하는 삼중 나선 구조를 형성하는 리보핵산을 암호화하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0520] 15. 실시형태 9 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 33 또는 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0521] 16. 실시형태 15에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66과 적어도 80% 동일성; 서열번호 66과 적어도 85% 동일성; 서열번호 66과 적어도 90% 동일성; 서열번호 66과 적어도 91% 동일성; 서열번호 66과 적어도 92% 동일성; 서열번호 66과 적어도 93% 동일성; 서열번호 66과 적어도 94% 동일성; 서열번호 66과 적어도 95% 동일성; 서열번호 66과 적어도 96% 동일성; 서열번호 66과 적어도 97% 동일성; 서열번호 66과 적어도 98% 동일성; 서열번호 66과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 66과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜

스-스플라이싱 분자.

[0522] 17. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 하기를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자:

[0523] (a) 5' 미번역 영역;

[0524] (b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0525] (c) 스플라이싱 도메인;

[0526] (d) 적어도 하나의 정지 코돈;

[0527] (e) 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

[0528] (f) 적어도 하나의 증진제;

[0529] (g) 번역 증진제;

[0530] (h) 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0531] (i) 3' 전사 종결인자 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0532] 18. 실시형태 17에 있어서,

[0533] (a) 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0534] (b) 스플라이싱 도메인은 서열번호 4(GTAAGT)를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0535] (c) 적어도 하나의 정지 코돈은 2개의 정지 코돈을 포함하되, 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고, 2개의 정지 코돈과 조합된 스플라이싱 도메인의 서열은 서열번호 68을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0536] (d) 적어도 하나의 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 이들의 임의의 조합물을 포함하고;

[0537] (e) 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0538] (f) 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0539] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, CDS는 서열번호 56을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0540] 20. 실시형태 18 또는 실시형태 19에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 69, 서열번호 78 또는 서열번호 90을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0541] 21. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 70 또는 서열번호 71을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0542] 22. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 40 내지 44, 46 또는 48 내지 50 중 어느 하나와 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0543] 23. 실시형태 1 내지 22 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로부터 전사된 리보핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0544] 24. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0545] (a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

[0546] (b) 선택적으로, GGTAAGT 또는 61 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0547] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제를 포함

하되, 링커 도메인, 존재하는 경우, 증진제 및 존재하는 경우, 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0548] 25. 실시형태 24에 있어서, 존재하는 경우 증진제는 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0549] 26. 실시형태 24 또는 25에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0550] 링커 도메인; 존재하는 경우, 증진제; 존재하는 경우, 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0551] 27. 실시형태 26에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0552] CDS; 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0553] 28. 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0554] (a) GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 GGTAAGT 또는 서열번호 61과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 중 적어도 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0555] (b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

[0556] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

[0557] 를 포함하되, 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 및 존재하는 경우 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0558] 29. 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0559] (a) 서열번호 62 또는 서열번호 62와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0560] (b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

[0561] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

[0562] 를 포함하되, 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 및 존재하는 경우 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0563] 30. 실시형태 28 또는 실시형태 29에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0564] 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 존재하는 경우, 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0565] 31. 실시형태 28 내지 30 중 어느 하나에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0566] CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자,

[0567] 32. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0568] (a) 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제; 및

[0569] (b) 선택적으로, GGTAAGT 또는 61 또는 이들의 임의의 조합물 중 적어도 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0570] (c) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인을 포함하되; 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 및 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0571] 33. 실시형태 32에 있어서, 존재하는 경우 증진제는 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0572] 34. 실시형태 32 또는 실시형태 33에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0573] 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0574] 35. 실시형태 32 내지 34 중 어느 하나에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0575] CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0576] 36. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0577] 링커 도메인 및 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 카세트는 서열번호 72를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0578] 37. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0579] 링커 도메인, 증진제 및 번역 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 카세트는 서열번호 73을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0580] 38. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0581] (a) 서열번호 66 또는 서열번호 66과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0582] 39. 실시형태 38에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66과 적어도 96% 동일성; 서열번호 66과 적어도 97% 동일성; 서열번호 66과 적어도 98% 동일성; 서열번호 66과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 66과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0583] 40. 실시형태 38 또는 실시형태 39에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0584] **넘버링된 실시형태 II**

[0585] 1. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0586] (a) ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(CDS);

[0587] (b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 링커 도메인; 및

[0588] (c) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인

[0589] 을 포함하되, CDS, 링커 도메인 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0590] 2. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0591] (a) 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS로서, 서열번호 53 내지 55 중 어느 하나의 변이체는 표 3에 열거된 적어도 하나의 크립틱 스플라이스 부위 내에 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하고, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 포함하는 적어도 하나의 크립틱 스플라이스 부위 각각에서 크립틱 스플라이스 부위 사용을 감소시키는, CDS; 및

[0592] (b) 선택적으로, 링커 도메인; 및

[0593] (c) 선택적으로, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인

[0594] 을 포함하되, CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

[0595] 3. 실시형태 2에 있어서, 서열번호 55의 변이체는 서열번호 56 내지 59 중 어느 하나를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0596] 4. 실시형태 3에 있어서, 서열번호 55의 변이체는 서열번호 56을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0597] 5. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 링커 도메인은 서열번호 27과 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0598] 6. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 링커 도메인은 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0599] 7. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 결합 도메인은 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론에 어닐링된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0600] 8. 실시형태 7에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론은 인트론 22인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0601] 9. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0602] 10. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 결합 도메인은 서열번호 18 또는 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0603] 11. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 존재하는 경우 결합 도메인은 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나, 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0604] 12. 실시형태 1 또는 5 내지 11 중 어느 하나에 있어서, CDS는 ABCA4 엑손 1 내지 22 또는 이의 변이체를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0605] 13. 실시형태 12에 있어서, CDS는 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0606] 14. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0607] (a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

[0608] (b) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0609] (c) 선택적으로, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS

[0610] 를 포함하되; 존재하는 경우 CDS, 링커 도메인 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0611] 15. 실시형태 14에 있어서, 존재하는 경우 CDS는 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0612] 16. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0613] (a) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0614] (b) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

[0615] (c) 선택적으로, 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 결합 도메인

[0616] 을 포함하되, CDS; 링커 도메인; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0617] 17. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는 적어도 하나의 서열을 포함하는 증진제를 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0618] 18. 실시형태 17에 있어서, 증진제는 링커 도메인에 작동 가능하게 연결된 3'인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0619] 19. 실시형태 17 또는 18에 있어서, 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0620] 20. 실시형태 17 내지 19 중 어느 하나에 있어서, 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하되, 3개의 서열은 서열번호 62를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0621] 21. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 번역 증진제를 추가로 포함하되, 번역 증진제는 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하며, 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열은 증진제의 3'에 작동 가능하게 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0622] 22. 실시형태 21에 있어서, 번역 증진제는 서열번호 63과 적어도 91% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 92% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 93% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 94% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 95% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 96% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 97% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 98% 동일성을 갖거나, 서열번호 63과 적어도 99% 동일성을 갖는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0623] 23. 실시형태 21 또는 22에 있어서, 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0624] 24. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, GTAAGT, GTAAGG, GTAAGC 또는 GTAACT 중 어느 하나를 포함하는 스플라이싱 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0625] 25. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 스플라이싱 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0626] 26. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 5' 미번역 영역을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0627] 27. 실시형태 26에 있어서, 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0628] 28. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0629] 29. 실시형태 28에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 트랜스-스플라이싱 분자의 3' 단부를 보호하는 삼중 나선 구조를 형성하는 리보핵산을 암호화하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0630] 30. 실시형태 28 또는 실시형태 29에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 야생형 MALAT1 서열(서열번호 33) 또는 서열번호 33과 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0631] 31. 실시형태 30항에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 33과 적어도 80% 동일성; 서열번호 33과 적어도 85% 동일성; 과 적어도 90% 동일성 서열번호 33; 서열번호 33과 적어도 91% 동일성; 서열번호 33과 적어도 92% 동일성; 서열번호 33과 적어도 93% 동일성; 서열번호 33과 적어도 94% 동일성; 서열번호 33과 적어도 95% 동일성; 서열번호 33과 적어도 96% 동일성; 서열번호 33과 적어도 97% 동일성; 서열번호 33과 적어도 98% 동일성; 서열번호 33과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 33과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0632] 32. 실시형태 28 또는 실시형태 29에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 33 또는 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0633] 33. 선행하는 실시형태 중 어느 하나에 있어서, 스플라이싱 도메인의 3'에 작동적으로 연결된 적어도 하나의 정지 코돈을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0634] 34. 실시형태 33에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 하기를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자:

[0635] (a) 5' 미번역 영역;

[0636] (b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0637] (c) 스플라이싱 도메인;

[0638] (d) 적어도 하나의 정지 코돈;

[0639] (e) 서열번호 27로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

[0640] (f) 적어도 하나의 증진제;

[0641] (g) 번역 증진제;

[0642] (h) 서열번호 18 또는 서열번호 20으로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0643] (i) 3' 전사 종결인자 도메인.

