



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월23일

(11) 등록번호 10-2799528

(24) 등록일자 2025년04월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/04 (2006.01) *A61K 38/44* (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01) *A61K 9/00* (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01) *C12N 15/52* (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 9/0006 (2013.01)
A61K 38/443 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2023-7013817(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2017년07월07일
 심사청구일자 2023년05월16일
- (85) 번역문제출일자 2023년04월24일
- (65) 공개번호 10-2023-0062878
- (43) 공개일자 2023년05월09일
- (62) 원출원 특허 10-2019-7003500
 원출원일자(국제) 2017년07월07일
 심사청구일자 2020년06월09일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2017/041122
- (87) 국제공개번호 WO 2018/009814
 국제공개일자 2018년01월11일
- (30) 우선권주장
 62/359,777 2016년07월08일 미국(US)
- (56) 선행기술조사문헌
 Investigative Ophthalmology & Visual Science,
 March 2012, Vol.53, 1916, ARVO Annual Meeting
 Abstract 1부.
 US20160015288 A1
 WO2015142941 A1
- (73) 특허권자
 더 트러스티스 오브 더 유니버시티 오브 펜실베이니아
 미국 펜실베이니아주 19104 필라델피아 씨빅 센터
 불러바드 3600, 9플로어
- (72) 발명자
 베네트 진
 미국 펜실베이니아 19010 브린 모어 피셔즈 로드
 182
 순 준웨이
 미국 펜실베이니아 19147 필라델피아 램버튼 스트리트
 725 알4
 바시레디 비디올라다
 미국 펜실베이니아 19087 웨인 우드스트림 드라이브
 32
- (74) 대리인
 특허법인와이에스장

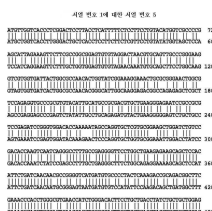
전체 청구항 수 : 총 24 항

심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 RDH12가 연루된 장애 및 질환의 치료를 위한 방법 및 조성물

(57) 요약

RDH12에 대한 코돈 최적화된 핵산 서열, 및 기능성 RDH12에 대한 코돈 최적화된 서열을 함유하는, 재조합 바이러스 벡터, 예컨대 AAV, 발현 카세트, 프로바이러스 플라스미드 또는 다른 플라스미드가 제공된다. 코돈 최적화된, 기능성 RDH12를 발현하는 재조합 벡터가 제공된다. 이 코돈 최적화된 서열을 함유하는 조성물은 RDH12의 부재, 결핍증 또는 부적절한 발현으로부터 생긴 소정의 실명 질환을 치료하거나, 지연시키거나 중지시키는 방법에서 유용하다. 비기능성, 결함성 또는 부적절하게 발현된 네이티브 RDH12를 수정하기 위한 다른 조성물 및 방법이 제공된다.

대표도

(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61K 9/0048 (2013.01)

A61P 27/02 (2018.01)

C12N 15/52 (2013.01)

C12N 15/86 (2013.01)

C12Y 101/01105 (2013.01)

C12N 2750/14141 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

AAV 캡시드 단백질 및 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 1-948과 적어도 95% 서열 동일성을 가지는 뉴클레오타이드 서열을 포함하는 핵산을 포함하고, 뉴클레오타이드 서열은 기능성 인간 레티놀 탈수소효소 12(RDH12) 단백질을 코딩하는 것인 재조합 아데노 연관된 바이러스 (rAAV).

청구항 2

제1 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 1-948과 적어도 97%의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 3

제1 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 인간 세포에서 발현에 대해 코돈 최적화된 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 4

제1 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있는 발현 제어 서열과 작동 가능하게 연관된 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 5

제1 항의 뉴클레오타이드 서열, 5' AAV 인버티드 말단 반복 서열 (ITR), 3' AAV ITR, 및 숙주 세포에서 뉴클레오타이드 서열의 발현을 지시할 수 있는 발현 제어 서열을 포함하는 rAAV 발현 카세트.

청구항 6

제5 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 1-948과 적어도 97%의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV 발현 카세트.

청구항 7

제5 항의 rAAV 발현 카세트를 포함하는 플라스미드.

청구항 8

제4 항에 있어서, 숙주 세포는 인간 세포인 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 9

제4 항에 있어서, 숙주 세포는 광수용체 세포인 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 10

제4 항에 있어서, 발현 제어 서열은 로돕신 키나제 촉진자 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 11

제4 항에 있어서, 발현 제어 서열은 BGH 폴리아데닐화 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 12

제1 항에 있어서, AAV 캡시드 단백질은 AAV8 캡시드 또는 이의 변이체, AAV7 캡시드 또는 이의 변이체, AAV5 캡시드 또는 이의 변이체, 또는 AAV2 캡시드 또는 이의 변이체 유래인 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 13

제1 항에 있어서, AAV 캡시드 단백질은 AAV8 캡시드 유래인 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 14

제1 항의 rAAV를 포함하는 숙주 세포.

청구항 15

제1 항의 rAAV 및 대상체의 복수의 눈 세포에 대한 전달에 적합한 담체 또는 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 16

제15 항에 있어서, 조성물은 지질 전달 비히클을 통해 숙주 세포에 전달되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제16 항에 있어서, 지질 전달 비히클은 리포솜인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 18

AAV8 캡시드 및 다음을 포함하는 발현 카세트를 포함하는 재조합 아데노 연관된 바이러스 (rAAV):

- a) 5' AAV ITR;
- b) 로돕신 키나제 촉진자;
- c) 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 1-948과 적어도 95%의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하는 뉴클레오타이드 서열; 및
- d) 3' AAV ITR,

뉴클레오타이드 서열은 기능성 인간 RDH12 단백질을 코딩하는 것이다.

청구항 19

제18 항에 있어서, 뉴클레오타이드 서열은 서열 번호 5의 뉴클레오타이드 1-948과 적어도 97%의 서열 동일성을 가지는 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 rAAV.

청구항 20

제18 항의 rAAV, 및 약제학적으로 허용 가능한 부형제를 포함하는 조성물.

청구항 21

제20 항에 있어서, 약제학적으로 허용 가능한 부형제는 대상체의 복수의 눈 세포에 대한 전달에 적합한 담체 또는 부형제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 22

제20 항에 있어서, 조성물은 지질 전달 비히클을 통해 숙주 세포에 전달되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 23

제22 항에 있어서, 지질 전달 비히클은 리포솜인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 24

제21 항에 있어서, 대상체는 인간인 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

전자 형태로 제출된 자료의 참조에 의한 도입

[0001]

[0002] 출원인은 본 명세서에 의해 본 명세서와 전자 형태로 제출된 서열 목록 자료를 참고로 도입한다. 이 파일은 2017년 7월 5일자의 9kB의 크기를 갖는 "UPN-16-7699PCT_ST25.txt"라 표지된다.

배경 기술

[0003] 광수용체 세포 및 RPE에 위치한 레티노이드 탈수소효소/환원효소는 시각 회로에서 중요한 산화-환원 반응을 촉매한다. RDH12 레티놀 탈수소효소 12(모든-트랜스/9-시스/11-시스)(14q23.3-q24.1)(MIM 608830호)는 트랜스 및 시스 레티노이드 기질 둘 다에서 작용하는 망막에서 발현된 이중 특이성 효소를 코딩한다. 예를 들어, 문헌 [Thompson, DA *et al*, Nov. 2005, Human Mol. Genet., 14(24):3865-3875]을 참조한다. 인간 RDH12에서의 다수의 돌연변이는 중증의 아동기 발병 상염색체 열성 망막 이영양증(autosomal recessive retinal dystrophy: arRD)의 소정의 형태와 연관된다. 예를 들어, 이 유전자의 결함은 레베르 선천성 흑암시 형태 13 및 망막색소변성증 53의 원인이다.

[0004] 망막의 중증 이영양증인 레베르 선천성 흑암시(Leber's Congenital Amaurosis: LCA)는 80,000명의 사람 중 약 1명에게 영향을 미친다. 장애는 상염색체 열성이고, 보균자는 출생 시 또는 생애 처음의 몇 개월 내에 광수용체의 비정상 발생을 제시한다. 비정상은 중증 시각 장애 및 실명을 발생시킨다. RDH12 연관된 LCA는 LCA의 희귀한 형태 중 하나이다. LCA 사례의 불과 약 2.7%는 RDH12에서의 돌연변이에 의해 생긴다.

[0005] 망막색소변성증(RP) 53은 색소분비 망막증의 군에 속하는 또 다른 망막 이영양증이다. 망막색소변성증은 안저 검사에서 가시적인 망막 색소 침착물 및 막대 광수용체 세포의 1차 손실, 이어서 원뿔 광수용체의 2차 손실을 특징으로 한다. 환자는 통상적으로 야간 시력 실명 및 망막중심부 시야의 손실을 갖는다. 이들의 증상이 진행되면서, 이들은 또한 이들의 먼 주변 시야 및 결국 중심 시야를 소실한다. RDH12는 또한 이 실명 질환과 연관된다.

[0006] 이들 실명 질환의 현재의 치료는 시각 손상된 아동에 대한 프로그램에 환자의 위탁, 굴절 오차의 보정 및, 가능할 때, 저시력 보조기의 사용, 및 직업적/교육적 치료의 접근을 수반하여 주로 지원차원이다. 주기적으로 영향 받는 환자는 안과학적 평가를 받고, 잔존 시력을 갖는 사람에서, 적절한 치료에 의해 약시, 녹내장 또는 백내장의 존재에 대해 조사된다. 유전자 증폭 치료는 레베르 선천성 흑암시(LCA)의 소정의 형태의 치료를 위해 평가되고 있다. 예를 들어, 미국 특허 제8,147,823호를 참조한다.

[0007] LCA13, RP53 및 다른 눈 질환(ocular disease)의 성공적인 치료를 위한 새롭고 효과적인 도구 및 방법에 대한 지속하는 수요가 당해 분야에 존재한다.

발명의 내용

[0008] 눈 장애의 치료에서 유용한 치료학적 조성물 및 방법은 기능성 RDH12 단백질을 코딩하도록 최적화된 신규한 cDNA 서열 및 눈 질환을 갖는 대상체에 대한 최적화된 서열의 전달을 수반한다. 일 실시형태에서, 이러한 신규한 서열은 바이러스 벡터에서 패키징될 수 있는 플라스미드 서열을 포함한다. 다른 실시형태에서, 신규한 AAV 프로바이러스 플라스미드 및/또는 재조합 AAV는 최적화된 서열을 보유하도록 제공된다. 본 명세서에 기재된 바대로, 이 벡터는 시험관내 및 생체내 둘 다에서 생물학적 활성을 입증하였다.

[0009] 일 양태에서, 기능성 포유류, 바람직하게는 인간, RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 cDNA 서열이 제공된다.

[0010] 또 다른 양태에서, 발현 카세트는 RDH12의 하나 이상의 기능성 카피를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는, 5' 내지 3' AAV ITR 서열에 배치된, 숙주 세포에서 이의 발현을 지시하는 조절 서열의 제어 하에 작동 가능하게 연결된 RDH12의 하나 이상의 기능성 카피를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 추가로 포함한다.

[0011] 다른 양태에서, 본 명세서에 기재된 발현 카세트 중 하나 이상을 함유하는 벡터가 제공되고, 벡터 또는 발현 카세트를 함유하는 숙주 세포가 제공된다.

[0012] 또 다른 양태에서, 프로바이러스 플라스미드는 AAV 캡시드를 코딩하는 서열, AAV 인버티드 말단 반복 서열 및 네이티브 또는 돌연변이된 또는 코돈 최적화된 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열 및 숙주 세포에서 코딩된 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 소정의 실시형태에서, 플라스미드 성분은 모듈식이다.

[0013] 또 다른 실시형태에서, 재조합 아데노 연관된 바이러스(AAV)는, 대상체의 광수용체 세포에서 RDH12를 발현하는

조절 서열의 제어 하에, AAV 캡시드 단백질 및 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 또는 이의 단편을 포함한다. 일 실시형태에서, rAAV는 AAV8 캡시드 또는 이의 변이체, 또는 AAV7 캡시드 또는 이의 변이체, 또는 AAV2 캡시드 또는 이의 변이체, 또는 AAV5 캡시드 또는 이의 변이체를 포함한다.

[0014] 또 다른 실시형태에서, rAAV는 AAV 인버티드 말단 반복 서열, 및 기능성 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열 및 숙주 세포에서 코딩된 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함하는 발현 카세트를 포함한다.

[0015] 더욱 추가의 양태에서, 약제학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제, 부형제 및/또는 애주번트 및 기능성 RDH12를 코딩하는 최적화된 핵산 서열, 및 플라스미드, 벡터, 또는 바이러스 벡터, 예컨대 본 명세서에 구체적으로 기재된 rAAV를 포함한다. 일 실시형태에서, 최적화된 핵산 서열은 대상체의 광수용체 세포에서 기능성 RDH12를 발현하는 조절 서열의 제어 하에 있다. 일 실시형태에서, 조성물은 기능성 RDH12를 코딩하는 서열의 복수의 카피를 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다.

[0016] 추가의 양태에서, 코돈 최적화된 RDH12 cDNA에 의해 코딩된 기능성 RDH12 단백질을 발현하는 세포가 제공된다. 일 실시형태에서, 이러한 세포는 세포의 기존의 RDH12 서열에서의 돌연변이를 표적화하고 수정하거나, 그 세포에서 신규한 발현을 위해 RDH12 코돈 최적화된 서열을 삽입하기 위한 성분 및 Caspr/Cas9 시스템 및 관련된 시스템과 같은 유전자 편집 시스템에 의해 치료된 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)이다.

[0017] 또 다른 양태에서, 포유류 대상체에서 RDH12 매개된 장애를 치료하는 방법은 본 명세서에 기재된 코돈 최적화된 RDH12 cDNA, 또는 본 명세서에 기재된 바와 같은 벡터, 바이러스 또는 약제학적 조성물을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0018] 또 다른 양태에서, 포유류 대상체에서 실명을 치료하거나, 이의 진행을 지연시키거나 중지시키거나, 적어도 부분 시력을 복원하는 방법은 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 최적화된 핵산 서열 또는 이의 단편, 또는 이의 단편을 대상체에게 투여하거나 전달하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 사용한다.

[0019] 또 다른 양태에서, 포유류 대상체에서 실명을 치료하거나, 이의 진행을 지연시키거나 중지시키거나, 적어도 부분 시력을 복원하는 방법은 대상체의 광수용체 세포에서 RDH12를 발현하는 조절 서열의 제어 하에 AAV 캡시드 단백질 및 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 핵산 서열을 포함하는 재조합 아데노 연관된 바이러스(AAV), 또는 이의 단편 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 본 명세서에 기재된 임의의 조성물을 사용한다.

[0020] 더욱 또 다른 양태에서, 비기능성 또는 부적절하게 기능성인 RDH12의 발현 또는 RDH12의 부적절한 양 또는 결핍 증으로부터 생긴 눈 장애를 치료하는 방법은 적합한 촉진자의 제어 하에 네이티브 또는 코돈 최적화된 RDH12 유전자를 포함하는 벡터를 결핍증을 갖는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0021] 훨씬 또 다른 양태에서, RDH12 결핍증 또는 RDH12 돌연변이 연관된 장애를 치료하는 방법은 RDH12에서의 돌연변이를 표적화하고 수정하기 위한 성분 및 Caspr/Cas9 시스템 및 관련된 시스템과 같은 유전자 편집 시스템을 사용하는 것을 포함한다. 일 실시형태에서, 수정은 생체내 RDH12 코딩 서열을 최적화하는 것을 수반한다.

[0022] 또 다른 실시형태에서, LCA 또는 RP의 치료 또는 예방을 요하는 대상체에서 RDH12에서의 결함, 결핍증 또는 돌연변이에 의해 생긴 LCA 또는 RP를 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 (a) RDH12 연관된 LCA 또는 RP를 갖거나 이를 발생시킬 위험에 있는 대상체를 확인하는 단계; (b) 유전자형 분석을 수행하고, RDH12 유전자에서의 돌연변이를 확인하는 단계; (c) 비침윤성 망막 영상화 및 기능성 연구를 수행하고, 치료에 표적화될 수 있는 보유된 광수용체의 영역을 확인하는 단계; (d) 상기 광수용체 세포에서 상기 서열의 생성물을 발현하는 촉진자 서열의 존재 하에 기능성 RDH12를 코딩하는 핵산 서열을 보유한 벡터(예를 들어, 재조합 바이러스), 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는, 유효 농도의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계(여기서, 상기 장애는 예방되거나, 정지되거나, 경감됨)를 포함한다.

[0023] 이들 조성물 및 방법의 더욱 다른 양태 및 이점은 이의 바람직한 실시형태의 하기 상세한 설명에서 추가로 기재된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1a 내지 도 1b는 약 78%의 서열 유사성을 보여주는 네이티브 RDH12(서열 번호 1; 하부 서열)에 의한 코돈 최적화된 RDH12(서열 번호 5; 상부 서열)의 정렬이다. 이 정렬에서, 점수는 787 비트(872)이고, 동일성은

744/949(78%)이고; 겹은 0/949(0%)이고; 2개의 가닥은 플러스 가닥이다.

