



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152192
(43) 공개일자 2022년11월15일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 48/00 (2006.01) A61P 25/28 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 48/005 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
- (21) 출원번호 10-2022-7022902
- (22) 출원일자(국제) 2020년12월07일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2022년07월04일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2020/063627
- (87) 국제공개번호 WO 2021/113824
국제공개일자 2021년06월10일
- (30) 우선권주장
62/943,999 2019년12월05일 미국(US)
63/074,578 2020년09월04일 미국(US)

- (71) 출원인
더 트러스티스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
미국 10027 뉴욕주 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로우 메모리얼 라이브러리 412
코넬 유니버시티
미국 뉴욕 14850 이타카 스위트 310 파인 트리 로드 395 옛 코넬 유니버시티(씨티엘) 센터 포 테크놀로지 라이센싱
메이리지티엑스 유케이 II 리미티드
영국 런던 엔1 7엔큐 브리타니아 워크 92
- (72) 발명자
스몰 스캇 에이.
미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
페츠코 그레고리
미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브 콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
장훈

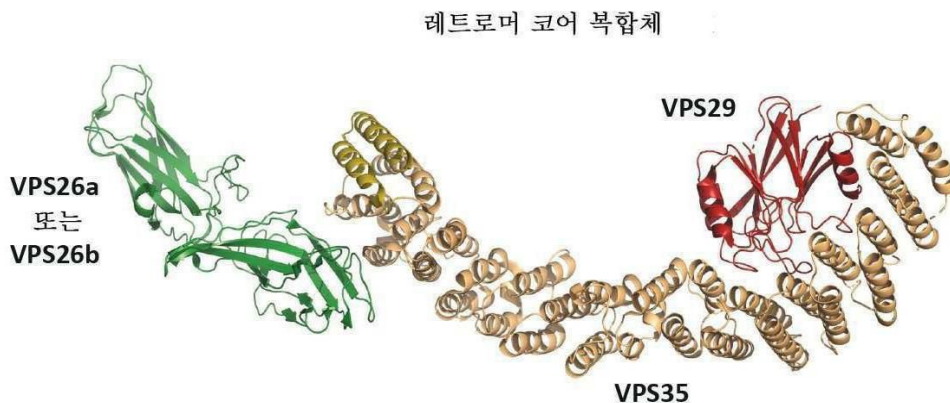
전체 청구항 수 : 총 58 항

(54) 발명의 명칭 **알츠하이머병 및 기타 신경 퇴행성 질환의 치료를 위한 레트로머의 안정화**

(57) 요약

본 개시 내용은 알츠하이머병 및 기타 신경 퇴행성 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 레트로머를 상승 및 안정화하는 방법 및 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 개시 내용은 알츠하이머병 (AD) 및 기타 신경 퇴행성 병태, 예를 들어, 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온병), 다발성 계통 위축증 (MSA), 다운 증후군 및 유전성 경련 하반신 마비 (HSP) 뿐만 아니라, 타우병증, 예를 들어, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)을 치료하기 위한 아데노바이러스 기반 요법에 관한 것이다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 14/47 (2013.01)
C12N 15/86 (2013.01)
C12N 2750/14143 (2013.01)
C12N 2830/008 (2013.01)
C12N 2830/40 (2013.01)
C12N 2830/50 (2013.01)

(72) 발명자

커레시 야서 에이치.

미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로
우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브
콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕

약술 사무엘 디.

미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로
우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브
콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕

포브스 알렉산드리아

미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로
우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브
콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕

콕스 레베카

미국 뉴욕 10027 뉴욕 웨스트 116 스트리트 535 로
우 메모리얼 라이브러리 412 더 트러스티스 오브
콜롬비아 유니버시티 인 더 시티 오브 뉴욕

명세서

청구범위

청구항 1

신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유하는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자를 포함하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 상기 대상체에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 2

신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유하는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 하나 이상의 조성물을 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 3

신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유하는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 핵산, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물을 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 4

신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 완화를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자를 포함하는 하나 이상의 바이러스 벡터를 상기 대상체에게 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 5

신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 완화를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a, VPS26b 및 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 하나 이상의 조성물을 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 6

신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상의 완화를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법으로서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 핵산, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물을 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는, 방법.

청구항 7

제2항 및 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 제1 조성물이 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여되고, VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 제2 조성물이 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여되는,

방법.

청구항 8

제7항에 있어서, VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 제3 조성물이 상기 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여되는, 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 제1 및 제2 조성물이 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 상기 제1 및 제2 조성물이 동시에 투여되는, 방법.

청구항 11

제8항에 있어서, 상기 제1, 제2 및 제3 조성물이 순차적으로 투여되는, 방법.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 제1, 제2 및 제3 조성물이 동시에 투여되는, 방법.

청구항 13

제2항, 제3항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 약제학적 담체를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 신경 퇴행성 질환 또는 장애가 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (neuronal ceroid lipofuscinosis: NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (transmissible spongiform encephalopathy: TSE; 또는 프리온병), 다발성 계통 위축증 (multiple system atrophy: MSA), 진행성 핵상 마비 (progressive supranuclear palsy: PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (Lewy Body Disease: LBD), 근위축성 측삭 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 전두측두엽 변성 (frontal-temporal degeneration: FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (chronic traumatic encephalopathy: CTE)으로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 방법.

청구항 15

레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하고 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 이식유전자를 포함하는 바이러스 벡터.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35가 VPS35 (서열 번호 1)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35가 VPS35 (서열 번호 1)의 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 Vps35를 암호화하는 이식유전자가 사람 Vps35 (서열 번호 1)를 포함하는, 바이러스 벡터.

청구항 19

제15항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS35 (서열 번호 1)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산

서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 이식유전자가 서열 번호 10의 핵산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 21

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a가 VPS26a (서열 번호 2)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 Vps26a가 VPS26a (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 23

제15항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 Vps35를 암호화하는 이식유전자가 사람 VPS26a (서열 번호 2)를 포함하는, 바이러스 벡터.

청구항 24

제15항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS26a (서열 번호 2)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b가 VPS26b (서열 번호 3)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 26

제15항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b가 VPS26b (서열 번호 3)의 아미노산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 27

제15항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자가 사람 VPS26b (서열 번호 3)를 포함하는, 바이러스 벡터.

청구항 28

제15항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS26b (서열 번호 3)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 갖는, 바이러스 벡터.

청구항 29

제1항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 벡터가 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus: AAV), 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 폭스바이러스, 마클로바이러스, 단순 포진 바이러스, 백시니아 바이러스 및 합성 바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 바이러스 벡터.

청구항 30

제29항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 AAV인, 바이러스 벡터.

청구항 31

제30항에 있어서, 상기 AAV가 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 및 AAVrh10인, 바이러스 벡터.

청구항 32

제30항에 있어서, 상기 AAV가 AAV9 및 AAV2/9로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 바이러스 벡터.

청구항 33

제1항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자가 신경 세포에서 상기 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있는, 바이러스 벡터.

청구항 34

제1항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자가 신경 세포에서 상기 이식유전자의 발현을 유도하는 인헨서에 작동 가능하게 연결되어 있는, 바이러스 벡터.

청구항 35

레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 적어도 하나의 바이러스 벡터를 포함하는 조성물.

청구항 36

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35가 VPS35 (서열 번호 1)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 37

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35가 VPS35 (서열 번호 1)의 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 38

제35항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자가 사람 VPS35 (서열 번호 1)를 포함하는, 조성물.

청구항 39

제35항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS35 (서열 번호 1)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 40

제35항에 있어서, 상기 이식유전자가 서열 번호 10의 핵산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 41

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a가 VPS26a (서열 번호 2)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 42

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 Vps26a가 VPS26a (서열 번호 2)의 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 43

제35항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 Vps35를 암호화하는 이식유전자가 사람 VPS26a (서열 번호 2)를 포함하는, 조성물.

청구항 44

제35항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS26a (서열 번호 2)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 45

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b가 VPS26b (서열 번호 3)의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 46

제35항에 있어서, 상기 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b가 VPS26b (서열 번호 3)의 아미노산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 47

제35항에 있어서, 상기 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자가 사람 VPS26b (서열 번호 3)를 포함하는, 조성물.

청구항 48

제35항에 있어서, 상기 이식유전자가 VPS26b (서열 번호 3)를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열을 갖는, 조성물.

청구항 49

제35항에 있어서, 상기 벡터가 아데노 관련 바이러스 (AAV), 아데노바이러스, 렌티바이러스, 레트로바이러스, 폭스바이러스, 바칼로바이러스, 단순 포진 바이러스, 백시니아 바이러스 및 합성 바이러스로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 50

제49항에 있어서, 상기 바이러스 벡터가 AAV인, 조성물.

청구항 51

제50항에 있어서, 상기 AAV가 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10 및 AAVrh10인, 조성물.

청구항 52

제50항에 있어서, 상기 AAV가 AAV9 및 AAV2/9로 이루어진 그룹으로부터 선택되는, 조성물.

청구항 53

제35항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자가 신경 세포에서 상기 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터에 작동 가능하게 연결되어 있는, 조성물.

청구항 54

제35항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 이식유전자가 신경 세포에서 상기 이식유전자의 발현을 유도하는 인헨서에 작동 가능하게 연결되어 있는, 조성물.

청구항 55

제35항에 있어서, 억제학적 담체를 추가로 포함하는, 조성물.

청구항 56

VPS35를 암호화하고 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 적어도 하나의 핵산을 포함하는 조성물.

청구항 57

제56항에 있어서, VPS35를 암호화하는 제1 핵산, 및 VPS26a, VPS26b 및 이들의 조합으로 이루어진 그룹으로부터 선택된 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 제2 핵산을 포함하는, 조성물.

청구항 58

제35항 내지 제57항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 키트.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 관련 출원에 대한 상호 참조
- [0002] 본 출원은 그 전체가 본 출원에 참조로 포함되는 2019년 12월 5일자로 출원된 미국 가출원 번호 US 62/943,999 및 2020년 9월 4일자로 출원된 미국 가출원 번호 US 63/074,578에 대한 우선권을 주장한다.
- [0003] 분야
- [0004] 본 개시 내용은 알츠하이머병 및 기타 신경 퇴행성 장애를 치료 및/또는 예방하기 위한 레트로머 (retromer)를 상승 및 안정화하는 방법 및 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0005] 배경
- [0006] 알츠하이머병 (AD)은 잘못 접힌 단백질 및 신경 염증의 질환으로 특징화되었다. 그러나, 아밀로이드, 타우, 콜린에스테라아제 억제제, 항염증 화합물, 메만틴 및 영양 보충제와 같은 대체 요법을 목표로 하는 알츠하이머병 치료제는 실패하여 왔고, 이 질환은 여전히 사망률, 이환율 및 재정적 부담의 주요 원인으로 남아 있다. AD 임상 시험의 실패로 인해 연구자들은 질환의 인과 관계를 더 조사해야 하였다. 수많은 전임상 연구에서 새로운 AD 관련 유전자, 세포 내 단백질 항상성 경로, 미세 환경 및 신경교 세포와 뉴런의 상호 작용이 조사되어 왔다. 여러 조사가 여전히 진행 중에 있다.
- [0007] 알츠하이머병에서 최근의 유전적 및 세포 생물학적 결과는 "엔도솜 트래피킹 (endosomal trafficking)"이 질환 병태생리학에서 중심적인 역할을 한다는 것을 나타냈다. 현재의 문헌에서는 네 가지 부류의 유전자가 알츠하이머병과 관련이 있다고 주장한다. 이러한 유전자 부류는 다음과 같다: 1) 엔도솜 트래피킹; 2) 콜레스테롤 대사; 3) 면역 반응; 및 4) 아밀로이드 전구체 단백질 (amyloid precursor protein: APP) 처리. 이 4가지 유전자 부류 모두 엔도솜 트래피킹 결함과 관련이 있다. 또한, 엔도솜 트래피킹 결함은 파킨슨병 (PD), 전염성 해면상 뇌병증 (transmissible spongiform encephalopathy: TSE; 또는 프리온 질환), 및 뉴런 세로이드 리포푸신증 (Neuronal Ceroid Lipofuscinosis: NCL)와 같은 다른 신경 퇴행성 질환과도 관련이 있어 왔다.
- [0008] 레트로머는 엔도솜 소기관과 관련된 단백질 복합체이며, 관형 소포 운반체 내의 특정 세포 화물 분자를 트랜스골지 (Golgi) 네트워크로 트래피킹하는 것을 제어한다. 이러한 트래피킹의 결함은 다양한 신경 퇴행성 질환과 관련이 있어 왔다 (문헌 [Small and Petsko 2015]; [Anderson *et al.* 2014]). 신경 퇴행은 뉴런의 사멸을 포함하여, 뉴런의 구조 또는 기능이 점진적으로 상실되는 것을 포괄하는 용어이다. 근위축성 측삭 경화증 (amyotrophic lateral sclerosis: ALS), 파킨슨병 (PD), 알츠하이머병 (AD) 및 헌팅턴병을 비롯한 많은 신경 퇴행성 질환은 신경 퇴행성 과정의 결과로 발생한다.
- [0009] 레트로머 복합 기능을 개선하기 위한 소분자의 사용이 설명되어 왔다. 그러나, 생체 내에서 긍정적인 약리학적 역할을 나타내는 성공적인 약물을 개발하는 것은 어렵고 수년이 걸릴 수 있다.

발명의 내용

- [0010] 이러한 신경 퇴행성 질환에 대한 효과적인 치료법이 시급히 요구되고 있으며, 현재로서는 장기적인 이점을 제공할 수 있는 유전자 기반 요법이 없다.
- [0011] 요약
- [0012] 본 개시 내용은 다음을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경 퇴행성 질환을 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체 (예를 들어, 사람 대상체와 같은 포유 동물 대상체)를 치료하는데 사용될 수 있는 조성물 및 방법에 관한 것이다

다: 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온병), 다운 증후군, 유전성 경련 하반신 마비 (hereditary spastic paraplegia: HSP), 및 다발성 계통 위축증 (multiple system atrophy: MSA) 뿐만 아니라, 진행성 핵상 마비 (progressive supranuclear palsy: PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (Lewy Body Disease: LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (frontal-temporal degeneration: FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (chronic traumatic encephalopathy: CTE)과 같은 타우병증.

[0013] 본 개시 내용의 조성물 및 방법을 사용하여, 상기 기재된 질환을 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체 (예를 들어, 사람 대상체와 같은 포유 동물 대상체)에는 본 출원에 기재된 레트로머 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 이식유전자 (transgene)를 함유하는 조성물이 투여될 수 있다. 조성물은 벡터, 예를 들어, 아데노 관련 바이러스 (adeno-associated virus: AAV) 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 본 출원에 기재된 레트로머 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 이식유전자를 함유하는 제2 조성물을 투여받는다. 제2 조성물은 벡터, 예를 들어, AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다. 일부 실시 형태에서, 대상체는 본 출원에 기재된 레트로머 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 이식유전자를 함유하는 제3 조성물을 투여받는다. 제3 조성물은 벡터, 예를 들어, AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함할 수 있다.

[0014] 제1 양태에서, 본 개시 내용은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 조성물을 특징으로 한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35 및 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35 및 VPS26a를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35 및 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS26a 및 VPS26b를 암호화한다. 다른 양태에서, 조성물은 VPS35를 암호화하는 하나의 이식유전자, 및 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 다른 하나의 이식유전자의 2개의 이식유전자를 포함한다. 다른 양태에서, 조성물은 VPS26a를 암호화하는 하나의 이식유전자, 및 VPS26b를 암호화하는 다른 하나 이식유전자의 2개의 이식유전자를 포함한다. 다른 양태에서, 조성물은 VPS35를 암호화하는 이식유전자, VPS26a를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26b를 암호화하는 이식유전자의 3개의 이식유전자를 포함한다.

[0015] 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35 단백질은 사람 유래이다. 이식유전자에 의해 암호화된 레트로머 코어 단백질 VPS35는 VPS35의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS35의 아미노산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35는 VPS35의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS35의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35는 VPS35의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS35의 아미노산 서열과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실, 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25 개 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS35와 상이한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS35는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환, 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25개 이상의 보존적 아미노산 치환 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS35와 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0016] 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자는 사람 VPS35 (유전자 ID 55737)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자는 VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자는 VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 85% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하

는 이식유전자는 VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 90% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자는 VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 95% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS35를 암호화하는 핵산 서열과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 이식유전자는 코돈 최적화된다.

[0017] 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a 단백질은 사람 유래이다. 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a는 VPS26a의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26a의 아미노산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a는 VPS26a의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26a의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a는 VPS26a의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26a의 아미노산 서열과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26a는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실, 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25 개 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS26a와 상이한 아미노산 서열을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a는 1개 내지 10개, 1개 내지 15개, 1개 내지 20개, 1개 내지 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS26a와 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0018] 추가의 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 사람 VPS26a (유전자 ID 9559)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 85% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 95% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26a를 암호화하는 핵산 서열과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태, 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자는 코돈 최적화된다.

[0019] 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26b 단백질은 사람 유래이다. 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b는 VPS26b의 아미노산 서열과 적어도 85% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26b의 아미노산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 가질 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b는 VPS26b의 아미노산 서열과 적어도 90% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26b의 아미노산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b는 VPS26b의 아미노산 서열과 적어도 95% 동일한 아미노산 서열 (예를 들어, VPS26b의 아미노산 서열과 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 아미노산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b는 하나 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실, 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25개 또는 그 이상의 아미노산 치환, 삽입 및/또는 결실 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상, 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS26b와 상이한 아미노산 서열을

갖는다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자에 의해 암호화되는 레트로머 코어 단백질 VPS26b는 하나 이상의 보존적 아미노산 치환, 예를 들어, 1 내지 10, 1 내지 15, 1 내지 20, 1 내지 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환 (예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25개 또는 그 이상의 보존적 아미노산 치환)으로 인해 VPS26b와 상이한 아미노산 서열을 갖는다.

[0020] 추가의 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자는 사람 VPS26b (유전자 ID 112936)를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자는 VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자는 VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 85% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자는 VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 적어도 90% 동일한 핵산 서열 (예를 들어, VPS26b를 암호화하는 핵산 서열과 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)을 갖는다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자는 코돈 최적화된다.

[0021] 진술한 양태의 일부 실시 형태에서, 조성물은 바이러스 벡터와 같은 벡터를 포함한다. 바이러스 벡터는 예를 들어, AAV 벡터, 아데노바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터, 폭스바이러스 벡터, 바칼로바이러스 벡터, 단순 포진 바이러스 벡터, 백시니아 바이러스 벡터, 또는 합성 바이러스 벡터 (예를 들어, 키메라 바이러스, 모자이크 바이러스 또는 유사형 바이러스, 및/또는 외래 단백질, 합성 중합체, 나노입자 또는 소분자를 함유하는 바이러스)일 수 있다.

[0022] 진술한 양태의 일부 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터, 예를 들어, AAV1 (즉, AAV1 역 말단 반복부 (ITR) 및 AAV1 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV2 (즉, AAV2 ITR 및 AAV2 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV3 (즉, AAV3 ITR 및 AAV3 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV4 (즉, AAV4 ITR 및 AAV4 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV5 (즉, AAV5 ITR 및 AAV5 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV6 (즉, AAV6 ITR 및 AAV6 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV7 (즉, AAV7 ITR 및 AAV7 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV8 (즉, AAV8 ITR 및 AAV8 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAV9 (즉, AAV9 ITR 및 AAV9 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAVrh74 (즉, AAVrh74 ITR 및 AAVrh74 캡시드 단백질을 함유하는 AAV), AAVrh.8 (즉, AAVrh.8 ITR 및 AAVrh.8 캡시드 단백질을 함유하는 AAV) 또는 AAVrh.10 (즉, AAVrh.10 ITR 및 AAVrh.10 캡시드 단백질을 함유하는 AAV)이다.

[0023] 진술한 양태의 일부 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 하나의 AAV 혈청형 유래의 ITR 및 또 다른 AAV 혈청형 유래의 캡시드 단백질을 함유하는 위형 (pseudotyped) AAV 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 위형 AAV는 AAV2/9 (즉, AAV2 ITR 및 AAV9 캡시드 단백질을 함유하는 AAV)이다. 일부 실시 형태에서, 위형 AAV는 AAV2/10 (즉, AAV2 ITR 및 AAV10 캡시드 단백질을 함유하는 AAV)이다.

[0024] 진술한 양태의 일부 실시 형태에서, AAV 벡터는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAVrh74, AAVrh.8 또는 AAVrh.10 유래의 캡시드 단백질 중 하나 이상의 키메라를 함유하는 캡시드 단백질과 같은 재조합 캡시드 단백질을 함유한다. 실시 형태에서, 캡시드는 AAV2 변이체 rAAV2-레트로 (본 출원에 참조로 포함되는 국제공개공보 WO 2017/218842의 서열 번호 44)와 같은 변이체 AAV 캡시드이다.

[0025] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV10이다. 예를 들어, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV10을 포함할 수 있다.

[0026] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV9이다. 예를 들어, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV9를 포함할 수 있다.

[0027] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV2/10이다. 예를 들어, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는

레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV2/10을 포함할 수 있다.

- [0028] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV2/9이다. 예를 들어, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV2/9를 포함할 수 있다.
- [0029] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이고 이식유전자는 VPS35 레트로머 코어 단백질을 암호화한다. 예를 들어, 조성물은 기능적 VPS35 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 VPS35 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV9와 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 VPS35 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV2/9 또는 AAV2/10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다.
- [0030] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이고 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화한다. 예를 들어, 조성물은 기능적 VPS26a 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV9와 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV2/9 또는 AAV2/10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다.
- [0031] 특정 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 AAV 벡터이고 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화한다. 예를 들어, 조성물은 기능적 VPS26b 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV9와 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다. 예를 들어, 조성물은 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 AAV2/9 또는 AAV2/10과 같은 재조합 AAV (rAAV)를 포함할 수 있다.
- [0032] 본 개시 내용의 상기 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 조성물은 리포솜, 소포, 합성 소포, 엑소솜, 합성 엑소솜, 덴드리머 또는 나노입자를 포함한다.
- [0033] 본 개시 내용의 상기 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 뉴런에서 이식유전자의 발현을 유도하는 프로모터에 작동 가능하게 연결된다. 프로모터는, 예를 들어, 닭 베타 액틴 프로모터, 사이토메갈로 바이러스 (CMV) 프로모터, 미오신 경쇄-2 프로모터, 알파 액틴 프로모터, 트로포닌 1 프로모터, Na⁺/Ca²⁺ 교환기 프로모터, 디스트로핀 프로모터, 크레아틴 키나아제 프로모터, 알파7 인테그린 프로모터, 뇌 나트륨 이뇨 (natriuretic) 펩타이드 프로모터, 알파 B-크리스탈린/소형 열 충격 단백질 프로모터, 알파 미오신 중쇄 프로모터 또는 심방 나트륨 이뇨 인자 프로모터일 수 있다.
- [0034] 본 개시 내용의 상기 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 뉴런에서 이식유전자의 발현을 유도하는 인헨서에 작동 가능하게 연결된다. 본 개시 내용의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 예시적인 인헨서는 CMV 인헨서, 근세포 인헨서 인자 2 (MEF2) 인헨서 및 MyoD 인헨서이다.
- [0035] 또 다른 양태에서, 본 개시 내용은 전술한 실시 형태에 따른 하나 이상의 바이러스 벡터를 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 퇴행성 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 대상체가 퇴행성 질환 또는 장애를 갖는 것으로 진단되자마자 또는 직후에 대상체에게 투여된다. 실시 형태에서, 퇴행성 질환 또는 장애는 신경 퇴행성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병, 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온 질환), 다발성 계통 위축증 (MSA), 다운 증후군 및 유전성 강직성 하반신마비 (HSP)뿐만 아니라, 타우병증, 예를 들어, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)이다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 개시 내용은 상기 단락에 기재된 바와 같이, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 하나 이상의 조성물을 투여함으로써 이를 필요로 하는 대상체에서 퇴행성 질환 또는 장애를 치료하는 방법을 특징으로 한다. 실시 형태에서, 조성물은 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26a를 암호화하는 이식유전자를 포함한다. 실시 형태에서, 조성물은 VPS35를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함한다. 실시 형태에서, 조성물은 VPS26a를 암호화하

는 이식유전자, 및 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함한다. 실시 형태에서, 조성물은 VPS35를 암호화하는 이식유전자, VPS26a를 암호화하는 이식유전자, 및 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 조성물은 대상체가 퇴행성 질환 또는 장애를 갖는 것으로 진단되자마자 또는 직후에 대상체에게 투여된다. 실시 형태에서, 퇴행성 질환 또는 장애는 신경 퇴행성 질환, 예를 들어, 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병, 뉴런 세로이드 리오포신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온 질환), 다발성 계통 위축증 (MSA), 다운 증후군 및 유전성 강직성 하반신마비 (HSP)뿐만 아니라, 타우병증, 예를 들어, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)이다.

- [0037] 일부 실시 형태에서, 방법은 상기 단락에 기재된 바와 같이, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 제1 조성물을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 방법은 상기 단락에 기재된 바와 같이, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 제2 조성물을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS35를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제1 조성물을 투여하고 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제1 조성물을 투여하고 VPS35를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS26a를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제1 조성물을 투여하고 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제1 조성물을 투여하고 VPS26a를 암호화하는 이식유전자를 포함하는 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.
- [0038] 일부 실시 형태에서, 방법은 상기 단락에 기재된 바와 같이, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 VPS26a 및/또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 제3 조성물을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 것을 추가로 포함한다. 실시 형태에서, 제1, 제2 및 제3 조성물은 각각 VPS35, VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 포함한다.
- [0039] 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 조성물은 동시에 대상체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제1, 제2 및 제3 조성물은 동시에 대상체에게 투여된다.
- [0040] 일부 실시 형태에서, 제2 조성물은 대상체에게 제1 조성물을 투여한 후 대상체에게 투여된다. 제2 조성물은 예를 들어, 제1 조성물을 대상체에게 투여한 지 1일 이상 이내 또는 수주 이내에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제2 조성물은 대상체에게 제1 조성물을 투여한 지 적어도 1개월 후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제1 조성물의 투여는 제2 조성물이 대상체에게 투여되는 동안 계속된다.
- [0041] 일부 실시 형태에서, 제3 조성물은 대상체에게 제1 및 제2 조성물을 투여한 후 대상체에게 투여된다. 제3 조성물은, 예를 들어, 제1 및 제2 조성물을 대상체에게 투여한 지 1일 이상 이내 또는 수주 이내에 대상체에게 투여될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 제3 조성물은 대상체에게 제1 및 제2 조성물을 투여한 지 적어도 1개월 후에 대상체에게 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 조성물의 투여는 제3 조성물이 대상체에게 투여되는 동안 계속된다.
- [0042] 일부 실시 형태에서, 제1 조성물은 대상체에게 정맥내, 경막내, 피내, 경피, 비경구, 근육내, 비강내, 피하, 경피, 기관내, 복막내, 동맥내, 혈관내, 흡입, 관류, 세척 (lavage) 및/또는 경구 투여에 의해 투여된다.
- [0043] 일부 실시 형태에서, 제2 조성물은 대상체에게 정맥내, 경막내, 피내, 경피, 비경구, 근육내, 비강내, 피하, 경피, 기관내, 복강내, 동맥내, 혈관내, 흡입, 관류, 세척 및/또는 경구 투여에 의해 투여된다.
- [0044] 일부 실시 형태에서, 제3 조성물은 대상체에게 정맥내, 경막내, 피내, 경피, 비경구, 근육내, 비강내, 피하, 경피, 기관내, 복강내, 동맥내, 혈관내, 흡입, 관류, 세척 및/또는 경구 투여에 의해 투여된다.
- [0045] 추가의 양태에서, 본 개시 내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유하는 방법을 특징으로 한다. 방법은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 조성물 또는 조성물들을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.
- [0046] 추가의 양태에서, 본 개시 내용은 이를 필요로 하는 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 완화시키는 방법을 특징으로 한다. 방법은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 이식유전자를 함유하는 조성물 또는 조성물들

을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0047] 전술한 양태의 일부로서, 본 개시 내용은 또한 본 출원에 기재된 바와 같은 방법에 사용하기 위한 본 출원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 조성물을 제공한다. 또한, 본 개시 내용은 본 출원에 기재된 바와 같은 방법을 위한 하나 이상의 의약의 제조를 위한 본 출원에 기재된 바와 같은 하나 이상의 조성물의 용도를 제공한다. 이식 유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화할 수 있다.

[0048] 따라서, 전술한 양태의 일부로서, 본 개시 내용은 또한 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 치료, 예방 및/또는 치유에 사용하기 위한, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 함유하는 조성물을 제공한다.