[0644] 35. 실시형태 34에 있어서,

[0645] (a) 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0646] (b) 스플라이싱 도메인은 GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0647] (c) 적어도 하나의 정지 코돈이 존재하고, 이것은 2개의 정지 코돈을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어되, 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고;

[0648] (d) 적어도 하나의 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하고;

[0649] (e) 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고; 그리고

[0650] (f) 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

[0651] 36. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0652] (a) 5' 미번역 영역;

[0653] (b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0654] (c) 스플라이싱 도메인;

[0655] (d) 선택적으로, 적어도 하나의 정지 코돈;

[0656] (e) 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

[0657] (f) 적어도 하나의 증진제;

[0658] (g) 번역 증진제;

[0659] (h) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0660] (i) 3' 전사 종결인자 도메인

[0661] 을 포함하되, 5' 미번역 영역; CDS; 스플라이싱 도메인; 존재하는 경우, 적어도 하나의 정지 코돈; 링커 도메인; 적어도 하나의 증진제; 번역 증진제; 결합 도메인; 및 3' 전사 종결인자 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

[0662] 37. 실시형태 36에 있어서,

[0663] (a) 5' 미번역 영역은 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0664] (b) 스플라이싱 도메인은 GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0665] (c) 적어도 하나의 정지 코돈이 존재하고, 이것은 2개의 정지 코돈을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어되, 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고;

[0666] (d) 적어도 하나의 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지되, 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하고;

[0667] (e) 번역 증진제는 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어지고;

[0668] (f) 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

[0669] 38. 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 하기를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이상 분자:

[0670] (a) 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 5' 미번역 영역;

[0671] (b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 CDS;

[0672] (c) GTAAGT를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 스플라이싱 도메인;

[0673] (d) 2개의 정지 코돈으로서, 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고, 2개의 정지 코돈과 조합된 스플라이싱 도메인의 서열은 서열번호 68을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 2개의 정지 코돈;

[0674] (e) 서열번호 27을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 링커 도메인;

[0675] (f) 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제;

[0676] (g) 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제;

[0677] (h) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나 이로 이루어진 결합 도메인; 및

[0678] (i) 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인.

[0679] 39. 실시형태 37 또는 실시형태 38에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 69, 서열번호 78 또는 서열번호 90을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0680] 40. 실시형태 1 내지 20 중 어느 하나에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 70 또는 서열번호 71을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0681] 41. 실시형태 1 내지 12 중 어느 하나에 있어서, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는 서열번호 40 내지 44, 46 또는 48 내지 50 중 어느 하나와 적어도 80% 동일성을 갖는 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0682] 42. 실시형태 1 내지 41 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로부터 전사된 리보핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0683] 43. 실시형태 1 내지 41 중 어느 하나에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA는 ABCA4-연관 망막 이영양증과 연관된 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0684] 44. 실시형태 43에 있어서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 열성 유전되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0685] 45. 실시형태 43 또는 실시형태 44에 있어서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 있는 대립유전자 병원성 돌연변이 및 원뿔세포 막대세포 이영양증(예를 들어, 원뿔세포 막대세포 이영양증-3), 스타르가르트 황반이영양증(예를 들어, 스타르가르트병-1), 황반 안저, 망막색소변성증-19또는 노인성 황반변성-2와 일치하는 표현형과 연관되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0686] 46. 실시형태 1 내지 45 중 어느 하나에 있어서, 적어도 하나의 돌연변이를 포함하는 내인성 ABCA4 프리-mRNA는

광수용체 세포 또는 망막 색소 상피 세포에서 발현되는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0687] 47. 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는, 벡터.

[0688] 48. 실시형태 47에 있어서, CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함하는, 벡터.

[0689] 49. 실시형태 48에 있어서, 5' 조절 도메인은 5' 미번역 영역에 작동적으로 연결된, 벡터.

[0690] 50. 실시형태 48 또는 49에 있어서, 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터 또는 조직 특이적 프로모터를 포함하는, 벡터.

[0691] 51. 실시형태 50에 있어서, 구성적 프로모터는 CMV 프로모터인, 벡터.

[0692] 52. 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는, 프로바이러스 플라스미드.

[0693] 53. 아데노 연관 바이러스로서, 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하되, AAV는 핵산 트랜스-스플라이싱 분자의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 선택적으로 포함하는, AAV.

[0694] 54. 실시형태 53에 있어서, CDS의 5'에 작동적으로 연결된 5' 조절 도메인을 포함하는, AAV.

[0695] 55. 실시형태 53 또는 54에 있어서, 5' 조절 도메인은 5' 미번역 영역에 작동적으로 연결된, AAV.

[0696] 56. 실시형태 53 내지 55 중 어느 하나에 있어서, 5' 조절 도메인은 구성적 프로모터를 포함하는, AAV.

[0697] 57. 실시형태 56에 있어서, 구성적 프로모터는 CMV 프로모터인, AAV.

[0698] 58. 실시형태 53 내지 57 중 어느 하나에 있어서, 광수용체 세포 및/또는 망막 색소 상피 세포를 우선적으로 표적으로 하는, AAV.

[0699] 59. 실시형태 53 내지 58 중 어느 하나에 있어서, AAV8, AAV5 또는 AAV2인, AAV.

[0700] 60. 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드 또는 실시형태 53 내지 59 중 어느 하나의 AAV를 포함하는, 조성물.

[0701] 61. 실시형태 60에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 조성물.

[0702] 62. 표적 세포에서 생물학적으로 활성인 ABCA4를 발현시켜 표적 세포에서 ABCA4 단백질의 기능 수준을 회복시키는 방법으로서, 표적 세포에 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 하나의 AAV 또는 실시형태 60 또는 61의 조성물을 형질도입시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0703] 63. 실시형태 62에 있어서, 표적 세포의 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 5%, 적어도 10% 또는 적어도 15%가 대체되는, 방법.

[0704] 64. 실시형태 63에 있어서, 표적 세포의 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 20%가 대체되는, 방법.

[0705] 65. 실시형태 64에 있어서, 표적 세포의 표적 ABCA4 mRNA의 적어도 35%가 대체되는, 방법.

[0706] 66. 실시형태 62 내지 65 중 어느 하나에 있어서, ABCA4의 기능 수준은 생물학적 기능을 갖는 전장 ABCA4 단백질을 발현시킴으로써 표적 세포에서 회복되는, 방법.

[0707] 67. 대상체에서 ABCA4-연관 리포푸신 및/또는 A2E 축적을 감소시키는 방법으로서, 대상체의 표적 망막 세포에 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 하나의 AAV 또는 실시형태 60 또는 61의 조성물을 형질주입 또는 형질도입시키는 단계를 포함하는, 방법.

[0708] 68. 대상체의 표적 세포에서 ABCA4 엑손 서열의 적어도 하나의 돌연변이를 교정하는 방법으로서, 대상체에게 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 하나의 AAV 또는 실시형태 60 또는 61의 조성물을 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0709] 69. ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 ABCA4-연관 망막 이영양증을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중

어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 어느 하나의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0710] 70. 실시형태 67 내지 69 중 어느 하나에 있어서, 대상체에게 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 어느 하나의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물을 망막하 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0711] 71. 실시형태 67 내지 70 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 비인간 영장류 또는 인간인, 방법.

[0712] 72. 실시형태 67 내지 71 중 어느 하나에 있어서, 대상체는 ABCA4-연관 망막 이영양증으로 진단된, 방법.

[0713] 73. ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 망막 이영양증의 치료에 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 어느 하나의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물.

[0714] 74. ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 망막 이영양증의 치료를 위한 의약의 제조에 사용하기 위한, 실시형태 1 내지 46 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자, 실시형태 47 내지 51 중 어느 하나의 벡터, 실시형태 52의 프로바이러스 플라스미드, 실시형태 53 내지 59 중 어느 하나의 AAV 또는 제60항 또는 제61항의 조성물.

[0715] 75. 실시형태 67 내지 72 중 어느 하나의 방법 또는 실시형태 73 또는 실시형태 74의 용도로서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 ABCA4 유전자의 엑손 1 내지 22에 걸쳐 있는 대립유전자 병원성 돌연변이 및 원뿔세포 막대세포 이영양증, 스타르가르트 황반이영양증 또는 황반 안저와 일치하는 표현형과 연관되는, 방법 또는 용도.

[0716] 76. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0717] (a) 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인; 및

[0718] (b) 선택적으로, 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0719] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제를 포함하되, 링커 도메인, 존재하는 경우, 증진제 및 존재하는 경우, 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0720] 77. 실시형태 76에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0721] 링커 도메인; 존재하는 경우, 증진제; 존재하는 경우, 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0722] 78. 실시형태 76 또는 실시형태 77에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0723] CDS; 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0724] 79. 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0725] (a) GGTAAGT 또는 서열번호 61 또는 GGTAAGT 또는 서열번호 61과 적어도 90% 동일성, 적어도 91% 동일성, 적어도 92% 동일성, 적어도 93% 동일성, 적어도 94% 동일성, 적어도 95% 동일성, 적어도 96% 동일성, 적어도 97% 동일성, 적어도 98% 동일성 또는 적어도 99% 동일성을 갖는 서열 중 적어도 하나를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0726] (b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

[0727] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

[0728] 를 포함하되, 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 및 존재하는 경우 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0729] 80. 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0730] (a) 서열번호 62 또는 서열번호 62와 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0731] (b) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인;

[0732] (c) 선택적으로, 서열번호 63을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제

[0733] 를 포함하되, 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 및 존재하는 경우 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 5' 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0734] 81. 실시형태 79 또는 실시형태 80에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0735] 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 존재하는 경우, 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0736] 82. 실시형태 79 내지 81 중 어느 하나에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0737] CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 증진제; 존재하는 경우 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0738] 83. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0739] (a) 서열번호 63 또는 서열번호 63과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 번역 증진제;

[0740] (b) 선택적으로, 서열번호 62를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 증진제; 및

[0741] (c) 선택적으로, 서열번호 27 또는 서열번호 27과 적어도 90% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 링커 도메인을 포함하되; 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 및 번역 증진제는 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0742] 84. 실시형태 83에 있어서, 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위에 어닐링된 결합 도메인을 추가로 포함하되,

[0743] 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 번역 증진제; 및 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0744] 85. 실시형태 83 또는 실시형태 84에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0745] CDS; 존재하는 경우 링커 도메인; 존재하는 경우 증진제; 번역 증진제; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0746] 86. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0747] 링커 도메인 및 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 카세트는 서열번호 72를 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0748] 87. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0749] 링커 도메인, 증진제 및 번역 증진제를 포함하는 카세트를 포함하되, 카세트는 서열번호 73을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0750] 88. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0751] (a) 서열번호 66 또는 서열번호 66과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0752] 89. 실시형태 88에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66과 적어도 96% 동일성; 서열번호 66과 적어도 97% 동일성; 서열번호 66과 적어도 98% 동일성; 서열번호 66과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 66과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0753] 90. 실시형태 88 또는 실시형태 89에 있어서, 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0754] 91. 청구항 89 또는 청구항 90에 있어서, ABCA4 엑손을 포함하는 CDS를 추가로 포함하되,