도 2A 내지 도 2F는 RDH12 플라스미드의 발현을 보여주는 6개의 패널이고: 왼쪽(도 2A) 및 오른쪽(도 2B) 상부 패널은 비형질주입된 대조군을 보여주고; 왼쪽(도 2C) 및 오른쪽(도 2D) 중간 패널은 RDH12Myc 형질주입된 세포를 보여주고; 왼쪽 바닥 패널은 RDH12Myc 형질주입된 세포(도 2E)를 보여주고; 오른쪽 바닥 패널(도 2F)은 오른쪽 중간 패널로부터의 2개의 세포의 확대(도 2D)이다.

도 2G는 RDH12Myc 형질주입된 COS-7 세포, 대조군 COS_7 세포, RDH12Myc 형질주입된 CHO 세포 및 대조군 Cho 세포 및 2개의 분자량 마커를 보여주는 겔이다.

도 3은 RDH12 iPs 세포에서의 AAV2-RDH12Myc의 발현을 보여주는 겔이다. 세포는 표지되고, MW 마커가 도시되어 있다.

도 4는 AAV8-RDH12-myc 및 AAV7m8RDH12-myc를 갖는 RDH12 KO 마우스의 RDH12.myc 주사된 대 비주사된 망막에서의 A-파 표백전(A-wave prebleach) 및 표백후(post bleach) 비율을 보여주는 그래프이다. 망막전도(electroretinogram: ERG)는 본 발명자들의 시험 벡터에 의해 하나의 눈에서 주사된 RDH12 -/- 마우스에서 수행되었다. 비주사된 대측성 눈은 광 유도된 망막 손상에 대한 외인성 RDh12의 보호 효과를 비교하기 위한 대조군으로서 사용되었다. ERG는 영향을 비교하기 위해 광 손상 전에 및 후에 수행되었다. 광 손상 후, 비주사된 눈은 A-파 진폭에서 감소를 보여주는 한편, 주사된 눈은 광 손상 후 비교적 안정하게 있었다.

도 5a는 RDH12 KO 마우스의 RDH12.myc(AAV8-RDH12-Myc) 주사된 대 비주사된 망막에서의 A-파 표백전 및 표백후 비율을 보여주는 그래프이다.

도 5b는 RDH12 KO 마우스의 RDH12.myc(AAV7m8-RDH12-Myc) 주사된 대 비주사된 망막에서의 A-파 표백전 및 표백후 비율을 보여주는 그래프이다.

도 6A 내지 도 6D는 왼쪽 눈(도 6A 및 도 6C)이 주사되지 않은 단일 동물 136에 대한 실험 결과를 보여준다. 오른쪽 눈(도 6B 및 도 6D)은 AAV7m8-RDH12-Myc가 주사되었다. ERG 기준선은 수행되고, 이후 광 손상되고, 이후 제2 ERG 되었다. 동물을 10일 동안 하우징하고, 제3 ERG를 수행하였다. 마우스를 희생시키고, 눈을 수집하고 고정하고 절편화하고, DAPI(도 6A 및 도 6B) 또는 로돕신 및 DAPI(도 6C 및 도 6D)에 의해 염색하였다.

도 7a 내지 도 7c는 광 손상 후 비주사된 망막과 비교하여 AAV7m8-RDH12-Myc 주사된 망막에서 보존된다는 것을 보여준다. 도 7a는 비주사된 왼쪽 눈을 보여준다. 도 7b는 얇은 ONL을 보여주는 왼쪽 눈의 더 높은 배율의 영상을 보여준다. 도 7c는 AAV7m8-RDH12-Myc가 주사된 오른쪽 눈이다.

도 8A는 얇은 망막을 보여주는 비주사된 왼쪽 눈을 갖는 동물의 망막 구조를 보여준다. 도 8B는 AAV8-RDH12-Myc가 주사된 동물의 오른쪽 눈을 보여준다.

도 9A 및 도 9B는 더 높은 배율의 영상을 갖는 단일 동물 147의 망막 구조를 보여준다. 도 9A는 비주사된 왼쪽 눈을 보여준다. 도 9B는 AAV8-RDH12-Myc에 의해 주사된 오른쪽 눈을 보여준다.

도 10a는, AAV 5' ITR과 3' ITR 사이에, 분비된 세포에서 RDH12의 발현을 지시하는, CMV.C β A 촉진자(CBAe)를 포함하는 조절 서열의 제어 하에 기능성 RDH12를 코딩하는 네이티브 핵산 서열을 함유하는, 발현 카세트인 pAAV.CBAe.h-네이티브-RDH12의 도식적 지도이다.

도 10b는, AAV 5' ITR과 3' ITR 사이에, 분비된 세포에서 RDH12의 발현을 지시하는, CMV.C β A 촉진자를 포함하는 조절 서열의 제어 하에 myc 태그에 연결된 기능성 RDH12를 코딩하는 네이티브 핵산 서열을 함유하는, 발현 카세트인 pAAV.CBAe.h-네이티브-RDH12.myc의 도식적 지도이다.

도 10c는, AAV 5' ITR과 3' ITR 사이에, 분비된 세포에서 RDH12의 발현을 지시하는, CMV.C β A 촉진자를 포함하는 조절 서열의 제어 하에 myc 태그에 연결된 기능성 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열(서열 번호 3)을 함유하는, 발현 카세트인 pAAV.CBAe.h-cocon opt-RDH12의 도식적 지도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025]

본 명세서에 기재된 방법 및 조성물은 눈 장애의 치료에 유용하다. 이러한 눈 장애는 RDH12 매개된 장애 또는 질환, 예를 들어 인간 망막 탈수소효소 12(RDH12)를 코딩하는 유전자에서의 돌연변이, 결함 또는 결핍증에 의해 생기거나, 이를 수반하는 장애이다. 일 실시형태에서, 이들 조성물 및 방법은 눈 장애의 치료를 위해 포유류 대상체에게 기능성 인간 망막 탈수소효소 유전자(hRDH12)를 코딩하는 코돈 최적화된 cDNA를 전달하는 데 있어서

유용하다. 소정의 실시형태에서, RDH12 매개된 장애는 실명 질환, 예컨대 LCA 또는 LCA13, 또는 RP 또는 RP53이다. 다른 실시형태에서, 방법 및 조성물은 생체내 대상체의 결함 유전자를 편집하는 데 또는 유전자 편집 시스템, 예컨대 CRISPR/Cas 시스템을 사용하여 기능성 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 cDNA 서열을 발현하는 적합한 세포주를 생성하는 데 유용하다. 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법은 기능성 RDH12를 코딩하는 서열의 하나 또는 다수의 상이한 버전의 전달을 위한 발현 카세트, 벡터, 재조합 바이러스 및 다른 조성물을 수반한다. 이러한 조성물은 동일한 발현 카세트, 벡터 또는 바이러스에서 RDH12의 다수 및 또는 상이한 버전의 어셈블리 및 코돈 최적화 둘 다를 수반한다. 이 특징은 발현되는 기능성 RDH12 단백질의 효율을 증가시킬 뿐만 아니라, 안전성을 증가시키기 위해 기능성 단백질을 전달하는 치료학적 시약의 더 낮은 용량을 또한 허용할 수 있다. 바이러스 또는 카세트에서 전달된 RDH12를 코딩하는 핵산 서열의 최적화가, RDH12를 코딩하는 네이티브 또는 내인성 서열을 사용하여 생성될 수 있는 수준과 비교하여, 생체내 기능성 RDH12 단백질의 생성의 수준을 최대화하는 것이 기대된다.

- [0026] 본 명세서에 사용된 기술적 및 과학적 용어는 본 발명이 속하는 당업자에 의해 그리고 공개된 텍스트를 참조하여 흔히 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고, 이것은 당업자에게 본 출원에 사용된 많은 용어에 대한 일반 가이드를 제공한다. 본 명세서에 함유된 정의는 본 명세서에서 성분 및 조성물을 기재하는 데 명확성을 위해 제공되고, 청구된 발명을 제한하도록 의도되지 않는다.
- [0027] 용어 "하나" 또는 "일"은 하나 이상을 의미한다. 예를 들어, "발현 카세트"는 하나 이상의 이러한 카세트를 나타내는 것으로 이해된다. 그러므로, 용어 "하나"(또는 "일"), "하나 이상" 및 "적어도 하나"는 본 명세서에서 상호 교환되어 사용된다.
- [0028] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "약"은, 달리 기재되지 않는 한, 기준으로부터 플러스 또는 마이너스 10%의 변동성을 의미한다.
- [0029] 단어 "포함한다", "포함" 및 "포함하는"은 배타적이기보다는 포함적으로, 즉 다른 언급되지 않은 성분 또는 공정 단계를 포함하도록 해석되어야 한다. 단어 "이루어진다", "이루어진" 및 "이"의 변형어는 포함적이기보다는 배타적으로, 즉 구체적으로 기재되지 않은 성분 또는 단계를 배제하도록 해석되어야 한다.
- [0030] "RDH12"는 레티놀 탈수소효소 12(모든-트랜스/9-시스/11-시스) 단백질, 바람직하게는 이의 인간 오솔로그이다. 이 단백질은 RP53, LCA13 및 SDR7C2로도 공지되어 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "RDH12"는, 하기 추가로 정의된 바대로, 전장 단백질 자체 또는 기능성 단편 또는 이의 변이체를 의미한다. 일 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 조성물이 치료하고자 의도한 동일한 포유류로부터 유래된다. 일 실시형태에서, RDH12는 인간으로부터 유래된다. 또 다른 실시형태에서, RDH12는 개과로부터 유래된다.
- [0031] 용어 "단편" 또는 "기능성 단편"이란, 단백질에 적용될 때, 반드시 발현 또는 활성의 동일한 수준은 아니지만 전장 단백질의 기능을 보유하는 임의의 단편을 의미한다.
- [0032] "기능성 단백질"이란, 눈 장애 또는 질환을 갖지 않는 대상체에서 정상적으로 작용하는 단백질, 예를 들어 RDH12의 생물학적 활성을 나타내는 임의의 아미노산 서열을 의미한다. 이러한 기능성 단백질은 돌연변이가 눈 질환 또는 장애를 야기하지 않는 이의 아미노산 서열 내에 이의 코딩 DNA 서열의 돌연변이 또는 변형을 보유할 수 있다. 다른 실시형태에서, 이러한 기능성 단백질은 단백질이 "네이티브" 또는 내인성 서열보다 이의 기능을 더 잘 수행하게 하는 돌연변이를 포함할 수 있다. 일 실시형태에서, 이러한 기능성 RDH12 단백질은 정상인 또는 정상적으로 작용하는 단백질인 것으로 생각될 수 있다.
- [0033] 일 실시형태에서, 네이티브 인간 RDH12는 서열 번호 2로 표시된 하기 서열을 갖는다(하기 부분 B에 기재된 핵산 서열 서열 번호 1의 코딩된 단백질임):
- [0034] MLVTLGLLTSSFSLYMVAPSIKFFAGGVCRTNVQLPGKVVVITGANTGIGKETARELASRGARVYIACRDVLKGESAAASEIRVDTKNSQVLVRKLDLSDTKSIRAFAGFLAEEKQLHLINNAGVMMCPYSKTADGFETHLGVNHLGHFLTYLLLERLKVSA PARVVNVSSVAHHIGKIPFHDQLQSEKRYSRGFAYCHSKLANVLFTR ELAKRLQGTGVTTAVHPGVVRSELVRHSSLLCLLWRLFSFVKTAREGAQTS LHCALAEGLPLSGKYFSDCKRTWVSPRRNNKTAERLWNVSCCELLGIRWE.
- [0035] 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질, 예컨대 서열 번호 1과 적어도 70, 적어도 75%, 적어도 78% 또는 적어도 80%의 동일성을 공유하는 변이체이다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 85%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 90%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 91%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12

단백질과 적어도 92%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 93%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 94%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 95%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 96%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 97%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 98%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, RDH12 단백질 서열은 네이티브 RDH12 단백질과 적어도 99%의 동일성을 공유한다.

[0036] 아미노산 서열의 맥락에서 용어 "퍼센트(%) 동일성", "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성" 또는 "동일한 퍼센트"는 관련성에 대해 정렬될 때 동일한 2개의 서열에서의 잔기를 의미한다. 퍼센트 동일성은 단백질의 전장, 폴리펩타이드, 약 70개의 아미노산 내지 약 300개의 아미노산, 또는 이의 펩타이드 단편 또는 상응하는 핵산 서열 코딩 시퀀스에 걸쳐 아미노산 서열에 대해 용이하게 결정될 수 있다. 적합한 아미노산 단편은 적어도 약 8개의 아미노산 길이일 수 있고, 약 150개 이하의 아미노산일 수 있다. 일반적으로, 2개의 상이한 서열 사이의 "동일성", "상동성" 또는 "유사성"을 언급할 때, "동일성", "상동성" 또는 "유사성"은 "정렬된" 서열과 관련하여 결정된다. "정렬된" 서열 또는 "정렬"은, 기준 서열과 비교하여 손실 또는 추가 염기 또는 아미노산에 대한 수정을 대개 함유하는, 다수의 핵산 서열 또는 단백질(아미노산) 서열을 의미한다. 정렬은 임의의 다양한 공공으로 또는 상업적으로 이용 가능한 다수의 서열 정렬 프로그램을 이용하여 수행된다. 서열 정렬 프로그램은 아미노산 서열, 예를 들어 "Clustal X", "MAP", "PIMA", "MSA", "BLOCKMAKER", "MEME" 및 "Match-Box" 프로그램에 이용 가능하다. 일반적으로, 임의의 이들 프로그램은, 당업자가 필요한 바대로 이 세팅을 변경할 수 있더라도, 디폴트 세팅에서 이용된다. 대안적으로, 당업자는 언급된 방법에 의해 제공된 것처럼 적어도 동일성 또는 정렬의 수준을 제공하는 또 다른 방법을 이용할 수 있다. 예를 들어, 문헌[J. D. Thomson *et al*, Nucl. Acids. Res., "A comprehensive comparison of multiple sequence alignments", 27(13):2682-2690 (1999)]을 참조한다.

[0037] "최적화된" 또는 "코돈 최적화된" RDH12 단백질이란, 단백질에서 침묵, 보존적 또는 비보존적 아미노산 변경, 또는 아미노산 삽입 또는 결실을 만드는 코돈 변경에 의해 네이티브 또는 천연 발생 서열과 다른 DNA 서열에 의해 코딩된 RDH12 단백질 서열, 예컨대 서열 번호 1의 것을 의미한다. 이 변경은 단백질 생성을 증가시키고/시키거나, 단백질 배좌 및 안정성을 증대시킬 수 있다. 본 명세서에 기재된 바와 같은 최적화된 RDH12 단백질은 코돈 최적화된 DNA 서열에 의해 코딩된 기능성 RDH12 단백질이다.

[0038] 최적화된 RDH12 단백질의 일 실시형태는 서열 번호 4로 표지된 번역된 기능성 RDH12 단백질 서열이다(하기 부분 B에 기재된 서열 번호 3인 핵산 서열의 코딩된 단백질임):

[0039] AAATMLVTLLTSSFFSLYLMVAPSIRKFFAGGVCRITNVQLPGKVVVITGANTGIGKETARELASRGARVYIACRDVLKGESAASEIRVDTKNSQVLVRKLD
LSDTKSIRAFAGFLAEKQLHLINNAAGVMCPYSKTADGFETHLGVNHLGHFLTYLLERLKVSAAPRVNVSSVAHHIGKIPFHDQLQSEKRYSRGFAY
CHSKLANVLFTRELAKRLQGTGVTTYAVHPGVVRSELVRHSSLLCLLWRLFSPFVKTAAREGAQTSLLHCALEGLEPLSGKYFSDCKRTWVSPRARNKTAER
LWNVSCCELLGIRWE.

[0040] 상기한 바대로 동의 코돈 변경 또는 보존적 아미노산 변경을 발생시키는 코돈 변경, 또는 삽입 또는 결실은 단백질 생성을 증가시키고/시키거나, 단백질 배좌 및 안정성을 증대시킬 수 있다. 이러한 최적화는 내인성 또는 네이티브 서열을 사용하여 생성될 수 있는 수준과 비교하여 실험 단백질의 생성의 수준을 최대화하는 치료학적 시약의 개발에서 유용하다.

[0041] 정상인 또는 정상적으로 작용하는 RDH12 단백질을 코딩하는 핵산 서열은 RDH12 단백질, 또는 이의 동족체를 네이티브로 발현하는 임의의 포유류로부터 유래될 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 RDH12를 코딩하는 네이티브 핵산 서열은 NCBI 데이터베이스 수탁 번호 NC_000014.9에서 보고되어 있다.