[0049] 또한, 신경 퇴행성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 완화하는데 사용하기 위한, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 함유하는 하나 이상의 조성물이 제공된다.

[0050] 전술한 양태의 일부로서, 본 개시 내용은 또한 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치료하기 위한 하나 이상의 의약의 제조를 위한, 하나 이상의 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 함유하는 하나 이상의 조성물의 용도를 제공한다. 또한, 신경 퇴행성 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 완화하기 위한 하나 이상의 의약의 제조를 위한, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 하나 이상의 이식유전자를 함유하는 하나 이상의 조성물의 용도가 제공된다.

[0051] 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 신경 퇴행성 질환 또는 장애이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 알츠하이머병 (AD)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 파킨슨병이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온 질환)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 다발성 계통 위축증 (MSA)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 진행성 핵상 마비 (PSP)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 만성 외상성 뇌병증 (CTE)이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 다운 증후군이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 HSP이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 LBD이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 ALS이다. 전술한 양태 중 임의의 양태의 일부 실시 형태에서, 질환 또는 장애는 FTD 또는 ALS-FTD이다.

[0052] 또 다른 양태에서, 본 개시 내용은 전술한 양태의 조성물을 함유하는 키트를 특징으로 한다. 키트는 본 개시 내용의 임의의 상기 양태 또는 실시 형태 중 임의의 것의 방법에 따라 대상체에게 조성물을 투여할 것을 키트의 사용자에게 지시하는 패키지 삽입물과 같은 패키지 삽입물을 추가로 포함할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0053] 본 발명을 예시할 목적으로, 본 발명의 특정 실시 형태가 도면에 도시되어 있다. 그러나, 본 발명은 도면에 도시된 실시 형태의 정확한 배열 및 수단으로 제한되지 않는다.

도 1은 VPS35 (주황색)와 VPS29 (적색) 및 VPS26a (녹색)의 상호 작용을 강조하는 레트로머의 카고 (cargo) 인 식 코어의 3차원 구조에 대한 백본 렌더링 (PyMOL, Schroedinger, Inc.사)을 도시한 것이다. Vps26b는 사실상 동일한 방식으로 Vps35에 결합한다 (문헌 [Collins *et al.* 2008]; [Shi *et al.* 2006]). 마우스 이종삼량체의 cryoEM 구조로부터 취한 원자 좌표 (PDB 파일 6vac) (문헌 [Kendall *et al.* 2020]).

도 2는 VPS35 발현만으로는 레트로머의 삼량체 및 기능을 상승시키기에 충분하지 않다는 것을 도시한 것이다. 도 2a는 AAV9-VPS35-HA에 따른 레트로머 및 Sor11 발현 수준을 나타내는 대표적인 면역블롯이다. AAV9-GFP 및 AAV9-EV (빈 벡터)를 대조군으로 사용하였다. 도 2b는 액틴에 정규화된 레트로머 성분 및 Sor11의 평균 수준을 도시하는 막대 그래프이다. 대조군 (좌측 막대, 짙은 회색, n=23), VPS35 과발현 (우측 막대, 적색, n=16).

***P < 0.001, ns= 유의하지 않음.

도 3은 실시예에서 사용된 플라스미드의 지도를 도시한 것이다. 도 3a는 빈 새시 (empty chassis) 플라스미드 지도를 도시한 것이다. 도 3b는 GFP 대조군 플라스미드 지도를 도시한 것이다. 도 3c는 VPS35 플라스미드 지도를 도시한 것이다. 도 3d는 VPS26a 플라스미드 지도를 도시한 것이다. 도 3e는 VPS26b 플라스미드 지도를 도시한 것이다.

도 4는 신경모세포종 세포에서 조합된 VPS35 및 VPS26 발현의 최적화를 도시한 것이다. 도 4a는 VPS35, VPS26a 및 VPS26b 단독을 함유하는 플라스미드의 감염 또는 VPS26a 또는 VPS26b와 함께 VPS35의 이중 형질 감염 후 레트로머 발현 수준을 도시하는 대표적인 면역블롯이다. GFP 또는 빈 백본 플라스미드를 대조군으로 사용하였다. 각각의 조건에서 도입된 플라스미드 DNA/리포펙타민 복합체의 양을 적절하게 제어하기 위해, 대조군 플라스미드 (GFP 또는 빈 백본)는 레트로머의 한 성분만이 형질 감염될 때마다 포함되었다. VPS29는 이러한 N2a 세포에서 이 단백질의 두 가지 다른 이소형 (isoform)을 나타내는 두 개의 별개의 밴드를 보여준다. 도 4b 내지 4e는 대조군으로서 빈 벡터 (EV) 및 GFP (EV + GFP), VPS35 단독, VPS26a 단독, VPS26b 단독, VPS35 벡터 + VPS26a 벡터, 및 VPS35 벡터 + VPS26b 벡터를 포함하는 벡터로서 형질 감염된 신경모세포종 세포에서 레트로머 코어 단백질 (VPS35, VPS26a, VPS26b, VPS29)의 평균 수준 (액틴으로 정규화됨)의 그래프이다. 도 4b는 VPS35를 도시한 것이다. 도 4c는 VPS26a를 도시한 것이다. 도 4d는 VPS26b를 도시한 것이다. 도 4e는 VPS29를 도시한 것이다. 대조군 (진한 회색, n=15), VPS35 (n=30), VPS26a (n=30) 및 VPS26b (n=15) 과발현 단독 (청색), VPS35 + VPS26 조합 (적색, n=15). ***P < 0.001, **P < 0.01, !P=0.07, ns= 유의하지 않음.

도 5는 조합된 VPS35 및 VPS26 발현이 뉴런에서 레트로머 기능을 상승시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 5a는 VPS35, VPS26a 및 VPS26b를 포함하는 AAV9 벡터로 형질 도입한 후 레트로머 발현 수준을 도시하는 대표적인 면역블롯이다. AAV9-GFP 및 AAV9-EV (빈 백본 플라스미드를 함유하는 AAV9)를 대조군으로 사용하였다. 실험적 AAV9 벡터는 하기와 같이 모든 가능한 조합으로 뉴런에서 발현되었다: 단일 단백질 발현 (VPS35 단독, VPS26a 단독, VPS26b 단독); 이중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); 및 삼중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a+VPS26b). 각각의 조건에서 도입된 DNA 및 AAV9의 양을 적절하게 제어하기 위해, 대조군 AAV9 (GFP 또는 EV)는 레트로머의 한 성분만이 형질 도입될 때마다 포함되었다. 도 5b 내지 5e는 빈 벡터 (EV), GFP, VPS35, VPS26a 또는 VPS26b를 함유하는 5개의 바이러스 벡터 (AAV9) 중 하나 이상으로 형질 감염된 신경모세포종 세포에서 레트로머 코어 단백질 (VPS35, VPS26a, VPS26b)의 평균 수준 (액틴으로 정규화됨)의 막대 그래프이다. 대조군으로서 빈 벡터 (EV) + GFP, VPS35 벡터 단독, VPS26a 벡터 단독, VPS26b 벡터 단독, VPS35 벡터 + VPS26a 벡터, VPS35 벡터 + VPS26b 벡터, VPS35 벡터 + VPS26a 벡터 + VPS26b 벡터 및 VPS26a 벡터 + VPS26b 벡터에 대한 결과가 도시되어 있다. 도 5b는 VPS35를 도시한 것이다. 도 5c는 VPS29를 도시한 것이다. 도 5d는 VPS26a를 도시한 것이다. 도 5e는 VPS26b를 도시한 것이다. 대조군 (진한 회색, n=9), VPS35, VPS26a 또는 VPS26b의 단일 과발현 (청색, n=18), VPS35 + VPS26a 또는 VPS26b 조합 (적색, n=9), VPS35 + VPS26a + VPS26b (진한 적색, n=9), VPS26a + VPS26b (분홍색, n=9). ***P < 0.001, **P < 0.01, *P < 0.05, ns= 유의하지 않음.

도 6은 조합된 VPS35 및 VPS26 발현이 뉴런에서 레트로머 기능을 상승시킨다는 것을 도시한 것이다. 도 6a는 VPS35, VPS26a 및 VPS26b를 함유하는 AAV9 벡터로 형질 도입한 후 Sor11 발현 수준을 도시하는 대표적인 면역블롯이다. AAV9-GFP 및 AAV9-EV (빈 백본 플라스미드를 함유하는 AAV9)를 대조군으로 사용하였다. 실험적 AAV9 벡터는 다음과 같이 모든 가능한 조합으로 뉴런에서 발현되었다: 단일 단백질 발현 (VPS35 단독, VPS26a 단독, VPS26b 단독); 이중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); 및 삼중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a+VPS26b). 각각의 조건에서 도입된 DNA 및 AAV9의 양을 적절하게 제어하기 위해, 레트로머의 한 성분만이 형질 도입될 때마다 대조군 AAV9 (GFP 또는 EV)를 포함되었다. 도 6b는 빈 벡터 (EV), GFP, VPS35, VPS26a 또는 VPS26b를 포함하는 5개의 바이러스 벡터 (AAV9) 중 하나 이상으로 형질 감염된 뉴런에서 Sor11 수준 (액틴으로 정규화됨)의 막대 그래프이다. 대조군으로서 빈 벡터 (EV) + GFP, VPS35 벡터 단독, VPS26a 벡터 단독, VPS26b 벡터 단독, VPS35 벡터 + VPS26a 벡터, VPS35 벡터 + VPS26b 벡터, VPS35 벡터 + VPS26a 벡터 + VPS26b 벡터 및 VPS26a 벡터 + VPS26b 벡터에 대한 결과가 도시되어 있다. 대조군 (진한 회색, n=9), VPS35, VPS26a 또는 VPS26b의 단일 과발현 (청색, n=18), VPS35 + VPS26a 또는 VPS26b 조합 (적색, n=9), VPS35 + VPS26a + VPS26b (진한 적색, n=9), VPS26a + VPS26b (분홍색, n=9). ***P < 0.001, ns= 유의하지 않음. 도 6c 및 6d는 다변량 회귀로부터 생성된 산점도 (scatter plot)로서, VPS26a (t=5.6, p=1.4E-7) 및 VPS26b (F=7.2, p=3.2E-11)가 Sor11 수준과 독립적으로 상관 관계가 있음을 도시한 것이다. 도 6c는 VPS26a를 도시한 것이다. 도 6d는 VPS26b를 도시한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0054] 정의
- [0055] 본 명세서에서 사용되는 용어는 일반적으로 본 발명의 맥락 및 각 용어가 사용되는 특정 맥락 내에서 당해 분야에서 통상적인 의미를 갖는다. 특정 용어는 본 발명의 방법 및 이를 사용하는 방법을 설명할 때 당해 분야의 통상의 기술자에게 추가 지침을 제공하기 위해 아래 또는 명세서의 다른 곳에서 논의되어 있다. 더욱이, 동일한 것이 하나 이상의 방식으로 말해질 수 있다는 것이 이해될 것이다. 결과적으로, 대체 언어 및 동의어가 본 출원에서 논의된 용어 중 하나 이상에 대하여 사용될 수 있으며, 용어가 본 출원에서 자세히 설명되거나 논의되는지 여부에는 특별한 의미를 두지 않는다. 특정 용어에 대한 동의어가 제공되어 있다. 하나 이상의 동의어의 나열이 다른 동의어의 사용을 배제하는 것은 아니다. 본 명세서에서 논의된 임의의 용어의 예를 포함하여 명세서의 어느 곳에서도 예를 사용하는 것은 단지 예시일 뿐이며, 본 발명 또는 임의의 예시된 용어의 범위 및 의미를 결코 제한하지 않는다. 마찬가지로, 본 발명은 바람직한 실시 형태로 제한되지 않는다.
- [0056] 용어 "약" 또는 "대략"은 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하며, 이러한 오차 범위는 값이 어떻게 측정 또는 결정되는지, 즉, 측정 시스템의 한계, 즉, 약제학적 제형과 같은 특정 목적에 필요한 정밀도의 정도에 따라 다르다. 예를 들어, "약"은 당해 분야의 관행에 따라 1 또는 1 초과의 표준 편차 이내를 의미할 수 있다. 대안으로, "약"은 주어진 값의 20% 이하, 바람직하게는 10% 이하, 보다 바람직하게는 5% 이하, 더욱 더 바람직하게는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다. 대안으로, 특히 생물학적 시스템 또는 과정과 관련하여, 상기 용어는 값의 10배 이내, 바람직하게는 5배 이내, 더욱 바람직하게는 2배 이내를 의미할 수 있다. 특정 값이 본 출원 및 청구범위에 기재된 경우, 달리 명시되지 않는 한, 용어 "약"은 그 특정 값에 대해 허용 가능한 오차 범위 내를 의미하는 것으로 가정해야 한다.
- [0057] 본 출원에서 사용되는 용어 "대상체"는 치료학적 또는 예방적 치료가 필요한 동물을 의미한다. 대상체로는 개과 동물, 고양이과 동물, 설치류, 소, 말, 돼지, 양 및 영장류와 같은 포유 동물이 포함된다. 따라서, 조성물 및 방법은 수의학에서, 예를 들어, 반려 동물, 농장 동물, 동물원의 실험 동물, 및 야생 동물을 치료하는데 사용될 수 있다. 본 출원에 개시된 조성물 및 방법은 사람 의료 적용에 특히 바람직하다.
- [0058] 본 출원에서 사용되는 용어 "환자"는 사람 대상체를 의미한다. 일부 실시 형태에서, "환자"는 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온병), 다운 증후군, 유전성 경련 하반신 마비 (HSP), 및 다발성 계통 위축증 (MSA)뿐만 아니라, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)과 같은 타우병증을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되는 환자이다. 일부 실시 형태에서, "환자"는 엔도솜 트래피킹, 예를 들어, 레트로머 기능장애와 관련된 장애 또는 질환을 갖는 것으로 알려져 있거나 의심되는 환자이다.
- [0059] "치료학적 유효량"이라는 문구는 본 출원에서 대상체의 임상적으로 유의한 병태의 개선을 야기하거나, 질환 또는 장애와 관련된 하나 이상의 증상을 지연 또는 최소화 또는 완화하거나, 대상체에서 원하는 유익한 생리학적 변화를 초래하기에 충분한 양을 의미하기 위해 사용된다.
- [0060] 용어 "치료하다", "치료" 등은 질환 또는 장애의 증상 중 적어도 하나를 늦추거나, 경감시키거나, 개선시키거나 또는 경감시키거나, 또는 발병 후 질환 또는 장애를 역전시키는 것을 의미한다.
- [0061] 용어 "예방하다", "예방" 등은 질환 또는 장애의 발병을 예방하거나, 질환 또는 장애의 정도를 최소화하거나, 발병 과정을 늦추기 위해 명백한 질환 또는 장애 발병 전에 작용하는 것을 의미한다.
- [0062] 용어 "치유하다" 등의 용어는 치유하거나, 낮게 하거나, 또는 건강하게 회복시키거나, 또는 질환의 재발이 없이 시간을 내어 재발의 위험이 적도록 하는 것을 의미한다.
- [0063] 용어 "이를 필요로 하는"은 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온병), 다운 증후군, 유전성 경련 하반신 마비 (HSP), 및 다발성 계통 위축증 (MSA)뿐만 아니라, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)과 같은 타우병증을 포함하나 이에 제한되지 않는 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 갖거나 가질 위험이 있는 것으로 알려져 있거나 의심되는 대상체를 의미한다.

- [0064] 본 출원에 사용되는 용어 "작용제 (agent)"는 효과를 생성하거나 생성할 수 있는 물질을 의미하며, 벡터, 화학 물질, 의약품, 생물학적 제제, 작은 유기 분자, 항체, 핵산, 펩타이드 및 단백질이 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 본 출원에 사용되는 용어 "담체"는 치료제와 함께 투여되는 희석제, 아쥘반트 (adjuvant), 부형제 또는 비히클을 의미하며, 임의의 모든 용매, 분산매, 비히클, 코팅제, 희석제, 항균제 및 항진균제, 등장성 및 흡수 지연제, 완충제, 담체 용액, 현탁액, 콜로이드 등이 있다. 약제학적 활성 물질을 위한 이러한 매질 및 제제의 사용은 당해 분야에 잘 알려져 있다.
- [0066] 용어 "약제학적으로 허용되는"은 사람 숙주에게 투여될 때 위장 장애, 현기증 등과 같은 알려지거나 이와 유사한 이상 반응을 일으키지 않고 연방 또는 주 정부의 규제 기관의 승인을 받았거나 또는 미국 약전 또는 동물, 특히 사람에 대한 사용에 대해 일반적으로 인정되는 기타 약전에 등재되어 있는 분자 엔티티 (entity) 및 조성물을 의미한다.
- [0067] "단리된 핵산 분자"는 게놈, mRNA, cDNA 또는 합성 기원의 DNA 또는 RNA, 또는 단리된 폴리뉴클레오타이드가 자연에서 발견되거나 자연에서 연결되지 않은 폴리뉴클레오타이드에 연결되어 있는 폴리뉴클레오타이드의 전부 또는 일부와 관련이 없는 이의 일부 조합을 의미한다. 본 개시 내용의 목적상, 특정 뉴클레오타이드 서열을 "포함하는 핵산 분자"는 온전한 염색체를 포함하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 명시된 핵산 서열을 "포함하는" 단리된 핵산 분자는 명시된 서열 외에도, 최대 10개 또는 최대 20개 이상의 다른 단백질 또는 이의 부분 또는 단편에 대한 코딩 서열을 포함할 수 있거나, 또는 언급된 핵산 서열의 코딩 영역의 발현을 조절하는 작동 가능하게 연결된 조절 서열을 포함할 수 있고/하거나 벡터 서열을 포함할 수 있다.
- [0068] "제어 서열"이라는 문구는 특정 숙주 유기체에서 작동 가능하게 연결된 코딩 서열의 발현에 필요한 DNA 서열을 의미한다. 예를 들어, 원핵 생물에 적합한 제어 서열은 프로모터, 임의로, 작동 유전자 서열 및 리보솜 결합 부위를 포함한다. 진핵 세포는 프로모터, 폴리아데닐화 신호 및 인핸서를 사용하는 것으로 알려져 있다.
- [0069] 핵산은 다른 핵산 서열과 기능적 관계에 놓일 때 "작동 가능하게 연결"된다. 예를 들어, 서열 또는 분비 리더에 대한 DNA가 폴리펩타이드의 분비에 참여하는 전단백질로 발현되는 경우, 폴리펩타이드에 대한 DNA에 작동 가능하게 연결되고; 프로모터 또는 인핸서는 서열의 전사에 영향을 미치는 경우, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결되고; 또는 리보솜 결합 부위는 번역을 용이하게 하도록 위치하는 경우, 코딩 서열에 작동 가능하게 연결된다. 일반적으로 "작동 가능하게 연결된"은 연결되는 DNA 서열이 인접하고, 분비 리더의 경우, 인접하고 판독 단계에 있다는 것을 의미한다. 그러나, 인핸서는 인접할 필요가 없다. 연결은 편리한 제한 부위에서의 연결에 의해 달성된다. 그러한 부위가 존재하지 않는 경우, 합성 올리고뉴클레오타이드 어댑터 또는 링커가 통상적인 실시예에 따라 사용된다.
- [0070] 본 출원에서 사용되는 표현 "세포", "세포주" 및 "세포 배양물"은 상호 교환적으로 사용되며 이러한 모든 명칭은 자손을 포함한다. 따라서, 용어 "형질 전환체" 및 "형질 전환된 세포"는 전달 횟수에 관계 없이 1차 대상 세포 및 이로부터 유래된 배양물을 포함한다. 또한, 고의적이거나 부주의한 돌연변이로 인해 모든 자손이 정확히 동일한 DNA 함량을 갖는 것은 아니라는 것도 이해된다. 원래 형질 전환된 세포에서 스크리닝된 것과 동일한 기능 또는 생물학적 활성을 갖는 돌연변이 자손이 포함된다. 별개의 명칭이 의도된 경우, 이는 문맥으로부터 명확해질 것이다.
- [0071] 일부 양태에서, 본 개시 내용은 단리된 아데노 관련 바이러스 벡터 (AAV)를 제공한다. AAV와 관련하여 본 출원에 사용된 용어 "단리된"은 이의 자연 환경 (예를 들어, 숙주 세포, 조직 또는 대상체)으로부터 단리되거나 인공적으로 생성된 AAV를 의미한다. 단리된 AAV는 제조합 방법을 사용하여 생성할 수 있다. 이러한 AAV는 본 출원에서는 "제조합 AAV"로 지칭된다. 제조합 AAV (rAAV)는 바람직하게는 rAAV의 이식유전자가 하나 이상의 예정된 조직(들)에 특이적으로 전달될 수 있도록 조직 특이적 표적화 능력을 갖는다. AAV 캡시드는 이러한 조직 특이적 표적화 능력을 결정하는 중요한 요소이다.
- [0072] 원하는 캡시드 단백질을 갖는 제조합 AAV를 얻는 방법이 기술되어 왔다 (예를 들어, 미국 특허 US 7,906,111 참조). 다수의 상이한 AAV 캡시드 단백질이 예를 들어, 문헌 [Gao, *et al.*, *J. Virology* 78(12):6381-6388 (June 2004)]; [Gao, *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100(10):6081-6086 (May 13, 2003)]; 및 미국 특허 US 7,906,111 및 미국 특허 US 8,999,678에 기재되어 있다. 현재 기재된 작제물 및 방법의 원하는 패키징을 위한 실시 형태에서, 제조합 AAV는 AAV9 또는 AAV10 벡터 및 캡시드일 수 있다. 그러나, rAAVrh.8 및 rAAVrh.10과 같은 다른 적합한 AAV, 또는 다른 유사한 벡터가 본 방법 및 조성물에 사용하기 위해 개조될 수 있다는 것에 유

의한다. 대표적으로, 방법은 AAV 캡시드 단백질 또는 이의 단편을 암호화하는 핵산 서열, 기능적 rep 유전자, AAV 역 말단 반복부 (ITR) 및 이식유전자로 구성된 재조합 AAV 벡터, 및 재조합 AAV 벡터의 AAV 캡시드 단백질을 패키징을 가능하게 하기에 충분한 헬퍼 기능을 포함하는 숙주 세포를 배양하는 단계를 포함한다.

[0073] AAV 캡시드에 rAAV 벡터를 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양될 성분은 트랜스 (trans)로 숙주 세포에 제공될 수 있다. 대안으로, 필요한 성분 (예를 들어, 재조합 AAV 벡터, rep 서열, cap 서열 및/또는 헬퍼 기능) 중 어느 하나 이상은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려진 방법을 사용하여 필요 성분 중 하나 이상을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다. 가장 적합하게는, 이러한 안정한 숙주 세포는 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 필요한 성분(들)을 함유할 것이다. 그러나, 필요한 성분(들)은 항시성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다. 또 다른 대안으로, 선택된 안정한 숙주 세포는 항시성 프로모터의 제어 하에 있는 선택된 성분(들) 및 하나 이상의 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 다른 선택된 성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, 293 세포 (항시성 프로모터의 제어 하에 E1 헬퍼 기능을 함유함)로부터 유래되지만, 유도성 프로모터의 제어 하에 있는 rep 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다.

[0074] rAAV를 생성하기 위한 재조합 AAV 벡터, rep 서열, 캡 서열, 및 헬퍼 기능은 임의의 적절한 유전 (genetic) 요소 (벡터)를 사용하여 패키징 숙주 세포에 전달될 수 있다. 선택된 유전 요소는 본 출원에 기재된 방법을 비롯한 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Fisher *et al.*, *J. Virology* 70:520-532 (1993)] 및 미국 특허 US 5,478,745]를 참조한다.

[0075] 일부 실시 형태에서, 재조합 AAV는 삼중 형질 감염 방법을 사용하여 생성될 수 있다 (예를 들어, 미국 특허 US 6,001,650에 상세히 기재된 바와 같음). 일반적으로, 재조합 AAV는 AAV 입자에 패키징될 재조합 AAV 벡터 (이식유전자를 포함함), AAV 헬퍼 기능 벡터 및 보조 (accessory) 기능 벡터로 숙주 세포를 형질 감염시킴으로써 생성된다.

[0076] AAV 헬퍼 기능 벡터는 생산적인 AAV 복제 및 캡슐화를 위해 트랜스로 기능하는 "AAV 헬퍼 기능" 서열 (즉, rep 및 cap)을 암호화한다. 바람직하게는, AAV 헬퍼 기능 벡터는 검출 가능한 야생형 AAV 비리온 (즉, 기능적 rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 비리온)을 생성하지 않고 효율적인 AAV 벡터 생성을 지원한다. 사용하기에 적합한 벡터의 비제한적인 예로는 그 전체가 본 출원에 참조로 포함되는 미국 특허 US 6,001,650에 기재된 pHLP19 및 그 전체가 본 출원에 참조로 포함되는 미국 특허 US 6,156,303에 기재된 pRep6cap6 벡터가 포함된다. 보조 기능 벡터는 AAV가 복제를 위해 의존하는 비-AAV 유래 바이러스 및/또는 세포 기능 (즉, "보조 기능")을 위한 뉴클레오타이드 서열을 암호화한다. 보조 기능에는 AAV 유전자 전사의 활성화, 단계 특이적 AAV mRNA 스플라이싱, AAV DNA 복제, 캡 발현 산물의 합성, 및 AAV 캡시드 어셈블리에 관여하는 모이머가 포함되지만 이에 제한되지 않는 AAV 복제에 필요한 기능이 포함된다. 바이러스 기반 보조 기능은 아데노바이러스, 헤르페스바이러스 (단순포진 바이러스 유형-1 제외) 및 백시니아 바이러스와 같은 알려진 헬퍼 바이러스에서 유래될 수 있다.

[0077] 본 출원에서 사용되는 용어 "AAV1", "AAV2", "AAV3", "AAV4" 등은 각각 AAV1, AAV2, AAV3 또는 AAV4 유래의 ITR을 함유할 뿐만 아니라 각각 AAV1, AAV2, AAV3 또는 AAV4 유래의 캡시드 단백질을 포함하는 AAV 벡터를 의미한다. 용어 "AAV2/1", "AAV2/8", "AAV2/9" 등은 AAV2 유래의 ITR 및 각각 AAV1, AAV8 또는 AAV9 유래의 캡시드 단백질을 함유하는 위형 AAV 벡터를 의미한다.

[0078] 형질 감염된 숙주 세포와 관련하여, 용어 "형질 감염"은 세포에 의한 외래 DNA의 흡수를 지칭하기 위해 사용되며, 외인성 DNA가 세포막 내부에 도입된 경우 세포는 "형질 감염"되었다. 다수의 형질 감염 기법이 당해 분야에 일반적으로 알려져 있다. 예를 들어, 문헌 [Graham *et al.*, *Virology* 52:456 (1973)], [Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratories, New York (1989)], [Davis *et al.*, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier (1986)] 및 [Chu *et al.*, *Gene* 13:197 (1981)]을 참조한다. 이러한 기법은 뉴클레오타이드 통합 벡터 및 기타 핵산 분자와 같은 하나 이상의 외인성 핵산을 적합한 숙주 세포에 도입하는데 사용될 수 있다.

[0079] "숙주 세포"는 관심 물질을 보유하거나 보유할 수 있는 임의의 세포를 의미한다. 종종 숙주 세포는 포유 동물 세포이다. 숙주 세포는 AAV 헬퍼 작제물, AAV 미니유전자 플라스미드, 보조 기능 벡터, 또는 재조합 AAV 벡터의 생성과 관련된 다른 전달 DNA의 수용자로서 사용될 수 있다. 이 용어는 형질 감염된 원래 세포의 자손을 포함한다. 따라서, 본 출원에서 사용되는 "숙주 세포"는 외인성 DNA 서열로 형질 감염된 세포를 의미할 수 있다. 단일 모 세포의 자손은 자연적, 우발적 또는 고의적 돌연변이로 인해 형태 또는 계놈 또는 전체 DNA 보체가 원래 모체와 반드시 완전히 동일하지 않을 수 있는 것으로 이해된다.