[0755] CDS; 카세트; 및 존재하는 경우 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0756] 92. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0757] (a) 서열번호 66 또는 서열번호 66과 적어도 95% 동일성을 갖는 서열을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진 3' 전사 종결인자 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0758] 93. 청구항 92에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66과 적어도 96% 동일성; 서열번호 66과 적어도 97% 동일성; 서열번호 66과 적어도 98% 동일성; 서열번호 66과 적어도 99% 동일성을 갖거나; 서열번호 66과 100% 동일한 핵산 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0759] 94. 청구항 92 또는 청구항 93에 있어서, 상기 3' 전사 종결인자 도메인은 서열번호 66을 포함하거나, 이로 본질적으로 이루어지거나, 이로 이루어진, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0760] **넘버링된 실시형태 III**

[0761] 1. 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로서,

[0762] (a) 크립틱 스플라이스 부위의 야생형 ABCA4 서열에 비해서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이체를 갖는 ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(CDS); 및

[0763] (b) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위와 상보적인 결합 도메인을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0764] 2. 실시형태 1에 있어서, 크립틱 스플라이스 부위는 표 3에 열거된 크립틱 스플라이스 부위인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0765] 3. 실시형태 1 또는 2에 있어서, 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이는 크립틱 스플라이스 부위에서 스플라이싱을 감소시키거나 제거하는 동의어 돌연변이인, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0766] 4. 실시형태 1 내지 3 중 어느 하나에 있어서, CDS는 서열번호 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 127, 129, 131, 673, 674, 679, 682, 685, 693, 695, 698, 701,708,721, 722, 737, 758, 763, 764, 765, 775, 785, 789, 791, 798, 799, 792, 818, 820, 822, 825, 831, 837, 854, 859, 873, 881, 886, 888, 891, 903, 904, 910, 918, 924, 932, 938, 940, 945, 946, 950, 951, 952, 968, 976, 992, 993, 995, 997, 998, 999, 1003, 1004, 1010, 1015, 1026, 1031, 1040, 1047, 1070, 1117 또는 1169 중 하나 이상을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0767] 5. 실시형태 1 내지 4 중 어느 하나에 있어서, CDS는 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이를 갖는 ABCA4의 엑손 1 내지 22를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0768] 6. 실시형태 1 내지 5 중 어느 하나에 있어서, CDS는 서열번호 56-59 중 어느 하나를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0769] 7. 실시형태 1 내지 6 중 어느 하나에 있어서, CDS는 서열번호 56을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0770] 8. 실시형태 1 내지 7 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 27과 적어도 85% 동일성을 갖는 서열을 포함하는 링커 도메인을 추가로 포함하되, 상기 CDS, 상기 링커 도메인 및 상기 결합 도메인은 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0771] 9. 실시형태 1 내지 8 중 어느 하나에 있어서, 결합 도메인은 상기 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 인트론 22 내의 서열에 어닐링된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0772] 10. 실시형태 1 내지 9 중 어느 하나에 있어서, 상기 결합 도메인은 서열번호 18 또는 20을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0773] 11. 실시형태 1 내지 10 중 어느 하나에 있어서, GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는 적어도 하나의 서열을

포함하는 증진제를 추가로 포함하되, 증진제는 상기 링커 도메인의 3'에 작동 가능하게 연결된, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0774] 12. 실시형태 11에 있어서, 상기 증진제는 탠덤으로 배열된 3개의 서열을 포함하되, 상기 3개의 서열 각각은 GGTAAGT 또는 서열번호 61을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0775] 13. 실시형태 12에 있어서, 상기 증진제는 탠덤으로 배열과 작동 가능하게 연결된 3개의 서열을 포함하되, 3개의 서열은 서열번호 62를 함께 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0776] 14. 실시형태 1 내지 13 중 어느 하나에 있어서, 번역 증진제를 추가로 포함하된, 번역 증진제는 증진제의 3'에 작동 가능하게 연결된 서열번호 63과 적어도 85% 동일성을 갖는 서열을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0777] 15. 실시형태 1 내지 14 중 어느 하나에 있어서, 서열 GTAAGT를 포함하는 스플라이싱 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0778] 16. 실시형태 1 내지 15 중 어느 하나에 있어서, 5' 미번역 영역을 추가로 포 함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0779] 17. 실시형태 1 내지 16 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 33 또는 서열번호 66과 적어도 85% 동일성을 갖는 MALAT1 서열을 포함하는 3' 전사 종결인자 도메인을 추가로 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자

[0780] 18. 실시형태 1 내지 17 중 어느 하나에 있어서, 5'에서 3' 방향으로 작동적으로 연결된, 하기를 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이상 분자:

[0781] (a) 서열번호 13 또는 서열번호 64를 포함하는 5' 미번역 영역;

[0782] (b) 서열번호 53 내지 59 중 어느 하나를 포함하는 CDS;

[0783] (c) 서열 GTAAGT를 포함하는 스플라이싱 도메인;

[0784] (d) 2개의 정지 코돈으로서, 상기 2개의 정지 코돈 중 첫번째 정지 코돈의 서열은 상기 스플라이싱 도메인 서열과 부분적으로 중첩되고, 상기 2개의 정지 코돈과 조합된 상기 스플라이싱 도메인의 서열은 서열번호 68(GTAAGTAGTGA)을 포함하는, 2개의 정지 코돈;

[0785] (e) 서열번호 27을 포함하는 링커 도메인;

[0786] (f) 서열번호 62를 포함하는 증진제;

[0787] (g) 서열번호 63을 포함하는 번역 증진제;

[0788] (h) 서열번호 18 또는 서열번호 20을 포함하는 결합 도메인; 및

[0789] (i) 서열번호 66을 포함하는 3' 전사 종결인자 도메인.

[0790] 19. 실시형태 1 내지 18 중 어느 하나에 있어서, 서열번호 69, 서열번호 78 또는 서열번호 90을 포함하는, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0791] 20. 실시형태 19의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자로부터 전사된 리보핵산 트랜스-스플라이싱 분자.

[0792] 21. 실시형태 1 내지 19 중 어느 하나의 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 포함하는 벡터 또는 아데노 연관 바이러스(AAV).

[0793] 22. 실시형태 21에 있어서, 벡터는 서열번호 82를 포함하는, 벡터.

[0794] 23. 실시형태 21 또는 22에 있어서, 광수용체 세포 및/또는 망막 색소 상피 세포를 우선적으로 표적으로 하는, AAV.

[0795] 24. 실시형태 23에 있어서, AAV8, AAV5 또는 AAV2인, AAV.

[0796] 25. 실시형태 21 내지 24 중 어느 하나의 벡터 또는 AAV 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는, 약제학적 조성물.

[0797] 26. ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 망막 이영양증을 치료하는 방법으로서,

상기 대상체에게 실시형태 25의 조성물을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

[0798] 27. 표적 세포에서 생물학적으로 활성인 ABCA4를 발현시키는 방법으로서, 표적 세포에 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 형질주입 또는 형질도입하는 단계를 포함하되, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는

[0799] (a) 크립틱 스플라이스 부위의 야생형 ABCA4 서열에 비해서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이체를 갖는 ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(CDS); 및

[0800] (b) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위와 상보적인 결합 도메인을 포함하는, 방법.

[0801] 28. 실시형태 27에 있어서, CDS는 서열번호 92, 94, 96, 98, 100, 102, 104, 106, 108, 110, 112, 114, 116, 118, 120, 122, 124, 127, 129, 131, 673, 674, 679, 682, 685, 693, 695, 698, 701,708,721, 722, 737, 758, 763, 764, 765, 775, 785, 789, 791, 798, 799, 792, 818, 820, 822, 825, 831, 837, 854, 859, 873, 881, 886, 888, 891, 903, 904, 910, 918, 924, 932, 938, 940, 945, 946, 950, 951, 952, 968, 976, 992, 993, 995, 997, 998, 999, 1003, 1004, 1010, 1015, 1026, 1031, 1040, 1047, 1070, 1117 또는 1169 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

[0802] 29. ABCA4-연관 망막 이영양증의 치료를 필요로 하는 대상체에서 이러한 망막 이영양증을 치료하는 방법으로서, 대상체에게 핵산 트랜스-스플라이싱 분자를 투여하는 단계를 포함하되, 핵산 트랜스-스플라이싱 분자는

[0803] (a) 크립틱 스플라이스 부위의 야생형 ABCA4 서열에 비해서 적어도 하나의 뉴클레오타이드 변이체를 갖는 ABCA4 엑손을 포함하는 암호 도메인 서열(CDS); 및

[0804] (b) 내인성 ABCA4 프리-mRNA 내의 결합 부위와 상보적인 결합 도메인을 포함하는, 방법.

[0805] 30. 실시형태 29에 있어서, ABCA4-연관 망막 이영양증은 ABCA4 유전자 내의 엑손 1 내지 22 내의 하나 이상의 대립유전자 병원성 돌연변이 및 원뿔세포 막대세포 이영양증(예를 들어, 원뿔세포 막대세포 이영양증-3), 스타르가르트 황반이영양증(예를 들어, 스타르가르트병-1), 황반 안저, 망막색소변성증-19 또는 노인성 황반 변성-2과 일치하는 표현형과 연관되는, 방법.