[0042] 일 실시형태에서, 네이티브 인간 RDH12 DNA 서열은 서열 번호 1로 표지된다:

[0043] ATGCTGGTCACCTTGGGACTGCTCACCTCCTTCTTCTCGTTCCTGTATATGGTAGCTCCATCCATCAGGAAGTTCTTTGCTGGTGGAGTGTGTAGAACAAAT
GTGCAGCTTCTTGGCAAGGTAGTGGTGATCACTGGCGCAACACGGGCATTGGCAAGGAGACGGCCAGAGAGCTCGCTAGCCGAGGAGCCGAGTCTATATT
GCCTGCAGAGATGTACTGAAGGGGAGTCTGCTGCCAGTGAAATCCGAGTGGATACAAGAACTCCCAGGTGCTGGTGGCGAAATTGGACATATCCGACACC
AAATCTATCCGAGCCTTTGCTGAGGGCTTTCTGGCAGAGGAAAAGCAGCTCCATATTCTGATCAACAATGCGGGAGTAATGATGTGTCCATATTCCAAGACA
GCTGATGGCTTTGAAACCCACCTGGGAGTCAACACCTGGGCCACTTCTCCTCACCTACCTGCTCCTGGAGCGGCTAAAGGTGTCTGCCCTGCACGGGTG
GTTAATGTGCTCCTCGGTGGCTCACCACATTGGCAAGATTCCCTTCCACGACCTCCAGAGCGAGAAGCGCTACAGCAGGGGTTTTCCTATTGCCACAGCAAG

CTGGCCAATGTGCTTTTACTCGTGAGCTGGCCAAGAGGCTCCAAGGCACCGGGGTACACCTACGCAGTGCACCCAGGCGTCGTCGCTCTGAGCTGGTC
CGGCACTCCTCCCTGCTCTGCTGCTCTGGCGGCTCTTCTCCCCCTTTGTCAAGACGGCAGGGAGGGGGCGCAGACCAGCCTGCACTGCGCCCTGGCTGAG
GGCCTGGAGCCCCTGAGTGGCAAGTACTTCACTGAGTGAAGAGGACCTGGGTGTCTCCAAGGGCCCGAAATAACAAAACAGCTGAGCGCCTATGGAATGTC
AGCTGTGAGCTTCTAGGAATCCGGTGGGAGT.

[0044] 다른 실시형태에서, 표적 세포에서 발현을 증대시키도록 RDH12 코딩 서열에 소정의 변형이 이루어진다. 이러한 변형은 코돈 최적화(예를 들어 US 특허 제7,561,972호; 제7,561,973호; 및 제7,888,112호(본 명세서에 참고로 포함됨) 참조) 및 gccRccATGR인 공통 Kozak 서열로의 번역 시작 부위를 둘러싼 서열의 전환을 포함한다. 문헌 [Kozak *et al*, *Nucleic Acids Res.* **15** (20): 8125-8148](본 명세서에 참고로 포함됨)을 참조한다. 코돈 최적화된 핵산 서열은 단백질 생성, 발현을 증가시키고/시키거나, 단백질 배화 및 안정성을 증대시키는 등의 코돈 변경에 의해 네이티브 또는 천연 발생 서열, 예컨대 서열 번호 1의 것과 다르다.

[0045] 코돈 최적화된 코딩 영역은 다양한 상이한 방법에 의해 설계될 수 있다. 이 최적화는 온라인, 공개 방법, 또는 코돈 최적화 서비스를 제공하는 회사에 이용 가능한 방법을 이용하여 수행될 수 있다. 하나의 코돈 최적화 방법은 예를 들어 국제 특허 출원 공보 WO 제2015/012924호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 간단히, 생성물을 코딩하는 핵산 서열은 동의 코돈 서열에 의해 변형된다. 적합하게, 생성물에 대한 오픈 리딩 프레임(open reading frame: ORF)의 전체 길이는 변형된다. 그러나, 몇몇 실시형태에서, 오직 ORF의 단편이 변경될 수 있다. 이들 방법 중 하나를 사용함으로써, 임의의 소정의 폴리펩타이드 서열에 대한 빈도를 적용하고, 폴리펩타이드를 코딩하는 코돈 최적화된 코딩 영역의 핵산 단편을 생성할 수 있다. 이러한 최적화는 내인성 또는 네이티브 서열을 사용하여 생성될 수 있는 수준과 비교하여 실험 단백질의 생성의 수준을 최대화하는 유전자 치료 시약의 개발에 유용하다. 이러한 코돈 최적화된 서열은 일 실시형태에서 생성된 치료학적 시약 조성물의 효율을 증가시키지만, 또한 사용되는 시약의 더 낮은 용량을 허용하여서, 치료학적 안전성을 증가시킬 수 있다.

[0046] 코돈에 대한 실제 변경을 수행하기 위해 또는 본 명세서에 기재된 바대로 설계된 코돈 최적화된 코딩 영역을 합성하기 위해 다수의 옵션이 이용 가능하다. 이러한 변형 또는 합성은 당업자에게 널리 공지된 표준 및 일상적 분자 생물 조작을 이용하여 수행될 수 있다. 일 접근법에서, 각각 80개 내지 90개의 뉴클레오타이드 길이의 및 원하는 서열의 길이에 이르는 일련의 상보성 올리고뉴클레오타이드 쌍은 표준 방법에 의해 합성된다. 이 올리고뉴클레오타이드 쌍은 합성될 수 있어서, 어닐링 시, 이들은 응집성 말단을 함유하는 80개 내지 90개의 염기 쌍의 이중 가닥 단편을 형성하고, 예를 들어 쌍에서의 각각의 올리고뉴클레오타이드는 쌍에서의 다른 올리고뉴클레오타이드에 상보적인 영역을 넘어서 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개, 10개 또는 이것 초과 염기를 연장시키도록 합성된다. 올리고뉴클레오타이드의 각각의 쌍의 단일 가닥 말단은 올리고뉴클레오타이드의 또 다른 쌍의 단일 가닥 말단과 어닐링하도록 설계된다. 올리고뉴클레오타이드 쌍은 어닐링하도록 허용되고, 이 이중 가닥 단편의 대략 5개 내지 6개는 이후 응집성 단일 가닥 말단을 통해 함께 어닐링하도록 허용되고, 이후 이들은 함께 결합되고, 표준 박테리아 클로닝 벡터, 예를 들어 Invitrogen Corporation(캘리포니아주 칼스바드)으로부터 이용 가능한 TOPO(등록상표) 벡터로 클로닝된다. 이후, 작제물은 표준 방법에 의해 서열분석된다. 80개 내지 90개의 염기 쌍 단편의 5개 내지 6개의 단편으로 이루어진 이들 작제물 중 몇몇은 함께 결합되고, 즉 약 500 염기 쌍의 단편이 제조되어서, 전체 원하는 서열은 일련의 플라스미드 작제물에서 표시된다. 이후, 이 플라스미드의 인서트는 적절한 제한 효소에 의해 절단되고 함께 절단되어서 최종 작제물을 형성한다. 이후, 최종 작제물은 표준 박테리아 클로닝 벡터로 클로닝되고 서열분석된다. 부가적인 방법은 당업자에게 즉시 명확할 것이다. 또한, 유전자 합성은 상업적으로 용이하게 이용 가능하다.

[0047] 코돈 최적화된 RDH12 DNA 서열의 일 실시형태는 서열 번호 3으로 표시된 RDH12 DNA 서열이다:

[0048] GCGGCCGCCACCATTGTTGGTCACCTCGGACTCCTTACCTCATTTTTCTCTTCTGATATGGTCGCCCCGAGCATTAGAAAGTTCTTCGCCGCGGAGTG
TGTAGGACTAACGTGCAGTTGCCCGGAAGGTCTGGTGATTACTGGCGCAACACTGGTATCGGAAAGGAACTGCGCGGGAAGTGGCGTCCAGAGGTGCC
CGCGTGATATTGCATGCCGCGACGTGCTGAAGGGAGAATCCGCGCGTCCGAGATCCGGGTGGACACCAAAATAGCCAGGTGCTCGTCCGGAAGCTGGAT
CTGTCCGACACCAAGTCAATCAGGGCCTTTGCCGAGGGGTCTCTGGCTGAAGAGAAGCAGCTCCACATTCTGATCAACAACGCCGGGGTATGATGTGCCCC
TACTCAAAGACCGCAGACGGCTTCGAAACCCACCTGGGCGTGAACCATCTGGGACACTTCTGCTGACCTATCTGCTGCTGGAGCGACTGAAAGTGTGGCT
CCTGCTCGGGTGTGAACGTGTCCAGCGTGGCCATCACATCGGAAAGATCCATTCCACGATCTCCAATCCGAGAAGCGGTACAGCAGGGGCTTCGCGTAC
TGTCATCTCGAAGTTGGCCAACGTGCTCTTTACCGCGAAGTGGCCAAGCGGCTGCAGGGCACTGGCGTGACCACTTACGCCGTGCACCCTGGTGTCTGCGG
TCCGAGCTGGTCCGCATTCTCTCTCTGTGCTCCTGTGGAGACTTCTCCCCGTTCTGTCAGACCGCAAGGGAAGGAGCCCAACGAGCCTTCACTGT
GCCCTGGCGGAAGGACTGGAGCGCTTAGCGGAAAGTACTTCTCGGACTGCAAGCGCACCTGGGTGTGCGCTAGAGCTCGGAACAACAAGACTGCCGAACGC
CTCTGGAATGTGTCTGCGAGCTGCTGGGAATCAGATGGGAGTGATGATCATGAGATCT.

- [0049] 인간 RDH12를 코딩하는 네이티브 핵산 서열과 정렬될 때, 코돈 최적화된 RDH12 코딩된 서열은, 임의의 이들 범위 사이의 임의의 정수를 포함하여, 적어도 50%, 또는 적어도 60%, 또는 적어도 70%, 또는 적어도 80% 또는 적어도 90%의 퍼센트 동일성을 가질 수 있다. 일 실시형태에서, 코돈 최적화된 RDH12는 적어도 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 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% 또는 99%의 네이티브 서열에 의한 퍼센트 동일성을 갖는다.
- [0050] 핵산 서열의 맥락에서 용어 "퍼센트(%) 동일성", "서열 동일성", "퍼센트 서열 동일성" 또는 "동일한 퍼센트"는 관련성에 대해 정렬될 때 동일한 2개의 서열에서의 염기를 의미한다. 퍼센트 동일성은 비교되는 서열에 걸쳐 최적 조건 하에 정렬되는 2개의 서열을 비교함으로써 결정된다. 서열 동일성 비교의 길이는 RDH12 코딩 서열의 전장 또는 적어도 약 100개 내지 150개의 뉴클레오타이드의 단편에 걸쳐, 또는 원하는 바대로 일 수 있다. 그러나, 예를 들어 적어도 약 9개의 뉴클레오타이드, 보통 적어도 약 20개 내지 24개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 28개 내지 32개의 뉴클레오타이드, 적어도 약 36개 이상의 뉴클레오타이드의 더 작은 단편 중에서 동일성이 또한 원해질 수 있다. 다수의 서열 정렬 프로그램은 또한 핵산 서열에 대해 이용 가능하다. 이러한 프로그램의 예는 인터넷에서 웹 서버를 통해 이용 가능한 "Clustal W", "CAP 서열 어셈블리", "BLAST", "MAP" 및 "MEME"를 포함한다. 이러한 프로그램에 대한 다른 소스는 당업자에게 이용 가능하다. 대안적으로, 또한 벡터 NTI 유용성이 이용된다. 상기 기재된 프로그램에 함유된 것을 포함하여 뉴클레오타이드 서열 동일성을 측정하기 위해 이용될 수 있는 당해 분야에 공지된 다수의 방법이 또한 존재한다. 또 다른 예로서, 폴리뉴클레오타이드 서열은 GCG Version 6.1에서의 프로그램인 Fasta(상표명)를 이용하여 비교될 수 있다. 흔히 이용 가능한 서열 분석 소프트웨어, 더 구체적으로, 공공 데이터베이스에 의해 제공된 BLAST 또는 분석 도구를 또한 이용할 수 있다.
- [0051] 서열 번호 3의 실시형태에서, 네이티브 인간 RDH12의 cDNA는 NotI 부위에서 임베딩된 5' 말단에서 완전한 Kozak 공통을 첨가함으로써 및 3' 말단에서 BclI 및 BamHI 부위(클로닝을 위한 제한 부위)를 첨가함으로써 본 발명자들에 의해 변형된다. TGA 중지 코돈은 최적 에피토프 태그화를 수월하게 하도록 BclI 부위에서 임베딩된다. 이 실시형태는 또한 소정의 내부 제한 효소, 예컨대 BglII, Bsu36I, NheI, NotI, SalI 및 XhoI의 사용을 피한다. Kozak-CACC 서열을 갖는 NotI 제한 부위는 서열 번호 3의 1번 내지 12번 뉴클레오타이드에서 삽입된다. BglII 제한 부위는 서열 번호 3의 마지막 6개의 뉴클레오타이드에서 삽입된다.
- [0052] 구체적으로, 도 1a 내지 도 1b는 서열 번호 1(네이티브 RDH12 코딩 서열)에 의한 서열 번호 5(코돈 최적화된 RDH12 DNA 서열)의 서열 정렬을 보여준다. 생성된 코딩된 단백질이 동일하더라도, 코돈 최적화된 RDH12의 오픈 리딩 프레임은 뉴클레오타이드의 22%(즉, 78% 상동성)만큼 네이티브 서열과 다르다.
- [0053] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는, 본 명세서에 사용된 바대로, 인간, 수의 또는 농장 동물, 가축 동물 또는 애완동물, 및 임상 조사에 보통 사용되는 동물을 포함하는 포유류 동물을 의미한다. 일 실시형태에서, 이들 방법 및 조성물의 대상체는 인간이다. 더욱 다른 적합한 대상체는, 제한 없이, 쥐과, 랫트, 개과, 고양이과, 돼지과, 소, 양 및 기타를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "대상체"는 "환자"와 상호 교환되어 사용된다. 대상체는 특히 인간을 포함하여 치료 또는 예방의 이들 방법을 요하는 임의의 포유류를 포함한다. 대상체는 수컷 또는 암컷일 수 있다. 일 실시형태에서, 대상체는 레베르 선천성 흑암시(LCA) 또는 망막 색소변성증을 갖거나, 이를 발생시킬 위험에 있다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 LCA 또는 RP, 또는 부적절하게 발현된 기능성 RDH12에서의 돌연변이 또는 이의 결여와 연관된 다른 눈 장애, 또는 부적절하게 발현된 기능성 RDH12를 갖거나 이를 발생시킬 위험에 있다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 LCA 또는 RP의 임상 징후를 나타냈다. LCA 또는 RP의 임상 징후는 안구진탕, 말초 시력의 감소, 중심(판독) 시력의 감소, 야간 시력의 감소, 색상 인지의 손실, 시력의 감소, 광수용체 기능의 감소, 색소 변화 및 실명을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 LCA 또는 RP로 진단된다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 대상체는 아직 LCA 또는 RP의 임상 징후를 나타내지 않았다.
- [0054] 더욱 또 다른 실시형태에서, 대상체는 약 또는 적어도 5 내지 10%의 광수용체 손상 및/또는 손실을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 적어도 20%의 광수용체 손상 및/또는 손실을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 적어도 30%의 광수용체 손상 및/또는 손실을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 적어도 40%, 적어도 50%, 적어도 60%의 광수용체 손상/손실을 갖는다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 적어도 70%, 적어도 80%, 또는 적어도 90%의 광수용체 손상 및/또는 손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 약 또는 적어도 5 내지 10% 또는 이것 초과와 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 적어도 20%의 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 적어도 30%의 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 적어도 40%의 막대 및/또는

원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 적어도 50%의 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 적어도 60%, 적어도 70%, 적어도 80%의 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다. 또 다른 일 실시형태에서, 대상체는 90%의 막대 및/또는 원뿔 기능 손상/손실을 갖는다.

[0055] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "장애" 또는 "유전자 장애" 또는 "RDH12 매개된 장애"는 RDH12 단백질이 대상체의 눈 세포에서 부분적으로 또는 전체로 비기능성이 되게 하는 네이티브(예를 들어, 야생형) RDH12 단백질의 아미노산 서열에서의 삽입, 변경 또는 결실과 연관된 임의의 질환, 장애 또는 병태를 의미하도록 본 명세서에 걸쳐 사용된다. 장애 또는 유전자 질환은 RDH12 단백질이 부분적으로 또는 전체로 비기능성이 되게 하거나, 대상체의 눈 세포에서 부분적으로 또는 전체로 발현된 몇몇 다른 결함을 또한 수반할 수 있다. 달리 기재되지 않는 한, 이러한 장애는 유전성 및/또는 비유전성 유전자 장애 및 유아기 또는 아동기 동안 신체 증상을 나타낼 수 없는 질환 및 병태를 포함한다.

[0056] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "눈 세포"는 눈에서의 또는 눈의 기능과 연관된 임의의 세포를 의미한다. 상기 용어는 막대, 원뿔 및 광감성 신경절 세포, 망막 색소 상피(RPE) 세포, 물러 세포(Mueller), 양극성 세포, 수평 세포, 아마크린 세포(amacrine cell)를 포함하는 임의의 하나 이상의 광수용체 세포를 의미할 수 있다. 일 실시형태에서, 눈 세포는 광수용체 세포이다. 또 다른 실시형태에서, 눈 세포는 막대 및 원뿔 세포이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 눈 세포는 원뿔 세포이다.