- [0080] 세포와 관련하여, 용어 "단리된"은 이의 자연 환경 (예를 들어, 조직 또는 대상체)으로부터 단리된 세포를 의미한다. 용어 "세포주"는 시험관내에서 연속적으로 또는 연장된 시간 동안 성장 및 분열할 수 있는 세포 집단을 의미한다. 종종, 세포주는 단일 전구 세포로부터 유래된 클론 집단이다. 또한, 이러한 클론 집단의 저장 또는 전달 동안 핵형의 자발적 또는 유도된 변화가 발생할 수 있다는 것이 당해 분야에 알려져 있다. 따라서, 언급된 세포주로부터 유래된 세포는 조상 세포 또는 배양물과 정확히 동일하지 않을 수 있으며, 언급된 세포주는 이러한 변이체를 포함한다. 본 출원에서 사용되는 용어 "재조합 세포"는 생물학적 활성 폴리펩타이드의 전사 또는 RNA와 같은 생물학적 활성 핵산의 생성을 유도하는 DNA 분절과 같은 외인성 DNA 분절이 도입된 세포를 의미한다.
- [0081] 용어 "벡터"는, 이는 적절한 제어 요소와 연관될 때 복제할 수 있고 세포 간에 유전자 서열을 전달할 수 있는 플라스미드, 파지, 트랜스포존, 코스미드, 염색체, 인공 염색체, 바이러스 또는 비리온과 같은 임의의 유전 요소를 포함한다. 따라서, 이 용어는 클로닝 및 발현 비히클 뿐만 아니라 바이러스 벡터를 포함한다. 일부 실시 형태에서, 유용한 벡터는 전사될 핵산 단편이 프로모터의 전사 제어 하에 위치하는 벡터인 것으로 고려된다. "프로모터"는 유전자의 특정 전사를 개시하는데 필요한 세포의 합성 기계 (machinery) 또는 도입된 합성 기계에 의해 인식되는 DNA 서열을 의미한다. "작동적으로 위치된", "작동적으로 연결된", "제어 하에" 또는 "전사 제어 하에"라는 문구는 프로모터가 RNA 폴리머라아제 개시 및 유전자 발현을 제어하기 위해 핵산에 관하여 정확한 위치 및 방향에 있다는 것을 의미한다.
- [0082] 용어 "발현 벡터" 또는 "발현 작제물" 또는 "작제물"은 핵산 코딩 서열의 일부 또는 전부가 전사될 수 있는 핵산을 함유하는 임의의 유형의 유전적 작제물을 의미한다. 일부 실시 형태에서, 발현은, 예를 들어, 전사된 유전자로부터 생물학적 활성 폴리펩타이드 생성물 또는 억제 RNA를 생성하기 위한 핵산의 전사를 포함한다.
- [0083] 분자 생물학의 표준 방법은 문헌 [Sambrook, Fritsch and Maniatis *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1982 & 1989 2nd Edition, 2001 3rd Edition)]; [Sambrook and Russell *Molecular Cloning*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (2001)]; [Wu *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA) (1993)]에 기재되어 있다. 또한, 표준 방법은 문헌 [Ausbel, *et al. Current Protocols in Molecular Biology, Vols.1-4*, John Wiley and Sons, Inc. New York, NY (2001)]에서도 나타나 있다.
- [0084] 레트로머 및 신경 퇴행성 질환
- [0085] 알츠하이머병 (AD)의 유전학, 세포 병리학 및 세포 생물학은 알츠하이머 병인의 주요 결함으로서 엔도솜 트래피킹에 수렴되어 왔다. 세 가지 증거가 AD에 레트로머 기능장애를 연루시켰다. 첫째로, 유전자 및 유전자 발현 연구에서는 선의의 기능 상실 돌연변이를 포함하여, 증가하는 수의 AD와 관련된 레트로머 관련 분자도 확인되었다. 둘째, 레트로머 기능장애는 아밀로이드 전구체 단백질 (APP)의 단편이 축적되는 확장된 기능장애 엔도솜을 특징으로 하는 알츠하이머병의 세포병리를 되풀이한다. 셋째, 레트로머 기능 장애는 뉴런에서의 APP 및 미세아교세포에서의 식세포 수용체를 비롯하여, 다수의 AD 관련 분자를 잘못 이동시킨다.
- [0086] 레트로머는 엔도솜 트래피킹의 '마스터 안내자 (master conductor)'인 다중 단백질 복합체이다. 레트로머의 코어는 3가지 상이한 단백질의 삼량체로, 기술적으로는 이종삼량체 (heterotrimer)이다. 그 단백질은 모두 'Vacuolar Protein Sorting' (VPS) 단백질 계열의 구성원이다. VPS35는 VPS29 및 VPS26이 결합하는 삼량체 코어의 중심 단백질이다. VPS26은 VPS26a 및 VPS26b라는 두 개의 파라로그를 갖는 유일한 코어 단백질이다. 따라서, 뉴런에는 VPS29-VPS35-VPS26a 및 VPS29-VPS35-VPS26b라는 두 개의 서로 다른 레트로머 코어가 있다. 도 1을 참조한다.
- [0087] 이들 코어 단백질은 과발현될 때 내인성 레트로머 성분에 결합하여 레트로머 기능을 증가시킬 수 있다. 이들 단백질은 세포 내부에서 매우 엄격하게 자가 조절된다. 이러한 장벽을 극복하기 위해, 본 출원에 기재된 바와 같이 2개의 레트로머 단백질이 동시에 공동 발현된다.
- [0088] 약리학적 샤페론이나 바이러스 벡터를 통해 VPS35 수준을 증가시키면 레트로머의 기능이 증가한다. VPS35 또는 VPS26과 비교하여 VPS29 단백질은 잉여로 존재할 수 있다. 본 출원에 나타난 바와 같이, VPS35 및 VPS26a 둘 모두 또는 VPS35 및 VPS26b 둘 모두의 공동 발현은 각각 VPS35 및 VPS26a 또는 VPS35 및 VPS26b의 세포 수준에 상승적 영향을 미친다.
- [0089] 또한, 레트로머 기능에 대한 증거는 알츠하이머병에서 관찰되는 Sor11 결핍의 정도를 반영하는 효과 크기 (effect size)인 약 34%까지 Sor11 수준의 증가에 의해 확인된다 (문헌 [Sager *et al.* 2007]; [Scherzer *et*

al. 204]; [Dodson et al. 2006]). 연구 전반에 걸친 Sor11의 효과에 대한 광범위한 비교는 레트로머 기능에 대한 정보를 제공한다. 첫 번째 뉴런 연구에서, VPS35가 단독으로 과발현되었을 때 3개의 레트로머 코어 단백질 중 2개가 강력하게 상승하였지만 레트로머 기능에는 영향을 미치지 않았다. 두 번째 뉴런 연구에서, 상승 작용 덕분에 삼량체 단백질 세 개 모두 강력하게 상승했을 때 레트로머 기능이 증가하였다. 이 결과는 레트로머의 전체 기능을 상향 조절하기 위해 세 개의 레트로머 코어 단백질 모두가 함께 상승될 필요가 있다는 일차적 경험적 증거를 제공한다. 본 출원에서의 연구는 레트로머의 화학량론 및 단백질-단백질 상호 작용을 이용함으로써 3가지 단백질 모두를 외인성으로 발현할 필요가 없음을 보여준다. 또한, VPS35 및 VPS26을 외인성으로 발현하는 것은 VPS29의 수준을 상향 조절하고 레트로머의 엔도솜 화물 재활용 기능을 증가시키기에 충분하다.

[0090] 또한, VPS26a 및 VPS26b의 수준은 서로 독립적이고, 따라서 조합의 적절한 선택은 하나의 레트로머 이종삼량체를 다른 것에 비해 선택적으로 증가시킬 수 있다는 것이 중요하게 본 출원에서 확인된다.

[0091] 본 출원에서는 생체내 레트로머 수준 및 기능을 증가시키는 생물학적 기반 방법이 설명되어 있다: 재조합 AAV (아데노 관련 아데노바이러스) 기술의 사용에 의한 레트로머의 과발현. 레트로머 기반 치료제에 사용할 새로운 레트로머-AAV 도구를 확립하는 것은, 최근 임상 적용을 위해 승인된 이 바이러스 전달 시스템이 유기체 내에서 소분자가 직면하는 장애물 (즉, 낮은 흡수율, 분해, 독성, 표적/장기 특이성 결여, 혈액 뇌 장벽 투과성)을 우회할 수 있기 때문에 높은 영향을 미칠 것이다. AAV 벡터 및 레트로머 이식유전자(들)를 포함하는 조성물은 치료제의 증가된 발현, 엄격한 단백질 자가조절의 우회, 안정화된 단백질의 장기간 발현 가능성, 및 안정화된 단백질의 반감기 증가를 비롯한 많은 이점을 갖는다.

[0092] 신경 퇴행성 질환의 치료, 예방 및/또는 치유 방법

[0093] 기술된 유전자 요법의 투여로부터 이익을 받을 환자는 알츠하이머병 (AD), 파킨슨병 (PD), 뉴런 세로이드 리포푸신증 (NCL), 전염성 해면상 뇌병증 (TSE 또는 프리온병), 다운 증후군, 유전성 경련 하반신 마비 (HSP) 및 다발성 계통 위축증 (MSA)뿐만 아니라, 진행성 핵상 마비 (PSP), 염색체 17q21-22와 관련된 전두측두엽 치매 및 이의 아형 (FTLD-17/FTLD-Tau), 루이소체병 (LBD), 근위축성 측삭 경화증 (ALS), 전두측두엽 변성 (FTD), ALS-FTD 및 만성 외상성 뇌병증 (CTE)과 같은 타우병증을 포함하나 이에 제한되지 않는, 엔도솜 트래피킹 결함이 연루된 신경 퇴행성 질환 또는 장애로 진단받은 환자를 포함한다.

[0094] 이들 환자에서, 레트로머 코어 단백질 중 하나 이상을 암호화하는 핵산을 함유하는 조성물 (예를 들어, 이러한 핵산을 함유하는 AAV 벡터와 같은 바이러스 벡터)이 환자에게 투여될 수 있다. 이들 조성물은 단독으로 또는 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 치료를 위한 다른 작용제와 조합하여 투여될 수 있다.

[0095] 일부 실시 형태에서, 본 개시 내용은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함하는 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV)와 같은 조성물 또는 조성물들을 이를 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여함으로써, 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방, 치유하고/하거나 이의 중증도 또는 정도를 감소시키는 방법을 제공한다. 일부 실시 형태에서, 바이러스 벡터는 rAAV2-레트로, AAV10, AAV2/10, AAV9 또는 AAV2/9와 같은 AAV이다. 일부 실시 형태에서, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함하는 조성물 또는 조성물들 (예를 들어, AAV와 같은 바이러스 벡터)은 신경 퇴행성 질환 또는 장애가 진단되거나 의심되자마자 투여된다. 실시 형태에서, 투여된 조성물은 VPS35 및 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS35를 암호화하는 핵산, 및 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물을 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS35를 암호화하는 핵산, VPS26a를 암호화하는 핵산, 및 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물을 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 VPS26a를 암호화하는 핵산 및 VPS26b를 암호화하는 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물을 동시에 또는 순차적으로 투여하는 단계를 포함한다.

[0096] 일부 실시 형태에서, 투여되는 이식유전자를 포함하는 AAV 벡터의 양은 약 4.2×10^{11} 또는 4.2×10^{10} 개 게놈 또는 벡터 또는 벡터 카피이다.

[0097] 또한, 본 개시 내용은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 제1 조성물 (예를 들어, AAV와 같은 바이러스 벡터)을 이를 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하고, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 제2 조성물 (예를 들어, AAV와

같은 바이러스 벡터)을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여함으로써, 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방, 치유하고/하거나 이의 중증도 또는 정도를 감소시키는 방법을 제공한다. 실시 형태에서, 방법은 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 핵산을 함유하는 치료학적 유효량의 제1 조성물 및 레트로머 코어 단백질 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 치료학적 유효량의 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다. 실시 형태에서, 방법은 레트로머 코어 단백질 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 치료학적 유효량의 제1 조성물 및 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 핵산을 함유하는 치료학적 유효량의 제2 조성물을 투여하는 단계를 포함한다.

[0098] 또한, 본 개시 내용은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 제1 조성물 (예를 들어, AAV와 같은 바이러스 벡터)을 이룰 필요로 하는 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하고, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 제2 조성물 (예를 들어, AAV와 같은 바이러스 벡터)을 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여하고, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유하는 제3 조성물 (예를 들어, AAV와 같은 바이러스 벡터)를 대상체에게 치료학적 유효량으로 투여함으로써, 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방, 치유하고/하거나 이의 중증도 또는 정도를 감소시키는 방법을 제공한다. 실시 형태에서, 제1, 제2 및 제3 조성물은 각각 레트로머 코어 단백질 VPS35, VPS26a 또는 VPS26b를 암호화하는 핵산을 함유한다.

[0099] 일부 실시 형태에서, 제1 및 제2 및 제3 AAV 벡터는 각각 독립적으로 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 VPS26b 레트로머 코어 단백질을 암호화하는 AAV9 벡터이다. 일부 실시 형태에서, 제1 AAV 벡터 및 제2 AAV 벡터 및 제3 AAV 벡터는 동시에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제1 AAV 벡터는 제2 AAV 벡터보다 먼저 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제2 AAV 벡터는 제3 AAV 벡터보다 먼저 투여된다.

[0100] 일부 실시 형태에서, 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 신경 퇴행성 질환 또는 장애가 진단되거나 의심되자마자 투여되고, 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제1 조성물 이후 특정 시점에서 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 수시간 내에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 수일 이내에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 몇 주 후에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 및 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 임의의 주어진 시점에서 동시에 투여된다.

[0101] 일부 실시 형태에서, 제3 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제2 조성물 투여 후 특정 시점에서 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 수시간 내에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 수일 이내에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 제3 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 투여 후 몇 주 후에 투여된다.

[0102] 일부 실시 형태에서, 제1 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 및 제2 조성물 (예를 들어, AAV 벡터) 및 제3 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 신경 퇴행성 질환 또는 장애가 진단되거나 의심되는 때 또는 그 이후를 포함하여 임의의 주어진 시점에서 동시에 투여된다. 일부 실시 형태에서, 3개의 조성물 (예를 들어, AAV 벡터)은 동일한 더 큰 조성물 내에 존재하고, 일부 실시 형태에서는 그 3개는 별개의 조성물이다.

[0103] 본 출원에 기재된 방법의 실시 형태에서, VPS35 및 VPS26b (이는 피질에서 우선적으로 발현됨)를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물은, 엔도솜 트래피킹 결함이 주로 피질에서 발생하며 VPS35가 영향을 받지 않는 장애를 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여된다. VPS35가 영향을 받지 않는 피질 엔도솜 트래피킹 장애의 예로는 바이오마커 음성 산발성 AD, SORL1 돌연변이가 있는 AD 환자, FTD, 프리온 질환 및 다운 증후군이 있다.

[0104] 본 출원에 기재된 방법의 다른 실시 형태에서, VPS35 및 VPS26a (이는 피질하 (subcortex)에서 우선적으로 발현됨)를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물은 바이오마커 음성 산발성 PD, HSP, 프리온 질환 및 NCL과 같은, 엔도솜 트래피킹 결함이 피질하 영역에서 주로 발생하는 장애를 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여된다.

[0105] 본 출원에 기재된 방법의 다른 실시 형태에서, VPS35, VPS26a 및 VPS26b를 암호화하는 하나 이상의 핵산을 포함하는 하나 이상의 조성물은 루이소체병 (LBD), 프리온병 및 ALS-FTD와 같은, 질환이 더욱 광범위한 엔도솜 트레

피킹 신경계 장애 (endosomal trafficking neurological disorder)를 갖거나 발병할 위험이 있는 대상체에게 투여된다.

- [0106] 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방, 치유하고/하거나 이의 중증도 또는 정도를 감소시키는 외에도, 실시 형태에서, 본 출원에 기재된 방법 및 조성물은 엔도솜 트래피킹 및 레트로머 기능장애와 관련이 있는 다른 장애 또는 질환을 치료, 예방, 치유하고/하거나 이의 중증도를 감소시키는데 사용된다.
- [0107] 제조합 AAV 벡터
- [0108] 본 출원에 기재된 "제조합 AAV (rAAV) 벡터"는 일반적으로 이식유전자 (예를 들어, 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화함)를 포함한다. 이식유전자는 5'- 및 3'-ITR에 의해 플랭킹 (flanking)되고 표적 조직의 세포에서 이식유전자 전사, 번역 및/또는 발현을 가능하게 하도록 하나 이상의 조절 요소에 작동 가능하게 연결될 수 있다. 이러한 조절 요소는 본 출원에 기재된 것들 중에서 닭 베타 액틴 프로모터 또는 사이토메갈로바이러스 인핸서와 같은 프로모터 또는 인핸서를 포함할 수 있다. 제조합 AAV 계놈은 일반적으로 캡시드 단백질 (예를 들어, ITR이 유래된 것과 동일한 AAV 혈청형 유래 또는 ITR이 유래된 것과 상이한 AAV 혈청형 유래)에 의해 캡슐화된다. 그 다음, AAV 벡터는 선택된 표적 세포 유형 또는 조직으로 전달될 수 있다. 일부 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35, VPS26a 및/또는 VPS26b 중 하나 이상을 암호화하는 벡터 서열에 이종성 (heterologous)인 핵산 서열이다. 본 개시 내용의 조성물 및 방법과 함께 사용될 수 있는 예시적인 AAV 벡터의 성분은 본 출원에 기재되어 있다.
- [0109] 임의의 AAV 혈청형 또는 AAV 혈청형의 조합이 본 개시 내용의 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 본 개시 내용의 방법 및 조성물은 신경 퇴행성 질환 또는 장애의 치료 및 치유를 위한 것이기 때문에, 적어도 중추 신경계를 표적화하는 AAV 혈청형이 일부 실시 형태에서 사용될 수 있고 이에 AAV1, AAV2, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9 및 AAV10이 포함되나 이에 제한되지 않는다.
- [0110] 일부 실시 형태에서, 넓은 지향성 (tropism)을 갖는 AAV9 혈청형이 사용된다. 일부 실시 형태에서, AAV2/9가 사용된다.
- [0111] AAV 벡터의 성분
- [0112] 본 출원에 기재된 AAV 벡터는 시스 작용 5' 및 3' ITR을 함유할 수 있다. 예를 들어, 문헌 [Carter, in "Handbook of Parvoviruses", ed., P. Tijsser, CRC Press, pp. 155 168 (1990)]을 참조한다. ITR 서열은 일반적으로 길이가 약 145bp이다. 바람직하게는, ITR을 암호화하는 실질적으로 전체 서열이 그 분자에 사용되지 만, 이들 서열의 약간의 변형은 허용된다. 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, (1989)] 및 [Fisher *et al.*, (1996)]과 같은 텍스트를 참조한다. 이러한 분자의 예는, 선택된 이식유전자 서열 및 관련 조절 요소가 5' 및 3' AAV ITR 서열에 의해 플랭킹되는 이식유전자를 함유하는 "시스 작용" 플라스미드이다. AAV ITR 서열은 현재 확인된 포유 동물 AAV 유형을 포함하는 임의의 알려진 AAV로부터 얻을 수 있다.
- [0113] 제조합 AAV 벡터에 대해 위에서 확인된 요소 이외에, 벡터는 또한 플라스미드 벡터로 형질 감염되거나 바이러스로 감염된 세포에서 이의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 이식유전자에 작동 가능하게 연결된 통상적인 조절 요소를 포함할 수 있다. 본 출원에서 사용되는 "작동 가능하게 연결된" 서열은 관심 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 관심 유전자를 제어하기 위해 트랜스로 또는 거리를 두고 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다. 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 프로모터 및 인핸서 서열; 스플라이싱 및 폴리아데닐화 (polyA) 신호와 같은 효율적인 RNA 처리 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 향상시키는 서열 (즉, Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 향상시키는 서열; 및 원하는 경우, 암호화된 생성물의 분비를 향상시키는 서열을 포함한다. 천연, 항시성, 유도성 및/또는 조직 특이적인 프로모터를 포함하는 다수의 발현 제어 서열이 당해 분야에 공지되어 있고 이용될 수 있다.
- [0114] 본 출원에 사용된 바와 같이, 핵산 서열 (예를 들어, 코딩 서열) 및 조절 서열은 핵산 서열의 발현 또는 전사가 조절 서열의 영향 또는 제어 하에 놓이도록 하는 방식으로 공유 연결되는 경우 작동 가능하게 연결된 것이라 말한다. 핵산 서열이 기능적 단백질로 번역되는 것이 바람직한 경우, 5' 조절 서열에서 프로모터의 유도가 코딩 서열의 전사를 초래하고 두 DNA 서열 사이의 연결이 (1) 프레임 이동 돌연변이의 도입을 초래하지 않거나, (2) 코딩 서열의 전사를 지지하는 프로모터 영역의 능력을 방해하지 않거나, (3) 단백질로 번역될 상응하는 RNA 전사체 능력을 방해하지 않는 경우, 두 개의 DNA 서열은 작동 가능하게 연결되어 있다고 한다. 따라서, 프로모터 영역은, 생성된 전사체가 원하는 단백질 또는 폴리펩타이드로 번역될 수 있도록 프로모터 영역이 그 DNA 서열의 전사에 영향을 미칠 수 있는 경우, 핵산 서열에 작동 가능하게 연결될 것이다. 유사하게, 2개 이상의 코딩 영

역은 공통 프로모터로부터의 이의 전사가 2개 이상의 단백질의 발현을 초래하는 방식으로 연결되는 경우 작동 가능하게 연결된다. 일부 실시 형태에서, 작동 가능하게 연결된 코딩 서열은 융합 단백질을 생성한다. 일부 실시 형태에서, 작동 가능하게 연결된 코딩 서열은 기능적 RNA (예를 들어, shRNA, miRNA)를 생성한다. 일부 실시 형태에서, 작동 가능하게 연결된 코딩 서열은 2개 이상의 별개의 기능적 단백질 (예를 들어, VPS35 및 VPS26a 또는 VPS26b)을 생성한다.

- [0115] 단백질을 암호화하는 핵산의 경우, 폴리아데닐화 서열은 일반적으로 이식유전자 서열 다음에 그리고 3' AAV ITR 서열 앞에 삽입된다. 또한, 본 개시 내용의 rAAV 작제물은 바람직하게는 프로모터/인핸서 서열과 이식유전자 사이에 위치하는 인트론을 함유할 수 있다. 하나의 가능한 인트론 서열은 SV-40에서 유래되며 SV-40 T 인트론 서열이라고 한다.
- [0116] 사용될 수 있는 또 다른 벡터 요소는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)이다. IRES 서열은 단일 전사체로부터 하나 이상의 폴리펩타이드 또는 단백질을 생성하는데 사용된다. IRES 요소는 예를 들어, 동일한 AAV 벡터로부터 VPS35 및 VPS26a, VPS35 및 VPS26b, 또는 VPS26a 및 VPS26b를 발현하는데 사용될 수 있다.
- [0117] 숙주 세포에서 유전자 발현에 필요한 조절 서열의 정확한 특성은 종, 조직 또는 세포 유형에 따라 다를 수 있지만, 필요에 따라 TATA 박스, 캡핑 서열, CAAT 서열, 인핸서 요소 등과 같은, 전사 및 번역의 개시와 관련된 5' 비전사 및 5' 비번역 서열을 일반적으로 포함한다. 특히, 이러한 5' 비-전사 조절 서열은 작동 가능하게 연결된 유전자의 전사 조절을 위한 프로모터 서열을 포함하는 프로모터 영역을 포함할 수 있다. 또한, 조절 서열은 원하는 경우 인핸서 서열 또는 업스트림 활성화인자 서열을 포함할 수 있다. 벡터는 5' 리더 또는 신호 서열을 임의로 포함할 수 있다.
- [0118] 항상성 프로모터의 예로는 닭 베타 액틴 프로모터, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스 (RSV) LTR 프로모터 (임의로, RSV 인핸서 포함), 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 (임의로, CMV 인핸서 포함), SV40 프로모터, 디하이드로폴레이트 리덕타제 프로모터, β -액틴 프로모터, 포스포글리세롤 키나아제 (PGK) 프로모터, 및 사람 신장 인자-1a (EF1a) 프로모터 (Invitrogen사)가 포함되지만 이에 제한되지는 않는다.
- [0119] 유도성 프로모터는 유전자 발현의 조절을 가능하게 하고 외부에서 공급된 화합물, 온도와 같은 환경 요인, 또는 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해 조절될 수 있거나 복제 세포에서만 조절될 수 있다. 유도성 프로모터 및 유도성 시스템은 Invitrogen사, Clontech사 및 Ariad사를 포함하나 이에 제한되지 않는 다양한 상업적 출처로부터 입수할 수 있다. 외부에서 공급된 프로모터에 의해 조절되는 유도성 프로모터의 예로는 아연 유도성 양 (sheep) 메탈로티오닌 (MT) 프로모터, 텍사메타손 (Dex) 유도성 마우스 유방 종양 바이러스 (MMTV) 프로모터, T7 폴리머라아제 프로모터 시스템 (국제공개공보 WO 98/10088; 엑디손 곤충 프로모터 (문헌 [No *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:3346-3351 (1996)]), 테트라사이클린 억제 시스템 (문헌 [Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551 (1992)]), 테트라사이클린 유도성 시스템 (문헌 [Gossen *et al.*, *Science* 268:1766-1769 (1995)]), RU486 유도성 시스템 (문헌 [Wang *et al.*, *Nat. Biotech.* 15:239-243 (1997)] 및 [Wang *et al.*, *Gene Ther.* 4:432-441 (1997)]), 및 라파마이신 유도성 시스템 (문헌 [Magari *et al.*, *J. Clin. Invest.* 100:2865-2872 (1997)])이 포함된다. 이와 관련하여 유용할 수 있는 또 다른 유형의 유도성 프로모터는 특정 생리학적 상태, 예를 들어, 온도, 급성기, 세포의 특정 분화 상태에 의해 조절되거나 또는 복제 세포에서만 조절되는 것들이다.
- [0120] 또 다른 실시 형태에서, 이식유전자에 대한 천연 프로모터 또는 이의 단편이 사용될 수 있다. 이식유전자의 발현이 고유 발현 (native expression)을 모방해야 하는 것이 바람직한 경우 천연 프로모터가 바람직할 수 있다. 천연 프로모터는 이식유전자의 발현이 일시적으로 또는 발생적으로, 또는 조직 특이적으로, 또는 특정 전사 자극에 반응하여 조절되어야 할 때 사용될 수 있다. 추가의 실시 형태에서, 인핸서 요소, 폴리아데닐화 부위 또는 Kozak 공통 서열과 같은 다른 고유 발현 제어 요소를 또한 사용하여 고유 발현을 모방할 수 있다.
- [0121] 일부 실시 형태에서, 조절 서열은 조직 특이적 유전자 발현 능력을 부여한다. 일부 경우에, 조직 특이적 조절 서열은 조직 특이적 방식으로 전사를 유도하는 조직 특이적 전사 인자에 결합한다.
- [0122] 일부 실시 형태에서, 하나 이상의 miRNA에 대한 하나 이상의 결합 부위는 rAAV 벡터의 도입유전자에 통합되어, 이식유전자를 보유하는 대상체의 하나 이상의 조직에서 이식유전자의 발현을 억제한다. mRNA의 miRNA 표적 부위는 5'-UTR, 3'-UTR 또는 코딩 영역에 있을 수 있다. 일반적으로, 표적 부위는 mRNA의 3' UTR에 있다. 또한, 이식유전자는 다중 miRNA가 동일 또는 다중 부위를 인식함으로써 mRNA를 조절하도록 설계될 수 있다. 다중 miRNA 결합 부위의 존재는 다중 RISC의 협력 작용을 일으키고 발현의 매우 효율적인 억제를 제공할 수 있다.

표적 부위 서열은 총 5 내지 100개, 10 내지 60개 또는 그 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다. 표적 부위 서열은 표적 유전자 결합 부위의 서열 중 5개 이상의 뉴클레오타이드를 포함할 수 있다.

[0123] 예를 들어, 간에서 이식유전자의 발현을 억제하는 3'-UTR 부위는 이식유전자에 통합될 수 있다. 이는 투여된 바이러스의 대부분 (약 60 내지 90%)이 결국 간에서 발견되기 때문에 간에 독성이 있는 치료학적 단백질을 암호화하는 이식유전자에 유익할 수 있다. 따라서, 간에서 치료 유전자 발현을 억제하면 간세포의 부담이 경감된다.

[0124] 일부 실시 형태에서, AAV 벡터는 자가 보완 (self-complementing) AAV가 되도록 변형될 수 있다. 자가 보완 AAV는 이식유전자의 상보적 서열 (즉, 이식유전자의 이중 카피)을 운반한다. 자기 보완은 유전자가 세포에 들어간 후 그 유전자를 더욱 안정적으로 만든다.