[0806] **다른 실시형태**

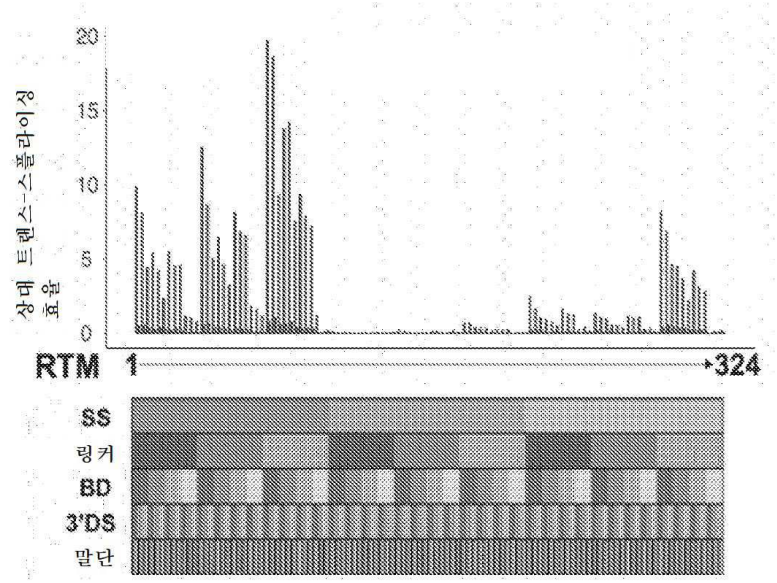
[0807] 본 명세서에 언급된 모든 간행물, 특허 및 특허 출원은 각각의 독립적인 간행물 또는 특허 출원은 구체적으로 개별적으로 참조에 의해 포함된다고 표시된 것과 동일한 정도로 참조에 의해 본 명세서에 포함된다.

[0808] 본 발명은 이의 구체적인 실시형태와 관련하여 설명되었지만, 추가적인 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이며, 본 출원은 일반적으로 본 발명의 원리를 따르고 본 발명이 속하는 기술 분야에서 알려져 있거나 관례적인 관행에 속하는 본 개시내용과의 이탈을 포함하여 본 발명의 모든 변형, 사용 또는 적응을 포괄하도록 의도되며, 위에 명시된 필수 특징에 적용될 수 있으며 청구범위의 범주에 속한다.

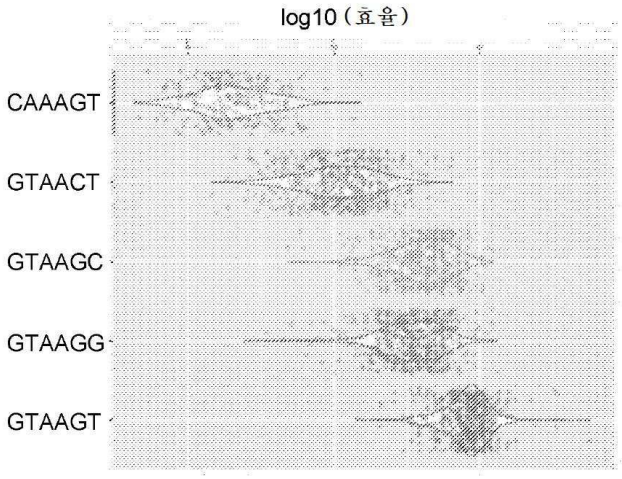
[0809] 다른 실시형태는 청구범위 내에 있다.

도면

도면1

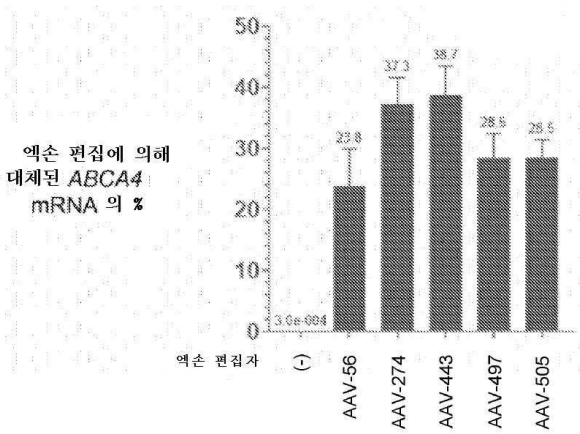

상대 트랜스-스플라이싱 효율
20
15
10
5
0
RTM
1
324
SS
링커
BD
3'DS
말단

도면2

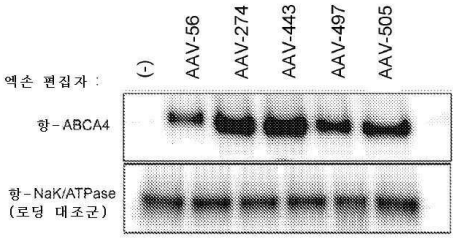

log10 (효율)
CAAAGT
GTAACT
GTAAGC
GTAAGG
GTAAGT

도면3ab

A

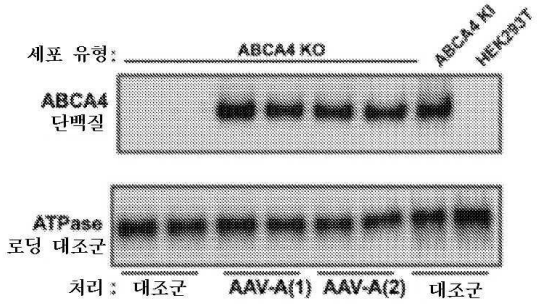

엑손 편집에 의해
대체된 ABCA4
mRNA 의 %
50
40
30
20
10
0
23.8
37.3
38.7
28.5
28.5
3.0e-004
엑손 편집자
(-)
AAV-56
AAV-274
AAV-443
AAV-497
AAV-505

B

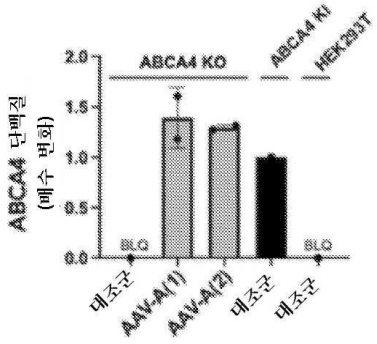

엑손 편집자 :
(-)
AAV-56
AAV-274
AAV-443
AAV-497
AAV-505
항-ABCA4
항-NaK/ATPase
(로딩 대조군)

도면3cd

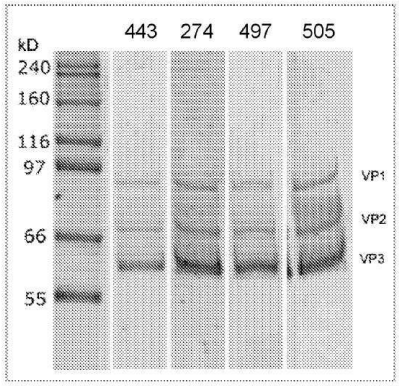
C


세포 유형:
ABCA4 KO
ABCA4 KI
HEK293T
ABCA4
단백질
ATPase
로딩 대조군
처리 : 대조군
AAV-A(1)
AAV-A(2)
대조군

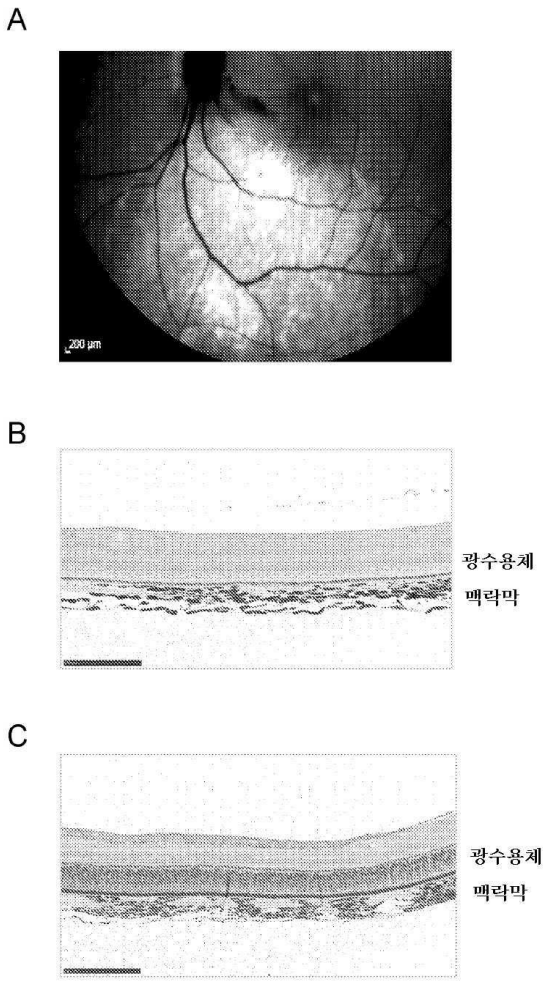
D


ABCA4 KO
ABCA4 KI
HEK293T
ABCA4 단백질
(배수 변화)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
BLQ
BLQ
대조군
AAV-A(1)
AAV-A(2)
대조군
대조군