[0057] 본 발명의 소정의 실시형태에서, 대상체는 본 발명의 성분, 조성물 및 방법이 치료하고자 설계된 "눈 장애"를 갖는다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "눈 장애"는 막대-원뿔 이상증 및 망막 질환, 예를 들어 제한 없이 스타르가르트병(Stargardt disease)(상염색체 우성 또는 상염색체 열성), 망막색소변성증, 연령 관련 황반변성, 막대-원뿔 이영양증, 레베르 선천성 흑암시, 어서 증후군(Usher's syndrome), 바르테트 비들 증후군(Bardet-Biedl Syndrome), 베스트병(Best disease), 베슨-코른와이크 증후군(Bassen-Kornzweig syndrome), 망막충간분리, 비치료된 망막 박리, 패튼 이영양증, 완전색맹, 맥락막결손, 눈 백색증, 증대된 S 원뿔 증후군, 당뇨병성 망막증, 미숙아 망막증, 겸상 세포 망막증, 레프선 증후군(refsun syndrome), 선천성 고정형 야맹증, 녹내장, 우극상 위축(gyrate atrophy) 또는 망막 정맥 폐쇄를 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 대상체는 녹내장, 레베르 유전성 시각 신경병증, 리보솜 축적 장애 또는 폐색시증 장애를 갖거나 이를 발생시킬 위험에 있다. 이러한 눈 질환의 임상 징후는 말초 시력의 감소, 중심(판독) 시력의 감소, 야간 시력의 감소, 색상 인지의 손실, 시력의 감소, 광수용체 기능의 감소, 색소 변화 및 궁극적으로 실명을 포함하지만, 이들로 제한되지는 않는다.

[0058] 본 발명의 소정의 실시형태에서, RDH12 핵산 서열은 벡터 또는 바이러스 벡터에 의해 치료를 요하는 눈 세포에 전달되고, 이들 중 많은 것은 공지되어 있고 당해 분야에서 이용 가능하다. 눈 세포에 대한 전달을 위해, 치료학적 벡터는 바람직하게는 비독성이고, 비면역원성이고, 제조하기 쉽고, DNA를 보호하고 이를 표적 세포로 전달하는 데 효과적이다. 본 명세서에 사용된 바와 같은 "벡터"는 외인성 또는 비상동성 또는 조작된 핵산 서열 또는 전이유전자가 삽입될 수 있고, 이것이 이후 적절한 숙주 세포로 도입될 수 있는 핵산 분자이다. 벡터는 바람직하게는 하나 이상의 복제 기원, 및 재조합 DNA가 삽입될 수 있는 하나 이상의 부위를 갖는다. 벡터는 대개 벡터를 갖는 세포는 벡터를 갖지 않는 것으로부터 선택될 수 있는 편리한 수단을 가지고, 예를 들어 이들은 약물 내성 유전자를 코딩한다. 흔한 벡터는 플라스미드, 바이러스 계통, 및 (주로 효모 및 박테리아에서) "인공 염색체"를 포함한다.

[0059] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하기 위해 사용된 바와 같은 용어 "외인성"은 핵산 또는 단백질이 염색체, 재조합 플라스미드, 벡터 또는 숙주 세포에서 존재하지 않는 위치에서 이것이 천연으로 발생하지 않는다는 것을 의미한다. 외인성 핵산 서열은 또한 동일한 숙주 세포 또는 대상체로부터 유래되거나 이로 삽입되지만, 비천연 상태, 예를 들어 상이한 카피수로, 또는 상이한 조절 요소의 제어 하에 존재하는 서열을 의미한다.

[0060] 핵산 서열 또는 단백질을 기재하기 위해 사용된 바와 같은 용어 "비상동성"은 핵산 또는 단백질이 이것이 발현된 숙주 세포 또는 대상체와 상이한 유기체 또는 이와 동일한 유기체의 상이한 종으로부터 유래된다는 것을 의미한다. 용어 "비상동성"은, 플라스미드, 발현 카세트 또는 벡터에서의 단백질 또는 핵산과 관련하여 사용될 때, 해당 단백질 또는 핵산이 자연에서 서로에 대한 동일한 관계에서 발견되지 않는 또 다른 서열 또는 하위서열에 의해 단백질 또는 핵산이 존재한다는 것을 나타낸다.

[0061] 용어 "단리된"은 재료가 이의 원래의 환경(예를 들어, 이것이 천연 발생인 경우, 천연 환경)으로부터 제거된다는 것을 의미한다. 예를 들어, 살아 있는 동물에 존재하는 천연 발생 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 단리되지 않지만, 천연 시스템에서 공존하는 재료의 일부 또는 전부로부터 분리된 동일한 폴리뉴클레오타이드

또는 폴리펩타이드는 후속하여 천연 시스템으로 재도입되더라도 단리된다. 이러한 폴리뉴클레오타이드는 벡터의 일부일 수 있고/있거나, 이러한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩타이드는 조성물의 일부일 수 있고, 이러한 벡터 또는 조성물이 이의 천연 환경의 일부가 아니라는 점에서 여전히 단리될 수 있다.

[0062] "조작된"이란, 본 명세서에 기재된 RDH12 및 RDH12 단백질을 코딩하는 핵산 서열이 조립되고, 예를 들어 비바이러스 전달 시스템(예를 들어, RNA계 시스템, 네이키드 DNA 등)을 생성하기 위해 또는 패키징 숙주 세포에서 바이러스 벡터를 생성하기 위해 및/또는 대상체에서의 숙주 세포로의 전달을 위해 여기에 보유된 RDH12 서열을 숙주 세포로 이동시키는 임의의 적합한 유전자 요소, 예를 들어 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포손, 코스미드, 에피솜 등에 배치된다는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 유전자 요소는 플라스미드이다. 이러한 조작된 작제물을 제조하기 위해 사용된 방법은 핵산 조작에서 당업자에게 공지되어 있고, 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]을 참조한다.

[0063] "바이러스 벡터"는 기능성 RDH12를 코딩하는 외인성 또는 비상동성 핵산 서열을 함유하는 복제 결함, 합성 또는 재조합 바이러스 입자로서 정의된다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 바와 같은 발현 카세트는 약물 전달을 위해 또는 바이러스 벡터의 생성을 위해 사용된 플라스미드로 조작될 수 있다. 적합한 바이러스 벡터는 바람직하게는 복제 결함이고, 눈 세포를 표적화하는 것 중에서 선택된다. 일 실시형태에서, 전이유전자를 함유하는 발현 카세트는 바이러스 캡시드 또는 봉입체에 패키징된다. 그 바이러스 캡시드 또는 봉입체 내에 또한 패키징된 임의의 바이러스 게놈 서열은 복제 결함이고, 즉 이것은 자손 비리온을 생성할 수 없지만, 표적 세포를 감염시키는 능력을 보유한다. 일 실시형태에서, 바이러스 벡터의 게놈은 복제하는 데 필요한 효소를 코딩하는 유전자를 포함하지 않지만(게놈은 "배 없이(gut less)" 조작될 수 있음 - 인공 게놈의 증폭 및 패키징에 필요한 신호에 의해 플랭킹된 관심 대상의 전이유전자를 오직 함유), 이 유전자는 생성 동안 공급될 수 있다. 따라서, 자손 비리온에 의한 감염 및 복제가 복제에 필요한 바이러스 효소의 존재에서 제외하고 발생할 수 없으므로, 이것이 유전자 치료에서 사용하기에 안전한 것으로 생각된다.

[0064] 바이러스 벡터는 유전자 치료에 적합한 임의의 바이러스, 예를 들어 아데노바이러스; 헤르페스 바이러스; 렌티 바이러스; 레트로바이러스; 파르보바이러스 등(이들로 제한되지는 않음)을 포함할 수 있다. 그러나, 이해의 용이성을 위해, 아데노 연관된 바이러스는 본 명세서에서 예시적인 바이러스 벡터라 언급된다. 따라서, 일 실시형태에서, 치료학적 조성물 또는 시약은 발현 제어 서열에 작동 가능하게 연결된 RDH12 전이유전자를 포함하는 아데노 연관된 바이러스 벡터를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "전이유전자"는, 본 명세서에 기재된 발현 카세트(플랭킹 rAAV ITR이 있거나 없음), 재조합 플라스미드 또는 프로바이러스 플라스미드, 벡터, 또는 숙주 세포에서 촉진자 또는 발현 제어 서열의 제어 하에 있는 외인성 또는 조작된 단백질 코딩 핵산 서열을 의미한다. 소정의 실시형태에서, 전이유전자는 서열 번호 3인 코돈 최적화된 RDH12 코딩 서열이다. 소정의 실시형태에서, 전이유전자는 서열 번호 1인 천연 발현 또는 네이티브 RDH12 코딩 서열이다. 다른 실시형태에서, 다양한 조합에서의 코돈 최적화된 및 천연 RDH12 코딩 서열 둘 다는 전이유전자로서 작용할 수 있다.

[0065] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "작동 가능하게 연결된" 또는 "작동 가능하게 연관된"은 RDH12를 코딩하는 핵산 서열과 인접한 발현 제어 서열 및/또는 이의 전사 및 발현을 제어하는 거리에서 또는 트랜스에서 작동하는 발현 제어 서열 둘 다를 의미한다.

[0066] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "숙주 세포"는 재조합 AAV가 프로바이러스 플라스미드로부터 생성된 패키징 세포주를 의미할 수 있다. 대안에서, 용어 "숙주 세포"는 전이유전자의 발현이 원해지는 임의의 표적 세포를 의미할 수 있다. 따라서, "숙주 세포"는 임의의 수단, 예를 들어 전기천공, 인산칼슘 침전, 미량주사, 형질전환, 바이러스 감염, 형질주입, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA 코팅된 펄스, 바이러스 감염 및 원형질체 융합에 의해 세포로 도입된 외인성 또는 비상동성 DNA를 함유하는 원핵 또는 진핵 세포를 의미한다. 본 명세서에서 소정의 실시형태에서, 용어 "숙주 세포"는 본 명세서에 기재된 조성물의 시험관내 평가를 위한 다양한 포유류 종의 눈 세포의 배양물을 의미한다. 본 명세서에서 다른 실시형태에서, 용어 "숙주 세포"는 바이러스 벡터 또는 재조합 바이러스를 생성하고 패키징하기 위해 사용된 세포를 의미한다. 더욱 다른 실시형태에서, 용어 "숙주 세포"는 눈 질환을 위해 생체내 치료되는 대상체의 눈 세포를 언급하도록 의도된다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 숙주 세포는 유전자를 발현하도록 강제됨으로써 배아 줄기 세포 유사 상태로 유전적으로 재프로그래밍된 성인 세포 및 배아 줄기 세포의 한정 특성을 유지시키는 데 중요한 인자인 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)를 의미할 수 있다. 이러한 세포는 본 명세서에 기재된 벡터의 기능을 평가하기 위한 모델 또는 도구로서 사용되고 조작될 수 있다.

- [0067] "플라스미드" 또는 플라스미드 벡터는 일반적으로 당업자에게 친숙한 표준 명명 규칙에 따라본 명세서에서 소문자 p, 이전의 및/또는 이후의 대문자 및/또는 숫자에 의해 지칭된다. 본 명세서에 개시된 시작 플라스미드는 상업적으로 이용 가능하거나, 비제한된 기준으로 공공으로 이용 가능하거나, 널리 공지된 공개된 절차의 일상적 적용에 의해 이용 가능한 플라스미드로부터 작제될 수 있다. 본 발명에 따라 사용될 수 있는 많은 플라스미드 및 다른 클로닝 및 발현 벡터는 널리 공지되어 있고, 당업자에게 용이하게 이용 가능하다. 더구나, 당업자는 본 발명에서 사용하기에 적합한 임의의 수의 다른 플라스미드를 용이하게 작제할 수 있다. 본 발명에서 이러한 플라스미드, 및 다른 벡터의 특성, 구성 및 용도는 본 개시내용으로부터 당업자에게 용이하게 명확할 것이다.
- [0068] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "전사 제어 서열" 또는 "발현 제어 서열"은 이들이 작동 가능하게 연결된 단백질 코딩 핵산 서열의 전사를 유도하거나, 억제하거나, 그렇지 않으면 제어하는 핵산 서열, 예컨대 개시제 서열, 인핸서 서열 및 촉진자 서열을 의미한다.
- [0069] 더욱 추가의 실시형태에서, 재조합 아데노 연관된 바이러스(AAV) 벡터는 본 명세서에 기재된 RDH12 작제물 및 최적화된 서열의 전달을 위해 제공된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "AAV"는 수십의 천연 발생 및 이용 가능한 아데노 연관된 바이러스, 인공 AAV를 의미한다. 아데노 연관된 바이러스(AAV) 바이러스 벡터는 표적 세포로의 전달을 위해 핵산 서열이 패키징된 AAV 단백질 캡시드를 갖는 AAV DNase 내성 입자이다. AAV 캡시드는 선택된 AAV에 따라 대략 1:1:10 내지 1:1:20의 비율로 20면체 대칭으로 배열된 VP1, VP2 및 VP3인 60개의 캡시드(cap) 단백질 아단위로 이루어진다. AAV는 상기 확인된 바대로 AAV 바이러스 벡터의 캡시드에 대한 소스로서 선택될 수 있다. 예를 들어, US 공개 특허 출원 제2007-0036760호 A1; US 공개 특허 출원 제2009-0197338-A1호; EP 제1310571호를 참조한다. 또한, WO 제2003/042397호(AAV7 및 다른 유인원 AAV), 미국 특허 제7790449호 및 미국 특허 제7282199호(AAV8), WO 제2005/033321호 및 US 제7,906,111호(AAV9), 및 WO 제2006/110689호 및 WO 제2003/042397호(rh.10)를 참조한다. 이들 문헌은 또한 AAV를 생성하는 데 선택될 수 있는 다른 AAV를 기재하고, 참고로 포함된다.
- [0070] 인간 또는 비인간 영장류(NHP)로부터 단리되거나 조작되고 널리 규명된 AAV 중에서, 인간 AAV2는 유전자 전달 벡터로서 개발된 제1의 AAV이고; 이것은 상이한 표적 조직 및 동물 모델에서 효율적인 유전자 전달 실험을 위해 널리 사용된다. 달리 기재되지 않는 한, 본 명세서에 기재된 AAV 캡시드, ITR, 및 다른 선택된 AAV 성분은 임의의 AAV, 예를 들어 제한 없이 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV8bp, AAV7M8 및 AAVAnc80, 이제 개발될 임의의 공지된 또는 언급된 AAV 또는 AAV의 변이체, 또는 이들의 변이체 또는 혼합물로서 흔히 확인된 AAV로부터 용이하게 선택될 수 있다. 예를 들어, WO 제2005/033321호(본 명세서에 참고로 포함됨)를 참조한다.
- [0071] 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 양극성 세포를 우선적으로 표적화하는 AAV8bp 캡시드이다. WO 제2014/024282호(본 명세서에 참고로 포함됨)를 참조한다. 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 외부 망막으로 우선적인 전달을 나타낸 AAV7m8 캡시드이다. 문헌[Dalkara *et al*, In Vivo-Directed Evolution of a New Adeno-Associated Virus for Therapeutic Outer Retinal Gene Delivery from the Vitreous, *Sci Transl Med* 5, 189ra76 (2013)](본 명세서에 참고로 포함됨)을 참조한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV8 캡시드이다. 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV9 캡시드이다. 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV5 캡시드이다.
- [0072] 몇몇 실시형태에서, 바이러스 벡터에서 사용하기 위한 AAV 캡시드는 상기 언급된 AAV 캡시드 중 하나 또는 이의 코딩 핵산의 돌연변이유발(즉, 삽입, 결실 또는 치환)에 의해 생성될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, AAV 캡시드는 상기 언급된 AAV 캡시드 단백질의 2개 또는 3개 또는 4개 이상으로부터의 도메인을 포함하는 키메라이다. 몇몇 실시형태에서, AAV 캡시드는 2개 또는 3개의 상이한 AAV 또는 재조합 AAV로부터의 Vp1, Vp2, 및 Vp3 단량체의 모자이크이다. 몇몇 실시형태에서, rAAV 조성물은 상기 언급된 Cap 중 1개 초과를 포함한다. 일 실시형태에서, 원하는 표적 세포, 예를 들어 광수용체, RPE 또는 다른 눈 세포에 향성(tropism)을 나타내는 AAV 캡시드를 사용하는 것이 바람직하다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 소정의 표면 노출된 타이로신 잔기가 페닐알라닌(F)에 의해 치환된 타이로신 캡시드-돌연변이체이다.
- [0073] 이러한 AAV 변이체는 예를 들어 문헌[Mowat *et al*, Jan 2014, Tyrosine capsid-mutant AAV vectors for gene delivery to the canine retina from a subretinal or intravitreal approach, *Gene Therapy* 21, 96-105](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재되어 있다. 일 실시형태에서, 캡시드는 Y733F 돌연변이를 갖는 AAV8 캡시드이다. 또 다른 실시형태에서, 캡시드는 Kay 등(Apr 2013, Targeting Photoreceptors via Intravitreal Delivery Using Novel, Capsid-Mutated AAV Vectors, *PLoS One*. 2013; 8(4): e62097)(본 명세서에 참고로 포함됨)에 의해 기재된 바대로 Y447F, Y733F 및 T494V 돌연변이("AAV8(C&G+T494V)" 및 "rep2-

cap8(Y447F+733F+T494V)"이라고도 칭함)를 갖는 AAV8 캡시드이다.