[0125] 이식유전자 코딩 서열

[0126] 본 출원에 기재된 이식유전자의 핵산 서열은 이식유전자를 발현할 특정 조성 (예를 들어, 바이러스 벡터)에 대한 지식을 기반으로 설계될 수 있다. 예를 들어, 한 유형의 이식유전자 서열은 발현 시 검출 가능한 신호를 생성하는 리포터 서열을 포함한다. 또 다른 예에서, 이식유전자는 치료 단백질 또는 치료 기능 RNA를 암호화한다. 또 다른 예에서, 이식유전자는 연구 목적, 예를 들어, 이식유전자를 보유하는 체세포 이식유전자 동물 모델을 생성하기 위해, 예를 들어, 이식유전자 생성물의 기능을 연구하기 위해 사용되도록 의도되는 단백질 또는 기능적 RNA를 암호화한다. 또 다른 예에서, 이식유전자는 질환의 동물 모델을 생성하는데 사용되도록 의도된 단백질 또는 기능적 RNA를 암호화한다. 적절한 이식유전자 코딩 서열은 당해 분야의 통상의 기술자에게 명백할 것이다.

[0127] 실시 형태에서, 이식유전자는 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 포함하나 이에 제한되지 않는 기능성 단백질을 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35 및 VPS26a 또는 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35, VPS26a 및 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS26a 및 VPS26b를 암호화한다. 실시 형태에서, 이식유전자는 VPS35, VPS26a 및 VPS26b 중 하나만을 암호화한다.

[0128] 아미노산 서열 정보는 미국 국립 생물 정보 센터 (National Center for Biotechnology Information: NCBI)로부터 얻을 수 있으며 아래에 기재되어 있다.

[0129] 사람 레트로머 코어 단백질 VPS35를 암호화하는 유전자 (유전자 ID: 55737)는 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS35 (서열 번호 1)를 암호화하는 이식유전자를 얻기 위해 사용될 수 있다:

MPTTQQSPQDEQEKLLEDAIQAVKVVQSFQMKRCLDKNKLMDALK
 HASNMLGELRTSMLSPKSYEELYMAISDELHYLEVYLTDEFQAKGRKVADLYELVQYAG
 NIIPRLYLLITVGVVYVKSFPQSRKDILKDLVEMCRGVQHPLRGLFLRNYLLQCTRNI
 LPDEGEPTDEETTGDISDSMDVLLNFAEMNKLVWRMQHQGHSRDREKRERERQELRIL
 VGTNLVRLSQLEGVNVRYKQIVLTGILEQVVNCRDALAQEYLMECIIQVFPDEFHLQTL
 NPFLRACAELHQNVNVKNIIIALIDRLALFAHREDGPGIPADIKLFDIFSQQVATVIQSRQD
 MPSEDVVSLQVSLINLAMKCYPRVDYVDKVLVETTVEIFNKLNLLEHIATSSAVSKELTRL
 LKIPVDTYNNILTVLKLKHFHPLFEYFDYESRKSMSVCYVLSNVLDYNTSIVSQDQVDSIM
 NLVSTLIQDQDPQVEDPDPEDFADEQSLVGRFIHLRSEDPPDQQLILNTARKHFGAGG
 NQRIRFTLPPLVFAAYQLAFRYKENSKVDDKWEKCKQKIFSFAHQITISALIKAELELPL
 RLFLQGALAAAGEIGFENHETVAYEFMSQAFSLYEDEISDSKAQLAAITLIIGTFERMKCFE
 EENHEPLRTQCALAASKLLKPDQGRAVSTCAHLFWSGRNTDKNGEELHGGKRVMEC
 LKKALKIANQCMDPSLQVQLFIEILNRYIYFYEKENDAVTIQVLNQLIQKIREDLPNLESS
 EETEQINKHFHNTLEHLRRLRESPESSEGGPIYEGLLI

[0130] ...

[0131] 사람 레트로머 코어 단백질 VPS26a를 암호화하는 유전자 (유전자 ID: 9559)는 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26a (서열 번호 2)를 암호화하는 이식유전자를 얻기 위해 사용될 수 있다:

MSFLGGFFGPICEIDIVLNDGETRKAEMKTEDGKVEKHLYFYDGESVSGKVNLAFKQP
 GKRLEHQGIRIEFVVGQIELFNDKSNTHEFVNLVKELALPGELTQSRSYDFEFMQVEKPYE
 SYIGANVRLRYFLKVTIVRRLTDLVKEYDLIVHQLATYPDVNNSIKMEVGIEDCLHIEFE
 YNKSXYHLKDVIVGKIYFLLVRIKIQHMELQLIKKEITGIGPSTTTETETIAKYEIMDGAPV
 KGESIPIRLFLAGYDPTPTMRDVKKFSVRYFLNLVLVD EEDRRYFKQQEIILWRKAPE
 KLRKQRTNFH QRFESPESQASAEQPEM

[0132]

[0133] 사람 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 유전자 (유전자 ID: 112936)는 기능적 레트로머 코어 단백질 VPS26b (서열 번호 3)을 암호화하는 이식유전자를 얻기 위해 사용될 수 있다:

[0133]

MSFFGFGQSVEVEILLNDAESRKRAEHKTEDGKKEKYFLFYDGE
 TVSGKVSALKNPNKRLEHQGIKIEFIGQIELYYDRGNHHEFVSLVKDLARPGEITQS
 QAFDFEFTHVEKPYESYTGQNVKLRVFLRATISRRLNDVVKEMDIVVHTLSTYPELNS
 SIKMEVGIEDCLHIEFEYNKSKYHLKDVIVGKIYFLLVRIKIKHMEIDIHKRETTGTG
 PNVYHENDTIAKYEIMDGAPVRGESIPIRLFLAGYELTPTMRDINKKFSVRYLNLVL
 IDEEERRYFKQQEVVLWRKGDIVRKSMHQAAIASQRFEGTTSLGEVRTPSQLSDNNC
 RQ

[0134]

[0135] 레트로머 코어 단백질에 대한 야생형 마우스 마우스 mRNA 서열 (즉, 코딩 서열)은 NCBI에서 입수하였고 아래제 기재되어 있다.

[0135]

[0136] mVPS35 (서열 번호 4)

[0136]

ATGCCTACAACACAGCAGTCACCCCAGGATGAGCAGGAAAACTTTTGG
 TGAAGCCATCCAGGCTGTGAAGGTTTCAGTCATTCCAGATGAAAAGATGCC
 TGGACAAAAACAAGCTGATGGATGCTCTGAAGCATGCCTC CAATATGCTT
 GGAGAGCTCCGGACCTCTATGCTGTCACCAAAGAGTTACTATGAACITTA
 TATGGCTATTTCTGATGAACTGCACTACTTGGAGGTCTACCTGACTGATG
 AATTTGCTAAAGGAAGAAAGGTGGCAGATCTCTATGAACTTGTACAGTAC
 GCGGGAAACATTATCCAAAGGCTTTATCTCTTGATCACAGTTGGAGTTGT
 ATATGTCAAGTCATTTCTCAATCCAGGAAAGATATTTTGAAAGATTTGG
 TAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAGCATCCGCTAAGGGGTTTGTTCCTCGA
 AATTACCTTCTTCAGTGTACTAGGAACATTTTACCTGATGAAGGAGAGCC
 AACAGATGAAGAAACAACACTGGTGATATCAGTGATTCCATGGATTTTGTAC
 TACTCAACTTTGCAGAAATGAATAAGCTCTGGGTGCGGATGCAGCATCAA
 GGACATAGTCGAGATAGAGAAAAAAGAGAACGAGAGAGACAAGAAGTGGAG
 AATTTTAGTGGAACAAATTTGGTGCCTTAGTCAGTTGGAAGGTGTAA
 ATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTAACAGGCATTCTGGAGCAGGTT

[0137]

GTGAATTGTAGGGATGCTCTGGCTCAGGAGTATCTCATGGAGTGCATCAT
 TCAGGTTTTTCCTGATGAGTTTCATCTTCAGACTTTGAATCCTTTTCTTA
 GAGCTTGTGCTGAATTACACCAAAATGTAAATGTGAAAAACATAATCATT
 GCTTTAATTGACAGATTAGCTTTATTTGCTCATCGTGAAGATGGACCCGG
 AATCCAGCTGAGATTAAACTTTTTGACATATTTTCACAACAGGTGGCTA
 CAGTCATACAGTCCAGACAAGACATGCCATCAGAGGATGTTGTATCTTTA
 CAAGTCTCTCTATTAATCTTGCTATGAAATGTTACCCTGATCGTGTGGA
 CTACGTCGATAAAGTTCTAGAAACAACAGTGGAGATATTCAATAAGCTTA
 ACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGGAGCTTACCAGA
 CTTTTGAAGATACCTGTTGATACTTACAACAATATCTTAACAGTATTA
 GTTAAAGCATTTCACCCACTTTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAA
 AGAGCATGAGCTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAA
 ATCGTCTCTCAGGACCAGGTAGATTCCATAATGAATTTGGTGTCCACATT
 GATTGAGGATCAGCCAGACCAACCTGTAGAAGACCCTGATCCAGAAGACT
 TCGCTGATGAACAGAGCCTTGTGGCCGATTTATTCATCTGCTACGTTCT
 GATGATCCTGACCAGCAGTATTTGATTTTGAATACGGCACGAAAACATTT
 TGGGGCTGGTGGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACTGCCACCTTGGTAT
 TTGCAGCTTACCAGTTGGCTTTTCGATACAAAGAGAATTCCTCAAATGGAT
 GACAAGTGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTTTCATTTGCTCACCAGAC
 TATCAGTGCTTTGATTAAGCTGAGCTGGCTGAATTACCACTGAGACTTT
 TTCTTCAAGGAGCATTAGCTGCTGGAGAAATTGGCTTTGAAAATCATGAA
 ACAGTAGCATATGAATTTATGTCCCAGGCATTTTCTCTATATGAAGATGA
 AATCAGTGATTCTAAAGCACAGCTGGCTGCTATCACCTTGATCATCGGTA
 CTTTTGAGAGGATGAAATGCTTCAGTGAAGAGAATCATGAACCCTTGAGA
 ACTCAGTGTGCACTTGCTGCATCAAACTTCTGAAAAAACCAGATCAAGG
 CCGAGCCGTGAGCACATGTGCGCATCTCTTTTGGTCTGGCCGAAACACAG
 AAAAAATGGGGAAGAGCTTCATGGAGGTAAAAGGGTCATGGAGTGCCTA
 AAGAAGGCACTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAAGT
 TCAGCTCTTTATAGAGATTCTGAACAGGTACATCTATTTCTATGAAAAAG
 AAAATGATGCGGTAACCATTCAAGTCTTGAACCAACTTATTCAAAGATT
 CGAGAAGATCTCCCAAATCTTGAGTCCAGTGAAGAAACAGAACAAATAAA

[0138]

CAAGCATTTTCACAACACATTGGAGCACTTGCGCTCAAGACGGGAATCAC
 CAGAGTCTGAGGGGCAATCTATGAAGGTCTCATCCTTTAA

[0139]

[0140] mVPS26a 이소형 A (서열 번호 5)

ATGAGTTTTCTTGGAGGCTTTTTTGGTCCCATTGTGAGATTGATGTTGCCCTTA
 ATGATGGGGAAACCAGGAAAATGGCAGAAAATGAAAAGCTGAGGATGGCAA
 GTAGAAAAACACTATCTCTTCTATGATGGCGAGTCTGTCTCAGGAAAGGT
 AAACCTAGCCTTTAAGCAGCCTGGAAAGAGGCTAGAGCATCAAGGAATTA
 GAATTGAATTTGTAGGTCAAATTGAGCTTTTCAATGACAAGAGTAATACT
 CATGAATTTGTAAACCTAGTGAAGGAACTAGCCTTGCCTGGAGAACTGAC
 TCAGAGCAGAAGCTATGACTTTGAATTTATGCAAGTTGAAAAGCCATATG
 AGTCATACATCGGTGCCAATGTCCGCCTGAGGTATTTCTTAAGGTGACA
 ATTGTGAGAAGATTGACAGACTTAGTGAAAGAGTACGATCTTATTGTTCA
 TCAGCTAGCCACCTATCCTGATGTCAACAACCTCTATTAATAAGTGAAGTGG
 GCATTGAAGACTGTCTGCACATAGAGTTTGAATATAATAAGTCCAAGTAT
 CATTAAAGGATGTAATTGTTGGAAAAATTTACTTCTTATTAGTAAGAAT
 AAAAATACAACACATGGAATTACAGCTGATCAAGAAAGAGATCACAGGAA
 TTGGACCCAGCACCACAACAGAGACAGAAACAATCGCTAAGTATGAAATA
 ATGGATGGGGCGCCAGTAAAAGGAGAATCTATTCCGATAAGATTGTTCTT
 AGCAGGGTATGACCCAACCCCCACGATGAGAGATGTGAACAAGAAGTTTT
 CAGTAAGGTACTTTCTAAACCTCGTGCTTGTGATGAGGAGGACCGAAGG
 TACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGAAAAGCACCCGAGAACT
 GAGAAAACAGAGGACGAACTTTCACCAGCGGTTTGAATCTCCAGACTCGC
 AGGCCTCTGC GGAGCAGCCT GAGATGTAA

[0141]

[0142] mVPS26b (서열 번호 6)

ATGAGCTTCTTCGGCTTCGGGCAGAGCGTGGAGGTGGAAATCTTGCTGAATGATGCG
 GAGAGTAGGAAGCGAGCGGAGCACAAGACTGAGGACGGGAAGAAGGAGAAATATT
 TCCTCTTCTACGACGGGGAAACCGTCTCGGGGAAAGTGAGCCTATCACTGAAGAAC
 CCCAACAAGCGACTAGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATTGGGCAGATCGA
 ACTCTACTATGACCGTGGGAACCACCATGAGTTTGTGTCTTTGGTGAAGGACCTGGC

[0143]

TCGGCCAGGAGAGATCACCAATCGCAGGCCTTCGACTTTGAGTTCACCCATGTGGA
 AAAGCCGTATGAATCCTACACAGGACAGAATGTGAAGCTCCGCTATTTCTTCGAGC
 CACCATCAGCCGCCCTCAATGATGTTGTTAAAGAGATGGACATTGTAGTTCACAC
 ACTTAGCACATAACCCGAGCTGAACTCATCCATCAAGATGGAAGTTGGCATTGAGG
 ATTGCCTGCACATTGAATTTGAGTACAACAAATCCAAATACCACTTCAAAGATGTCA
 TTGTAGGGAAGATATACTTCTGCTGGTGAGAATCAAGATCAAGCACATGGAGATA
 GACATCATCAAACGAGAGACAACAGGCACGGGTCCCAACGTGTACCACGAGAACG
 ACACAATAGCGAAGTATGAGATCATGGACGGGGCACCAGTCCGAGGTGAGTCCATC
 CCCATCAGGCTCTTCTGTCAGGGTATGAGCTCACACCCACCATGCGTGACATAAAT
 AAGAAGTTCTCTGTGCGCTATTACCTCAACTTGGTGCTGATAGATGAGGAGGAACGG
 CGCTACTTCAAGCAGCAGGAAGTGGTGTGTTGTGGCGGAAGGGTGACATCGTACGGAA
 GAGCATGTCCACCAGGCAGCCATTGCCTCACAGCGCTTCGAGGGCACAACCTCCCT
 GGGTGAGGTGCGGACCCCTGGCCAACCTGTCTGACAACAACAGCAGGCAGTAG

[0144]

[0145] 이식유전자 코딩 서열의 코돈 최적화

[0146] 이식유전자 코딩 서열의 코돈 최적화는 유전자 치료의 효율성을 증가시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시 형태에서, 치료 단백질을 암호화하는 이식유전자의 코딩 서열과 적어도 70% 동일한 핵산 (예를 들어, 핵산 서열과 70%, 71%, 72%, 73%, 74%인 핵산 서열), 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91 %, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% 또는 100% 동일한 핵산 서열)이 사용된다.

[0147] 코돈 최적화 도구는 당해 분야에 알려져 있다.

[0148] 예시적인 코돈 최적화 핵산은 다음과 같다.

[0149] 코돈 최적화된 mVPS35 (서열 번호 7)

```

ATGCCCACAAACACAGCAGAGCCCACAGGATGAACAGGAAAAGCTGCTGGATGAGG
CCATCCAGGCTGTGAAAGTGCAGTCCTTCCAGATGAAAAGATGTCTGGATAAGAAT
AAGCTGATGGACGCCCTGAAGCATGCCAGCAACATGCTGGGCGAGCTGAGGACCAG
CATGCTGICTCCCAAGTCCTACTACGAGCTGTACATGGCCATTTCTGACGAGCTGCA
CTACCTGGAGGTGTACCTCACAGATGAGTTCGCCAAGGGGAGAAAGGTGGCCGATC
TGTATGAGCTGGTGCAGTATGCTGGCAACATCATCCCCAGGCTGTACCTGCTGATCA
    
```

[0150] .

CCGTGGGCGTGGTGTATGTGAAGAGCTTCCCCAGTCTAGAAAGGATATCCTGAAG
 GACCTGGTGGAAATGTGCAGGGGAGTGCAGCATCCTCTGAGAGGCCTGTTTCTGAG
 AAACCTACCTGCTGCAGTGTACCAGGAATATCCTGCCCGACGAAGGCGAGCCTACTG
 ATGAAGAAACAACCGGCGACATCAGCGACAGCATGGATTTTGTGCTGCTGAACTTC
 GCCGAGATGAACAAACTGTGGGTGAGAATGCAGCACCAGGGACACAGCAGGGACA
 GAGAGAAGAGAGAGAGGGGAGAGACAGGAGCTGAGAATCCTGGTGGGCACCAACCT
 GGTGAGGCTGTCCCAGCTGGAGGGCGTGAATGTGGAGAGATATAAGCAGATTGTGC
 TGACAGGAATCCTGGAGCAGGTGGTGAATGCAGAGATGCCCTGGCCCAGGAGTAT
 CTGATGGAATGCATCATTAGGTGTTCCCAGATGAGTTCCACCTGCAGACACTGAAC
 CCTTTCTGAGGGCCTGCGCCGAGCTGCATCAGAACGTGAACGTCAAGAACATCATC
 ATTGCTCTGATTGACAGGCTGGCCCTGTTTGCCCATAGAGAGGATGGACCTGGCATC
 CCAGCCGAGATCAAGCTGTTTGACATTTTCAGCCAGCAGGTGGCCACCGTGATCCAG
 TCTAGGCAGGACATGCCTTCCGAAGATGTGGTGAGCCTGCAGGTGTCCCTGATCAAT
 CTGGCCATGAAGTGTACCCTGATAGAGTGGATTACGTGGACAAGGTGCTGGAGAC
 CACAGTGGAGATCTTCAACAAGCTGAACCTGGAGCACATCGCCACTTCTTCTGCTGT
 GTCTAAAGAAGTGAACAAGACTGCTGAAGATCCCTGTGGACACCTACAACAACATTCT
 GACCGTGTGAAGCTGAAACACTTCCATCCACTGTTTCGAGTACTTTGATTATGAGAG
 CAGGAAGTCCATGAGCTGCTACGTGCTGAGCAATGTGCTGGACTACAATACAGAAA
 TCGTGTCCCAGGATCAGGTGGACAGCATCATGAATCTGGTGAGCACACTGATCCAG
 GACCAGCCTGATCAGCCAGTGGAGGACCCCCGACCCTGAGGACTTCGCTGACGAGCA
 GAGCCTGGTGGGCAGGTTTCATCCACCTGCTGAGGTCTGATGATCCAGACCAGCAGTA
 CCTGATCCTGAACACCGCCAGGAAGCACTTTGGAGCCGGAGGCAACCAGAGGATCA
 GATTCACCCTGCCTCCCCTGGTGTGTTGCCGCCTACCAGCTGGCTTTCAGATACAAGG
 AAAATTCCCAGATGGATGACAAGTGGGAGAAAAAATGCCAGAAGATCTTTTCTTTT
 GCTCACCAGACCATCTCTGCCCTGATCAAAGCTGAGCTGGCTGAACTGCCACTGAGA
 CTGTTCCCTCCAGGGGGCCCTGGCTGCCGGGAGATCGGCTTTGAGAACCATGAGACT
 GTGGCCTATGAATTCATGTCAGGCCTTCTCTCTGTACGAAGATGAGATCAGCGAC
 AGCAAGGCTCAGCTGGCTGCTATCACACTGATCATTGGAACATTTGAAAGGATGAA
 GTGCTTCTCCGAGGAAAACACGAGCCACTGAGAACACAGTGTGCACTGGCCGCCT
 CCAAGCTGCTGAAGAAGCCTGACCAGGGCAGAGCCGTGTCTACCTGTGCCACCTG
 TTCTGGAGCGGAAGAAACACAGACAAAAATGGAGAGGAGCTGCATGGCGGCAAGA

[0151]

GGGTGATGGAGTGCCTGAAGAAAGCCCTGAAGATTGCCAACCAGTGCATGGACCCA
 AGCCTGCAGGTGCAGCTGTTTCATCGAGATCCTGAACAGGTACATCTACTTCTACGAG
 AAGGAGAATGACGCCGTGACCATTAGGTGCTGAATCAGCTGATCCAGAAAATCAG
 GGAAGACCTGCCAACCTGGAGAGCTCTGAAGAGACAGAGCAGATCAACAAGCATT
 TTCACAACACTCTGGAACATCTGAGGTCCAGGAGGGAGTCCCCAGAGTCTGAGGGA
 CCCATCTATGAGGGGCTGATCCTGTGA

[0152]

[0153] 코돈 최적화된 mVPS26a 이소형 A (서열 번호 8)

ATGAGCTTCCTGGGCGGCTTCTTCGGCCCCATCTGTGAGATCGACGIGGCCCTGAAC
 GACGGCGAGACCAGAAAGATGGCCGAGATGAAGACAGAGGATGGCAAGGTGGAGA
 AGCACTACCTGTTCTACGACGGAGAGTCTGTGTCCGGCAAGGTGAACCTGGCCTTCA
 AGCAGCCTGGGAAGAGGCTGGAGCACCAGGGCATCAGAATCGAGTTCGTGGGCCAG
 ATCGAGCTGTTCAACGACAAGAGCAACACCCACGAGTTTGTGAACCTGGTGAAGGA
 GCTGGCTCTGCCTGGCGAGCTGACCCAGAGCAGAAGCTACGACTTCGAGTTCATGC
 AGGTGGAGAAGCCTTACGAGAGCTACATCGGGCCAACGTGAGACTGAGATACTTC
 CTGAAGGTGACCATCGTGAGGAGACTGACCGACCTGGTGAAGGAGTATGACCTGAT
 CGTGCACCAGCTGGCCACCTACCCTGACGTGAACAACAGCATCAAGATGGAGGTGG
 GCATCGAGGACTGCCTGCACATCGAGTTCGAGTACAACAAGTCCAAGTACCACCTG
 AAGGACGTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCTGCTGGTGAGGATCAAGATCCAGCA
 CATGGAGCTGCAGCTGATCAAGAAGGAGATCACCGGCATCGGCCCTTCCACAACCA
 CCGAGACAGAGACAATCGCCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGAAGGGC
 GAGAGCATCCCTATCAGGCTGTTCTGGCCGGCTACGACCTACCCCTACCATGAGA
 GACGTGAACAAGAAGTTCAGCGTGAGGTACTTCTGAACCTGGTGCTGGTGGACGA
 GGAGGACAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGATCATCCTGTGGAGGAAGGCCCTG
 AGAAGCTGAGGAAGCAGAGGACCAACTTCCACCAGAGATTTCGAGTCCCCTGACAGC
 CAGGCCAGCGCCGAGCAGCCAGAGATGTGA

[0154]

[0155] 코돈 최적화된 mVPS26b (서열 번호 9)

ATGAGTTTTTTTTGGGTTTTGGACAGTCAGTGGAGGTGGAGATCCTGCTGAACGACGCC
 GAGAGCAGGAAGAGGGCCGAGCACAAGACAGAGGATGGCAAGAAGGAGAAGTACT
 TCCTGTTCTACGACGGAGAGACCGTGAGCGGCAAGGTGTCCCTGAGCCTGAAGAAC

[0156]

CCAAACAAGAGACTGGAGCACCAGGGCATCAAGATCGAGTTCATCGGCCAGATCGA
 GCTGTACTACGACAGGGGCAACCACCACGAGTTCGTGAGCCTGGTGAAGGACCTGG
 CCAGACCTGGCGAGATCACCCAGAGCCAGGCCTTCGACTTCGAGTTCACCCACGTG
 GAGAAGCCTTACGAGAGCTACACAGGCCAGAACGTGAAGCTGAGGTACTTCTGAG
 AGCCACCATCAGCAGAAGACTGAACGACGTGGTGAAGGAGATGGACATCGTGGTGC
 ACACCCTGAGCACCTACCCTGAGCTGAACTTCCATCAAGATGGAGGTGGGCATCG
 AGGACTGCCTGCACATCGAGTTCGAGTACAACAAGAGCAAGTACCACCTGAAGGAC
 GTGATCGTGGGCAAGATCTACTTCTGCTGGTGAGAATCAAGATCAAGCACATGGA
 GATCGACATCATCAAGAGAGAGACCACAGGCACAGGCCCTAACGTGTACCACGAGA
 ACGACACCATCGCCAAGTACGAGATCATGGACGGCGCCCCTGTGAGAGGCGAGAGC
 ATCCCTATCAGGCTGTTCTGCGCCGGCTACGAGCTGACCCCTACCATGAGGGACATC
 AACAAGAAGTTCAGCGTGAGATACTACCTGAACCTGGTGCTGATCGATGAGGAGGA
 GAGAAGATACTTCAAGCAGCAGGAGGTGGTGTGTGGAGAAAGGGCGACATCGTGA
 GAAAGAGCATGAGCCACCAGGCCGCCATCGCCAGCCAGAGATTTCAGGGCACCACC
 AGCCTGGGCGAGGTGAGGACCCCTGGCCAGCTGAGCGACAACAACAGCAGACAGT
 GA

[0157]

[0158] 사람 VPS35 코딩 서열 (제한 부위를 제거하도록 변형된 특정 코돈 포함) (서열 번호 10)

ATGCCTACAACACAGCAGTCCCCTCAGGATGAGCAGGAAAAGCTCTTGGATGAAGC
 CATA CAGGCTGTGAAGGTCCAGTCATTCCAAATGAAGAGATGCCTGGACAAAAACA
 AGCTCATGGATGCTCTAAAACATGCTTCTAATATGCTTGGTGAAC TCCGGACTTCTA
 TGTTATCACCAAAGAGTTACTATGAACTTTATATGGCCATTTCTGATGAACTGCACT
 ACTTGGAGGTCTACCTGACAGATGAGTTTGCTAAAGGAAGGAAAGTGGCAGATCTC
 TACGAACTTGTACAGTATGCTGGAAACATTATCCCAAGGCTTIACCTTCTGATCACA
 GTTGGAGTTGTATATGTCAAGTCATTTCCCTCAGTCCAGGAAGGATATTCTGAAAGAT
 TTGGTAGAAATGTGCCGTGGTGTGCAACATCCCTTGAGGGGTCTGTTTCTTCGAAAT
 TACCTTCTCAGTGTACCAGAAATATCTTACCTGATGAAGGAGAGCCAACAGATGAA
 GAAACA ACTGGTGACATCAGTGATTCCATGGATTTTCG TACTGCTCAACTTTGCAGAA
 ATGAACAAGCTCTGGGTGCGAATGCAGCATCAGGGACATAGCCGAGATAGAGAAAA
 AAGAGAACGAGAAAGACAAGA ACTGAGGATTCTAGTGGGAACAAATTTGGTGCGCC

[0159]