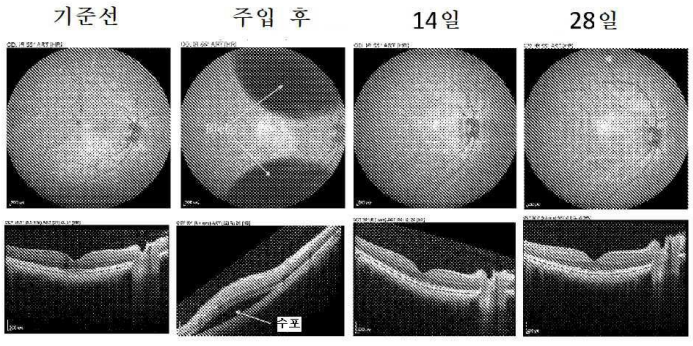
도면4


443
274
497
505
kD
240
160
116
97
66
55
VP1
VP2
VP3

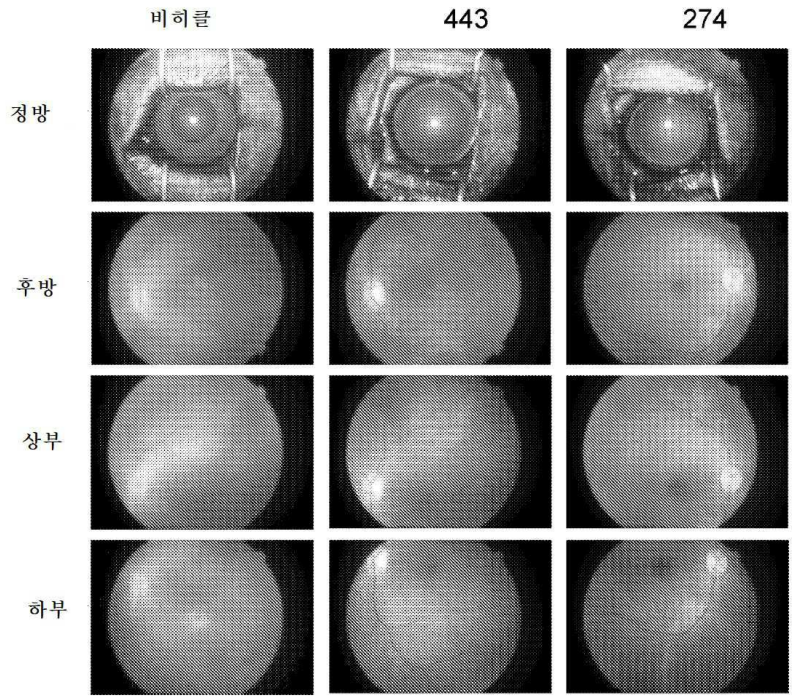
도면5



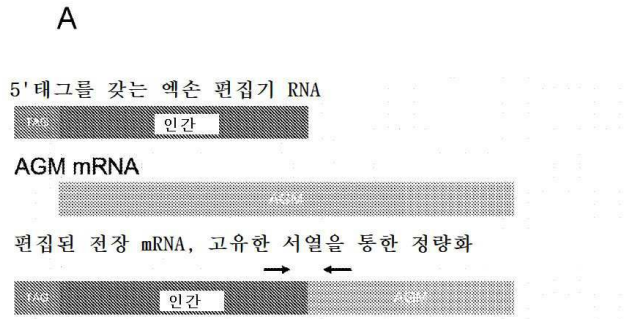
도면6

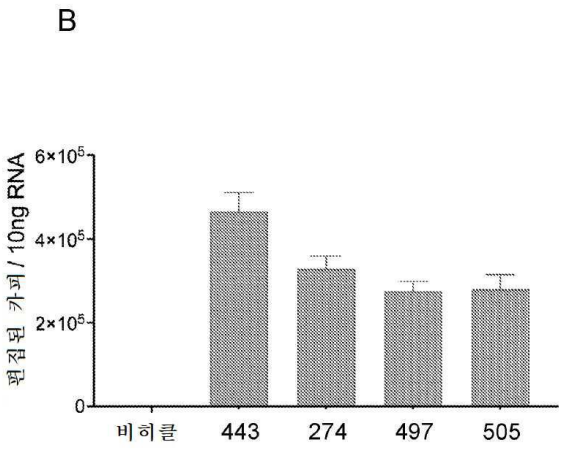


도면7

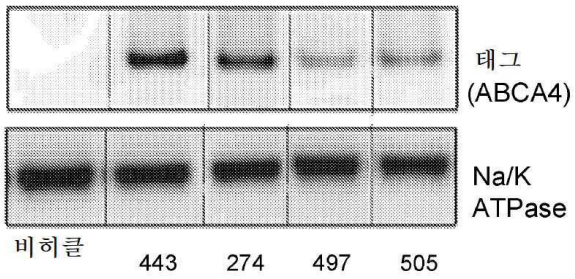

비히클
443
274
정방
후방
상부
하부

도면8


A
5'태그를 갖는 엑손 편집기 RNA
TAG
인간
AGM mRNA
AGM
편집된 전장 mRNA, 고유한 서열을 통한 정량화
TAG
인간
AGM

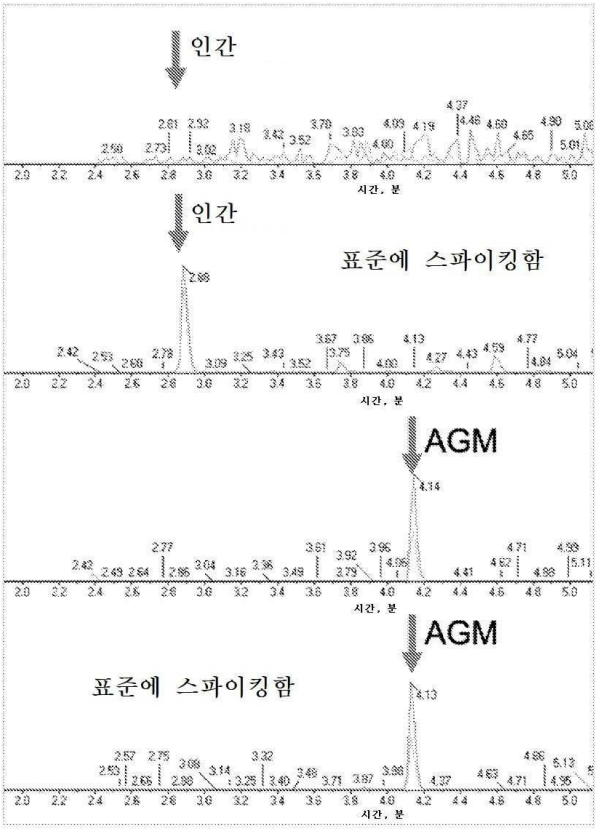

B
편집된 카피 / 10ng RNA
6×10⁵
4×10⁵
2×10⁵
0
비히클
443
274
497
505

도면9


태그
(ABCA4)
Na/K
ATPase
비히클
443
274
497
505

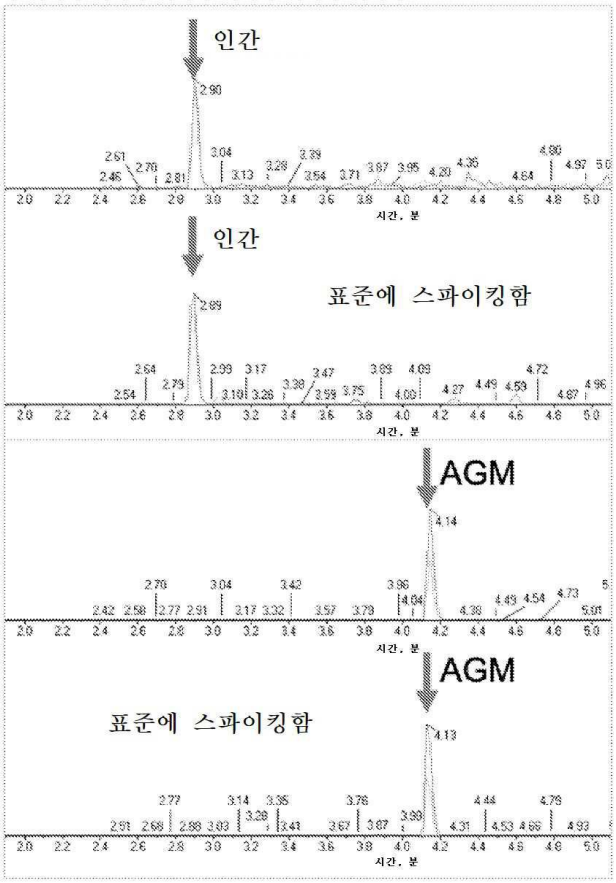
도면10a

A


인간
인간
표준에 스파이킹함
AGM
AGM
표준에 스파이킹함
시간, 분

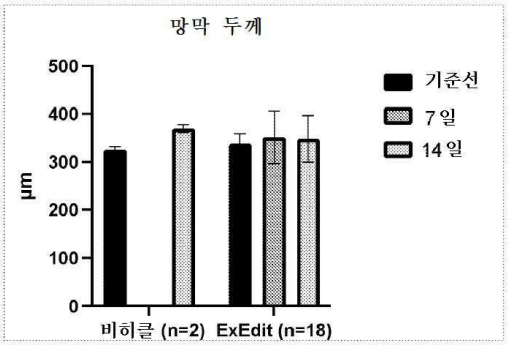
도면10b

B

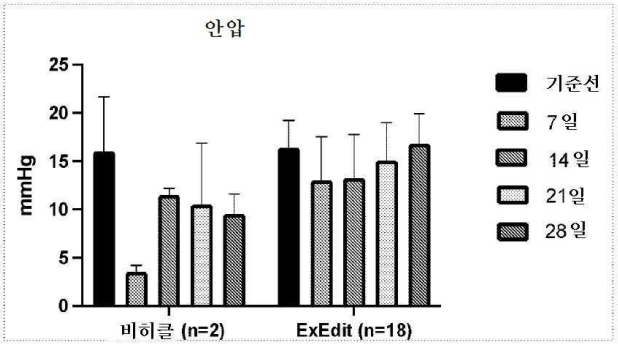


도면11ab

A

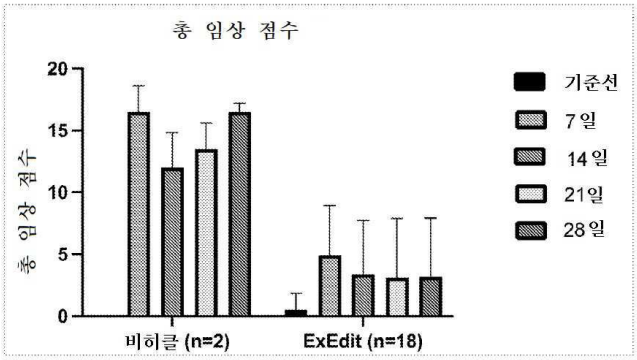

망막 두께
500
400
300
200
100
0
µm
기준선
7일
14일
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)