- [0074] 본 명세서에 사용된 바와 같은, AAV와 관련하여, 용어 "변이체"는 아미노산 또는 핵산 서열에 걸쳐 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 97%, 적어도 99% 또는 이것 초과와 서열 동일성을 공유하는 것을 포함하여 공지된 AAV 서열로부터 유래된 임의의 AAV 서열을 의미한다. 또 다른 실시형태에서, AAV 캡시드는 임의의 기재된 또는 공지된 AAV 캡시드 서열로부터 약 10% 이하의 변동을 포함할 수 있는 변이체를 포함한다. 즉, AAV 캡시드는 본 명세서에 제공된 및/또는 당해 분야에 공지된 AAV 캡시드와 약 90%의 동일성 내지 약 99.9%의 동일성, 약 95% 내지 약 99%의 동일성 또는 약 97% 내지 약 98%의 동일성을 공유한다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV 캡시드와 적어도 95%의 동일성을 공유한다. AAV 캡시드의 퍼센트 동일성을 결정할 때, 임의의 가변 단백질(예를 들어, vp1, vp2 또는 vp3)에 걸쳐 비교가 만들어질 수 있다. 일 실시형태에서, AAV 캡시드는 AAV8 vp3과 적어도 95%의 동일성을 공유한다. 또 다른 실시형태에서, 자가 상보성 AAV를 사용한다.
- [0075] ITR 또는 다른 AAV 성분은 AAV로부터 당업자에게 이용 가능한 기법을 이용하여 용이하게 단리되거나 조작될 수 있다. 이러한 AAV는 학술적, 상업적 또는 공공 소스(예를 들어, 미국 배양 협회(American Type Culture Collection)(버지니아주 머내서스))로부터 단리되거나 조작되거나 얻어질 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적합한 수단을 통해 조작될 수 있고, 예를 들어 문헌에서 또는 예를 들어 GenBank, PubMed 등과 같은 데이터베이스에서 이용 가능하다. AAV 바이러스는 종래의 분자 생물학 기법에 의해 조작될 수 있어서, 핵산 서열의 세포 특이적 전달을 위해, 면역원성을 최소화하기 위해, 안정성 및 입자 수명을 조절하기 위해, 효율적인 분해를 위해, 핵에 대한 정확한 전달 등을 위해 이들 입자를 최적화하는 것이 가능하게 한다.
- [0076] 본 명세서에 사용된 바와 같은, "인공 AAV"는, 제한 없이, 비천연 발생 캡시드 단백질을 갖는 AAV를 의미한다. 이러한 인공 캡시드는 상이한 선택된 AAV, 동일한 AAV의 비인접한 부분으로부터, 비-AAV 바이러스 소스로부터, 또는 비바이러스 소스로부터 얻어질 수 있는 비상동성 서열과 조합되어 선택된 AAV 서열(예를 들어, vp1 캡시드 단백질의 단편)을 사용하여 임의의 적합한 기법에 의해 생성될 수 있다. 인공 AAV는, 제한 없이, 위형화된 AAV, 키메라 AAV 캡시드, 재조합 AAV 캡시드, 또는 "인간화된" AAV 캡시드일 수 있다. 하나의 AAV의 캡시드가 비상동성 캡시드 단백질에 의해 대체된 위형화된 벡터는 본 발명에서 유용하다. 일 실시형태에서, AAV2/5 및 AAV2/8은 예시적인 위형화된 벡터이다.
- [0077] 발현 카세트 또는 rAAV 게놈 또는 생성 플라스미드 또는 프로바이러스 플라스미드를 비리온으로 패키징하기 위해, ITR은 전이유전자와 동일한 작제물에서 시스템에서 필요한 유일한 AAV 성분이다. 일 실시형태에서, 복제(rep) 및/또는 캡시드(cap)에 대한 코딩 서열은 AAV 게놈로부터 제거되고, 트랜스에서 또는 AAV 벡터를 생성하기 위해 세포주를 패키징함으로써 공급된다. 예를 들어, 상기 기재된 바대로, 위형화된 AAV는 AAV 캡시드의 소스와 다른 소스로부터의 ITR을 함유할 수 있다. 일 실시형태에서, AAV2/5 및 AAV2/8은 예시적인 위형화된 벡터이다. 부가적으로 또는 대안적으로, 키메라 AAV 캡시드를 사용할 수 있다. 더욱 다른 AAV 성분을 선택할 수 있다. 이러한 AAV 서열의 소스는 본 명세서에 기재되어 있고, 학술적, 상업적 또는 공공 소스(예를 들어, 미국 배양 협회((버지니아주 머내서스))로부터 또한 단리되거나 조작되거나 얻어질 수 있다. 대안적으로, AAV 서열은 AAV 서열은 공개된 서열을 참조하여 합성 또는 다른 적합한 수단을 통해 얻어질 수 있고, 예를 들어 문헌에서 또는 예를 들어 GenBank(등록상표), PubMed(등록상표) 등과 같은 데이터베이스에서 이용 가능하다.
- [0078] "자가 상보성 AAV"는 재조합 AAV 핵산 서열이 보유한 코딩 영역이 분자내 이중 가닥 DNA 주형을 형성하도록 설계된 발현 카세트를 갖는 플라스미드 또는 벡터를 의미한다. 감염 시, 제2 가닥의 세포 매개된 합성을 기다리기 보다는, scAAV의 2개의 상보성 절반은 즉시 복제 및 전사에 준비된 하나의 이중 가닥 DNA(dsDNA) 단위를 형성하도록 회합할 것이다. 예를 들어, 문헌[D M McCarty *et al*, "Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis", *Gene Therapy*, (August 2001), Vol 8, Number 16, Pages 1248-1254]을 참조한다. 자가 상보성 AAV는 예를 들어 미국 특허 제 6,596,535호; 제7,125,717호; 및 제7,456,683호(이들은 각각 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0079] 일 실시형태에서, AAV는 자가 상보성 AAV2/8이다. 예를 들어, 문헌[Buie *et al*, Jan. 2010, Self-complementary AAV Virus (scAAV) Safe and Long-term Gene Transfer in the Trabecular Meshwork of Living Rats and Monkeys, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, 51(1): 236-248, 및 Ryals *et al*, Apr. 2011, Quantifying transduction efficiencies of unmodified and tyrosine capsid mutant AAV vectors in vitro using two

ocular cell lines, Mol Vis.;17:1090-102](본 명세서에 참고로 포함됨)을 참조한다. 일 실시형태에서, AAV는 적어도 Y733F 돌연변이를 갖는 자가 상보성 AAV2/8이다. 문헌[Ku *et al*, Dec. 2011, Gene therapy using self-complementary Y733F capsid mutant AAV2/8 restores vision in a model of early onset Leber congenital amaurosis, Hum Mol Genet., 20(23): 4569-4581](본 명세서에 참고로 포함됨)을 참조한다. 또 다른 실시형태에서, AAV는 적어도 Y447F+733F+T494V 돌연변이를 갖는 자가 상보성 AAV2/8이다. 본 명세서에 인용된 Kay 등의 문헌(2013)을 참조한다.

- [0080] 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물 및 방법에서 유용한 벡터는, 최소한, 선택된 AAV 캡시드, 예를 들어 AAV8 캡시드를 코딩하는 서열, 또는 이의 단편을 함유한다. 또 다른 실시형태에서, 유용한 벡터는, 최소한, 선택된 AAV rep 단백질, 예를 들어 AAV5 rep 단백질을 코딩하는 서열, 또는 이의 단편을 함유한다. 임의로, 이러한 벡터는 AAV cap 및 rep 단백질 둘 다를 함유할 수 있다. AAV rep 및 cap 둘 다가 제공되는 벡터에서, AAV rep 및 AAV cap 서열은 둘 다 하나의 기원, 예를 들어 모든 AAV5 기원 또는 모든 AAV7 기원 동일 수 있다.
- [0081] 대안적으로, rep 서열이 cap 서열을 제공하는 것과 다른 AAV 유래인 벡터를 사용할 수 있다. 일 실시형태에서, rep 및 cap 서열은 별개의 소스(예를 들어, 별개의 벡터, 또는 숙주 세포 및 벡터)로부터 발현된다. 또 다른 실시형태에서, 이 rep 서열은 키메라 AAV 벡터, 예컨대 미국 특허 제7,282,199호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 AAV2/8을 형성하기 위해 상이한 AAV의 cap 서열에 인프레임으로 융합된다.
- [0082] 본 명세서에 기재된 소정의 조성물은 단리되거나, 기능성 RDH12를 코딩하는 신규한 코돈 최적화된 서열을 제공하는 합성으로 또는 재조합으로 조작된 핵산 서열이다. 일 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 hRDH12 작제물을 코딩하는 최적화된 핵산 서열은 임의의 적합한 유전자 요소, 예를 들어 네이키드 DNA, 파지, 트랜스포손, 코스미드, RNA 분자(예를 들어, mRNA), 에피솜 등으로 조작되고, 이것은 예를 들어 DNA 또는 RNA를 보유하는 나노입자, 패키징 숙주 세포에서 바이러스 벡터를 생성하기 위해 및/또는 대상체에서 숙주 세포로의 전달을 위해 여기에 보유된 RDH12 서열을 숙주 세포로 이동시킨다. 일 실시형태에서, 유전자 요소는 플라스미드이다.
- [0083] 선택된 유전자 요소는 형질주입, 전기천공, 리포솜 전달, 막 융합 기법, 고속 DNA 코팅된 펠릿, 바이러스 감염 및 원형질체 융합을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 이러한 작제물을 제조하기 위해 이용된 방법은 핵산 조작에서 당업자에게 공지되어 있고, 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]을 참조한다.
- [0084] hRDH12 단백질의 다수의 또는 상이한 버전의 발현을 위해 서열 번호 3을 이용하는 다양한 발현 카세트가 제공된다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "발현 카세트"는 최적화된 RDH12 단백질에 대한 코딩 서열, 촉진자를 포함하는 핵산 분자를 의미하고, 이에 대한 다른 조절 서열을 포함할 수 있고, 이 카세트는 유전자 요소 또는 플라스미드로 조작되고/되거나, 바이러스 벡터의 캡시드(예를 들어, 바이러스 입자)로 패키징될 수 있다. 일 실시형태에서, 발현 카세트는 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 카세트는 숙주 세포에서 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열의 발현을 지시하는 발현 제어 서열과 작동 가능하게 연관된 코돈 최적화된 RDH12를 제공한다.
- [0085] 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 일 실시형태에서, 카세트는 숙주 세포에서 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열의 발현을 지시하는 발현 제어 서열과 작동 가능하게 연관된 코돈 최적화된 RDH12를 제공한다.
- [0086] 훨씬 또 다른 실시형태에서, 발현 카세트는 기능성 최적화된 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함한다. 이러한 발현 카세트의 일 실시형태에서, RDH12를 코딩하는 서열은 숙주 세포에서 RDH12를 코딩하는 천연 발생 핵산 서열의 발현을 지시하는 제1 발현 제어 서열(들)과 작동 가능하게 연관된다. RDH12를 함유하는 발현 카세트에 대해 상기 기재된 바대로, 기능성 RDH12의 다수의 카피 또는 다수의 상이한 버전을 발현하는 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열은 서열의 또 다른 버전에 5' 또는 3'에 배치될 수 있다. 당업자는 본 명세서 및 선행 기술의 교시의 관점에서 RDH12의 다수의 카피의 발현에 대해 작제물을 용이하게 설계할 수 있다.
- [0087] 본 명세서에 기재된 바대로, 발현 카세트는 이의 5' 말단에서 5'AAV 인버티드 말단 반복 서열(ITR)에 의해 플랭킹되고, 이의 3' 말단에서 3' AAV ITR에 의해 플랭킹될 수 있다. 따라서, 이 rAAV ITR 플랭킹된 발현 카세트는 AAV 바이러스 입자로 발현 카세트를 패키징하는 데 필요한 최소 서열, 즉 AAV 5' 및 3' ITR을 함유한다. AAV ITR은 예컨대 본 명세서에 기재된 임의의 AAV의 ITR 서열로부터 얻어질 수 있다. 이 ITR은 생성된 재조합 AAV에서 사용된 캡시드와 동일한 AAV 기원 또는 (AAV 위형을 제조하기 위한) 상이한 AAV 기원일 수 있다. 일 실시형

태에서, AAV2로부터의 ITR 서열, 또는 이의 결실된 버전(Δ ITR)은 편리함을 위해 및 규제 허가를 가속화하도록 사용된다. 그러나, 다른 AAV 소스로부터의 ITR을 선택할 수 있다. 이후, 각각의 rAAV 게놈을 WO 제2012/158757 호의 교시에 따라 프로바이러스 플라스미드로 도입할 수 있다. 프로바이러스 플라스미드는 AAV cap 및/또는 rep 단백질을 발현하는 숙주 세포에서 배양된다. 숙주 세포에서, 각각의 rAAV 게놈은 구제되고 캡시드 단백질 또는 봉입체 단백질로 패키징되어서 감염성 바이러스 입자를 형성한다.

[0088] 더욱 또 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 임의의 발현 카세트를 포함하는 벡터가 제공된다. 상기 기재된 바대로, 이러한 벡터는 다양한 기원의 플라스미드일 수 있고, 소정의 실시형태에서 본 명세서에서 추가로 기재된 바대로 재조합 복제 결합 바이러스의 생성을 위해 유용하다.

[0089] 또 다른 일 실시형태에서, 벡터는 AAV 캡시드 및 재조합 AAV-ITR 플랭킹된 발현 카세트를 포함하는 프로바이러스 플라스미드이고, 상기 카세트는 RDH12 또는 RDH12의 다수(즉, 적어도 2개)의 카피를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열, 및 숙주 세포에서 코딩된 단백질의 발현을 지시하는 발현 제어 서열을 포함한다.

[0090] 프로바이러스 플라스미드의 하나의 유형은 카세트의 성분의 부분이 플라스미드에서 제한 부위를 파괴하지 않으면서 제거되고 다른 성분에 의해 반복하여 대체되는 모듈식 재조합 발현 카세트를 포함한다. 이러한 프로바이러스 플라스미드는 5' AAV ITR 서열, 상류에서 제한 부위 1에 의해 및 하류에서 제한 부위 2에 의해 플랭킹된 ITR; 상류에서 제한 부위 2에 의해 및 하류에서 제한 부위 3에 의해 플랭킹된 선택된 촉진자를 함유하는 것이다. 모듈식 rAAV의 또 다른 성분은 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 함유하는 적어도 제한 부위 3, 제한 부위 4 및 제한 부위 5를 포함하는 폴리링커 서열, 또는 RDH12를 코딩하는 서열의 2개 이상의 카피이고, 적어도 하나의 이러한 서열은 RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열이다. RDH12 코딩 서열은 제한 부위 3, 4 및 5 중 임의의 2개 사이에 배치되고, 촉진자에 작동 가능하게 연결되고, 이의 조절 제어 하에 있다. 대안적으로, 제2 코딩 서열은 상기 기재된 바대로 발현 카세트의 제2 발현 제어 서열과 함께 폴리링커 서열로 삽입된다.

[0091] 모듈식 rAAV 카세트의 추가적인 성분은 상류에서 제한 부위 4 또는 5에 의해 플랭킹되고 하류에서 제한 부위 6에 의해 플랭킹된 폴리아데닐화 서열; 및 상류에서 제한 부위 6에 의해 플랭킹되고 하류에서 제한 부위 7에 의해 플랭킹된 3' AAV ITR 서열을 포함한다. 프로바이러스 플라스미드는 또한 박테리아 세포에서 복제에 필요한 유전요소 및 내성 유전자를 함유한다. 상기 기재된 제한 부위 1 내지 7의 각각은 프로바이러스 플라스미드에서 오직 한번 발생하고, 플라스미드에서 또 다른 제한 부위를 절단할 수 없는 상이한 효소에 의해 절단되고, 이로써 전체 rAAV 모듈식 카세트 또는 오직 플라스미드로부터의 이 제한 부위에 의해 플랭킹된 유전요소의 독립적이고 반복된 제거, 대체 또는 치환을 허용한다. 이러한 플라스미드는 국제 특허 출원 공보 WO 제2012/158757호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 자세히 기재되어 있다.