TCAGTCAGTTGGAAGGTGTAATGTGGAACGTTACAAACAGATTGTTCTGACTGGCA
TATTGGAGCAAGTTGTAAACTGTAGGGATGCTTTGGCTCAAGAATATCTCATGGAGT
GTATTATTCAGGTATTCCCTGATGAATTCACCTCCAGACTTTGAATCCTTTCCTTCG
GGCCTGTGCTGAGTTACACCAGAATGTAATGTGAAGAACATAATCATTGCTTTAAT
TGATAGATTAGCTTTATTTGCTCACCGTGAAGATGGACCTGGAATCCCAGCGGATAT
TAAACTATTTCGATATATTCTCACAGCAGGTGGCTACAGTGATACAGTCAAGACAAGA
CATGCCTTCAGAGGATGTTGTATCTTTACAAGTATCTCTTATTAATCTTGCCATGAAA
TGTTACCCTGATCGTGTGGACTATGTTGATAAAGTACTAGAAAACAACAGTGGAGATA
TTCAATAAGCTCAACCTTGAACATATTGCTACCAGTAGTGCAGTTTCAAAGGAACTC
ACCAGACTATTGAAAATACCAGTTGACACTTACAACAATATATTAACAGTCTTGAAA
TTAAAACATTTCCACCCACTCTTTGAGTACTTTGACTACGAGTCCAGAAAAGAGCATG
AGTTGTTATGTGCTTAGTAATGTTCTGGATTATAACACAGAAATTGTATCTCAAGAC
CAGGTGGATTCCATAATGAATTTGGTATCCACGTTGATTCAAGATCAGCCAGATCAA
CCTGTAGAAGACCTGATCCAGAAGATTCGCTGATGAGCAGAGCCTTGTTGGGCCG
TTCATTCATCTGCTGCGCTCTGAGGACCCTGACCAGCAGTACTTGATATTGAACACA
GCACGAAAACATTTCCGAGCTGGTGAAATCAGCGGATTCGCTTCACACTGCCACCT
TTGGTATTTGCAGCTTACCAGCTGGCATTTCGATATAAAGAGAACTCTAAAGTGGAT
GACAAATGGGAAAAGAAATGCCAGAAGATATTCTCATTGCCCACCAGACTATCAG
TGCTTTGATCAAAGCAGAGCTGGCAGAATTGCCGTTAAGACTATTCCTTCAAGGAGC
ACTAGCTGCTGGGGAAATTGGATTTGAAAATCATGAAACAGTCGCATATGAATTCAT
GTCCCAGGCATTCTCTCTGTATGAAGATGAAATCAGCGATTCCAAAGCACAGCTTGC
TGCCATCACCTTGATCATTGGCACATTTGAAAGGATGAAGTGCTTCAGTGAAGAGAA
TCATGAACCTCTGAGGACTCAGTGTGCCCTTGCTGCATCCAACTTCTAAAGAAACC
TGATCAGGGCCGAGCTGTGAGCACCTGTGCACATCTTCTGGTCTGGCAGAAACAC
GGACAAAATGGGGAGGAGCTTCACGGAGGCAAGAGGGTAATGGAGTGCCTAAAA
AAAGCTCTAAAAATAGCAAATCAGTGCATGGACCCCTCTCTACAAGTGCAGCTATTC
ATAGAAATTCTGAACAGATATATCTACTTCTATGAAAAGGAAAATGATGCGGTAAC
AATTCAGGTATTAACCAGCTTATCCAAAAGATTCGAGAAGACCTCCCGAATCTTGA
ATCCAGTGAAGAAACAGAGCAGATTAACAAACACTTTCATAACACACTGGAGCATT
TGCGCTTGCGCGGGAATCACCAGAATCCGAGGGCCAATTTATGAAGGACTCATC
CTTTAA

[0160]

[0161]

투여 경로 및 투여량

[0162]

본 개시 내용은 대상체에서 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 치료, 예방 및/또는 치유하고/하거나 신경 퇴행성 질환 및/또는 장애와 관련된 증상 중 적어도 하나를 완화시키는 방법에 사용하기 위한 rAAV 벡터를 제공한다. 일부 실시 형태에서, 방법은 약제학적으로 허용되는 담체 내의 하나 이상의 치료용 폴리펩타이드 또는 단백질을 암호화하는 rAAV 벡터를, 이러한 신경 퇴행성 질환 또는 장애를 갖거나 가질 것으로 의심되는 대상체에서 신경 퇴행성 질환을 치료, 예방 및/또는 치유하기에 충분한 양 및 기간 동안 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. rAAV 벡터는 당해 분야에 공알려진 임의의 적절한 방법에 따라 조성물로 대상체에게 전달될 수 있다. 바람직한 계는 생리학적으로 적합한 담체 (예를 들어, 조성물)에 현탁된 rAAV 벡터가 대상체에게 투여될 수 있다. 특정 실시 형태에서, 조성물은 rAAV 벡터를 단독으로, 또는 하나 이상의 다른 벡터 (예를 들어, 하나 이상의 상이한 이식유전자를 갖는 제2 rAAV 벡터)와 조합하여 포함할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 포함하나 이에 제한되지 않는 기능성 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 rAAV9 벡터를 포함할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a

및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 포함하지만 이에 제한되지 않는 기능적 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 rAAV2/9 벡터를 포함할 수 있다. 하나의 실시 형태에서, 조성물은 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 포함하지만 이에 제한되지 않는 기능성 단백질을 암호화하는 이식유전자를 포함하는 핵산 서열을 포함하는 rAAV10 또는 rAAV2/10 벡터를 포함할 수 있다.

[0163] 적합한 담체는 rAAV가 지시되는 적응증을 고려하여 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, 하나의 적합한 담체는 다양한 완충 용액 (예를 들어, 포스페이트 완충 식염수)으로 제형화될 수 있는 식염수를 포함한다. 다른 예시적인 담체로는 멸균 식염수, 락토오스, 수크로오스, 인산칼슘, 젤라틴, 텍스트란, 한천, 펙틴, 땅콩유, 참기름 및 물이 있다. 담체의 선택은 본 개시 내용의 제한이 아니다.

[0164] 임의로, 본 출원에 개시된 조성물은 rAAV 및 담체(들)외에도, 보존제 또는 화학적 안정제와 같은 다른 통상적인 약제학적 성분을 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제로는 클로로부탄올, 소르브산칼륨, 소르브산, 이산화황, 갈산프로필, 파라벤, 에틸 바닐린, 글리세린, 페놀 및 파라클로로페놀이 있다. 적합한 화학적 안정제로는 젤라틴 및 알부민이 있다.

[0165] 일부 실시 형태에서, rAAV 조성물은 특히 높은 rAAV 농도가 존재하는 경우 (예를 들어, 약 10^{13} GC/ml 이상) 조성물에서 AAV 입자의 응집을 감소시키도록 제형화된다. rAAV의 응집을 감소시키는 방법은 당해 분야에 잘 알려져 있으며, 이에는 예를 들어, 계면활성제의 첨가, pH 조정 및 염 농도 조정이 포함된다 (예를 들어, 문헌 [Wright, *et al.*, *Molecular Therapy* 12:171-178 (2005)] 참조).

[0166] 주사용으로 적합한 약제학적 형태로는 멸균 주사용 용액 또는 분산액의 즉석 제조를 위한 멸균 수용액 또는 분산액 및 멸균 분말을 포함한다. 또한, 분산액은 글리세롤, 액체 폴리에틸렌 글리콜, 및 이들의 혼합물에서 및 오일에서 제조될 수 있다. 일반적인 보관 및 사용 조건에서 이러한 제제에는 미생물의 성장을 방지하기 위한 보존제를 함유한다. 많은 경우에, 그 형태는 쉽게 주사할 수 있을 정도로 무균 상태이며 유동적이다. 이는 제조 및 보관 조건에서 안정해야 하며 세균 및 진균과 같은 미생물의 오염 작용에 대하여 보존되어야 한다. 담체는 예를 들어, 물, 에탄올, 폴리올 (예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜, 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 적합한 혼합물, 및/또는 식물성 오일을 함유하는 용매 또는 분산매일 수 있다. 적절한 유동성은 예를 들어, 레시틴과 같은 코팅제의 사용, 분산액의 경우 필요한 입자 크기의 유지, 및 계면활성제의 사용에 의해 유지될 수 있다. 미생물 작용의 방지는 다양한 항균제 및 항진균제, 예를 들어, 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르브산, 티메로살 등에 의해 달성될 수 있다. 많은 경우에, 등장화제, 예를 들어, 당류 또는 염화나트륨을 포함하는 것이 바람직할 것이다. 주사가능한 조성물의 연장된 흡수는 흡수를 지연시키는 작용제, 예를 들어, 알루미늄 모노스테아레이트 및 젤라틴을 조성물에서 사용함으로써 달성될 수 있다.

[0167] 주사 가능한 수용액의 투여를 위해, 예를 들어, 용액은 필요한 경우, 적절하게 완충될 수 있고, 액체 희석제는 먼저 충분한 염수 또는 글루코오스를 이용하여 등장성이 된다. 이러한 특정 수용액은 정맥내, 근육내, 피하 및 복막내 투여에 특히 적합하다. 이와 관련하여, 사용될 수 있는 멸균 수성 매질은 당해 분야의 통상의 기술자에게 알려져 있을 것이다. 예를 들어, 1회 투여량을 등장성 NaCl 용액 1ml에 용해시키고 피하주사액 1000ml에 첨가하거나 제안된 주입 부위에 주사할 수 있다. 투여량의 약간의 변화는 숙주의 상태에 따라 필연적으로 발생할 것이다. 투여 책임자는 어떤 경우에도 개별 숙주에 대한 적절한 용량을 결정할 수 있다.

[0168] 멸균 주사 용액은 필요한 양의 활성 rAAV를 필요한 경우 본 출원에 열거된 다양한 다른 성분과 함께 적절한 용매에 혼합한 후 여과 멸균하여 제조된다. 일반적으로, 분산액은 기본 분산매 및 위에 열거된 것들 중 필요한 기타 성분을 함유하는 멸균 비히클에 다양한 멸균된 활성 성분을 혼합함으로써 제조된다. 멸균 주사 용액의 제조를 위한 멸균 분말의 경우, 바람직한 제조 방법은 사전 멸균 여과된 용액으로부터 활성 성분 및 임의의 추가의 원하는 성분의 분말을 생성하는 진공 건조 및 동결 건조 기법이다.

[0169] 상기 기재된 전달 방법 외에도, rAAV 조성물을 숙주에 전달하는 대안적 방법으로서 하기 기법이 또한 고려된다. 초음파 영동법 (즉, 초음파)이 사용되어 왔고 이는 순환계 내로 및 순환계를 통한 약물 투과 속도 및 효능을 향상시키기 위한 장치로서 미국 특허 US 5,656,016에 기재되어 있다. 고려되는 다른 약물 전달 대안으로는 골내 주사 (미국 특허 US 5,779,708), 마이크로칩 장치 (미국 특허 US 5,797,898), 안과용 제형, 경피 매트릭스 (미국 특허 US 5,770,219 및 5,783,208) 및 피드백 제어 (미국 특허 US 5,697,899)가 있다.

[0170] rAAVs는, 원하는 조직의 세포를 형질 감염시키고 과도한 부작용 없이 충분한 수준의 유전자 전달 및 발현을 제공하기에 충분한 양으로 투여 경로에 의해 투여된다.

- [0171] 통상적이고 약제학적으로 허용되는 투여 경로로는 선택된 조직으로의 직접 전달 (예를 들어, 뇌내 투여, 척추강 내 투여), 정맥내, 경구, 흡입 (비강 및 기관내 전달 포함), 안내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내 및 기타 비경구 투여 경로가 있으나 이에 제한되지 않는다. 원하는 경우, 투여 경로를 조합할 수 있다. 투여 요법은 치료학적 조성물의 혈청 또는 조직 회전율 (turnover rate), 증상의 수준, 및 생물학적 기질에서 표적 세포의 접근성을 비롯한 여러 요인에 따라 달라진다. 바람직하게는, 투여 요법은 바람직하지 않은 부작용을 최소화하면서 동시에 표적 질환 상태의 개선을 달성하기에 충분한 치료학적 조성물을 전달한다. 따라서, 전달되는 생물학적 제제의 양은 특정 치료학적 조성물 및 치료되는 병태의 중증도에 부분적으로 의존한다.
- [0172] 본 개시 내용은 rAAV 비리온을 포함하는 안정한 약제학적 조성물을 제공한다. 조성물은, 동결/해동 주기를 거치고 유리를 비롯한 다양한 재료로 만들어진 용기에 보관될 때에도 안정하고 활성을 유지한다.
- [0173] 적절한 투여량은 특히 치료되는 대상체 (예를 들어, 사람 또는 비사람 영장류 또는 기타 포유 동물), 치료될 대상체의 연령 및 일반적인 상태, 치료되는 병태의 중증도, rAAV 비리온의 투여 방식에 따라 달라질 것이다. 적절한 유효량은 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0174] 원하는 효과 또는 "치료 효과"를 달성하는데 필요한 rAAV 비리온의 투여량, 예를 들어, 벡터 게놈의 투여량 단위/체중 킬로그램 (vg/kg)은 다음을 포함하지만 이에 제한되지 않는 여러 요인에 따라 달라질 것이다: rAAV 투여 경로; 치료 효과를 달성하는데 필요한 유전자 또는 RNA 발현 수준; 치료 중인 특정 질환 또는 장애; 및 유전자 또는 RNA 생성물의 안정성. 당해 분야의 통상의 기술자는 전술한 요인 뿐만 아니라 당해 분야에 널리 공지된 다른 요인에 기초하여 특정 질환 또는 장애를 갖는 대상체를 치료하기 위해 rAAV 비리온 투여량 범위를 용이하게 결정할 수 있다. rAAV의 유효량은 일반적으로 대상체당 약 10^9 내지 10^{16} 개의 게놈 카피를 함유하는 용액 약 10 μ l 내지 약 100 ml의 범위이다. 다른 부피의 용액을 사용할 수 있다. 사용되는 부피는 일반적으로 무엇보다도 대상체의 크기, rAAV의 투여량, 및 투여 경로에 따라 달라질 것이다. 예를 들어, 척추강내 또는 뇌내 투여를 위해 1 μ l 내지 10 μ l 또는 10 μ l 내지 100 μ l 범위의 부피가 사용될 수 있다. 정맥내 투여의 경우, 10 μ l 내지 100 μ l, 100 μ l 내지 1 ml, 1 ml 내지 10 ml 또는 그 이상의 범위의 부피가 사용될 수 있다. 일부 경우에, 대상체당 약 10^{10} 내지 10^{12} 개 rAAV 게놈 카피의 투여량이 적절하다. 특정 실시 형태에서, 대상체당 10^{12} 개의 rAAV 게놈 카피는 원하는 조직을 표적화하는데 효과적이다. 일부 실시 형태에서, rAAV는 대상체당 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} 개 게놈 카피의 투여량으로 투여된다. 일부 실시 형태에서, rAAV는 kg당 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , or 10^{14} 개 게놈 카피의 투여량으로 투여된다.
- [0175] 따라서, "치료학적 유효량"은 임상 시험을 통해 결정될 수 있는 비교적 넓은 범위에 속할 것이다. 예를 들어, 생체내 주사, 즉, 대상체에 직접 주사의 경우, 치료학적 유효 투여량은 약 10^5 내지 10^{16} 개의 rAAV 비리온, 보다 바람직하게는 10^8 내지 10^{14} 개 정도의 rAAV 비리온일 수 있다. 시험관내 형질 도입의 경우, 세포에 전달될 rAAV 비리온의 유효량은 10^5 내지 10^{13} , 바람직하게는 10^8 내지 10^{13} 개 정도의 rAAV 비리온일 수 있다. 조성물이 대상체에게 다시 전달될 형질 도입된 세포를 포함하는 경우, 약제학적 조성물에서 형질 도입된 세포의 양은 약 10^4 내지 10^{10} 개 세포, 보다 바람직하게는 10^5 내지 10^8 개 세포일 수 있다. 물론, 투여량은 형질 도입의 효율성, 프로모터 강도, 메시지의 안정성 및 이에 의해 암호화된 단백질에 따라 다르다. 유효 투여량은 투여량 반응 곡선을 확립하는 일상적인 시험을 통해 당해 분야의 통상의 기술자에 의해 용이하게 설정될 수 있다.
- [0176] 투약량 치료 (dosage treatment)는 궁극적으로 위에서 명시된 양을 전달하기 위한 단일 투여 스케줄 또는 다중 투여 스케줄일 수 있다. 더욱이, 대상체는 적절한 만큼 많은 투여량을 투여받을 수 있다. 따라서, 대상체에는 예를 들어, 10^5 내지 10^{16} 개 rAAV 비리온이 단일 투여량으로 투여될 수 있거나, 예를 들어, 10^5 내지 10^{16} 개 rAAV 비리온의 전달을 집합적으로 초래하는 2, 3, 4, 5, 6회 또는 그 이상의 횟수의 투여량으로 투여될 수 있다. 당해 분야의 통상의 기술자는 투여하기에 적절한 투여 횟수를 쉽게 결정할 수 있다.
- [0177] 따라서, 약제학적 조성물은 치료학적 유효량, 즉, 문제의 질환 상태의 증상을 감소 또는 완화하기에 충분한 양 또는 원하는 이점을 부여하기에 충분한 양의 관심 단백질을 생성하기에 충분한 유전 물질을 포함할 것이다. 따라서, rAAV 비리온은 하나 이상의 용량으로 제공될 때 치료 효과를 제공하기에 충분한 양으로 대상 조성물에 존재할 것이다. rAAV 비리온은 동결 건조된 제제로 제공될 수 있고 즉시 또는 향후 사용을 위해 비리온 안정화 조성물에 희석될 수 있다. 대안으로, rAAV 비리온은 생산 직후에 제공되고 향후 사용을 위해 보관될 수 있다.

- [0178] 또한, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용되는 부형제 또는 담체를 함유할 수 있다. 이러한 부형제는 조성물을 투여 받는 개체에게 유해한 항체의 생산을 자체적으로 유도하지 않고 과도한 독성 없이 투여될 수 있는 임의의 약제학적 작용제를 포함한다. 약제학적으로 허용되는 부형제로는 물, 식염수, 글리세롤 및 에탄올과 같은 액체가 있지만 이에 제한되지 않는다. 약제학적으로 허용되는 염, 예를 들어, 염산염, 브롬화수소산염, 인산염, 황산염 등과 같은 무기산염; 및 아세테이트, 프로피오네이트, 말로네이트, 벤조에이트 등과 같은 유기산의 염이 포함될 수 있다. 또한, 습윤제 또는 유화제, pH 완충 물질 등과 같은 보조 물질이 이러한 비히클에 존재할 수 있다. 약제학적으로 허용되는 부형제에 대한 철저한 논의는 문헌 [*Remington's Pharmaceutical Sciences and U.S. Pharmacopeia: National Formulary*, Mack Publishing Company, Easton, PA (1984)]에서 확인할 수 있다.
- [0179] 치료제 및 진단제의 제형은 예를 들어, 동결 건조된 분말, 슬러리, 수용액 또는 현탁액의 형태로, 허용되는 담체, 부형제 또는 안정화제와 혼합함으로써 제조될 수 있다.
- [0180] 단독으로 또는 다른 제제와 조합하여 투여되는 치료학적 조성물의 독성 및 치료 효능은 예를 들어, LD₅₀ (집단의 50%에 치명적인 용량) 및 ED₅₀ (집단의 50%에서 치료학적으로 효과적인 용량)을 결정하기 위한 세포 배양 또는 실험 동물에서 표준 약제학적 절차를 통해 결정될 수 있다, 독성 효과와 치료 효과 사이의 투여량 비율은 치료 지수 (LD₅₀/ED₅₀)이다. 특정 양태에서, 높은 치료 지수를 나타내는 치료학적 조성물이 바람직하다. 이러한 세포 배양 분석 및 동물 연구로부터 얻은 데이터는 인체에 사용하기 위한 투여량 범위를 공식화하는데 사용될 수 있다. 이러한 화합물의 투여량은 바람직하게는 독성이 거의 또는 전혀 없는 ED₅₀을 포함하는 순환 농도 범위 내에 있다. 투여량은 사용된 투여 형태 및 투여 경로에 따라 이러한 범위 내에서 다양할 수 있다.
- [0181] 적절한 투여량의 결정은 예를 들어, 치료에 영향을 미치는 것으로 당해 분야에 알려져 있거나 의심되는 파라미터 또는 요인을 사용하여 임상시에 의해 이루어진다. 투여는 최적 투여량보다 약간 적은 양으로 시작할 수 있으며 그 이후에는 부정적인 부작용에 비해 원하는 또는 최적의 효과가 달성될 때까지 조금씩 증량할 수 있다. 중요한 진단 척도는, 예를 들어, 염증의 증상 또는 생성된 염증성 사이토카인의 수준을 포함한다. 일반적으로, 사용되는 생물학적 제제 (biologic)는 치료 대상 동물과 동일한 종에서 유래되어 시약에 대한 면역 반응을 최소화하는 것이 바람직하다.
- [0182] AAV의 바람직한 투여 경로는 정맥내이다. 본 출원에 기재된 rAAV 벡터의 다른 투여 경로는 두개내, 실질내, 척수내를 포함한다.
- [0183] 바람직한 투여량은 약 1x10¹⁰ 내지 약 8x10¹¹, 약 2x10¹⁰ 내지 약 6x10¹¹, 약 4x10¹⁰ 내지 약 4x10¹¹개 게놈 또는 바이러스 카피 (vc) 총 투여량 범위이다. 바람직한 투여량은 rAAV의 약 4x10¹¹개 게놈 또는 바이러스 카피 (vc) 총 투여량이다.
- [0184] 하나 이상의 rAAV가 사용되는 경우 벡터의 바람직한 총 투여량은 약 1x10¹⁰ 내지 약 6x10¹¹, 약 2x10¹⁰ 내지 약 5x10¹¹, 약 1x10¹⁰ 내지 약 4x10¹¹ 게놈 또는 바이러스 카피 (vc) 총 투여량의 범위이다. 전체 벡터의 바람직한 투여량은 약 3x10¹¹이다.
- [0185] AAV는 동일한 양, 예를 들어, 50/50의 비율로 투여될 수 있거나, 약 5/95, 10/90, 15/85, 20/80, 25/75, 30/70, 35/65, 40/60, 45/55, 55/45, 60/40, 65/35, 70/30, 75/25, 80/20, 85/15, 90/10 및 95/5의 비율로 투여될 수 있다.
- [0186] 투여량은 대상체에서의 효과를 최적화하기 위해 조정될 수 있다. 추가로, 투여량을 증가시키기 전에 대상체의 병태 개선에 대해 대상체를 모니터링할 수 있다. rAAV의 치료학적 투여에 대한 대상체의 반응은 대상체의 근력 및 조절, 이동성 뿐만 아니라 키 및 체중의 변화를 관찰함으로써 모니터링될 수 있다. 투여 후 이러한 파라미터 중 하나 이상이 증가하면, 치료를 계속할 수 있다. 이러한 파라미터 중 하나 이상이 동일하게 유지되거나 감소하면, 투여량을 늘릴 수 있다.
- [0187] 키트
- [0188] 또한, 본 개시 내용은 키트 형태로 본 출원에 개시된 조합물의 성분을 포함하는 키트를 제공한다. 본 개시 내용의 키트는 본 출원에 기재된 바이러스 벡터 (예를 들어, AAV 벡터)를 포함하나 이에 제한되지 않는 하나 이상의 성분을 포함한다. 키트는 본 출원에 논의된 바와 같이 약제학적으로 허용되는 담체를 추가로 포함할 수 있

다. 바이러스 벡터는 약제학적 조성물에서 순수한 조성물로서 또는 약제학적으로 허용되는 담체와 조합하여 제형화될 수 있다.

[0189] 일부 실시 형태에서, 키트는 하나의 용기 (예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알)에 본 출원에 기재된 이식유전자를 함유하는 AAV 벡터를 포함한다.

[0190] 일부 실시 형태에서, 키트는 하나의 용기 (예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알)에서 본 출원에 기재된 이식유전자를 함유하는 AAV 벡터 및 또 다른 용기 (예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알)에서 본 출원에 기재된 이식유전자를 암호화하는 제2 AAV 벡터 및 또 다른 용기 (예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알)에서 본 출원에 기재된 이식유전자를 암호화하는 제3 AAV 벡터를 포함한다.

[0191] 일부 실시 형태에서, 키트는 하나 이상의 용기 (예를 들어, 멸균 유리 또는 플라스틱 바이알)에서 레트로머 코어 단백질 VPS35 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26a 및/또는 레트로머 코어 단백질 VPS26b를 암호화하는 AAV 벡터, 또는 이의 약제학적 조성물을 포함한다.

[0192] 키트가 대상체에 대한 비경구 투여를 위한 하나 이상의 약제학적 조성물을 포함하는 경우, 키트는 이러한 투여를 수행하기 위한 장치를 포함할 수 있다. 예를 들어, 키트는 위에서 논의된 바와 같이 하나 이상의 피하 주사 바늘 또는 다른 주사 장치를 포함할 수 있다.

[0193] 키트는 키트 내의 약제학적 조성물 및 투여 형태에 관한 정보를 포함하는 패키지 삽입물을 포함할 수 있다. 일반적으로, 이러한 정보는 동봉된 약제학적 조성물 및 제형을 효과적이고 안전하게 사용하는데 있어서 환자 및 의사를 돕는다. 예를 들어, 조합에 관한 하기의 정보가 삽입물에 제공될 수 있다: 약동학, 약리학, 임상 연구, 효능 파라미터, 적응증 및 사용법, 금기 사항, 경고, 예방 조치, 이상 반응, 과량투여, 적절한 투여량 및 투여, 공급 방법, 적절한 보관 조건, 참조, 제조업체/유통업체 정보, 및 특허 정보.

[0194] 실시예

[0195] 본 발명은 본 발명의 바람직한 실시 형태를 보다 완전하게 예시하기 위해 제시된 하기의 비제한적 실시예를 참조하여 더 잘 이해될 수 있다. 이들은 결코 본 발명의 넓은 범위를 제한하는 것으로 해석되어서는 안된다.

[0196] 실시예 1- 재료 및 방법

[0197] 플라스미드 제조

[0198] VPS35, VPS26a 및 VPS26b에 대한 mRNA 서열은 NCBI에서 입수하였다. 그 서열을 코돈 최적화한 다음 새로 합성하였다. 합성된 작제물을 AAV2 역 말단 반복부 (ITR) 및 유비퀴틴스 치킨 베타 액틴 야생형 프로모터를 갖는 AAV 전달 플라스미드 내로 서브클로닝하였다. 이식유전자 다음에는 소 성장 호르몬 폴리아데닐화 신호가 뒤따랐다. VPS35 서열을 삭제하여 빈 새시 벡터 대조군을 생성하였다. GFP 대조군은 표적 VPS-작제물의 이론적 설계를 모방하도록 설계하였다. 이는 VPS 작제물과 동일한 강화된 녹색 형광성 단백질, 동일한 소 성장 호르몬 polyA (BgH) 및 치킨 베타 액틴 야생형 프로모터를 함유하였다. 얻어지는 플라스미드는 도 3에 도시되어 있다.

[0199] AAV9 생성

[0200] 위에서 설명한 각 작제물은 MeiraGTx의 캡시드 및 헬퍼 플라스미드 DNA를 사용하여 재조합 아데노 관련 바이러스 벡터 9 (AAV9)에 개별적으로 패키징하였다. 간단히 말해서, 전달 플라스미드, rep-캡 플라스미드 및 헬퍼 플라스미드를 HEK 293 세포에 공동 형질 감염시켰다. 바이러스 및 세포 찌꺼기를 포함하는 수확된 현탁액을 밀리포어 SHC XL150 필터 (140cm²)를 사용하여 정화하였다. 그 다음, 정화된 현탁액을 AVB 세파로스, 20mL 컬럼으로 3배 컬럼 부피로 용리하여 정제하였다. 농축 및 정용여과를 100kD mPES 중공 섬유 (Spectrum MicroKros cat# C02-E100-05-S)를 이용하여 수행하였다. Amicon Ultra-4 Centrifugal Filter 30kD (cat# UFC8030)를 사용하여 추가 농축을 수행하였다.

[0201] N2A 배양

[0202] 마우스 신경모세포종 (N2a) 세포는 미생물 오염을 방지하기 위한 페니실린 및 스트렙토마이신을 갖는 50% DMEM (고 글루코오스) 및 50% Opti-MEM + 10% FBS 및 글루타민 (2mM)에서 배양하였다.

[0203] 형질 감염

[0204] 리포펙타민 형질 감염 프로토콜을 약간 수정하여 사용하였다. 간략하게 말해서, 리포펙타민 LTX를 사용하여 Vps35 및 Vps26 (Vps26a 또는 Vps26b) 플라스미드를 6웰 형태로 뉴런 유사 세포인 Neuro2a (N2a)에 공동 형질

감염시켰다. 100k 세포를 DNA-리포펙타민 복합체가 있는 배지를 이미 포함하는 각 웰에 플레이팅하였다. 빈 새시와 GFP는 대조군 플라스미드로 사용되었다. 웰 당 도입된 DNA 카피의 양은 2.81E+11이었다. 이전에 설명한 대로 RIPA 완충액을 사용하여 형질 감염 48시간 후에 세포를 수확하였다 (문헌 [Qureshi *et al.* 2019]).