B

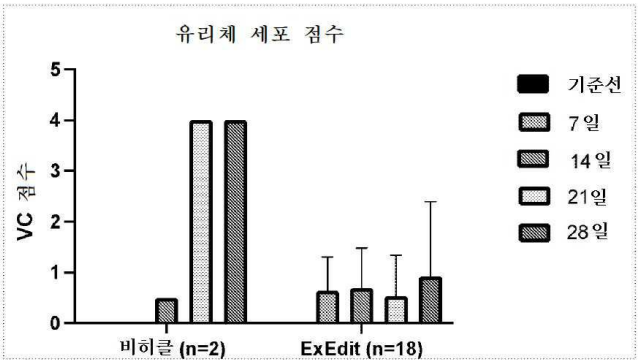

안압
25
20
15
10
5
0
mmHg
기준선
7일
14일
21일
28일
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)

도면11cd

C

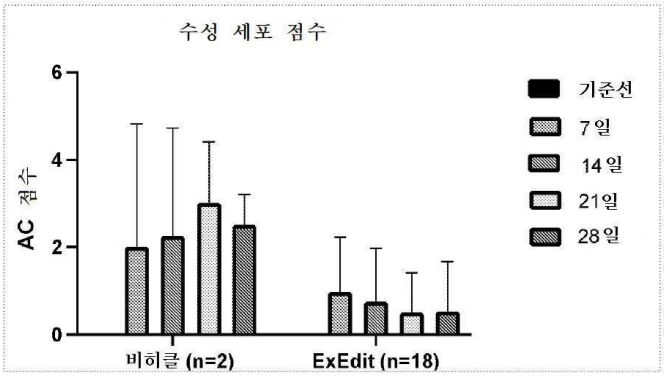

총 임상 점수
총 임상 점수
20
15
10
5
0
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)
기준선
7일
14일
21일
28일

D

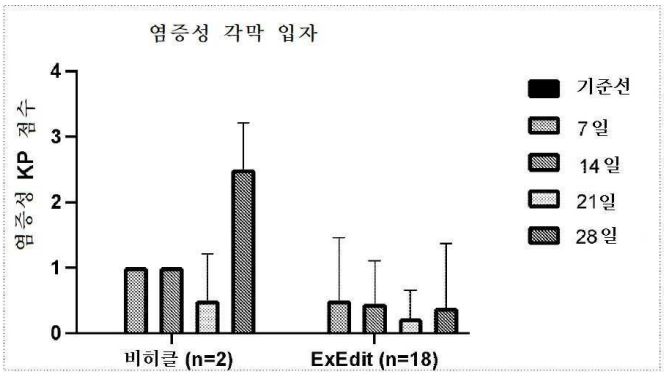

유리체 세포 점수
VC 점수
5
4
3
2
1
0
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)
기준선
7일
14일
21일
28일

도면11ef

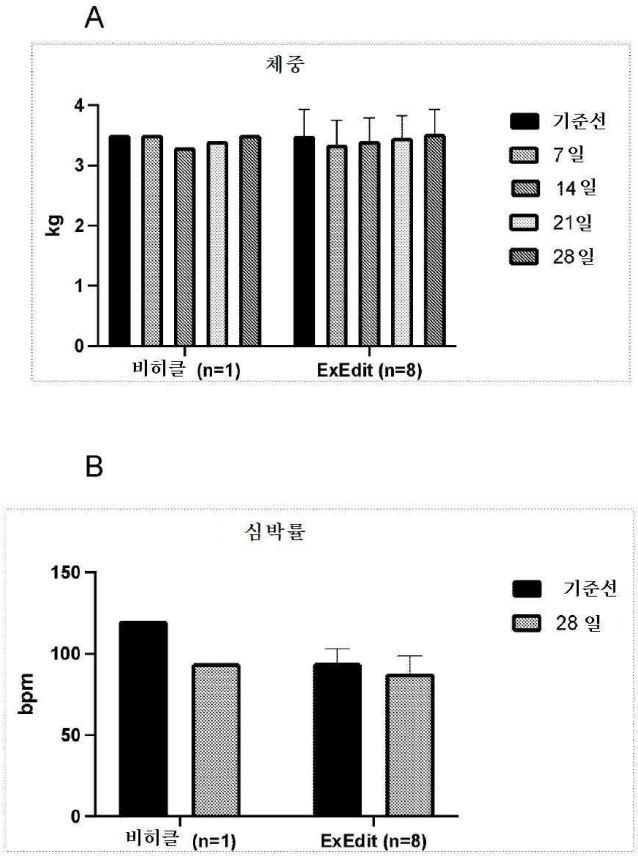
E


수성 세포 점수
AC 점수
6
4
2
0
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)
기준선
7일
14일
21일
28일