[0092] 적합한 재조합 아데노 연관된 바이러스(AAV)는 본 명세서에 정의된 바와 같은 아데노 연관된 바이러스(AAV) 혈청형 캡시드 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 또는 이의 단편; 기능성 rep 유전자; 최소한, AAV 인버티드 말단 반복부(ITR) 및 NPHP5 핵산 서열로 이루어진 미니유전자; 및 AAV 캡시드 단백질로의 미니유전자의 패키징을 허용하는 충분한 헬퍼 기능을 함유하는 숙주 세포를 배양함으로써 생성된다. AAV 캡시드에서 AAV 미니유전자를 패키징하기 위해 숙주 세포에서 배양되는 데 필요한 성분은 트랜스에서 숙주 세포로 제공될 수 있다. 대안적으로, 필요한 성분(예를 들어, 미니유전자, rep 서열, cap 서열, 및/또는 헬퍼 기능) 중 임의의 하나 이상은 당업자에게 공지된 방법을 이용하여 필요한 성분의 하나 이상을 함유하도록 조작된 안정한 숙주 세포에 의해 제공될 수 있다.

[0093] 가장 적합하게, 이러한 안정한 숙주 세포는 유도성 촉진자의 제어 하에 필요한 성분(들)을 함유할 것이다. 그러나, 필요한 성분(들)은 구성적 촉진자의 제어 하에 있을 수 있다. 적합한 유도성 및 구성적 촉진자의 예는 전이 유전자, 즉 RDH12와 사용하기에 적합한 조절 요소의 하기 설명에서 본 명세서에 제공된다. 훨씬 또 다른 대안에서, 선택된 안정한 숙주 세포는 구성적 촉진자의 제어 하에 선택된 성분(들) 및 하나 이상의 유도성 촉진자의 제어 하에 다른 선택된 성분(들)을 함유할 수 있다. 예를 들어, (구성적 촉진자의 제어 하에 E1 헬퍼 기능을 함유하는) 293 세포로부터 유래되지만, 유도성 촉진자의 제어 하에 rep 및/또는 cap 단백질을 함유하는 안정한 숙주 세포가 생성될 수 있다. 더욱 다른 안정한 숙주 세포는 당업자에 의해 생성될 수 있다.

[0094] 본 발명의 rAAV를 제조하는 데 필요한 미니유전자, rep 서열, cap 서열 및 헬퍼 기능은 여기에 보유된 서열을 이동시키는 임의의 유전자 요소의 형태로 패키징 숙주 세포로 전달될 수 있다. 선택된 유전자 요소는 본 명세서에 기재된 것을 포함하는 임의의 적합한 방법에 의해 전달될 수 있다. 본 발명의 임의의 실시형태를 구축하도록 이용된 방법은 핵산 조작에서의 당업자에게 공지되어 있고, 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기법을

포함한다. 예를 들어, 문헌[Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에서 제한이 아니다. 무엇보다도 예를 들어 문헌[K. Fisher et al., 1993 *J. Virol.*, 70:520-532] 및 미국 특허 제5,478,745호를 참조한다. 이들 공보는 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0095] 미니유전자는, 최소한, 상기 기재된 바와 같은 RDH12 핵산 서열(전이유전자), 및 이의 조절 서열, 및 5' 및 3' AAV 인버티드 말단 반복부(ITR)로 이루어진다. 바람직한 일 실시형태에서, AAV 혈청형 2의 ITR을 사용한다. 그러나, 다른 적합한 혈청형으로부터의 ITR을 선택할 수 있다. 이것은 캡시드 단백질로 패키징되고 선택된 숙주 세포로 전달되는 미니유전자이다.

[0096] 조절 서열은 벡터에 의해 형질주입된 또는 본 발명에 의해 제조된 바이러스에 의해 감염된 세포에서의 이의 전사, 번역 및/또는 발현을 허용하는 방식으로 RDH12 유전자에 작동 가능하게 연결된 종래의 제어 요소를 포함한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "작동 가능하게 연결된" 서열은 관심 대상의 유전자와 인접한 발현 제어 서열 및 관심 대상의 유전자를 제어하는 거리로 또는 트랜스로 작용하는 발현 제어 서열 둘 다를 포함한다.

[0097] 발현 제어 서열은 적절한 전사 개시, 종결, 촉진자 및 인핸서 서열; 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증대시키는 서열(즉, Kozak 공통 서열); 단백질 안정성을 증대시키는 서열; 및 원할 때, 코딩된 생성물의 분비를 증대시키는 서열을 포함한다. 촉진자를 포함하는 발현 제어 서열의 많은 수는 당해 분야에 공지되어 있고, 사용될 수 있다.

[0098] 본 발명의 작제물에서 유용한 조절 서열은 바람직하게는 촉진자/인핸서 서열과 유전자 사이에 배치된 인트론을 또한 함유할 수 있다. 하나의 바람직한 인트론 서열은 SV-40으로부터 유래되고, SD-SA라 칭해지는 100bp 미니-인트론 스플라이스 도너/스플라이스 억셉터이다. 또 다른 적합한 서열은 마멋 간염 바이러스 전사 후 유전요소를 포함한다. (예를 들어, 문헌[L. Wang and I. Verma, 1999 *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 96:3906-3910]을 참조한다). polyA 신호는, 제한 없이 SV-40, 인간 및 소를 포함하는 많은 적합한 종으로부터 유래될 수 있다.

[0099] 본 발명의 방법에서 유용한 rAAV의 또 다른 조절 성분은 내부 리보솜 진입 부위(internal ribosome entry site: IRES)이다. IRES 서열 또는 다른 적합한 시스템은 단일 유전자 전사체로부터 하나 초과 폴리펩타이드를 제조하도록 사용될 수 있다. IRES(또는 다른 적합한 서열)는 하나 초과 폴리펩타이드 사슬을 함유하는 단백질을 제조하기 위해 또는 동일한 세포 내에 또는 이로부터 2개의 상이한 단백질을 발현하기 위해 사용된다. 예시적인 IRES는 광수용체, RPE 및 신경절 세포에서의 전이유전자 발현을 지지하는 폴리오바이러스 내부 리보솜 진입 서열이다. 바람직하게는, IRES는 rAAV 벡터에서 전이유전자에 3'에 위치한다.

[0100] rAAV에서 사용하고자 하는 촉진자의 선택은 원하는 눈 세포에서 선택된 전이유전자를 발현할 수 있는 넓은 수의 구성적 또는 유도성 촉진자 중에서 만들어질 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 세포 특이적이다. 용어 "세포 특이적"은 재조합 벡터에 대해 선택된 특정한 촉진자가 특정한 눈 세포 유형에서 선택된 전이유전자의 발현을 지시할 수 있다는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 촉진자는 광수용체 세포에서의 전이유전자의 발현에 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 막대 및 원뿔에서의 발현에 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 막대에서의 발현에 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 원뿔에서의 발현에 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 RPE 세포에서의 전이유전자의 발현에 특이적이다. 또 다른 실시형태에서, 전이유전자는 임의의 상기 기재된 눈 세포에서 발현된다.

[0101] 촉진자는 임의의 종으로부터 유래될 수 있다. 예시적인 촉진자는 인간 G-단백질 커플링된 수용체 단백질 키나제 1(G-protein-coupled receptor protein kinase 1: GRK1) 촉진자(Genbank 수탁 번호 AY327580)일 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 GRK1 촉진자의 292 nt 단편(1793번 내지 2087번 위치)이다(문헌[Beltran et al, *Gene Therapy* 2010 17:1162-74](본 명세서에 참고로 본 명세서에서 포함됨)을 참조한다). 또 다른 바람직한 실시형태에서, 촉진자는 인간 광수용체간 레티노이드 결합 단백질 근위(interphotoreceptor retinoid-binding protein proximal: IRBP) 촉진자이다. 일 실시형태에서, 촉진자는 hIRBP 촉진자의 235 nt 단편이다.

[0102] 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 발현시키고자 하는 유전자에 대한 네이티브 촉진자이다. 일 실시형태에서, 촉진자는 RDH12 근위 촉진자이다. 본 발명에서 유용한 다른 촉진자는, 제한 없이, RPGR 근위 촉진자(Shu et al., *IOVS*, May 2102), 막대 옵신 촉진자, 적색-녹색 옵신 촉진자, 청색 옵신 촉진자, cGMP-β-포스포다이에스테라제 촉진자, 마우스 옵신 촉진자(상기 인용된 Beltran et al 2010 문헌), 로돕신 촉진자(Mussolino et al, *Gene Ther*, July 2011, 18(7):637-45); 원뿔 트랜스듀신의 알파 아단위(Morrissey et al, *BMC Dev Biol*, Jan 2011, 11:3); 베타 포스포다이에스테라제(PDE) 촉진자; 망막색소변성증(RP1) 촉진자(Nicord et al, *J. Gene Med*, Dec

2007, 9(12):1015-23); NXNL2/NXNL1 촉진자(Lambard et al, PLoS One, Oct. 2010, 5(10):e13025), RPE65 촉진자; 망막 퇴행 슬로우/페리페린 2(*Rds/perph2*) 촉진자(Cai et al, Exp Eye Res. 2010 Aug;91(2):186-94); 및 VMD2 촉진자(Kachi et al, Human Gene Therapy, 2009 (20:31-9))를 포함한다. 이들 문헌의 각각은 본 명세서에 참고로 포함된다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 인간 EF1 α 촉진자, 로돕신 촉진자, 로돕신 키나제, 광수용체간 결합 단백질(IRBP), 원뿔 옵신 촉진자(적색-녹색, 청색), 적색-녹색 원뿔 유전자위 제어 영역을 함유하는 원뿔 옵신 상류 서열, 원뿔 트랜스듀싱 및 전사 인자 촉진자(신경 망막 류신 지퍼(Nr1) 및 광수용체 특이적 핵 수용체 Nr2e3, bZIP)로부터 선택된다.

[0103] 일 실시형태에서, 촉진자는 AAV 벡터의 크기 제한으로 인해 1000bp 미만의 작은 크기이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 400bp 미만이다. 다른 촉진자는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0104] 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 유비쿼터스 또는 구성적 촉진자이다. 적합한 촉진자의 예는 사이토메갈로바이러스(CMV) 인핸서 유전요소를 갖는 하이브리드 닭 β -액틴(CBA) 촉진자이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 CB7 촉진자이다. 다른 적합한 촉진자는 인간 β -액틴 촉진자, 인간 신장 인자-1 α 촉진자, 사이토메갈로바이러스(CMV) 촉진자, 유인원 바이러스 40 촉진자 및 단순 포진 바이러스 타이미딘 키나제 촉진자를 포함한다. 예를 들어, 문헌[Damdindorj et al, (August 2014) A Comparative Analysis of Constitutive Promoters Located in Adeno-Associated Viral Vectors. PLoS ONE 9(8): e106472]을 참조한다. 더욱 다른 적합한 촉진자는 바이러스 촉진자, 구성적 촉진자, 조절 가능한 촉진자[예를 들어, WO 제2011/126808호 및 WO 제2013/04943호 참조]를 포함한다. 대안적으로, 생리학적 치유에 반응성인 촉진자는 본 명세서에 기재된 발현 카세트, rAAV 게놈, 벡터, 플라스미드 및 바이러스에서 사용될 수 있다. 일 실시형태에서, 촉진자는 AAV 벡터의 크기 제한으로 인해 1000bp 미만의 작은 크기이다. 또 다른 실시형태에서, 촉진자는 400bp 미만이다. 다른 촉진자는 당업자에 의해 선택될 수 있다.

[0105] 본 발명에서 유용한 구성적 촉진자의 예는, 제한 없이, 레트로바이러스 라우스 육종 바이러스(RSV) LTR 촉진자(임의로 RSV 인핸서를 가짐), 사이토메갈로바이러스(CMV) 촉진자(임의로 CMV 인핸서를 가짐), SV40 촉진자, 다이하이드로엽산 환원효소 촉진자, 닭 β -액틴(CBA) 촉진자, 포스포글라이콜 키나제(PGK) 촉진자, EF1촉진자(Invitrogen) 및 CBA 촉진자와 커플링된 즉시 초기 CMV 인핸서(상기 인용된 Beltran et al, Gene Therapy 2010)를 포함한다.

[0106] 유도성 촉진자는 유전자 발현의 조절을 허용하고, 외인성으로 공급된 화합물, 환경 인자, 예컨대 온도, 또는 급성 단계와 같은 특정한 생리학적 상태의 존재, 세포의 특정한 분화 상태에 의해, 또는 오직 복제하는 세포에서 조절될 수 있다. 유도성 촉진자 및 유도성 시스템은, 제한 없이, Invitrogen, Clontech 및 Ariad를 포함하는 다양한 상업적 소스로부터 이용 가능하다. 많은 다른 시스템은 기재되어 있고, 당업자에 의해 용이하게 선택될 수 있다. 외인성으로 공급된 화합물에 의해 조절된 유도성 촉진자의 예는 아연 유도성 양 메탈로티오닌(MT) 촉진자, 텍사메타손(Dex)-유도성 마우스 유방 종양 바이러스(MMTV) 촉진자, T7 중합효소 촉진자 시스템; 에크디손 곤충 촉진자, 테트라사이클린 억제성 시스템, 테트라사이클린-유도성 시스템, RU486-유도성 시스템 및 라파마이신 유도성 시스템을 포함한다. 이 맥락에서 유용할 수 있는 유도성 촉진자의 다른 유형은 온도, 급성 단계와 같은 특정한 생리학적 상태, 세포의 특정한 분화 상태에 의해, 또는 오직 복제하는 세포에서 조절된 것이다. 단단히 조절되고 특정한 표적 눈 세포 유형에 특이적인 유도성 촉진자의 임의의 유형을 사용할 수 있다.

[0107] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 카세트, 벡터, 플라스미드 및 바이러스 작제물은 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호; TATA 서열; 세포질 mRNA를 안정화하는 서열; 번역 효율을 증대시키는 서열(즉, Kozak 공통 서열); 인트론; 단백질 안정성을 증대시키는 서열; 및 원할 때, 코딩된 생성물의 분비를 증대시키는 서열을 함유한다. 발현 카세트 또는 벡터는 본 명세서에 기재된 임의의 유전요소의 0개, 1개 또는 이것 초과를 함유할 수 있다. 적합한 polyA 서열의 예는 예를 들어 SV40, 소 성장 호르몬(bGH) 및 TK polyA를 포함한다. 적합한 인핸서의 예는, 무엇보다도, 예를 들어 CMV 인핸서, RSV 인핸서, 알파 태아단백질 인핸서, TTR 최소 촉진자/인핸서, LSP(TH-결합 글로불린 촉진자/알파 1-마이크로글로불린/비쿠닌 인핸서)를 포함한다.

[0108] 본 발명에서 유용한 다른 인핸서 서열은 IRBP 인핸서(상기 인용된 Nicord 2007 문헌), 즉시 초기 사이토메갈로바이러스 인핸서, 면역글로불린 유전자 또는 SV40 인핸서로부터 유래된 것, 마우스 근위 촉진자에서 확인된 시스 작용 유전요소 등을 포함한다.

[0109] 이들 및 다른 혼한 벡터 및 조절 요소의 선택은 종래대로이고, 많은 이러한 서열은 이용 가능하다. 예를 들어, Sambrook et al., 및 예를 들어 페이지 3.18-3.26 및 16.17-16.27에서 여기 인용된 참고문헌 및 문헌(Ausubel

et al., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, New York, 1989)을 참조한다. 물론, 모든 벡터 및 발현 제어 서열이 본 발명의 모든 전이유전자를 발현하기 위해 동일하게 잘 작용하지 않을 것이다. 그러나, 당업자는 본 발명의 범위로부터 벗어나지 않으면서 이들, 및 다른, 발현 제어 서열 중에서 선택을 만들 수 있다.

[0110] 대상체에 대한 전달에 적합한 AAV 바이러스 벡터를 생성하고 분리하는 방법은 당해 분야에 공지되어 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7790449호; 미국 특허 제7282199호; WO 제2003/042397호; WO 제2005/033321호, WO 제2006/110689호; 및 US 제7588772호 B2를 참조한다. 일 시스템에서, 생성자 세포주는 ITR에 의해 플랭킹된 전이유전자를 코딩하는 작제물 및 rep 및 cap를 코딩하는 작제물(들)에 의해 일시적으로 형질주입된다. 제2 시스템에서, rep 및 cap를 안정하게 공급하는 패키징 세포주는 ITR에 의해 플랭킹된 전이유전자를 코딩하는 작제물에 의해 일시적으로 형질주입된다. 이들 시스템의 각각에서, AAV 비리온은 오염 바이러스로부터 rAAV의 분리를 요하는 헬퍼 아데노바이러스 또는 헤르페스바이러스에 의한 감염에 반응하여 생성된다. 더 최근에, AAV를 회수하기 위해 헬퍼 바이러스에 의한 감염을 요하지 않는 시스템이 개발되었고 - 필요한 헬퍼 기능(즉, 아데노바이러스 E1, E2a, VA, 및 E4 또는 헤르페스바이러스 UL5, UL8, UL52, 및 UL29, 및 헤르페스바이러스 중합효소)은 또한 시스템에 의해 트랜스로 공급된다. 이 더 새로운 시스템에서, 헬퍼 기능은 필요한 헬퍼 기능을 코딩하는 작제물에 의한 세포의 일시적인 형질주입에 의해 공급될 수 있거나, 세포는 헬퍼 기능을 코딩하는 유전자를 안정하게 함유하도록 조작될 수 있고, 이의 발현은 전사 또는 전사 후 수준에서 제어될 수 있다.