[0205] 뉴런 배양 및 형질 도입

[0206] 이전에 설명한 대로 실시된 기본 마우스 피질 및 해마 뉴런 배양 (문헌 [Bhalla *et al.* 2012]). 뉴런 (웰 당 450k 세포)에는 12웰 플레이트에 플레이팅한 후 7일에 레트로머 AAV9 (웰 당 조건 당 2.27E+10 벡터 계놈)를 형질 도입하였다. 빈 새시 AAV9 및 GFP AAV9를 대조군으로 사용하였다. 배양물은 형질 도입 후 3주 동안 유지하였다 (총 4주). 28일째에 뉴런은 프로테아제 및 포스포타아제 억제제와 함께 RIPA 완충액을 사용하여 파쇄하였다.

[0207] 웨스턴 블롯

[0208] N2A 및 뉴런 배양물의 세포를 RIPA에서 파쇄하고 단백질을 이전에 설명한 대로 단리하였다 (문헌 [Qureshi *et al.* 2019]; [Kirby *et al.* 2015]). 샘플의 파쇄물을 NuPAGE® Bis-Tris 4-12% 겔에서 진행시키고, iblot을 사용하여 니트로셀룰로오스 막으로 옮기고 항체로 프로브하였다.

[0209] 하기의 단백질을 표적화하는 1차 항체를 사용하였다: VPS35 (ab57632, Abcam사, 1:1k); VPS26a (ab211530, Abcam사, 1:500); VPS26b (NBP1-92575, Novus사, 1:500 또는 15915-1-AP, Proteintech사, 1:500); VPS29 (sab2501105, Sigma-Aldrich사, 1:500); Sor11 (611861, BD-biosciences사, 1:2k 및 79322, Cell Signaling사, 1:500); 및 β-액틴 (ab6276, Abcam사, 1:5k). IRDye® 800 또는 680 항체 (LI-COR)를 800CW의 경우 1:10k, 680RD의 경우 1:15k, 680LT 항체의 경우 1:25k로 희석하여 2차 항체로 사용하였다. 이전에 설명한 대로 Odyssey 이미징 시스템을 사용하여 웨스턴 블롯을 스캔하였다 (문헌 [Eaton *et al.* 2013]).

[0210] Sor11 (BD-611861)의 경우, Peroxidase AffiniPure 당나귀 항-마우스 IgG (H+L)를 2차 항체로 사용하고 (Jackson Immuno Research labs사, 1:2k), Fujifilm LAS-3000 Imager에서 블롯을 스캔하였다.

[0211] 통계 분석

[0212] 통계 분석은 Microsoft Excel과 SPSS를 사용하여 수행하였다. 달리 명시되지 않는 한 양측 분포가 있는 등분산을 가정한 독립 2표본 스튜던트 t-검정을 모든 실험에 사용하였다. 모든 데이터는 평균으로 표시되며 오차 막대는 평균의 표준 오차를 나타낸다. 모든 막대 그래프는 GraphPad Prism 8에서 생성되었다. 산점도는 SPSS에서 생성되었다.

[0213] 실시예 2 - VPS35 발현 단독은 레트로머의 삼량체 및 기능을 상승시키기에 충분하지 않다

[0214] 외인성 VPS35 과발현이 레트로머 코어 단백질 및 비-결핍 상태에서 레트로머 기능에 미치는 영향을 확인하기 위해, 배양된 야생형 마우스 뉴런에 AAV9-VPS35-HA를 형질 도입하고 AAV9-GFP 또는 AAV9-빈 벡터 (EV)를 대조군 조건으로 하고 3주 후에 세포를 수확하였다.

[0215] 모든 레트로머 코어 단백질의 수준은 면역블롯팅에 의해 측정하였다 (도 2a). 대조군과 비교하여, 90% VPS35-HA 과발현은 내인성 VPS29 (p=9E-09)의 강력한 67% 증가 및 VPS26a (p=2E-08)의 작은 22% 증가를 유도하고 VPS26b (p=0.62) 증가를 유도하지 않는다 (도 2b).

[0216] 또한, Sor11 수준은 면역블롯팅에 의해 측정하였다. 대조군과 비교하여 VPS35 단독의 과발현은 Sor11의 약간 (11%)의 통계적으로 신뢰할 수 없는 (p=0.06) 증가를 유도하였다 (도 2b).

[0217] VPS35 과발현이 VPS29의 강력한 과발현을 유도하지만 VPS26 파라로그의 증가를 유도하지 않거나 약간의 증가를 유도하여 레트로머 기능에 명확한 영향을 미치지 않는다는 것을 보여줌으로써, 이러한 결과는 VPS35 및 VPS26 공동 발현의 영향의 조사를 정당화한다.

[0218] 실시예 3 - 신경모세포종 세포 및 플라스미드 및 AAV9 작제물을 사용한 결과

[0219] 신경모세포종 (N2A) 세포에 단일 단백질 (VPS35, VPS26a 또는 VPS26b) 또는 단백질 조합 (VPS35+VPS26a 또는 VPS35+VPS26b)을 발현하는 플라스미드를 형질 감염시켰다. GFP를 발현하는 플라스미드 또는 빈 플라스미드를 대조군으로 사용하였다.

[0220] 단일 단백질 조건은 다음과 같이 대조군 수준보다 높은 각 단백질의 과발현을 초래하였다: VPS35 단독의 경우 (80%, p=3.4E-09), VPS26a 단독의 경우 (550%; p=2.2E-06) 및 VPS26b 단독의 경우 (362%; p=0.0002). 단일 단

백질 조건과 비교할 때, VPS35+VPS26a 발현은 VPS35 (31%; $p=0.0003$), VPS29 (17%; $p=0.0007$) 및 VPS26a (52%; $p=0.015$)의 유의한 증가를 초래했지만, VPS26b의 변화는 최소였다. VPS35+VPS26b 발현은 VPS35 (15%; $p=0.07$) 및 VPS26b (56%; $p=0.14$)의 유의하지 않은 증가 및 VPS29 (22%; $p=0.0005$)의 유의한 증가를 초래했지만, VPS26a의 증가는 없었다. 도 4 참조.

- [0221] 실시예 4 - 뉴런 및 AAV9 작제물을 사용한 결과
- [0222] 배양된 뉴런에서 VPS35 및 VPS26 조합의 영향을 테스트하기 위해, 마우스 VPS35, VPS26a, VPS26b를 발현하는 5개의 실험 AAV9 벡터 및 2개의 대조군 AAV9 벡터 (하나는 GFP를 발현하고 다른 하나는 빈 벡터임)를 생성하였다. 실험 벡터는 다음과 같이 가능한 모든 조합으로 뉴런에서 발현시켰다: 단일 단백질 발현 (VPS35 단독, VPS26a 단독, VPS26b 단독); 이중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a, VPS35+VPS26b, VPS26b+VPS26a); 및 삼중 단백질 발현 (VPS35+VPS26a+VPS26b).
- [0223] 각 바이러스 벡터의 투여량은 탐색적 연구에서 최적화하였으며, 최종 조합 연구에서 사용되었을 때 평균 AAV9-VPS35 과발현은 11% (범위: 1% 내지 23%), 평균 AAV9-VPS26a는 218% (범위: 154% 내지 354%) 및 평균 AAV9-VPS26b는 80% (범위: 50% 내지 107%)였다 (도 5B, 청색 막대). 이러한 프로파일은 상호 작용 테스트에 특히 유용한 것으로 판명되었다.
- [0224] 단일 단백질 조건에서 검출된 수준을 조합 실험에서 검출된 수준과 비교함으로써, 레트로머 코어 단백질 발현에 VPS35-VPS26 상호 작용이 있는지 여부를 먼저 테스트하였다. 단일 단백질 발현과 비교하여, VPS35+VPS26a 발현은 VPS35 (70%; $p=4.4E-18$), VPS26a (53%; $p=2.1E-05$) 및 VPS29 (~42%; $p<1.22E-05$)의 유의한 증가를 초래했지만, VPS26b의 유의한 증가는 초래하지 않았다. VPS35+VPS26b 발현은 VPS35 (64%; $p=3.6E-09$), VPS26b (15%; $p=0.003$), 및 VPS29 (~18%; $p<0.013$)의 유의한 증가를 초래했지만, VPS26a의 유의한 증가는 초래하지 않았다.
- [0225] 마지막으로, VPS35+VPS26a+VPS26b 발현은 하기와 같이 대조군 (EV+GFP)에 비해 4가지 레트로머 단백질 모두의 유의한 증가를 초래하였다: VPS35 (81%; $p=5.6E-15$), VPS29 (51%; $p<1.8E-07$), VPS26a (220%; $p=1.7E-08$) 및 VPS26b (51%; $p=9.8E-10$).
- [0226] 도 5 참조.
- [0227] 이러한 결과는 VPS35 발현뿐만 아니라 VPS26a 및 VPS26b에 대한 VPS35 + VPS26의 공동 발현의 상승적 효과를 다시 입증하였다.
- [0228] 이러한 포괄적인 일련의 실험의 주요 목적은 상승적 상호 작용을 테스트하기 위한 것이지만, VPS35+VPS26a가 VPS26b에 영향을 미치지 않았고 VPS35+VPS26b가 VPS26a에 영향을 미치지 않았다는 사실은 뉴런에서 각 VPS26 파라로그가 생화학적으로 별개의 삼량체로 존재함을 시사한다.
- [0229] 실시예 5 - 조합된 VPS35 및 VPS26 발현은 뉴런에서 레트로머 기능을 상승시킨다
- [0230] 다음으로, SORL1의 기능 상실 돌연변이가 알츠하이머병의 원인이고 (문헌 [Holstege *et al.* 2017]) Sor11 단백질의 약 30% 감소는 산발성 질병의 초기 단계에서도 발견되기 때문에 (문헌 [Sager *et al.* 2007]; [Scherzer *et al.* 2004]; [Dodson *et al.* 2006]), 모든 조건에서 측정된 Sor11의 수준을 비교함으로써 VPS35 및 VPS26 조합이 레트로머 기능에 상승 효과가 있는지 여부를 테스트하였다.
- [0231] 제어 조건, 단일 조건, 조합 조건을 고정 요인으로 포함하고 Sor11을 종속 변수로 포함하는 일변량 (univariate) ANOVA를 사용하였다. 결과는 그룹 효과 ($F=19.3$, $p=9.3E-8$)를 나타내었으며, 대조군과 단일 조건 사이에 차이가 없었지만 (대조 추정치=0.1, $p=0.9$), 단일 및 조합 조건 간에는 유의한 (대조 추정치=0.4, $p=2.2E-7$)가 있었다. 사후 비교는 각 조합 조건이 단일 조건과 상당히 다르다는 것을 나타냈다 (도 6b).
- [0232] 흥미롭게도, 이러한 조합 조건이 VPS35 또는 VPS29의 수준을 증가시키지 않았음에도 불구하고 (도 5b), Sor11 (34%; $p=0.006$)에 미치는 VPS26a+VPS26b 과발현의 유의한 영향도 관찰되었다 (도 6b). Sor11은 VPS26을 통해 레트로머 코어와 상호 작용하는 것으로 밝혀졌으며 (문헌 [Suzuki *et al.* (2019)]), 이러한 관찰 결과는 두 파라로그가 Sor11과 독립적으로 상호 작용할 수 있음을 시사한다.
- [0233] 140개 이상의 실험 또는 제어 조건이 있고 4개의 레트로머 코어 단백질과 Sor11이 넓은 동적 범위에 걸쳐 측정된 대규모 데이터 세트를 사용하였다. Sor11 수준을 종속 변수로 포함하고 VPS35, VPS26, VPS26a 및 VPS26b 수준을 동시에 독립 변수로 입력하는 다중 선형 회귀 모델을 사용하였다. VPS26 파라로그만이 모델에 크게 기여하면서 Sor11 수준에 대한 유의한 관계가 확인되었다 ($F=19.5$, $p=1.1E-12$). 따라서, 그 모델은 두 파라로그

를 모두 포함하도록 트리밍되었으므로, VPS26a ($t=5.6$, $p=1.4E-7$) 및 VPS26b ($F=7.2$, $p=3.2E-11$)가 모두 Sor11 수준과 독립적으로 상관 관계가 있음을 확인하였다 (도 6c 및 도 6d). 이러한 결과는 뉴런이, 생화학적으로 구별될 뿐만 아니라 기능적으로도 구별되는 2개의 삼량체 (VPS26b-VPS35-VPS29 및 VPS26a-VPS35-VPS29)를 갖는다는 해석과 일치하였다.

[0234] 참고 문헌

Andersen, *et al.* Securing the future of drug discovery for central nervous system disorders. *Nature reviews. Drug discovery*. 2014;13(12):871-872.

Bhalla *et al.* The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport. *Neurobiol Dis*. 2012;47(1):126-34.

Collins *et al.* Structure of Vps26B and mapping of its interaction with the retromer protein complex. *Traffic* 2008;9(3):366-79.

Dodson *et al.* LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2006;65(9): 866-72.

Eaton *et al.* Total protein analysis as a reliable loading control for quantitative fluorescent Western blotting. *PLoS one*. 2013;8(8):e72457.

Holstege *et al.* Characterization of pathogenic SORL1 genetic variants for association with Alzheimer's disease: a clinical interpretation strategy. *Eur J Hum Genet*. 2017.

Kendall *et al.* Mammalian Retromer Is an Adaptable Scaffold for Cargo Sorting from Endosomes. *Structure*. 2020;28(4):393-405.e4.

Kirby *et al.* Adult hippocampal neural stem and progenitor cells regulate the neurogenic niche by secreting VEGF. *PNAS USA*. 2015;112(13):4128-33. Epub 2015/03/17.

Qureshi *et al.* Retromer repletion with AAV9-VPS35 restores endosomal function in the mouse hippocampus. *bioRxiv*. 2019:618496.

[0234]

[0235]

Sager *et al.*, Neuronal LR11/sorLA expression is reduced in mild cognitive impairment. *Ann Neurol.* 2007;62(6):640-7.

Scherzer *et al.* Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol.* 2004;61(8):1200-5.

Shi *et al.* The retromer subunit Vps26 has an arrestin fold and binds Vps35 through its C-terminal domain. *Nat Struct Mol Biol.* 2006;13(6):540-8.

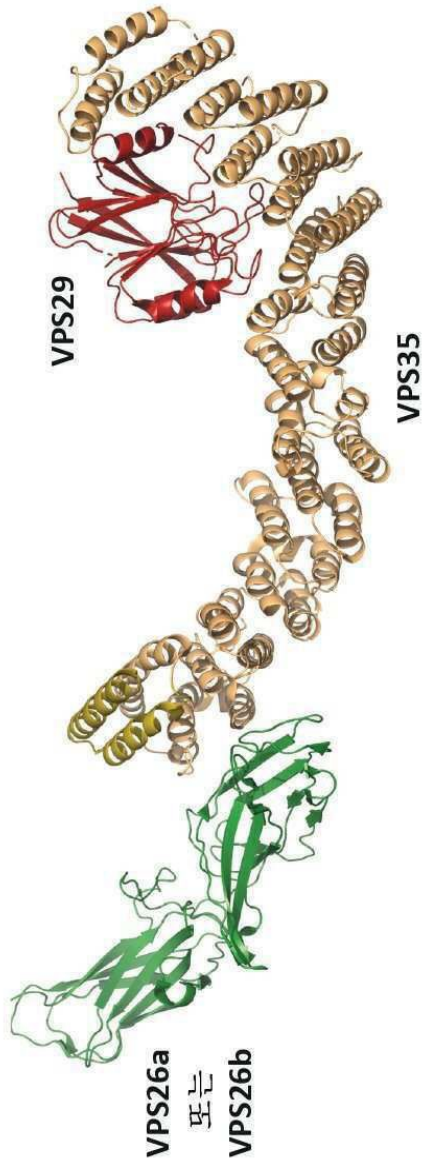
Small and Petsko Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nature reviews. Neuroscience.* 2015;16(3):126-132.

Suzuki *et al.* A bipartite sorting signal ensures specificity of retromer complex in membrane protein recycling. *J Cell Biol.* 2019;218(9):2876-2886.

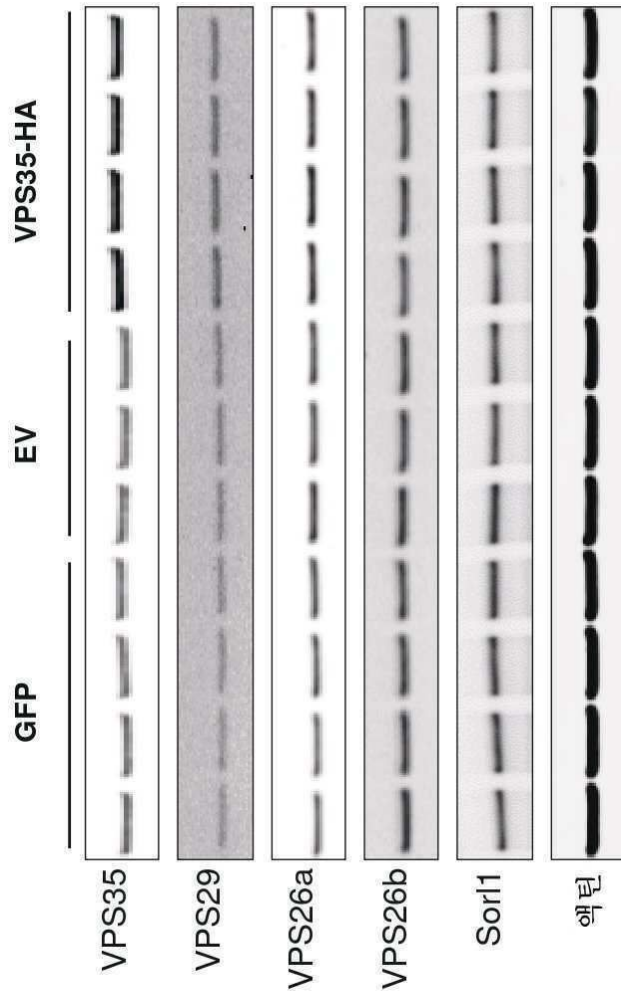
[0236]