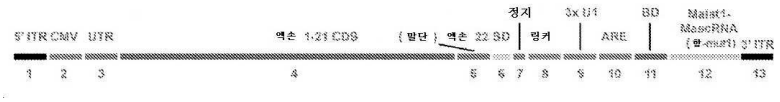
F


염증성 각막 입자
염증성 KP 점수
4
3
2
1
0
비히클 (n=2)
ExEdit (n=18)
기준선
7일
14일
21일
28일

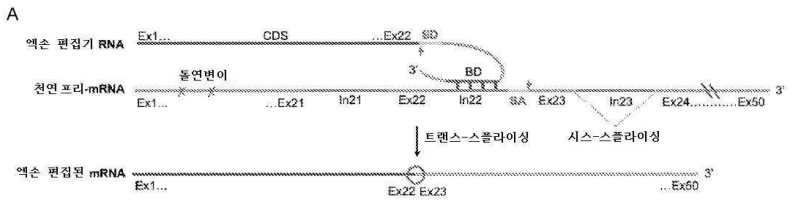
도면12ab



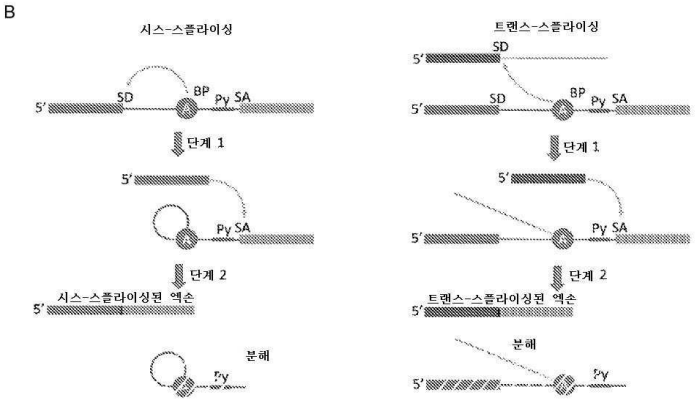
도면13



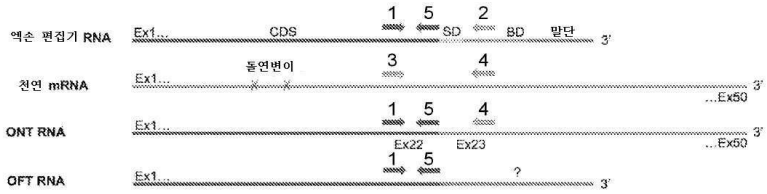
도면14a



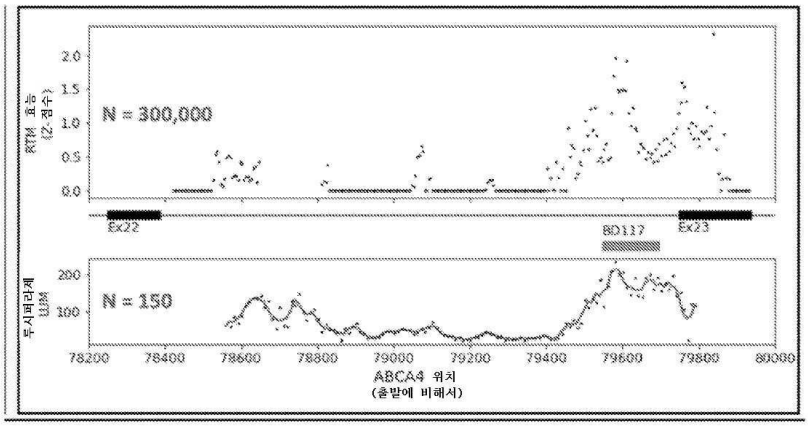
도면14b



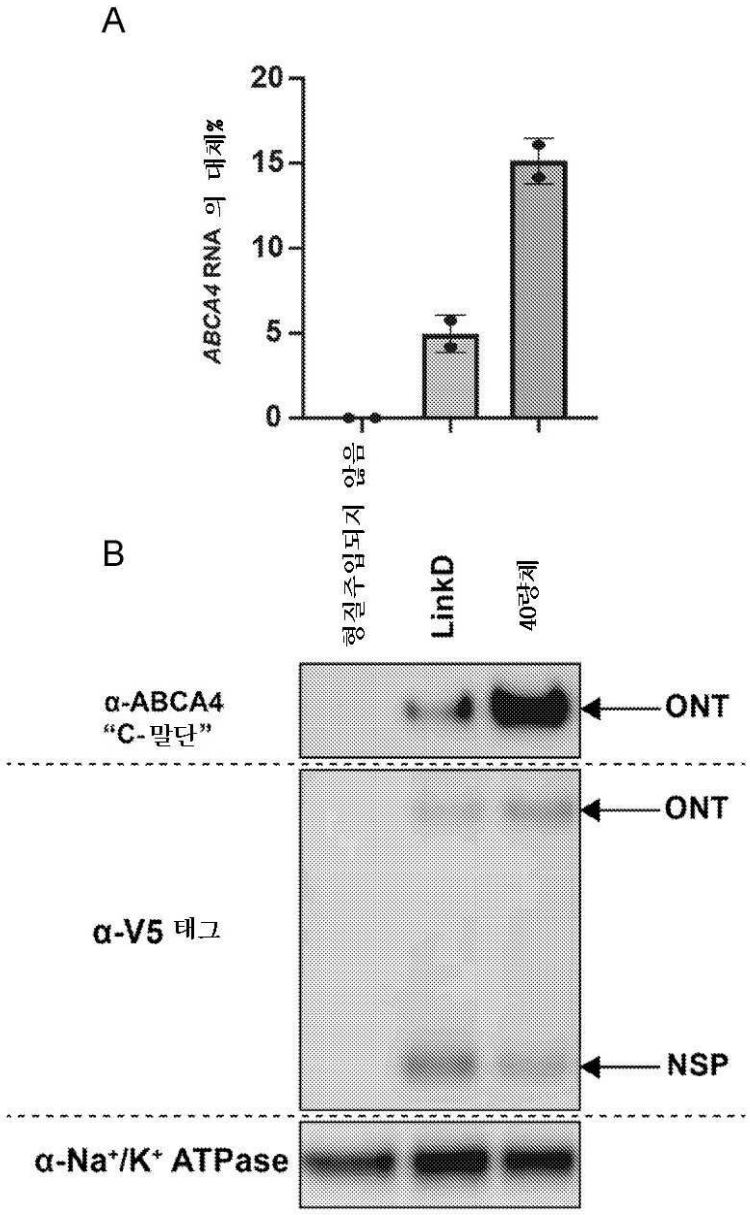
도면15



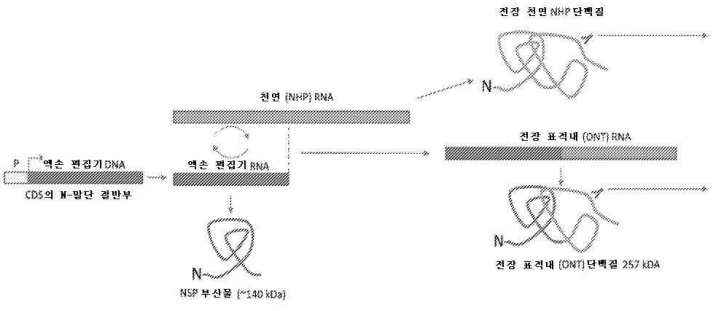
도면16



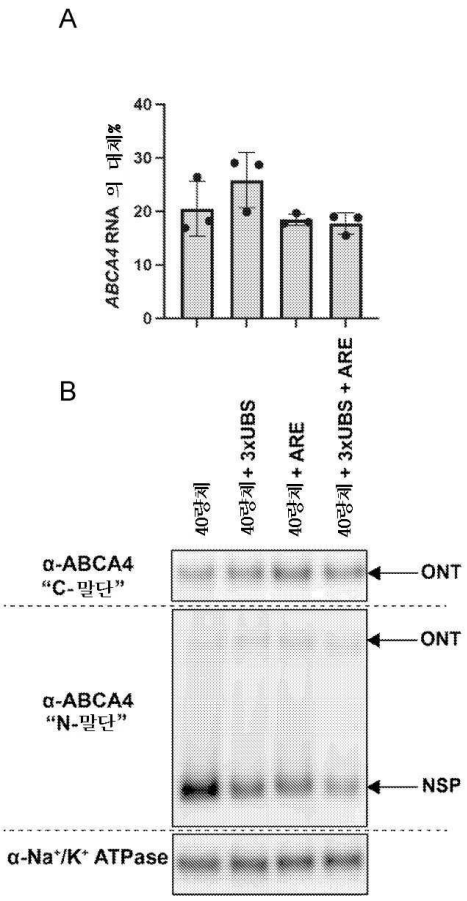
도면17


A
20
15
10
5
0
ABCA4 RNA 의 대체%
형질주입되지 않음
LinkD
40량체
B
α-ABCA4
"C-말단"
ONT
ONT
α-V5 태그
NSP
α-Na+/K+ ATPase

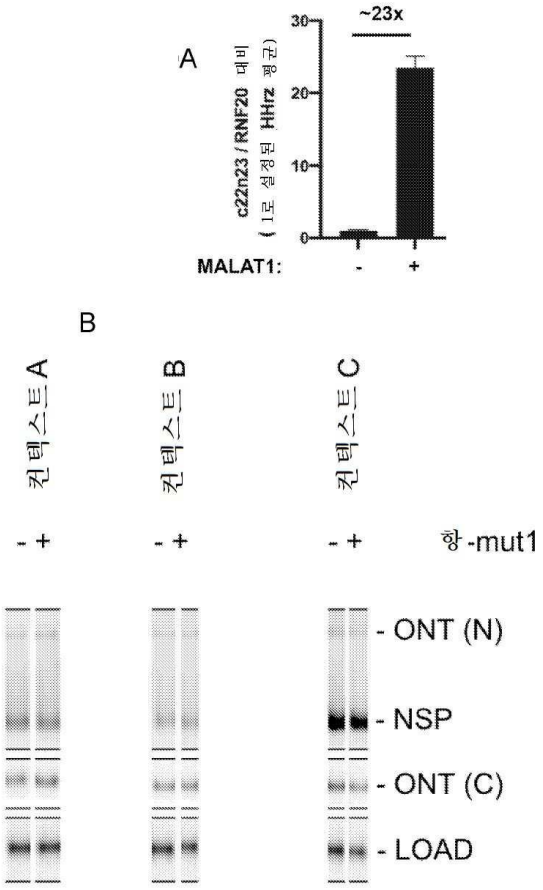
도면18


건강 천연 NHP 단백질
천연 (NHP) RNA
N
건강 표적내 (ONT) RNA
P
역손 편집기 DNA
CDS의 N-말단 절반부
역손 편집기 RNA
N
건강 표적내 (ONT) 단백질 257 kDa
N
NSP 부산물 (~140 kDa)

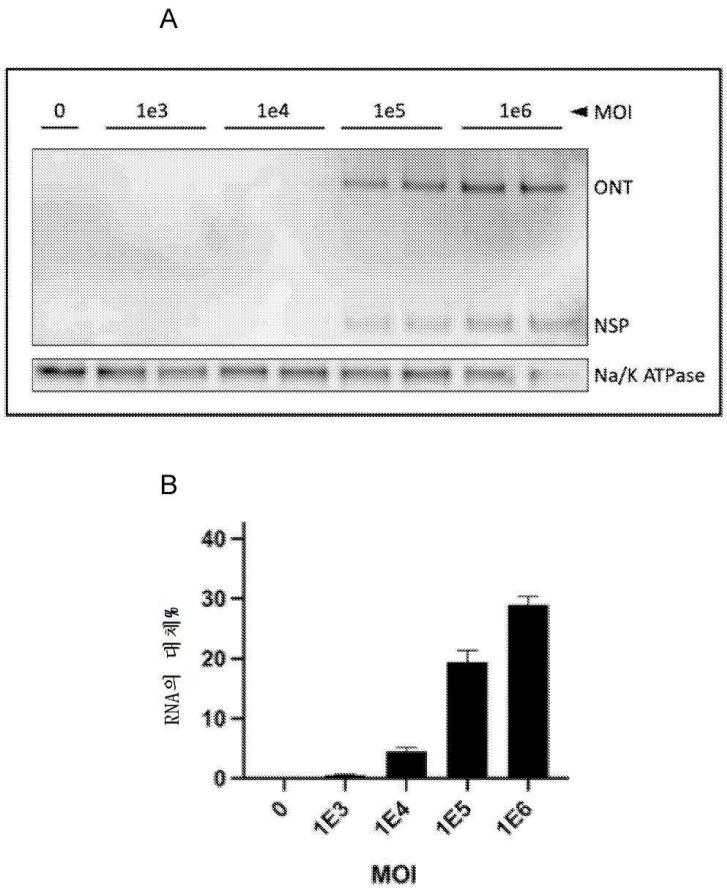
도면19


A
ABCA4 RNA 의 대체%
40
30
20
10
0
B
40량체
40량체 + 3xUBS
40량체 + ARE
40량체 + 3xUBS + ARE
α-ABCA4
"C-말단"
ONT
ONT
α-ABCA4
"N-말단"
NSP
α-Na+/K+ ATPase

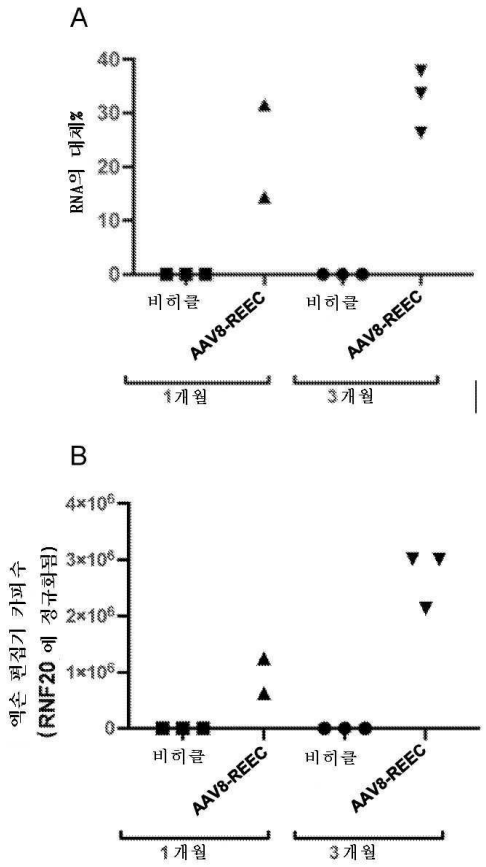
도면20


A
c22n23 / RNF20 대비 HHrz (1로 설정된 평균)
~23x
30
20
10
0
MALAT1:
-
+
B
컨텍스트 A
컨텍스트 B
컨텍스트 C
- +
- +
- +
항-mut1
- ONT (N)
- NSP
- ONT (C)
- LOAD