[0111] 더욱 또 다른 시스템에서, ITR에 의해 플랭킹된 전이유전자 및 rep/cap 유전자는 바클로바이러스 기반 벡터에 의한 감염에 의해 곤충 세포로 도입된다. 이 제조 시스템의 검토를 위해, 일반적으로, 예를 들어 문헌[Zhang et al., 2009, "Adenovirus-adenovirus-associated virus hybrid for large-scale recombinant adeno-associated virus production," Human Gene Therapy 20:922-929](이의 각각의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다. 이들 및 다른 AAV 제조 시스템을 제조하고 사용하는 방법은 또한 하기 미국 특허(이의 내용은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨): 제5,139,941호; 제5,741,683호; 제6,057,152호; 제6,204,059호; 제6,268,213호; 제6,491,907호; 제6,660,514호; 제6,951,753호; 제7,094,604호; 제7,172,893호; 제7,201,898호; 제7,229,823호; 및 제7,439,065호에 기재되어 있다. 일반적으로, 예를 들어 문헌[Grieger & Samulski, 2005, "Adeno-associated virus as a gene therapy vector: Vector development, production and clinical applications," Adv. Biochem. Engin/Biotechnol. 99: 119-145; Buning et al., 2008, "Recent developments in adeno-associated virus vector technology," J. Gene Med. 10:717-733]; 및 하기 인용된 참고문헌(이의 각각은 본 명세서에 그 전문이 참고로 포함됨)을 참조한다.

[0112] 본 발명의 임의의 실시형태를 구축하도록 사용된 방법은 핵산 조작에서의 당업자에게 공지되어 있고, 유전자 조작, 재조합 조작 및 합성 기법을 포함한다. 예를 들어, 문헌[Green and Sambrook et al, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)]을 참조한다. 유사하게, rAAV 비리온을 생성하는 방법은 널리 공지되어 있고, 적합한 방법의 선택은 본 발명에 대한 제한이 아니다. 예를 들어, 문헌[K. Fisher et al, (1993) J. Virol., 70:520-532] 및 미국 특허 제5,478,745호를 참조한다.

[0113] 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 카세트, 벡터, 플라스미드 및 바이러스 작제물은 다른 적절한 전사 개시, 종결, 인핸서 서열, 효율적인 RNA 가공 신호, 예컨대 스플라이싱 및 폴리아데닐화(polyA) 신호; TATA 서열; 세포질 mRNA를 안정화시키는 서열; 번역 효율을 증대시키는 서열(즉, Kozak 공동 서열); 인트론; 단백질 안정성을 증대시키는 서열; 및 원할 때, 코딩된 생성물의 분비를 증대시키는 서열을 함유한다. 발현 카세트 또는 벡터는 본 명세서에 기재된 임의의 유전요소의 0개, 1개 또는 이것 초과를 함유할 수 있다. 적합한 polyA 서열의 예는 예를 들어 SV40, 소 성장 호르몬(bGH) 및 TK polyA를 포함한다. 적합한 인핸서의 예는, 무엇보다도, 예를 들어 CMV 인핸서, RSV 인핸서, 알파 태아단백질 인핸서, TTR 최소 촉진자/인핸서, LSP(TH-결합 글로불린 촉진자/알파1-마이크로글로불린/비쿠닌 인핸서)를 포함한다.

[0114] 따라서, 일 실시형태에서 신규한 AAV 프로바이러스 플라스미드는 정상 또는 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 망막 탈수소효소 12(RDH12)의 네이티브 또는 최적화된 cDNA를 보유하고, 이러한 플라스미드는 AAV 벡터에서 패키징될 수 있다. 이 벡터는 시험관내 및 생체내 둘 다에서 생물학적 활성을 입증하였다.

[0115] 일 실시형태에서, 재조합 rAAV를 생성하는 방법은 상기 기재된 바와 같은 rAAV 게놈을 함유하는 플라스미드를 얻는 단계 및 감염성 AAV 봉입체 또는 캡시드로 AAV 바이러스 게놈의 패키징을 허용하도록 충분한 바이러스 서열의 존재 하에 플라스미드를 보유하는 패키징 세포를 배양하는 단계를 포함한다. rAAV 벡터 생성의 구체적인 방법은 상기 기재되어 있고, 상기 및 하기 실시예에 기재된 발현 카세트 및 게놈에서의 코돈 최적화된 RDH12 또

는 RDH12 중 하나 이상을 전달할 수 있는 rAAV 벡터를 생성하는 데 이용될 수 있다.

- [0116] 헬썬 또 다른 양태에서, 유전자 편집의 방법은 눈에서의 돌연변이 또는 바람직하지 않은 RDH12 유전자 서열을 수정하도록 이용된다. 유전자 편집의 하나의 바람직한 방법은 "CRISPR/Cas9" 시스템을 이용한다. CRISPR/Cas9는 유전자 돌연변이 또는 특이적 표현형과 연관된 질환의 수정에서 가능성을 가지는 것으로 기재된 기법이다. 일정한 간격을 두고 주기적으로 분포하는 짧은 회문 반복서열(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats: CRISPR) 및 CRISPR 연관된 단백질(Cas9) 시스템은 2개의 명확한 성분을 갖는다: (1) 가이드 RNA 및 (2) 엔도뉴클레아제, 이 경우에 CRISPR 연관된 (Cas) 뉴클레아제, Cas9. 가이드 RNA는 단일 키메라 가이드 RNA(gRNA) 전사체로 내인성 박테리아 crRNA(CRISPR RNA) 및 tracrRNA(전사촉진 crRNA)의 조합이다. gRNA는 단일 전사체로 crRNA의 표적화 특이성을 tracrRNA의 스캐폴딩 특성과 조합한다. gRNA 및 Cas9가 세포에서 발현될 때, 게놈 표적 서열은 변형되거나 영구적으로 파괴될 수 있다. 이 시스템은 포유류 시스템에 대한 게놈 조작에 이용되고, 예를 들어 문헌[Cong, L., *et al.* 2013. Science 339: 819-823; Mali, P., *et al.* 2013 Science 339: 823-826; Ran, F.A., *et al.* 2013. Nat. Protoc. 8: 2281-2308; 및 Shalem, O., *et al.* 2014 Science 343: 84-87]을 참조한다. CRISPR II형 시스템은 현재 게놈 조작을 위한 가장 흔히 사용되는 RNA-가이드 엔도뉴클레아제 기술이다. 아데노 연관된 바이러스는 CRISPR-Cas 시스템을 수반하는 유전자 치료에 대한 유용한 벡터로서 기재된다. 예를 들어, 문헌[Yin *et al.*, 2014 Biotechnology, 32: 551-3 and 2015 Nature Biotechnology, 33: 102-6]을 참조한다.
- [0117] 헬썬 또 다른 실시형태에서, 이 유전자 편집 기법은 RDH12 코딩된 서열(네이티브 또는 코돈 최적화된)을 삽입하도록 분비된 세포에서 이용될 수 있다. 이러한 세포는 HEPG2 세포 또는 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)를 포함할 수 있고, 이것은 이후 본 명세서에서 벡터, 재조합 바이러스, 및 다른 조성물 및 시약의 기능을 조사하기 위한 모델로서 사용될 수 있다.
- [0118] 더욱 다른 양태에서, 이 핵산 서열, 벡터, 프로바이러스 플라스미드, 발현 카세트, rAAV-ITR 플랭킹된 발현 카세트, 바이러스 벡터, 예를 들어 rAAV 바이러스 벡터는 약제학적으로 허용 가능한 담체를 또한 포함하는 약제학적 조성물에서 유용하다. 이러한 약제학적 조성물은 이러한 재조합으로 조작된 AAV 또는 인공 AAV에 의한 전달을 통해 눈 세포에서 최적화된 RDH12 또는 RDH12의 다수의 카피를 발현하도록 사용된다.
- [0119] 핵산 서열을 함유하는 이 안과학적 약제학적 조성물을 제조하기 위해, 벡터, rAAV 게놈 및 rAAV 바이러스 벡터, 서열 또는 벡터 또는 바이러스 벡터는 바람직하게는 종래의 방법에 의해 오염에 대해 평가되고, 이후 눈에 대한 투여에 적합한 약제학적 조성물로 제제화된다. 일반적으로, 안과학적 약제학적 제제는 적합하게 배합되고 눈에 대한 적하를 위해 패키징된 본질적으로 외래 입자가 없는 무균 제제이다. 일 실시형태에서, 제제는 망막하 주사에 적합하다. 이러한 제제는 약제학적으로 및/또는 생리학적으로 허용 가능한 비히클 또는 담체, 특히 눈에 대한 투여에 적합한 것의 사용을 수반한다. 적합한 약제학적 담체는 적절한 생리학적 수준에서 pH를 유지시키기 위해 리포솜, 니오솜, 디스크롬(discome), 또는 심지어 연고 또는 겔, 예컨대 완충 식염수 또는 다른 완충제, 예를 들어 HEPES 중에 인산염 완충 식염수 용액, 물, 에멀션, 예컨대 오일/물 에멀션 또는 마이크로에멀션, 현탁액, 다양한 유형의 습윤제, 무균 용액을 포함한다.
- [0120] 임의로, 다른 의학 물질, 예컨대 약제학적 물질, 안정화제, 완충제, 애주번트, 희석제 또는 계면활성제 등은 포함된다. 주사를 위해, 담체는 통상적으로 액체일 것이다. 예시적인 생리학적으로 허용 가능한 담체는 무균의 발열원이 없는 물 및 무균의 발열원이 없는 인산염 완충 식염수를 포함한다. 다양한 이러한 공지된 담체는 미국 특허 공보 제7,629,322호(본 명세서에 참고로 포함됨)에 제공된다. 일 실시형태에서, 담체는 등장성 염화나트륨 용액이다. 또 다른 실시형태에서, 담체는 균형화 염 용액이다. 일 실시형태에서, 담체는 Tween을 포함한다. 바이러스가 장기가 저장되는 경우, 이것은 글라이콜 또는 Tween20의 존재 하에 냉동될 수 있다.
- [0121] 일 실시형태에서, 제제의 함량은 4.75 내지 7.40의 pH 범위를 유지시키도록 설계된다. 국소 생성물은 또한 자연 눈물의 것과 가까운 긴장성의 조정을 요한다. 일반적으로, 0.5% 내지 2% 식염수 긴장성의 범위는 널리 관용된다. 적합한 계면활성제는 또한 예를 들어 합성 계면활성제, 예컨대 콜포세틸 팔미테이트(Exosurf), 분산제(spreading agent)로서 첨가된 DPPC와 헥사데칸올 및 킬록사폴의 혼합물; Pumactant, DPPC 및 PG의 혼합물; SP-B의 구조 특징을 모방하는 21개의 아미노산 합성 펩타이드와 조합된, DPPC, 팔미토일-올레오일 포스파티딜글라이콜 및 팔미트산로 이루어진 KL-4; Venticute, DPPC, PG, 팔미트산 및 재조합 SP-C의 조합; 또는 동물 유래된 계면활성제, 예컨대 Beractant(Alveofact 또는 Survanta), Calfactant(Infasurf) 또는 Poractant alfa(Curosurf)를 포함한다. 또 다른 유용한 계면활성제는 Surfaxin(FDA 승인 합성 펩타이드)이다. 헬썬 또 다른 유용한 계면활성제는 Pluronic F68이다.

- [0122] 예시적인 구체적일 일 실시형태에서, 적합한 제제는 180mM NaCl, 10mM 인산나트륨 완충제(NaPi)(pH 7.3)와 함께 0.0001% 내지 0.01%의 Pluronic F68(PF68) 계면활성제를 함유한다. 완충제의 식염수 성분의 정확한 조성은 160mM 내지 180mM NaCl의 범위이다. 임의로, 상이한 pH 완충제(잠재적으로 HEPES, 중탄산나트륨 또는 TRIS)는 구체적으로 기재된 완충제 대신에 사용된다. 더욱 대안적으로, 0.9% NaCl을 함유하는 완충제는 유용하다.
- [0123] 임의로, 본 발명의 조성물은, rAAV 및/또는 변이체 및 담체(들) 이외에, 다른 종래의 약제학적 성분, 예컨대 보존제 또는 화학 안정화제를 함유할 수 있다. 적합한 예시적인 보존제는 클로로부탄올, 소르브산칼륨, 소르브산, 이산화황, 프로필 갈레이트, 파라벤, 에틸 바닐린, 글라이세린, 페놀 및 파라클로로페놀을 포함한다. 적합한 화학 안정화제는 젤라틴 및 알부민을 포함한다.
- [0124] 복제 결함 rAAV 바이러스를 함유하는 약제학적 조성물은 유전자 전달 및 유전자 치료 분야에서 사용하기 위해 생리학적으로 허용 가능한 담체와 제제화될 수 있다. AAV 바이러스 벡터의 경우에, 게놈 카피("GC"), 벡터 게놈 또는 바이러스 입자의 정량화는 제제 또는 현탁액에 함유된 용량의 측정치로서 이용될 수 있다. 당해 분야에 공지된 임의의 방법은 본 발명의 복제 결함 바이러스 조성물의 게놈 카피(GC) 수를 결정하도록 이용될 수 있다. AAV GC 수 적정을 수행하기 위한 하나의 방법은 하기와 같다: 정제된 AAV 벡터 샘플을 처음에 DNase에 의해 처리하여 제조 과정으로부터 비캡슐화된 AAV 게놈 DNA 또는 오염 플라스미드 DNA를 제거한다. 이후, DNase 내성 입자를 열 처리로 처리하여 캡시드로부터 게놈을 방출시킨다. 이후, 방출된 게놈은 바이러스 게놈의 특이적 영역(보통 폴리 A 신호)을 표적화하는 프라이머/프로브 세트를 사용하여 실시간 PCR에 의해 정량화된다. 또 다른 방법에서, 바람직하게 최적화된 RDH12 전이유전자를 코딩하는 핵산 서열을 보유하는 재조합 아데노 연관된 바이러스의 유효 용량은 문헌[S.K. McLaughlin *et al*, 1988 J. Virol., 62:1963]에 기재된 바대로 측정된다. 또 다른 방법에서, 역가는 드롭렛 디지털 PCR(ddPCR)을 이용하여 결정된다. 예를 들어 [M. Lock *et al*, Hu Gene Therapy Methods, 2014 Apr;25(2):115-25. doi: 10.1089/hgtb.2013.131. Epub 2014 Feb 14](본 명세서에 참고로 포함됨)에 기재된 바대로 살펴본다.
- [0125] 상기 방법에서 사용된 "투여하는"이란, 눈 질환을 특징으로 하는 선택된 세포를 표적화하기 위해 조성물을 전달하는 것을 의미한다. 일 실시형태에서, 상기 방법은 망막하 주사에 의해 광수용체 세포 또는 다른 눈 세포에 조성물을 전달하는 것을 수반한다. 또 다른 실시형태에서, 눈 세포에 대한 유리체내 주사가 이용된다. 훨씬 또 다른 방법에서, 안검정맥을 통한 눈 세포에 대한 주사가 이용된다. 투여의 더욱 다른 방법은 본 개시내용이 주어진 당업자에 의해 선택될 수 있다. "투여하는" 또는 "투여 경로"란, 약제학적 담체 또는 부형제가 있거나 없는 본 명세서에 기재된 조성물의 대상체의 전달이다. 투여 경로는 원하는 경우 조합될 수 있다. 몇몇 실시형태에서, 투여는 정기적으로 반복된다. 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물은 임의의 적합한 경로 또는 상이한 경로의 조합에 의해 이를 요하는 대상체에 대한 전달에 대해 설계된다. 눈에 대한 직접 전달(임의로 눈 전달, 망막내 주사, 유리체내, 국소를 통한), 또는 전신 경로를 통한 전달, 예를 들어 동맥내, 눈내, 정맥내, 근육내, 피하, 피내, 및 투여의 다른 비경구 경로. 본 명세서에 기재된 핵산 분자 및/또는 벡터는 단일 조성물 또는 다수의 조성물로 전달될 수 있다. 임의로, 2개 이상의 상이한 AAV, 또는 다수의 바이러스가 전달될 수 있다[예를 들어, WO20 2011/126808 및 WO 2013/049493 참조]. 또 다른 실시형태에서, 다수의 바이러스는 단독으로 또는 단백질과 조합되어 상이한 복제 결함 바이러스(예를 들어, AAV 및 아데노바이러스)를 함유할 수 있다.
- [0126] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "치료" 또는 "치료하는"은 눈 질환의 하나 이상의 증상을 경감시킬 목적을 위해 본 명세서에 기재된 하나 이상의 화합물 또는 조성물을 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 것으로 정의된다. "치료"는 따라서 소정의 대상체에서 눈 질환의 발병 또는 진행의 감소, 질환의 예방, 질환 증상의 중증도의 감소, 또는 실명의 진행을 포함하여 이의 진행의 억제, 질환 증상의 제거, 질환의 발병의 지연 또는 질환의 진행 또는 치료의 효율의 모니터링 중 하나 이상을 포함할 수 있다.
- [0127] 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "투약량"은 치료의 과정에서 대상체에게 전달된 전체 투약량, 또는 단일 단위 투여로 전달된 양(또는 다수의 단위 또는 단위 투약량)을 의미할 수 있다. 약제학적 바이러스 조성물은 본 명세서에 기재된 바대로 RDH12를 코딩하는 핵산 서열을 보유하는 복제 결함 바이러스의 양을 함유하도록 투약량 단위에서 제제화될 수 있다. 투약량은 핵산 서열의 게놈 카피(GC)로 표시될 수 있다. 투약량은 또한 바이러스 입자의 면에서 표시될 수 있다. 일 실시형태에서, 적합한 투약량은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 약 1.0×10^6 GC 또는 약 1.0×10^{15} GC에 대한 바이러스 입자의 범위이다. 일 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^6 , 2×10^6 , 3×10^6 , 4×10^6 , 5×10^6 , 6×10^6 , 7×10^6 , 8×10^6 , 또는 9×10^6 GC의 양을 함유하도록 제제화되거나, 투약량은 이 양으로 투여된다. 일 실시형