도면
도면1

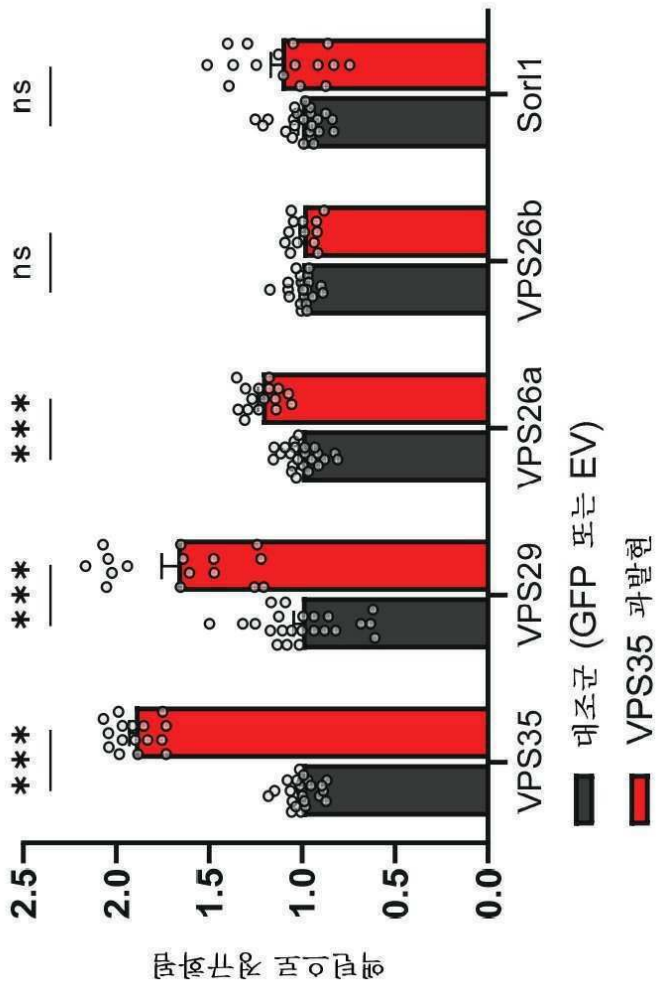
레트로머 코어 복합체



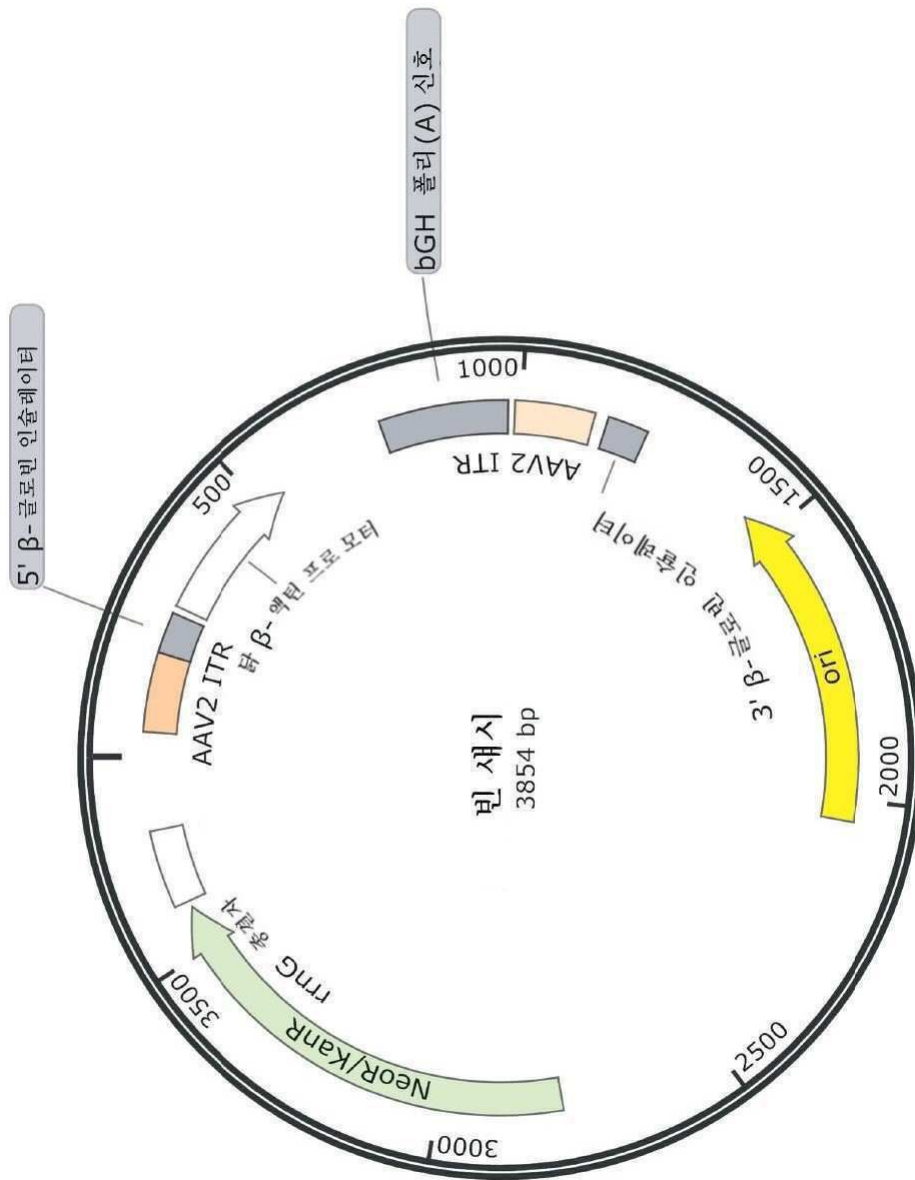
도면2a



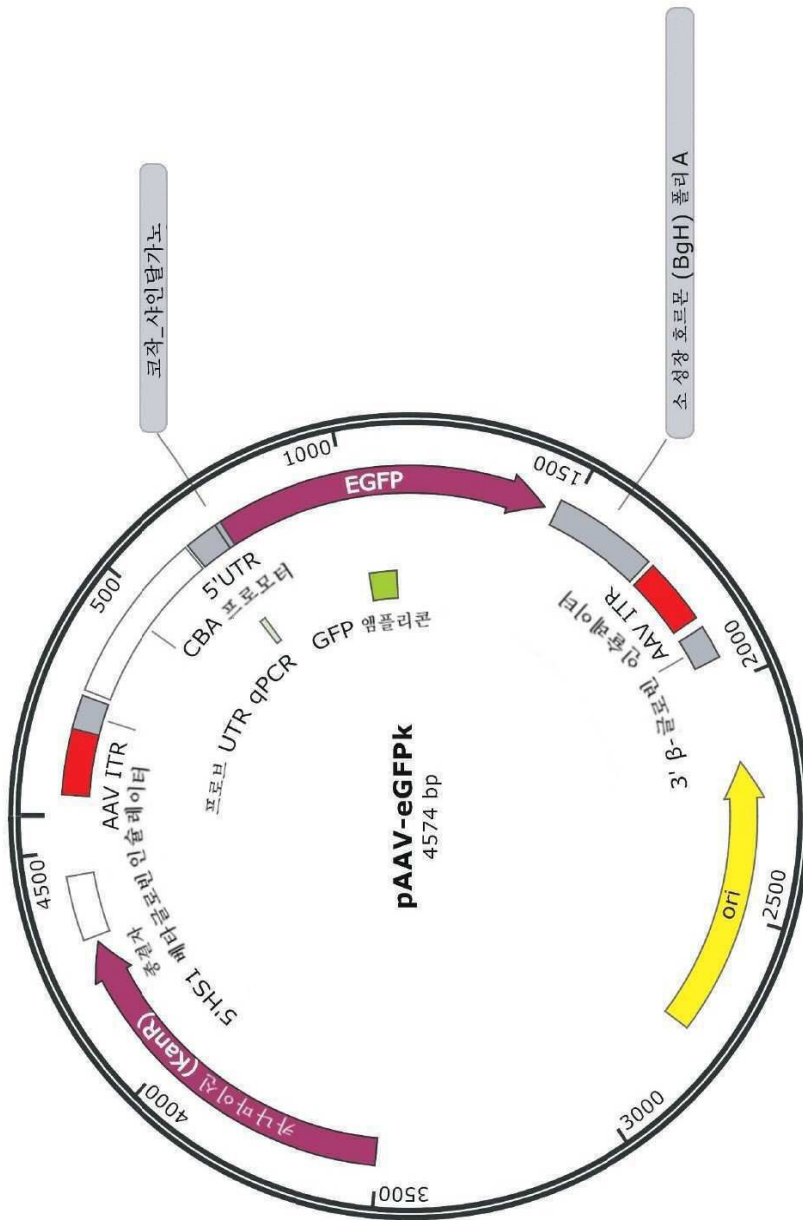
도면2b



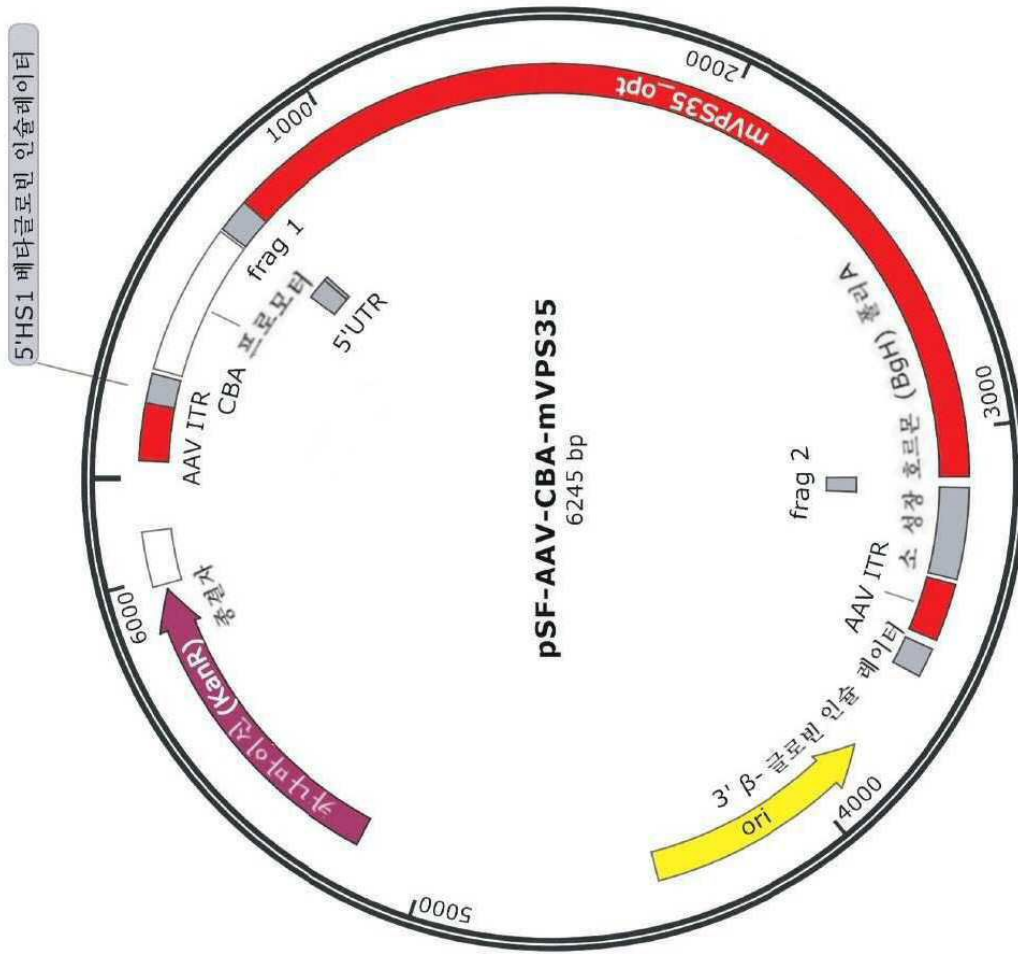
도면3a



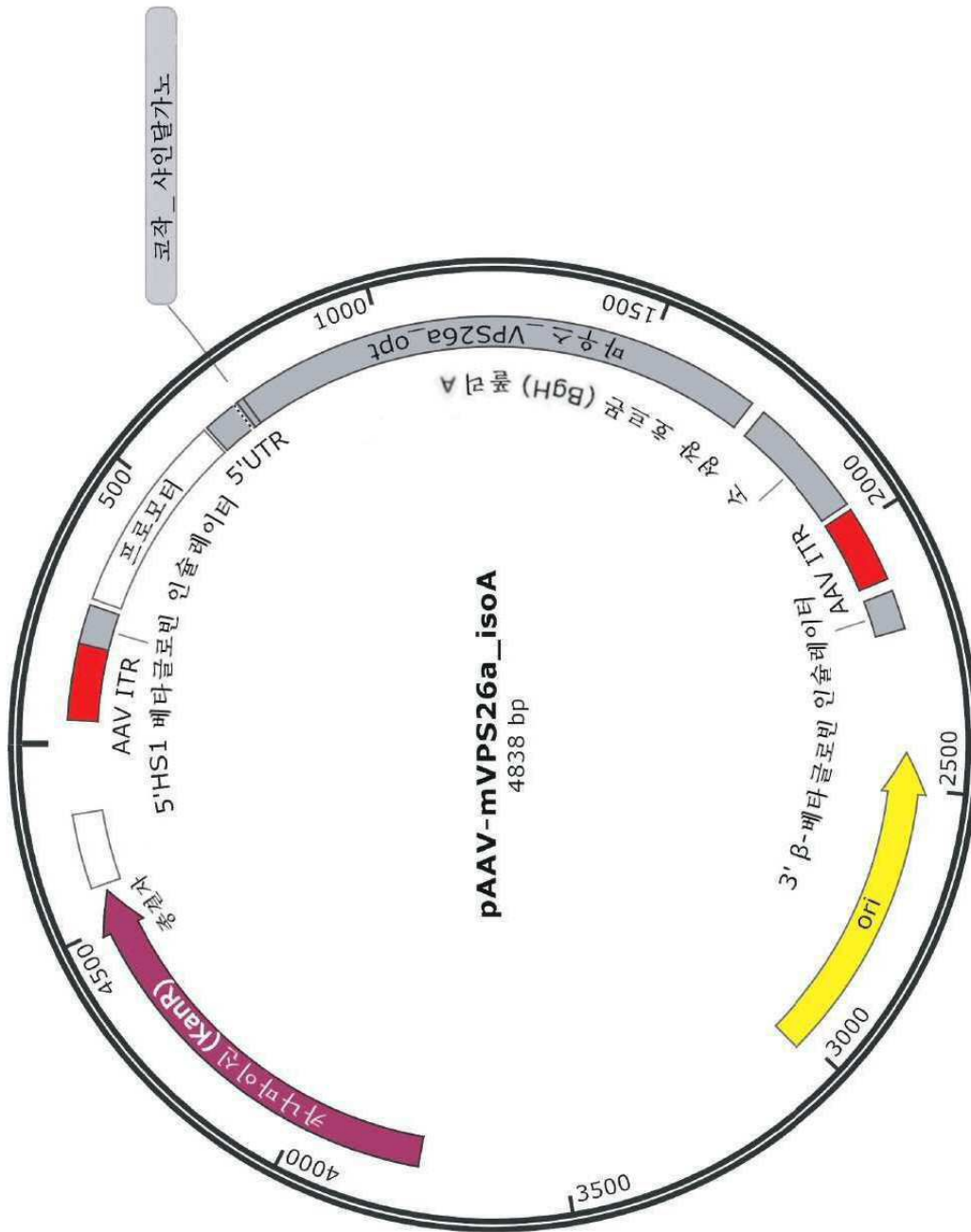
도면3b



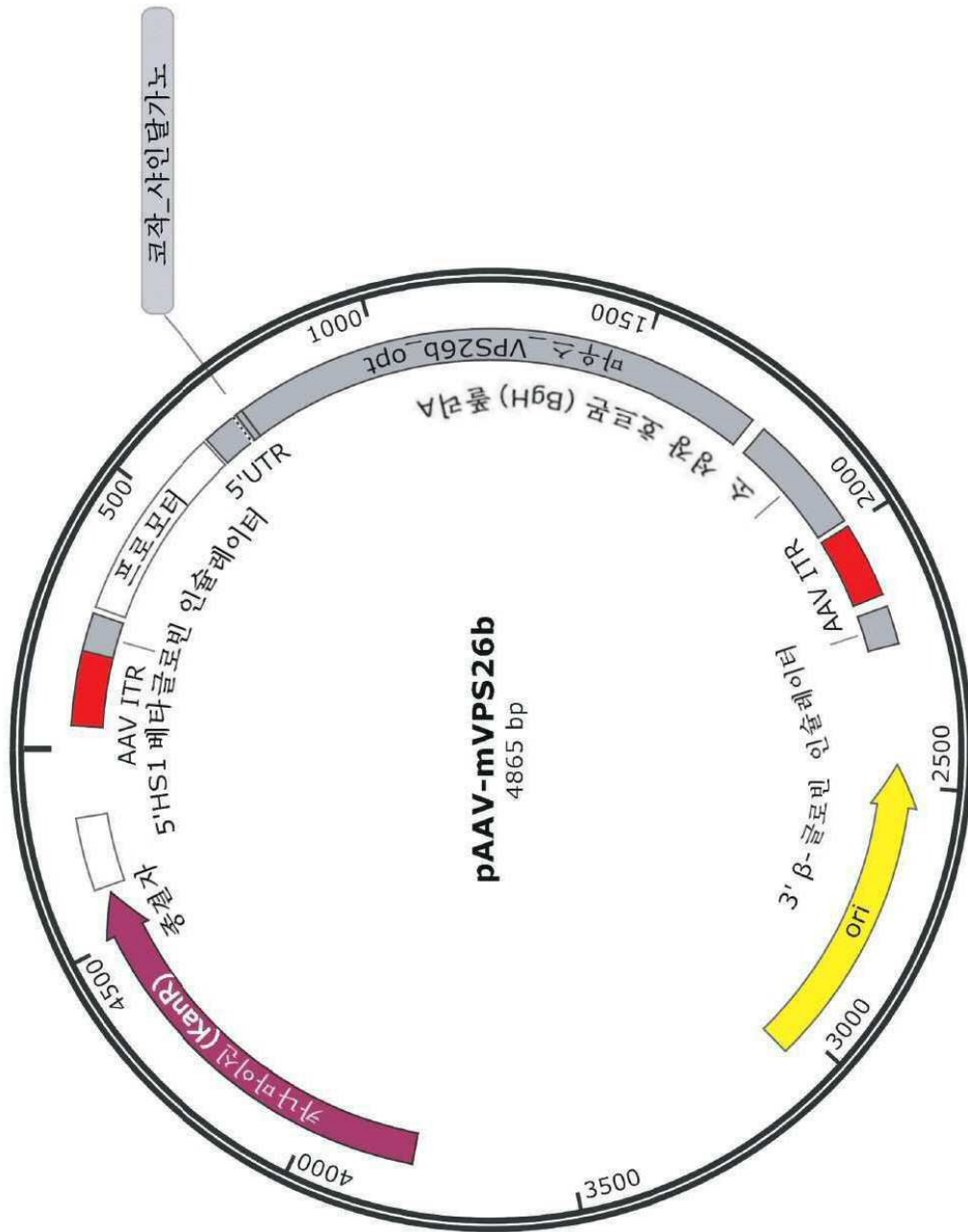
도면3c



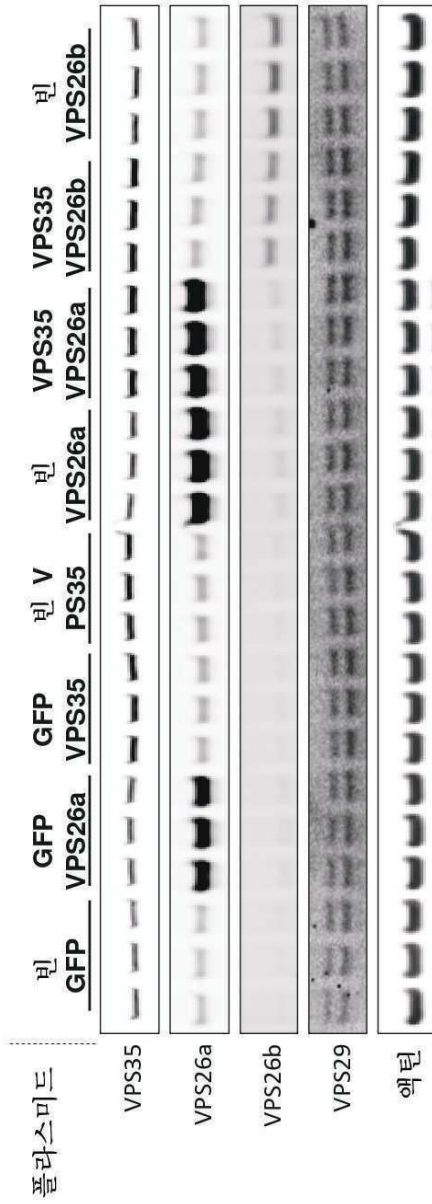
도면3d



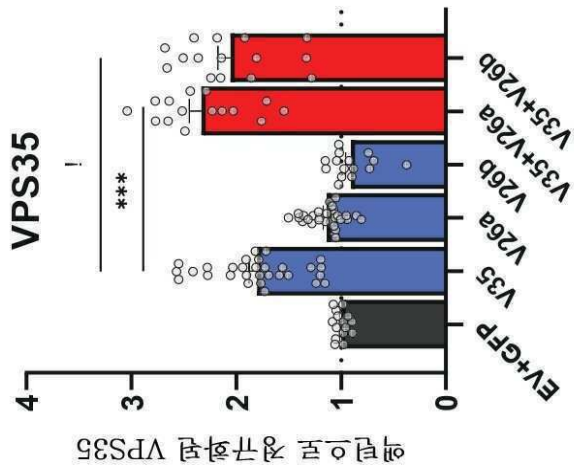
도면3e



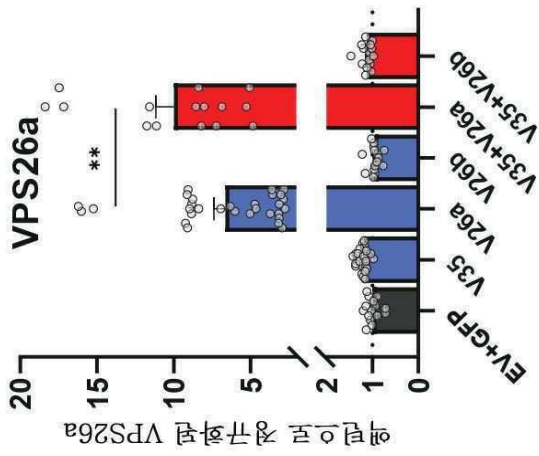
도면4a



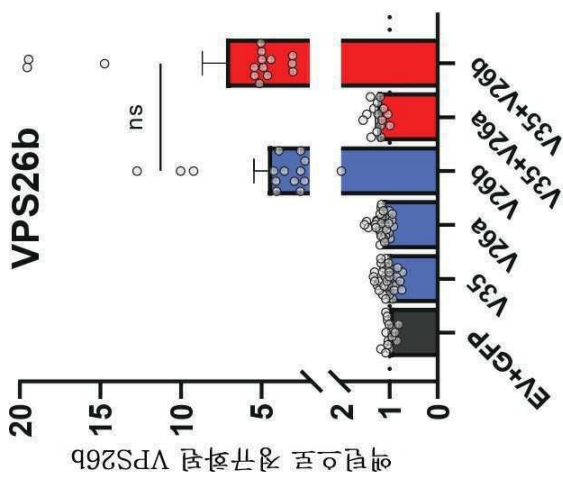
도면4b



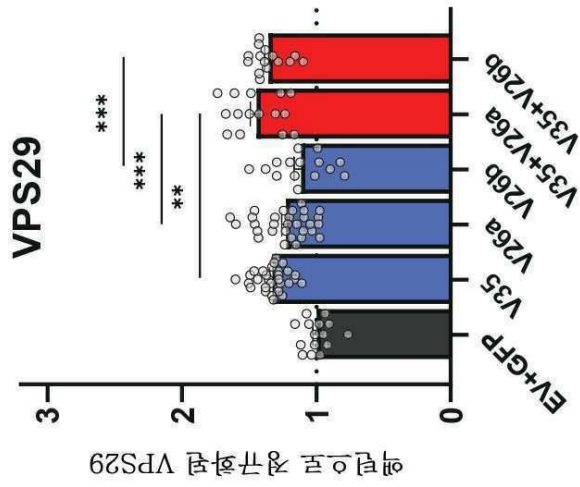
도면4c



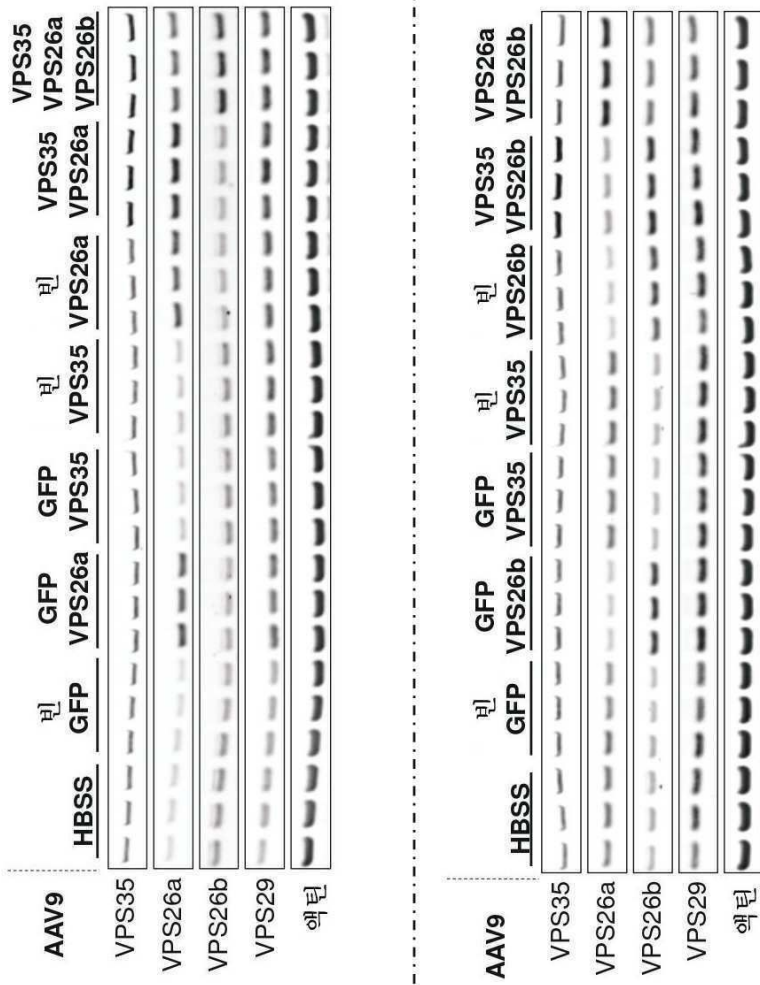
도면4d



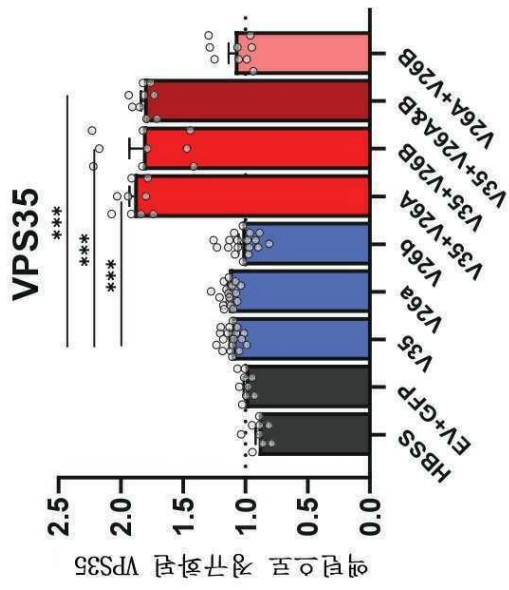
도면4e



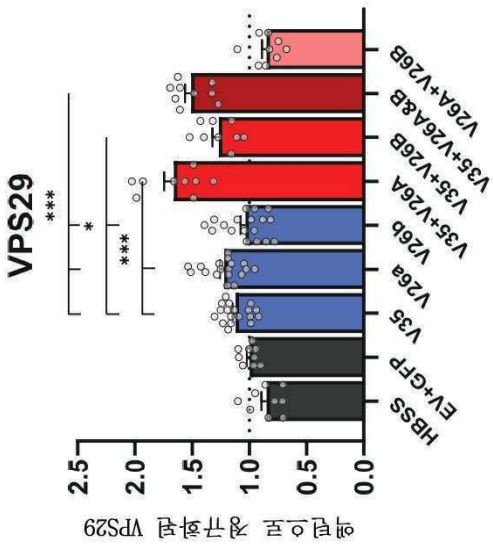
도면5a



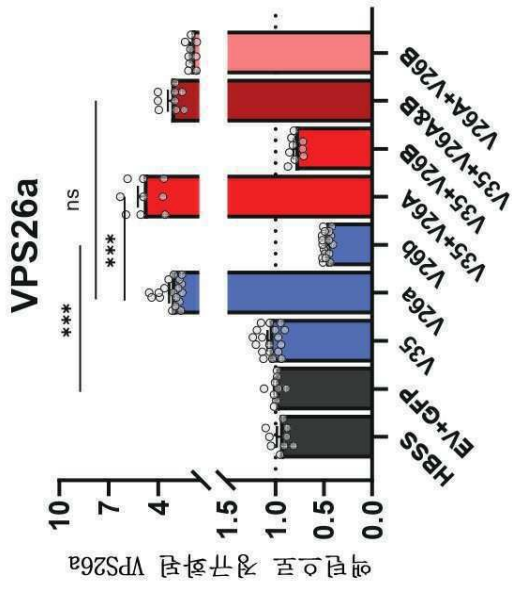
도면5b



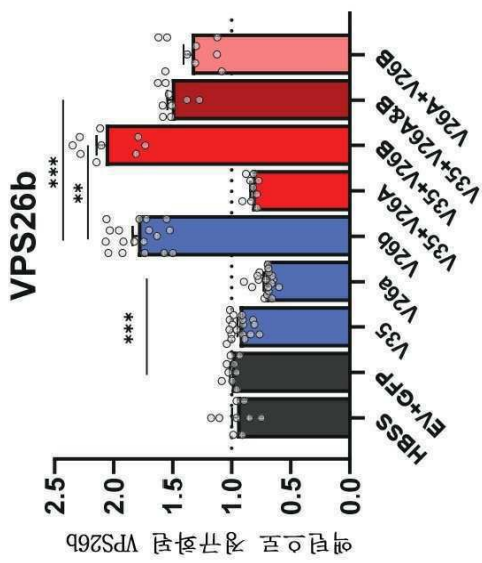
도면5c



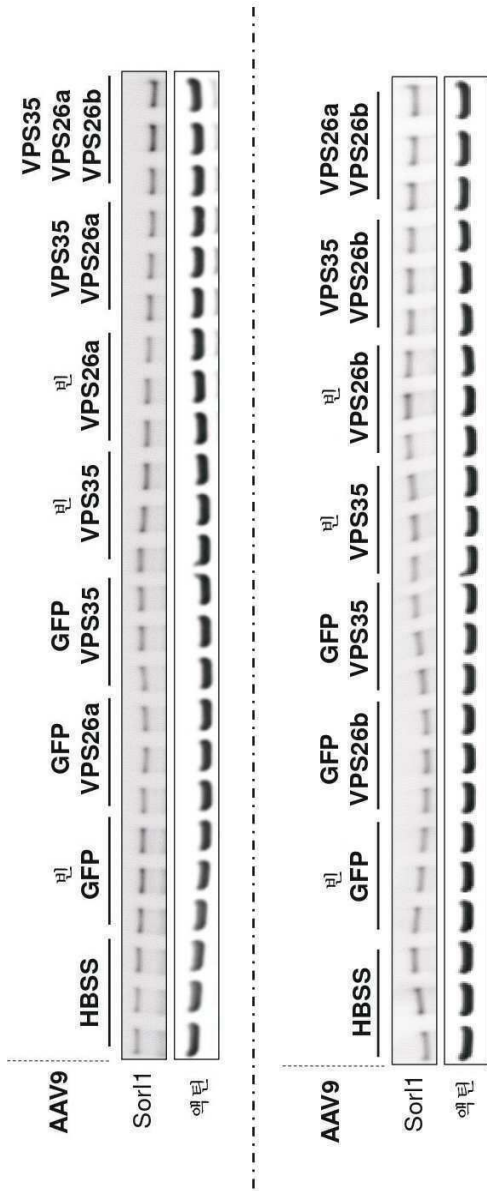
도면5d



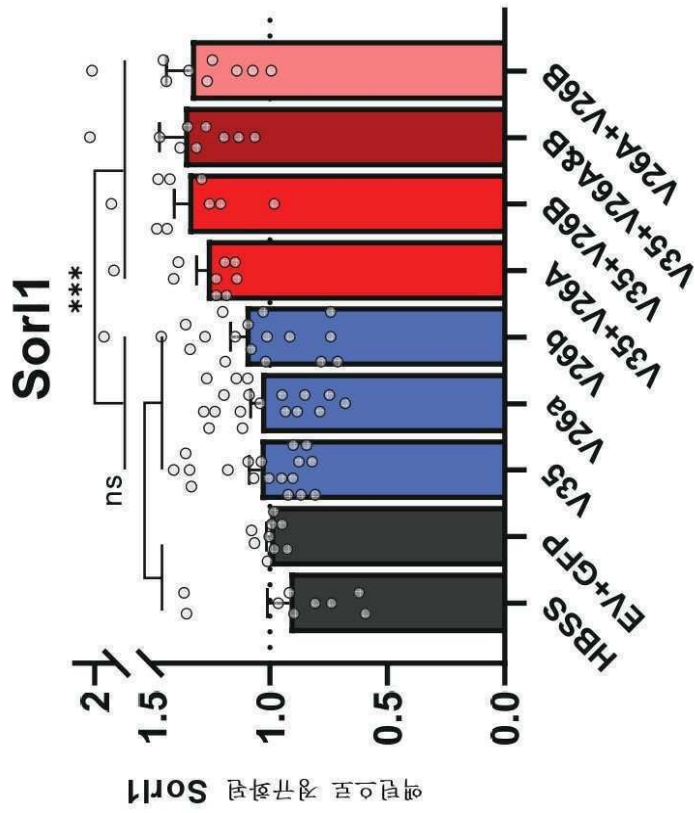
도면5e



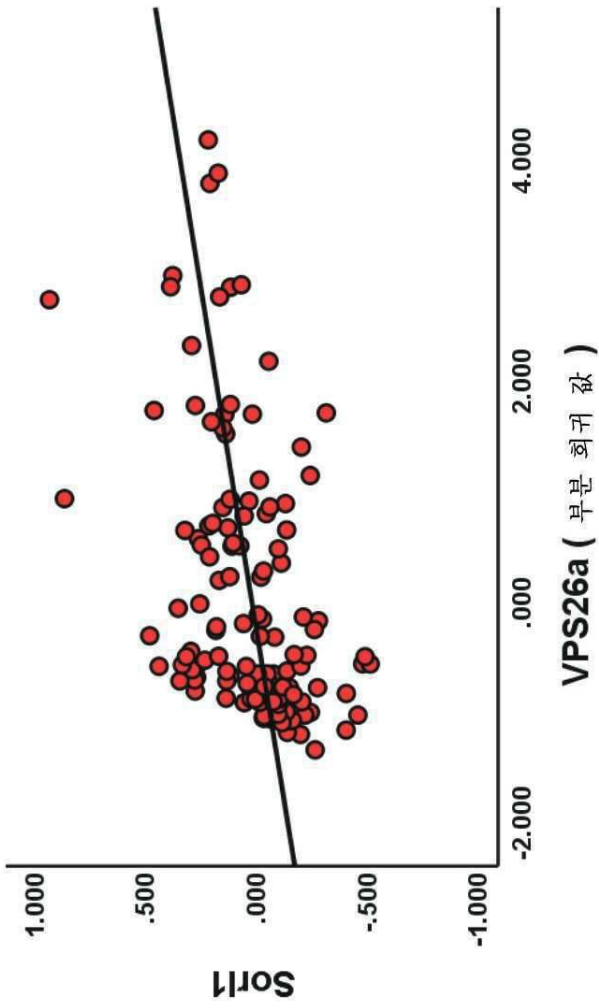
도면6a



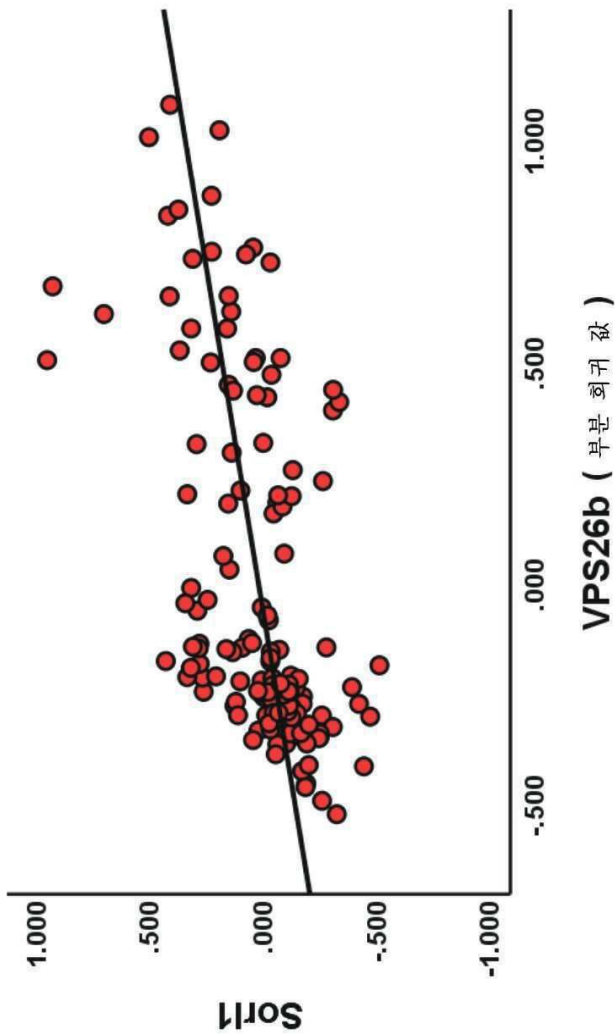
도면6b



도면6c



도면6d



서열 목록

- <110> The Trustees of Columbia University in the City of New York
Cornell University, Center for Technology Licensing at
Cornell
MeiraGTX UK II Limited
- <120> Stabilization of Retromer for the Treatment of Alzheimer's
Disease and Other Neurodegenerative Disorders
- <130> 01001/007731-W00
- <140> Filed Herewith
- <141> 2020-12-07
- <150> 62/943,999
- <151> 2019-12-05
- <150> 63/074,578