도면21


A
0
1e3
1e4
1e5
1e6
MOI
ONT
NSP
Na/K ATPase
B
RNA의 대체%
40
30
20
10
0
0
1E3
1E4
1E5
1E6
MOI

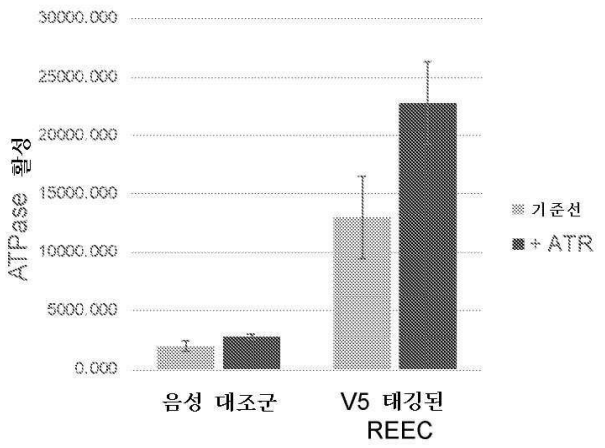
도면22


A
RNA의 대체%
40
30
20
10
0
비히클
AAV8-REEC
비히클
AAV8-REEC
1개월
3개월
B
엑손 편집기 카피 수
(RNF20 에 정규화됨)
4×10⁶
3×10⁶
2×10⁶
1×10⁶
0
비히클
AAV8-REEC
비히클
AAV8-REEC
1개월
3개월

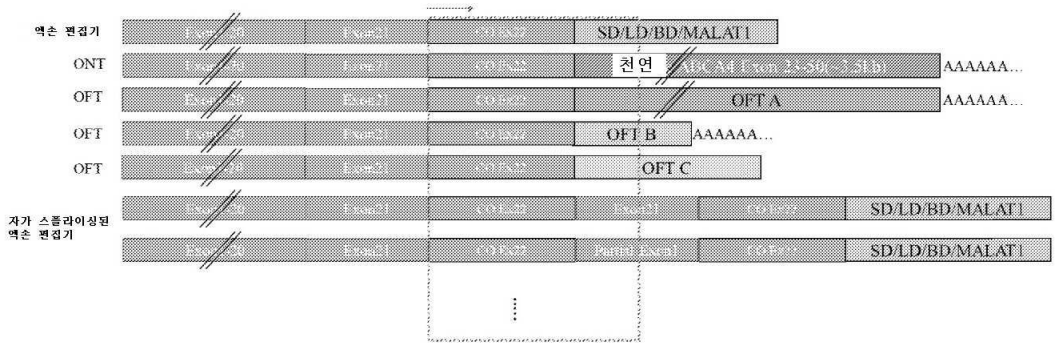
도면23


ABCA4-01을
암호화하는 AAV 벡터 플라스미드
13,232 bp

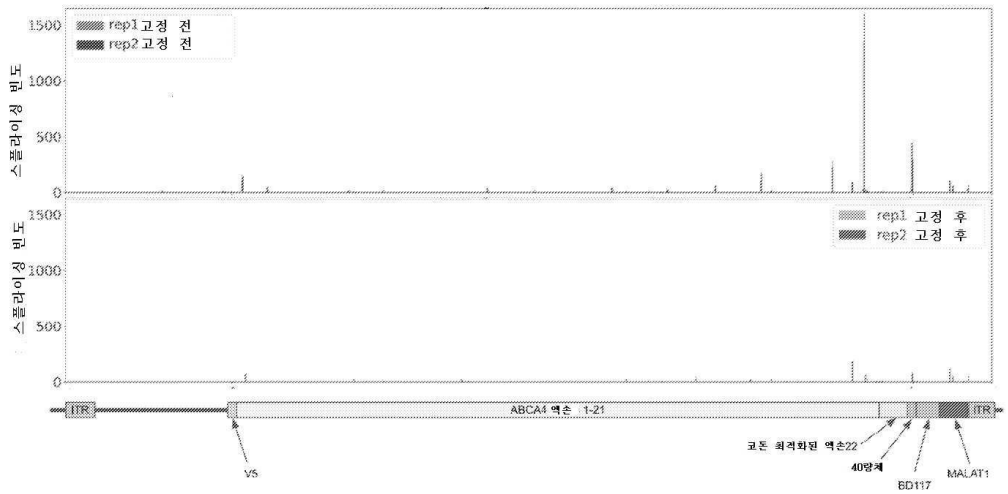
도면24



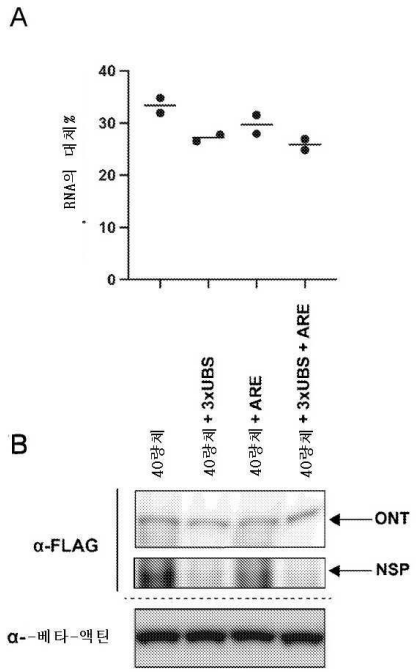
도면25



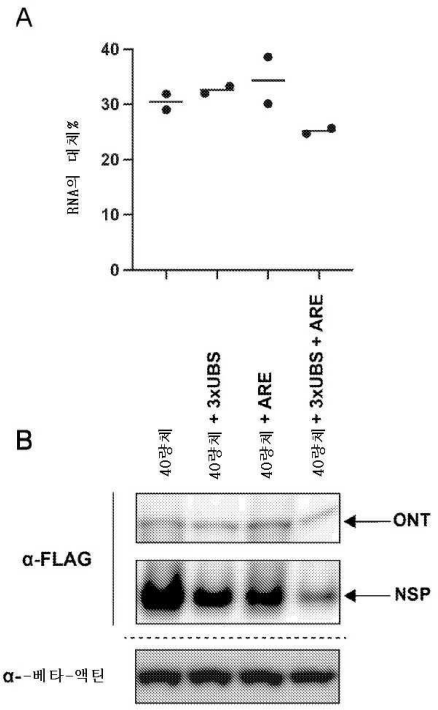
도면26



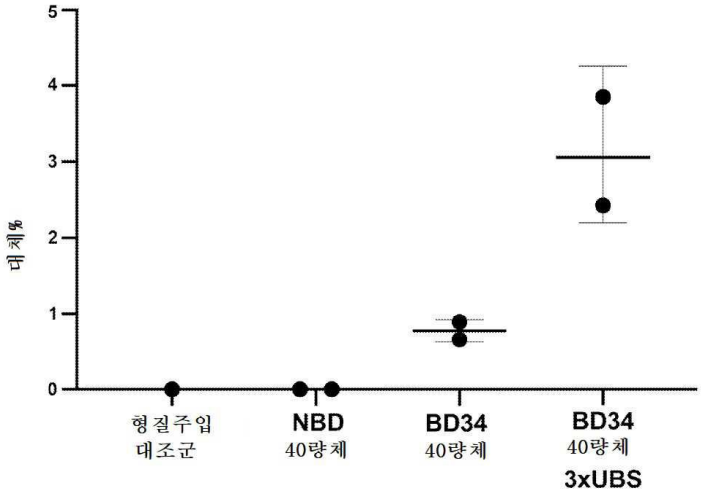
도면27


A
RNA의 대체%
40
30
20
10
0
40량체
40량체 + 3xUBS
40량체 + ARE
40량체 + 3xUBS + ARE
B
α-FLAG
ONT
NSP
α-베타-액틴

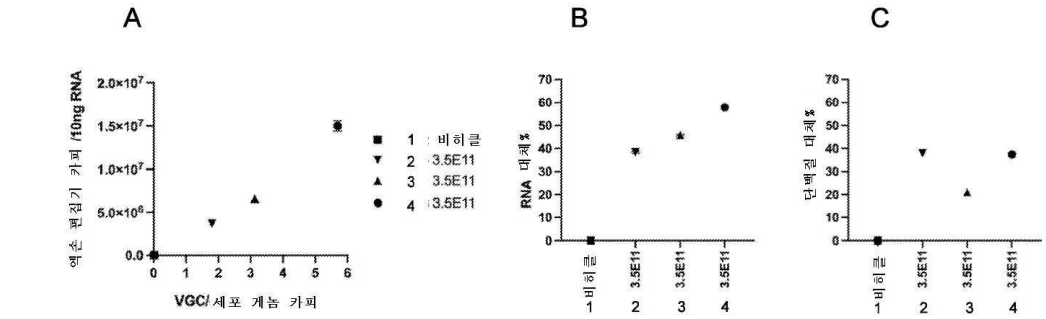
도면28


A
RNA의 대체%
40
30
20
10
0
40량체
40량체 + 3xUBS
40량체 + ARE
40량체 + 3xUBS + ARE
B
α-FLAG
ONT
NSP
α-베타-액틴

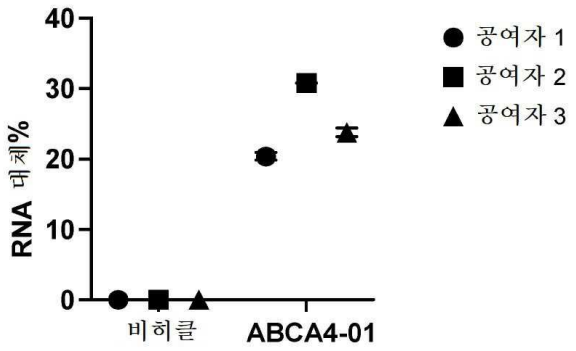
도면29



도면30



도면31



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

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