<151> 2020-09-04

<160> 10

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211

> 796

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Pro Thr Thr Gln Gln Ser Pro Gln Asp Glu Gln Glu Lys Leu Leu

1 5 10 15

Asp Glu Ala Ile Gln Ala Val Lys Val Gln Ser Phe Gln Met Lys Arg

 20 25 30

Cys Leu Asp Lys Asn Lys Leu Met Asp Ala Leu Lys His Ala Ser Asn

 35 40 45

Met Leu Gly Glu Leu Arg Thr Ser Met Leu Ser Pro Lys Ser Tyr Tyr

 50 55 60

Glu Leu Tyr Met Ala Ile Ser Asp Glu Leu His Tyr Leu Glu Val Tyr

65 70 75 80

Leu Thr Asp Glu Phe Ala Lys Gly Arg Lys Val Ala Asp Leu Tyr Glu

 85 90 95

Leu Val Gln Tyr Ala Gly Asn Ile Ile Pro Arg Leu Tyr Leu Leu Ile

 100 105 110

Thr Val Gly Val Val Tyr Val Lys Ser Phe Pro Gln Ser Arg Lys Asp

 115 120 125

Ile Leu Lys Asp Leu Val Glu Met Cys Arg Gly Val Gln His Pro Leu

 130 135 140

Arg Gly Leu Phe Leu Arg Asn Tyr Leu Leu Gln Cys Thr Arg Asn Ile

145 150 155 160

Leu Pro Asp Glu Gly Glu Pro Thr Asp Glu Glu Thr Thr Gly Asp Ile

 165 170 175

Ser Asp Ser Met Asp Phe Val Leu Leu Asn Phe Ala Glu Met Asn Lys

Arg Lys Ser Met Ser Cys Tyr Val Leu Ser Asn Val Leu Asp Tyr Asn
 435 440 445
 Thr Glu Ile Val Ser Gln Asp Gln Val Asp Ser Ile Met Asn Leu Val
 450 455 460
 Ser Thr Leu Ile Gln Asp Gln Pro Asp Gln Pro Val Glu Asp Pro Asp
 465 470 475 480
 Pro Glu Asp Phe Ala Asp Glu Gln Ser Leu Val Gly Arg Phe Ile His
 485 490 495
 Leu Leu Arg Ser Glu Asp Pro Asp Gln Gln Tyr Leu Ile Leu Asn Thr
 500 505 510
 Ala Arg Lys His Phe Gly Ala Gly Gly Asn Gln Arg Ile Arg Phe Thr
 515 520 525
 Leu Pro Pro Leu Val Phe Ala Ala Tyr Gln Leu Ala Phe Arg Tyr Lys
 530 535 540
 Glu Asn Ser Lys Val Asp Asp Lys Trp Glu Lys Lys Cys Gln Lys Ile
 545 550 555 560
 Phe Ser Phe Ala His Gln Thr Ile Ser Ala Leu Ile Lys Ala Glu Leu
 565 570 575
 Ala Glu Leu Pro Leu Arg Leu Phe Leu Gln Gly Ala Leu Ala Ala Gly
 580 585 590
 Glu Ile Gly Phe Glu Asn His Glu Thr Val Ala Tyr Glu Phe Met Ser
 595 600 605
 Gln Ala Phe Ser Leu Tyr Glu Asp Glu Ile Ser Asp Ser Lys Ala Gln
 610 615 620
 Leu Ala Ala Ile Thr Leu Ile Ile Gly Thr Phe Glu Arg Met Lys Cys
 625 630 635 640
 Phe Ser Glu Glu Asn His Glu Pro Leu Arg Thr Gln Cys Ala Leu Ala
 645 650 655
 Ala Ser Lys Leu Leu Lys Lys Pro Asp Gln Gly Arg Ala Val Ser Thr
 660 665 670
 Cys Ala His Leu Phe Trp Ser Gly Arg Asn Thr Asp Lys Asn Gly Glu

675 680 685
 Glu Leu His Gly Gly Lys Arg Val Met Glu Cys Leu Lys Lys Ala Leu

690 695 700
 Lys Ile Ala Asn Gln Cys Met Asp Pro Ser Leu Gln Val Gln Leu Phe
 705 710 715 720

Ile Glu Ile Leu Asn Arg Tyr Ile Tyr Phe Tyr Glu Lys Glu Asn Asp
 725 730 735

Ala Val Thr Ile Gln Val Leu Asn Gln Leu Ile Gln Lys Ile Arg Glu
 740 745 750

Asp Leu Pro Asn Leu Glu Ser Ser Glu Glu Thr Glu Gln Ile Asn Lys

755 760 765
 His Phe His Asn Thr Leu Glu His Leu Arg Leu Arg Arg Glu Ser Pro

770 775 780
 Glu Ser Glu Gly Pro Ile Tyr Glu Gly Leu Ile Leu

785 790 795

- <210> 2
- <211> 327
- <212> PRT
- <213> Homo sapiens
- <400> 2

Met Ser Phe Leu Gly Gly Phe Phe Gly Pro Ile Cys Glu Ile Asp Ile
 1 5 10 15

Val Leu Asn Asp Gly Glu Thr Arg Lys Met Ala Glu Met Lys Thr Glu

20 25 30
 Asp Gly Lys Val Glu Lys His Tyr Leu Phe Tyr Asp Gly Glu Ser Val

35 40 45
 Ser Gly Lys Val Asn Leu Ala Phe Lys Gln Pro Gly Lys Arg Leu Glu

50 55 60
 His Gln Gly Ile Arg Ile Glu Phe Val Gly Gln Ile Glu Leu Phe Asn

65 70 75 80
 Asp Lys Ser Asn Thr His Glu Phe Val Asn Leu Val Lys Glu Leu Ala

85 90 95
 Leu Pro Gly Glu Leu Thr Gln Ser Arg Ser Tyr Asp Phe Glu Phe Met
 100 105 110
 Gln Val Glu Lys Pro Tyr Glu Ser Tyr Ile Gly Ala Asn Val Arg Leu
 115 120 125
 Arg Tyr Phe Leu Lys Val Thr Ile Val Arg Arg Leu Thr Asp Leu Val
 130 135 140
 Lys Glu Tyr Asp Leu Ile Val His Gln Leu Ala Thr Tyr Pro Asp Val

 145 150 155 160
 Asn Asn Ser Ile Lys Met Glu Val Gly Ile Glu Asp Cys Leu His Ile
 165 170 175
 Glu Phe Glu Tyr Asn Lys Ser Lys Tyr His Leu Lys Asp Val Ile Val
 180 185 190
 Gly Lys Ile Tyr Phe Leu Leu Val Arg Ile Lys Ile Gln His Met Glu
 195 200 205
 Leu Gln Leu Ile Lys Lys Glu Ile Thr Gly Ile Gly Pro Ser Thr Thr

 210 215 220
 Thr Glu Thr Glu Thr Ile Ala Lys Tyr Glu Ile Met Asp Gly Ala Pro
 225 230 235 240
 Val Lys Gly Glu Ser Ile Pro Ile Arg Leu Phe Leu Ala Gly Tyr Asp
 245 250 255
 Pro Thr Pro Thr Met Arg Asp Val Asn Lys Lys Phe Ser Val Arg Tyr
 260 265 270
 Phe Leu Asn Leu Val Leu Val Asp Glu Glu Asp Arg Arg Tyr Phe Lys

 275 280 285
 Gln Gln Glu Ile Ile Leu Trp Arg Lys Ala Pro Glu Lys Leu Arg Lys
 290 295 300
 Gln Arg Thr Asn Phe His Gln Arg Phe Glu Ser Pro Glu Ser Gln Ala
 305 310 315 320
 Ser Ala Glu Gln Pro Glu Met
 325

<210> 3

<211> 336

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Met Ser Phe Phe Gly Phe Gly Gln Ser Val Glu Val Glu Ile Leu Leu

1 5 10 15
Asn Asp Ala Glu Ser Arg Lys Arg Ala Glu His Lys Thr Glu Asp Gly

 20 25 30
Lys Lys Glu Lys Tyr Phe Leu Phe Tyr Asp Gly Glu Thr Val Ser Gly

 35 40 45
Lys Val Ser Leu Ala Leu Lys Asn Pro Asn Lys Arg Leu Glu His Gln

 50 55 60
Gly Ile Lys Ile Glu Phe Ile Gly Gln Ile Glu Leu Tyr Tyr Asp Arg

65 70 75 80
Gly Asn His His Glu Phe Val Ser Leu Val Lys Asp Leu Ala Arg Pro

 85 90 95
Gly Glu Ile Thr Gln Ser Gln Ala Phe Asp Phe Glu Phe Thr His Val

 100 105 110
Glu Lys Pro Tyr Glu Ser Tyr Thr Gly Gln Asn Val Lys Leu Arg Tyr

 115 120 125
Phe Leu Arg Ala Thr Ile Ser Arg Arg Leu Asn Asp Val Val Lys Glu

 130 135 140
Met Asp Ile Val Val His Thr Leu Ser Thr Tyr Pro Glu Leu Asn Ser

145 150 155 160
Ser Ile Lys Met Glu Val Gly Ile Glu Asp Cys Leu His Ile Glu Phe

 165 170 175
Glu Tyr Asn Lys Ser Lys Tyr His Leu Lys Asp Val Ile Val Gly Lys

 180 185 190
Ile Tyr Phe Leu Leu Val Arg Ile Lys Ile Lys His Met Glu Ile Asp

 195 200 205
Ile Ile Lys Arg Glu Thr Thr Gly Thr Gly Pro Asn Val Tyr His Glu

ggaacaaatt tggtagcct tagtcagttg gaaggtgtaa atgtggaacg ttacaaacag 720

 atgtttctaa caggcattct ggagcaggtt gtgaattgta gggatgctct ggctcaggag 780
 tatctcatgg agtgcacat tcaggttttt cctgatgagt ttcaccttca gactttgaat 840
 ccttttctta gagcttgtgc tgaattacac caaaatgtaa atgtgaaaa cataatcatt 900
 gctttaattg acagattagc tttatttgct catcgtgaag atggaccgg aattccagct 960
 gagattaaac tttttgacat attttcacaa caggtggcta cagtcataca gtccagacaa 1020
 gacatgcat cagaggatgt tgtatcttta caagtctctc tcattaatct tgctatgaaa 1080
 tgttacctg atcgtgtgga ctacgtgat aaagtcttag aaacaacagt ggagatattc 1140

 aataagctta acctgaaca tattgctacc agtagtgcag tttcaaagga gcttaccaga 1200
 cttttgaaga tacctgttga tacttacaac aatatttaa caglatataa gttaaagcat 1260
 ttccaccac tttttgagta ctttgactac gaggccagaa agagcatgag ctgttatgtg 1320
 cttagtaatg ttctggatta taacacagaa atcgtctctc aggaccaggt agattccata 1380
 atgaatttgg tgtccacatt gattcaggat cagccagacc aacctgtaga agaccctgat 1440
 ccagaagact tcgtgatga acagagcctt gttggccgat ttattcatct getacgttct 1500
 gatgatcctg accagcagta tttgattttg aataggcac gaaaacattt tggggctggt 1560

 ggaaatcagc ggattcgtt cacactgcca cttttggtat ttgcagctta ccagttggct 1620
 tttcgataca aagagaattc ccaaatggat gacaagtggg aaaagaaatg ccagaagata 1680
 ttttcatttg ctaccagac tatcagtgct ttgattaaag ctgagctggc tgaattacca 1740
 ctgagacttt ttctcaagg agcattagct gctggagaaa ttggctttga aatcatgaa 1800
 acagtagcat atgaatttat gtcccaggca ttttctctat atgaagatga aatcagtgat 1860
 tctaaagcac agctggctgc taccacttg atcatcgga cttttgagag gatgaaatgc 1920
 ttcagtgaag agaatcatga acccttgaga actcagtggt cacttgctgc atcaaaactt 1980

 ctgaaaaaac cagatcaagg ccgagccgtg agcacatgtg cgcactcttt ttggtctggc 2040
 cgaaacacag acaaaaatgg ggaagagctt catggaggta aaagggtcat ggagtgccta 2100
 aagaaggcac taaaaatagc aatcagtgct atggaccctt ctctacaagt tcagctcttt 2160
 atagagattc tgaacaggta catctatttc tafgaaaaag aaaatgatgc ggtaccatt 2220
 caagtcttga accaacttat tcaaaagatt cgagaagatc tcccaaatct tgagtccagt 2280
 gaagaacacag acaaaataaa caagcatttt cacaacacat tggagcactt gcgctcaaga 2340
 cgggaatcac cagagcttga ggggccaatc tafgaaggtc tcatccttta a 2391

<210> 5

<211> 984

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 5

atgagttttc ttggagcctt ttttggtecc atttgtgaga ttgatgttgc ccttaatgat 60
 ggggaaacca ggaaaatggc agaaatgaaa actgaggatg gcaaagtaga aaaacactat 120
 ctcttctatg atggcgagtc tgtctcagga aaggtaaacc tagcctttaa gcagcctgga 180
 aagaggctag agcatcaagg aattagaatt gaattttag gtcaaattga gcttttcaat 240
 gacaagagta atactcatga atttgtaaac ctagtgaagg aactagcctt gcctggagaa 300
 ctgactcaga gcagaagcta tgactttgaa tttatgcaag ttgaaaagcc atatgagtca 360

tacatcgggtg ccaatgtccg cctgaggat tttcttaagg tgacaattgt gagaagattg 420
 acagacttag tgaagagta cgatcttatt gttcatcagc tagccaccta tctgatgtc 480
 aacaactcta ttaaaatgga agtgggcatt gaagactgtc tgcacataga gtttgaatat 540
 aataagtcca agiatcattt aaaggatgta attgttgaa aaatttactt cttattagta 600
 agaataaaaa tacaacacat ggaattacag ctgatcaaga aagagatcac aggaattgga 660
 cccagcacca caacagagac agaaacaatc gctaagtatg aaataatgga tggggcgcca 720
 gtaaaaggag aatctattcc gataagattg ttcttagcag ggtatgaccc aacccccacg 780

atgagagatg tgaacaagaa gttttcagta aggtactttc taaacctcgt gcttgttgat 840
 gaggaggacc gaaggactt caagcagcag gagatcatcc tgtggagaaa agcaccggag 900
 aaactgagaa aacagaggac gaactttcac cagcggtttg aatctccaga ctgcaggcc 960
 tctgcggagc agcctgagat gtaa 984

<210> 6

<211> 1011

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 6

atgagcttct tcggcttcgg gcagagcgtg gaggtggaaa tcttctgtaa tgatgcggag 60
 agtaggaagc gagcggagca caagactgag gacgggaaga aggagaaata tttcctcttc 120

 tacgacgggg aaaccgtctc ggggaaagtg agcctatcac tgaagaaccc caacaagcga 180
 ctagagcacc agggcatcaa gatcgagttc attgggcaga tcgaactcta ctatgaccgt 240
 gggaaccacc atgagtttgt gtctttgggtg aaggacctgg ctcggccagg agagatcacc 300

caatcgagg ccttcgactt tgagttcacc catgtggaaa agccgtatga atcctacaca 360
 ggacagaatg tgaagctccg ctatttcctt cgagccacca tcagccgccg cctcaatgat 420
 gttgttaaag agatggacat tgtagttcac acacttagca cataccccga gctgaactca 480
 tccatcaaga tggaagtgg cattgaggat tgctgcaca ttgaatttga gtacaacaaa 540

 tccaaatacc acttgaaaga tgtcattgta gggaagatat acttcctgct ggtgagaatc 600
 aagatcaage acatggagat agacatcatc aaacgagaga caacaggcac gggteccaac 660
 gtgtaccacg agaacgacac aatagcgaag tatgagatca tggacggggc accagtccga 720
 ggtgagtcca tccccatcag gctcttctg gcagggtatg agctcacacc caccatgcgt 780
 gacataaata agaagtctc tgtgcgctat tacctcaact tgggtctgat agatgaggag 840
 gaacggcgct acttcaagca gcaggaagtg gtgttggc ggaagggtga catcgtacgg 900
 aagagcatgt cccaccaggc agccattgcc tcacagcgtc tcgagggcac aacctcctg 960

 ggtgaggtgc ggaccctgg ccaactgtct gacaacaaca gcaggcagta g 1011
 <210> 7
 <211> 2391
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 7

 atgcccaaa cacagcagag cccacaggat gaacaggaaa agctgctgga tgaggccatc 60
 caggctgtga aagtgcagtc cttccagatg aaaagatgtc tggataagaa taagctgatg 120
 gacgcccctga agcatgccag caacatgctg ggcgagctga ggaccagcat gctgtctccc 180
 aagtcctact acgagctgta catggccatt tctgacgagc tgcactacct ggaggtgtac 240
 ctacagatg agttcgccaa ggggagaaaag gtggccgatac tgtatgagct ggtgcagtat 300

 gctggcaaca tcatccccag gctgtacctg ctgatcaccg tgggcgtggt gtatgtgaag 360
 agttcccc agtctagaaa ggatatcctg aaggacctgg tggaaatgtg caggggagtg 420
 cagcatcctc tgagaggcct gtttttgaga aactacctgc tgcagtgtac caggaatatic 480
 ctgcccagc aaggcgagcc tactgatgaa gaaacaaccg gcgacatcag cgacagcatg 540
 gattttgtgc tgcgtgaactt cgccgagatg aacaaactgt ggggtgagaat gcagcaccag 600
 ggacacagca gggacagaga gaagagagag agggagagac aggagctgag aatcctggtg 660
 ggcaccaacc tggtagaggt gtcccagctg gagggcgtga atgtggagag atataagcag 720

 attgtgctga caggaatcct ggagcaggtg gtgaactgca gagatgcctt ggcccaggag 780
 tatctgatgg aatgcatcat tcaggtgttc ccagatgagt tccacctgca gacactgaac 840

cctttcctga gggcctgcgc cgagctgcat cagaacgtga acgtcaagaa catcatcatt 900
 gctctgattg acaggctggc cctgtttgcc catagagagg atggacctgg catcccagcc 960
 gagatcaagc tgtttgacat ttccagccag caggtggcca ccgtgatcca gtctaggcag 1020
 gacatgcctt ccgaagatgt ggtgagcctg caggtgtccc tgatcaatct ggccatgaag 1080
 tgttaccctg atagagtgga ttacgtggac aaggtgctgg agaccacagt ggagatcttc 1140

 aacaagctga acctggagca catgccact tcttctgctg tgtctaaaga actgacaaga 1200
 ctgctgaaga tcctgtgga cacctacaac aacattctga ccgtgctgaa gctgaaacac 1260
 ttccatccac tgttcgagta ctttgattat gagagcagga agtccatgag ctgctacgtg 1320
 ctgagcaatg tgctggacta caatacagaa atcgtgtccc aggatcaggt ggacagcatc 1380
 atgaatctgg tgagcacact gatccaggac cagcctgac agccagtgga ggaccccgac 1440
 cctgaggact tcgctgacga gcagagcctg gtgggcaggt tcatccacct gctgaggtct 1500
 gatgatccag accagcagta cctgatcctg aacaccgcca ggaagcactt tggagccgga 1560

 ggcaaccaga ggatcagatt caccctgcct ccctggtgt ttgccgcta ccagctggct 1620
 ttcagataca aggaaaattc ccagatggat gacaagtggg agaaaaaatg ccagaagatc 1680
 ttttcttttg ctaccagac catctctgcc ctgatcaaag ctgagctggc tgaactgcca 1740
 ctgagactgt tctccaggg ggcctggct gccggggaga tcggctttga gaacatgag 1800
 actgtggcct atgaattcat gtctcaggcc ttctctctgt acgaagatga gatcagcgac 1860
 agcaaggctc agctggctgc tatcacactg atcattggaa catttgaaag gatgaagtgc 1920
 ttctccgagg aaaaccacga gccactgaga acacagtgtg cactggccgc ctccaagctg 1980

 ctgaagaagc ctgaccaggg cagagccgtg tctacctgtg cccacctgtt ctggagcggg 2040
 agaaacacag acaaaaatgg agaggagctg catggcggca agagggtgat ggagtgcctg 2100
 aagaaagccc tgaagattgc caaccagtgc atggacceaa gcctgcaggt gcagctgttc 2160
 atcgagatcc tgaacaggtg catctacttc tacgagaagg agaatgacgc cgtgaccatt 2220
 caggtgctga atcagctgat ccagaaaatc agggaagacc tgccaacct ggagagctct 2280
 gaagagacag agcagatcaa caagcatttt cacaacactc tggaacatct gaggtccagg 2340
 agggagtccc cagagtctga gggacccatc tatgaggggc tgatcctgtg a 2391

<210> 8

<211> 984

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 8

atgagcttcc tggcggtt cttcggcccc atctgtgaga tgcacgtggc cctgaacgac 60
 ggcgagacca gaaagatggc cgagatgaag acagaggatg gcaaggtgga gaagcactac 120
 ctgttctacg acggagagtc tgtgtccggc aaggtgaacc tggccttcaa gcagcctggg 180
 aagaggctgg agcaccaggg catcagaatc gagttcgtgg gccagatcga gctgttcaac 240
 gacaagagca acaccacga gtttgaac ctggtgaagg agctggctct gcctggcgag 300
 ctgaccaga gcagaagcta cgacttcgag ttcattgcagg tggagaagcc ttacgagagc 360

 tacatcggcg ccaacgtgag actgagatac ttctgaagg tgaccatcgt gaggagactg 420
 accgacctgg tgaaggagta tgacctgac gtgcaccagc tggccaccta cctgacgtg 480
 aacaacagca tcaagatgga ggtgggcatc gaggactgcc tgacatcga gttcgagtac 540
 aacaagtcca agtaccacct gaaggacgtg atcgtgggca agatctactt cctgctggtg 600
 aggatcaaga tccagcacat ggagctgcag ctgatcaaga aggagatcac cggcatcggc 660
 cttccaca ccaccgagac agagacaatc gccaagtacg agatcatgga cggcgcccct 720
 gtgaaggcg agagcatccc tatcaggctg ttctggccg gctacgacc taccctacc 780

 atgagagacg tgaacaagaa gttcagcgtg aggtacttcc tgaacctggt getggtggac 840
 gaggaggaca gaagatactt caagcagcag gagatcatcc tgtggaggaa ggcccctgag 900
 aagctgagga agcagaggac caactccac cagagattcg agtcccctga cagccaggcc 960
 agcggcggagc agccagagat gtga 984

 <210> 9
 <211> 1011
 <212> DNA
 <213> Mus musculus
 <400> 9

 atgagttttt ttgggttgg acagtcagtg gaggtggaga tcctgctgaa cgacggcgag 60
 agcaggaaga gggccgagca caagacagag gatggcaaga aggagaagta cttcctgttc 120

 tacgacggag agaccgtgag cggcaagggtg tcctgagcc tgaagaacce aaacaagaga 180
 ctggagcacc agggcatcaa gatcgagttc atcggccaga tcgagctgta ctacgacagg 240
 ggcaaccacc acgagttcgt gagcctggtg aaggacctgg ccagacctgg cgagatcacc 300
 cagagccagg ccttcgactt cgagttcacc cacgtggaga agccttacga gagctacaca 360
 ggccagaacg tgaagctgag gtacttcctg agagccacca tcagcagaag actgaacgac 420
 tgggtgaagg agatggacat cgtggtgcac accctgagca cctacctga gctgaactct 480
 tccatcaaga tggaggtggg catcaggagc tgctgcaca tcgagttcga gtacaacaag 540

agcaagtacc acctgaagga cgtgatcgtg ggcaagatct acttcctgct ggtgagaatc 600
 aagatcaagc acatggagat cgacatcatc aagagagaga ccacaggcac aggcctaac 660
 gtgtaccacg agaacgacac catcgccaag tacgagatca tggacggcgc ccctgtgaga 720
 ggcgagagca tcctatcag gctgttcctg gccggctacg agctgacccc taccatgagg 780
 gacatcaaca agaagttcag cgtgagatac tacctgaacc tgggtctgat cgatgaggag 840
 gagagaagat acttcaagca gcaggagggtg gtgctgtgga gaaagggcga catcgtgaga 900
 aagagcatga gccaccaggc cgccatcgcc agccagagat tcgagggcac caccagcctg 960

ggcgaggtga ggaccctgg ccagctgagc gacaacaaca gcagacagtg a 1011

<210> 10

<211> 2391

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atgcctaca cacagcagtc ccctcaggat gaggcagaaa agctcttggga tgaagccata 60
 caggctgtga aggtccagtc attcctaatg aagagatgcc tggacaaaa caagctcatg 120
 gatgctctaa aacatgcttc taatatgctt ggtgaactcc ggacttctat gttatcacca 180
 aagagttact atgaacttta tatggccatt tctgatgaac tgcactactt ggaggctctac 240
 ctgacagatg agtttgctaa aggaagggaaa gtggcagatc tctacgaact tgtacagtat 300

gctggaaca ttatccaag gctttacctt ctgatcacag ttggagttgt atatgtcaag 360
 tcatttcctc agtccaggaa ggatattctg aaagatttgg tagaaatgtg ccgtggtgtg 420
 caacatccct tgaggggtct gtttcttcca aattaccttc ttcagtgtac cagaaatc 480
 ttacctgatg aaggagagcc aacagatgaa gaaacaactg gtgacatcag tgattccatg 540
 gatttcgtac tgctcaactt tgcagaaatg aacaagctct gggtgcgaat gcagcatcag 600
 ggacatagcc gagatagaga aaaaagagaa cgagaaagac aagaactgag gattctagt 660
 ggaacaaatt tggtagcctt cagtcagttg gaaggtgtaa atgtggaacg ttacaaacag 720

attgttctga ctggcatatt ggagcaagtt gtaaactgta gggatgcttt ggctcaagaa 780
 tatctcatgg agtgattat tcaagttatc cctgatgaat ttcacctcca gactttgaat 840
 ctttctctc gggcctgtgc tgagttacac cagaatgtaa atgtgaagaa cataatcatt 900
 gctttaattg atagattagc tttatttgct caccgtgaag atggacctgg aatcccagcg 960
 gatattaaac tattcgatat attctcacag caggtggcta cagtataca gtcaagacaa 1020
 gacatgcctt cagaggatgt tgtatcttta caagtatctc ttattaatct tgccatgaaa 1080

tgttacctg atcgtgtgga ctatgtgat aaagtactag aaacaacagt ggagatattc 1140

 aataagctca accttgaaca tattgctacc agtagtgcag tttcaaagga actcaccaga 1200
 ctattgaaaa taccagtga cacttacaac aatatattaa cagtcttgaa attaaaacat 1260
 ttccaccac tctttgagta ctttgactac gagtccagaa agagcatgag ttgttatgtg 1320
 cttagtaatg ttctggatta taacacagaa attgtatctc aagaccaggt ggattccata 1380
 atgaatttgg tatccacgtt gattcaagat cagccagatc aacctgtaga agacctgat 1440
 ccagaagatt tcgctgatga gcagagcctt gtgggccgct tcattcatct gctgcgctct 1500
 gaggaccctg accagcagta cttgatattg aacacagcac gaaaacattt cggagctggt 1560

 ggaaatcagc ggattcgtt cacttgcca cctttggtat ttgcagctta ccagctggca 1620
 tttcgatata aagagaactc taaagtggat gacaaatggg aaaagaaatg ccagaagata 1680
 ttctcatttg ccaccagac tatcagtgtt ttgatcaaag cagagctggc agaattgccg 1740
 ttaagactat tccttcaagg agcactagct gctggggaaa ttggatttga aatcatgaa 1800
 acagtgcac atgaattcat gtcccaggca ttctctctgt atgaagatga aatcagcgt 1860
 tccaaagcac agcttctgc catcaccttg atcattggca catttgaaag gatgaagtgc 1920
 ttcagtgaag agaatcatga acctctgagg actcagtgtg cccttgctgc atccaaactt 1980

 ctaaagaaac ctgatcaggg ccgagctgtg agcacctgtg cacatctctt ctggtctggc 2040
 agaaacacgg acaaaaatgg ggaggagctt cacggaggca agagggtaat ggagtgccta 2100
 aaaaaagctc taaaaatagc aatcagtgc atggaccctt ctctacaagt gcagctattc 2160
 atagaaatc tgaacagata tatctacttc tatgaaaagg aaaatgatgc ggtacaatt 2220
 caggtattaa accagcttat ccaaagatt cgagaagacc tcccgaatct tgaatccagt 2280
 gaagaaacag agcagattaa caaacactt cataacacac tggagcattt gcgcttgagg 2340
 cgggaatcac cagaatccga ggggccaatt tatgaaggac tcaccttta a 2391