태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^7 , 2×10^7 , 3×10^7 , 4×10^7 , 5×10^7 , 6×10^7 , 7×10^7 , 8×10^7 , 또는 9×10^7 GC의 양을 함유하도록 제제화되거나, 투약량은 이 양으로 투여된다. 일 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^8 , 2×10^8 , 3×10^8 , 4×10^8 , 5×10^8 , 6×10^8 , 7×10^8 , 8×10^8 , 또는 9×10^8 GC를 함유하도록 제제화된다. 일 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^9 , 2×10^9 , 3×10^9 , 4×10^9 , 5×10^9 , 6×10^9 , 7×10^9 , 8×10^9 , 또는 9×10^9 GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{10} , 2×10^{10} , 3×10^{10} , 4×10^{10} , 5×10^{10} , 6×10^{10} , 7×10^{10} , 8×10^{10} , 또는 9×10^{10} GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{11} , 2×10^{11} , 3×10^{11} , 4×10^{11} , 5×10^{11} , 6×10^{11} , 7×10^{11} , 8×10^{11} , 또는 9×10^{11} GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{12} , 2×10^{12} , 3×10^{12} , 4×10^{12} , 5×10^{12} , 6×10^{12} , 7×10^{12} , 8×10^{12} , 또는 9×10^{12} GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{13} , 2×10^{13} , 3×10^{13} , 4×10^{13} , 5×10^{13} , 6×10^{13} , 7×10^{13} , 8×10^{13} , 또는 9×10^{13} GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{14} , 2×10^{14} , 3×10^{14} , 4×10^{14} , 5×10^{14} , 6×10^{14} , 7×10^{14} , 8×10^{14} , 또는 9×10^{14} GC를 함유하도록 제제화된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 적어도 1×10^{15} , 2×10^{15} , 3×10^{15} , 4×10^{15} , 5×10^{15} , 6×10^{15} , 7×10^{15} , 8×10^{15} , 또는 9×10^{15} GC를 함유하도록 제제화된다. 일 실시형태에서, 인간 분야를 위해 용량은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 1×10^6 내지 약 1×10^{13} GC의 범위일 수 있다. 일 실시형태에서, 인간 분야를 위해 용량은, 하기 범위 내의 모든 정수 또는 분수 양을 포함하여, 용량마다 1×10^{10} 내지 약 1×10^{12} GC의 범위일 수 있다. 더욱 다른 용량 및 투약량은 주치의에 의해 결정될 수 있다.

[0128] 이 상기 용량은, 치료되는 면적의 크기, 사용된 바이러스 역가, 투여 경로 및 방법의 원하는 효과에 따라, 범위 내의 모든 숫자를 포함하여, 약 25 내지 약 1000 마이크로리터의 범위의, 담체, 부형제 또는 완충제 제제의 다양한 용적으로 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 담체, 부형제 또는 완충제의 용적은 적어도 약 $25 \mu\text{l}$ 이다. 일 실시형태에서, 용적은 약 $50 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $75 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $100 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $125 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $150 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $175 \mu\text{l}$ 이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $200 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $225 \mu\text{l}$ 이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $250 \mu\text{l}$ 이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $275 \mu\text{l}$ 이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $300 \mu\text{l}$ 이다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $325 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $350 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $375 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $400 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $450 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $500 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $550 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $600 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $650 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 $700 \mu\text{l}$ 이다. 또 다른 실시형태에서, 용적은 약 700 내지 $1000 \mu\text{l}$ 이다.

[0129] 일 실시형태에서, 바이러스 작제물은 작은 동물 대상체, 예컨대 마우스에 대해 약 $1 \mu\text{l}$ 내지 약 $3 \mu\text{l}$ 의 용적으로 적어도 1×10^6 내지 적어도 1×10^{11} GC의 농도로 전달될 수 있다. 인간 눈과 거의 동일한 크기의 눈을 갖는 더 작은 수의 대상체에 대해, 상기 기재된 더 많은 인간 투약량 및 용적, 예를 들어 용량마다 1×10^6 내지 약 1×10^{15} GC가 유용하다. 다양한 수의 동물에 대한 물질의 투여를 위해 양호한 실험의 기제를 위해, 예를 들어, 문헌 [Diehl *et al.*, J. Applied Toxicology, 21:15-23 (2001)]을 참조한다. 이 문헌은 본 명세서에 참고로 포함된다.

[0130] 바이러스 또는 다른 전달 비히클의 가장 낮은 유효 농도가 원치 않는 효과, 예컨대 독성, 망막 이형성증 및 박리의 위험을 감소시키기 위해 사용되는 것이 바람직하다. 일 실시형태에서, 코돈 최적화된 서열이 인간에서 천연 발생 서열보다 더 효과적인 경우, 상기 기재된 더 낮은 투약량이 유용할 것으로 예상된다. 이 범위에서의 더

욱 다른 투약량은 치료되는 대상체, 바람직하게는 인간의 신체 상태, 대상체의 연령, 특정한 눈 장애(예를 들어, RDH12 매개된 장애) 및 진행성인 경우 장애가 발생한 정도를 고려하여, 주치의에 의해 선택될 수 있다.

[0131] 본 명세서에 기재된 더욱 또 다른 양태는 코돈 최적화된 RDH12 DNA, 벡터, 바이러스 또는 이를 함유하는 다른 약제학적 조성물을 투여함으로써 RDH12 매개된 장애 또는 눈 장애를 치료하는 다양한 방법이다. 또 다른 실시형태에서, 상기 기재된 눈 질환 및 이와 연관된 망막 변경으로 인해 시야 손실을 예방하거나, 치료하거나, 이의 진행을 중지시키거나 경감시키는 방법이 제공된다. 더욱 다른 방법은 눈 장애를 갖는 대상체에게 부분 또는 완전 시야 또는 시력을 복원하도록 설계된다. LCA 또는 RP와 연관된 시력 손실은 말초 시력, 중심(리딩) 시력, 야간 시력, 명소시의 임의의 감소, 색상 인지의 손실, 대비 민감도의 손실, 또는 시력 감소를 의미한다. 기재된 방법을 이용하여 치료될 수 있는 다른 시력 문제는 광선공포증 및 안구진탕을 포함한다.

[0132] 일반적으로, 상기 방법은 대상체의 눈 세포에서 유전자의 생성물을 발현하는 조절 서열의 제어 하에 정상 또는 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 핵산 서열, 또는 이의 단편을 보유하는 재조합 아테노 연관된 바이러스(AAV), 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조성물의 유효량을 이를 요하는 포유류 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다.

[0133] 일 실시형태에서, 이러한 방법은 상기 기재된 눈 질환, 예컨대 LCA 또는 RP 중 하나 이상을 갖는 포유류 대상체에서 실명을 치료하거나, 이를 지연시키거나, 이의 진행을 중단시키도록 설계된다. 바람직하게는 생리학적으로 상용성인 담체, 희석제, 부형제 및/또는 애즈루벤트 중에 현탁된 RDH12 최적화된 코딩 서열 또는 또 다른 기능성 RDH12 서열을 보유하는 rAAV는, 제한 없이, 개, 고양이, 또는 다른 비인간 포유류 대상체를 포함하는 원하는 대상체에게 투여될 수 있다. 이 방법은 임의의 핵산 서열, 발현 카세트, rAAV 게놈, 플라스미드, 벡터 또는 rAAV 벡터 또는 이를 함유하는 조성물을 이를 요하는 대상체에게 투여하는 단계를 포함한다. 일 실시형태에서, 조성물은 망막하로 전달된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 유리체내 전달된다. 훨씬 또 다른 실시형태에서, 조성물은 눈 질환의 치료에 적합한 투여 경로의 조합을 이용하여 전달되고, 안검정맥 또는 다른 정맥내 또는 종래의 투여 투여를 통한 투여를 또한 수반할 수 있다.

[0134] 이 방법에서의 사용을 위해, 각각의 투약량의 용적 및 바이러스 역가는 본 명세서에 추가로 기재된 바대로 개별적으로 결정되고, 동일한, 또는 대측성, 눈에서 수행된 다른 치료로부터 동일하거나 상이할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 단일의, 더 큰 용적 치료는 전체 눈을 치료하도록 이루어진다. 투약량, 투여 및 섭생은 본 명세서의 교시내용이 주어진 주치의에 의해 결정될 수 있다.

[0135] 일 실시형태에서, 조성물은 단일의 이환된 눈에서 상기 기재된 것으로부터 선택된 단일 투약량으로 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 이환된 눈 둘 다에서 상기 기재된 것으로부터 선택된 단일 투약량으로서 동시에 또는 순차적으로 투여된다. 순차적인 투여는 분, 시간, 일, 주 또는 개월의 간격으로부터 하나의 눈으로부터 또 다른 눈의 투여의 시간 간격을 의미할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 2개 이상의 투약량(예를 들어, 분할 투약량)으로 눈에 조성물을 투여하는 것을 수반한다.

[0136] 더욱 다른 실시형태에서, 본 명세서에 기재된 조성물은 단일 조성물 또는 다수의 조성물로 전달될 수 있다. 임의로, 2개 이상의 상이한 AAV, 또는 다수의 바이러스가 전달될 수 있다[예를 들어, WO 제2011/126808호 및 WO 제2013/049493호]. 또 다른 실시형태에서, 다수의 바이러스는 상이한 복제 결합 바이러스(예를 들어, AAV 및 아테노바이러스)를 함유할 수 있다.

[0137] 본 발명의 소정의 실시형태에서, 치료에 대해 표적화하고자 하는 막대 및 원뿔 광수용체의 부위를 확인하기 위해 비침윤성 망막 영상화 및 기능성 연구를 수행하는 것이 바람직하다. 이 실시형태에서, 임상 진단학적 시험은 하나 이상의 망막하 주사(들)에 대한 정확한 위치(들)를 결정하기 위해 이용된다. 이 시험은 치료되는 대상체의 종, 이들의 신체 상태 및 건강 및 투약량에 따라 동일초점 주사 레이저 검안경검사(cSLO) 및 광학 간섭 단층촬영 영술(OCT), 적응 광학(AO)을 통한 원뿔 밀도의 지형도, 기능성 눈 검사 등에 의한 망막전위도검사(ERG), 시야측정법, 망막의 층의 지형도 및 이의 층의 두께의 측정을 포함할 수 있다. 영상화 및 기능성 연구를 고려하여, 본 발명의 몇몇 실시형태에서 하나 이상의 주사는 이환된 눈의 상이한 부위를 표적화하기 위해 동일한 눈에서 수행된다. 각각의 주사의 용적 및 바이러스 역가는 본 명세서에 추가로 기재된 바대로 개별적으로 결정되고, 동일한, 또는 대측성, 눈에서 수행된 다른 치료로부터 동일하거나 상이할 수 있다. 또 다른 실시형태에서, 단일의, 더 큰 용적 주사는 전체 눈을 치료하도록 이루어진다. 일 실시형태에서, 손상된 막대 및 원뿔 수용체의 영역만이 영향을 받도록 rAAV 조성물의 용적 및 농도가 선택된다. 또 다른 실시형태에서, rAAV 조성물의 용적 및/또는 농도는 비손상된 광수용체를 포함하는 눈의 더 큰 부분에 도달하도록 더 많은 양이다.

- [0138] 본 명세서에 기재된 방법의 일 실시형태에서, 조성물, 예컨대 본 명세서에 기재된 것의 한 번의 눈내 전달, 예를 들어 최적화된 RDH12 카세트의 AAV 전달은 유전자형 또는 환경 노출과 관련 없이 이러한 눈 장애 또는 다기관 질환에 의해 이환된 수백만 명의 개체에서 시야 손실 및 실명을 예방하는 데 유용하다.
- [0139] 따라서, 일 실시형태에서, 조성물은 질환 발병 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 시각 장애 또는 손실의 개시 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 시각 장애 또는 손실의 개시 후에 투여된다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 조성물은 90% 미만의 막대 및/또는 원뿔 또는 광수용체가 비이환된 눈과 비교하여 기능하거나 남아 있을 때 투여된다.
- [0140] 또 다른 실시형태에서, 상기 방법은 치료의 효율을 결정하도록 부가적인 연구, 예를 들어 기능성 및 영상화 연구를 수행하는 것을 포함한다. 동물에서의 실험을 위해, 이러한 시험은 막대 및 원뿔 광수용체 기능을 보는 망막전도(ERG)를 통한 망막 및 시기능 평가, 시동성 안구진탕, 동공축정법, 수중 미로 시험, 광-암 선호 조직학(망막 두께, 외부 핵 층에서의 핵의 열, 전이유전자 발현을 기재하기 위한 면역형광, 원뿔 광수용체 계수, 원뿔 광수용체 시스름 확인하는 망막 응집소에 의한 망막 절편의 염색)을 포함한다. 효율의 다른 적합한 시험은 RDH12 전이유전자 단백질의 존재를 입증하기 위한 전안방 유체의 샘플링이다.
- [0141] 구체적으로 인간 대상체에 대해, 본 명세서에 기재된 조성물의 투약량의 투여 이후에, 대상체는 막대 및 원뿔 광수용체 기능을 조사하기 위해 망막전도(ERG), 동공축정법 시력, 대조 민감성 색상 시야 시험, 시야 시험(Humphrey 시야/Goldmann 시야), 시야축정법 이동성 시험(장애물 코스) 및 읽기 속도 시험을 사용하여 치료의 효율에 대해 시험된다. 대상체가 본 명세서에 기재된 약제학적 조성물에 의한 치료 이후에 노출되는 다른 유용한 치료 후 효율 시험은 기능성 자기 공명 영상화(fMRI), 전면 광 민감성 시험, 망막 구조 연구, 예를 들어 광학 간섭 단층촬영술, 안저 사진촬영술, 안저 자가형광, 적응 광학 주사, 및/또는 레이저 검안경검사이다. 이들 및 다른 효율 시험은 미국 특허 제8,147,823호; 동시 계류 중인 국제 특허 출원 공보 WO 제2014/011210호 또는 WO 제2014/124282호(참고로 포함됨)에 기재되어 있다.
- [0142] 더욱 또 다른 실시형태에서, 임의의 상기 기재된 방법은 또 다른, 또는 2차, 치료와 조합되어 수행된다. 더욱 다른 실시형태에서, 이 눈 질환의 치료의 방법은 또 다른 치료, 예컨대 항생제 치료, 통증에 대한 완화 치료 등과 조합되어 본 명세서에 자세히 기재된 조성물에 의해 대상체를 치료하는 것을 수반한다. 부가적인 치료는 이 돌연변이 또는 결함 또는 이와 연관된 임의의 효과를 예방하거나, 치료하거나, 경감시키는 것을 돕는, 임의의 지금 공지된, 또는 아직 공지된 않은 바의, 치료일 수 있다. 2차 치료는 상기 기재된 조성물의 투여 전에, 이와 동시에 또는 후에 투여될 수 있다. 일 실시형태에서, 2차 치료는 망막 세포의 건강을 유지시키기 위한 비특이적 접근법, 예컨대 신경영양성 인자, 항산화제, 항아포토시스 물질의 투여를 수반한다. 비특이적 접근법은 단백질, 재조합 DNA, 재조합 바이러스 벡터, 줄기 세포, 태아 조직, 또는 유전자 변형된 세포의 주사를 통해 달성된다. 후자는 캡슐화된 유전자 변형된 세포를 포함할 수 있다.
- [0143] 또 다른 실시형태에서, 본 발명은 대상체에서 광수용체 기능 손실을 예방하거나 정지시키거나, 광수용체 기능을 증가시키는 방법을 제공한다. 광수용체 기능은 당해 분야에서 종래인 상기 및 하기 실시예에 기재된 기능성 연구, 예를 들어 ERG 또는 시야축정법을 이용하여 평가될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바대로 "광수용체 기능 손실"은 정상, 비이환된 눈 또는 더 이른 시점에서의 동일한 눈과 비교하여 광수용체 기능의 감소를 의미한다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, "광수용체 기능을 증가시킨다"는 광수용체의 기능을 개선시키거나, (동일한 눈 질환을 갖는) 이환된 눈, 더 이른 시점에서의 동일한 눈, 동일한 눈의 비치료된 부분 또는 동일한 환자의 대측성 눈과 비교하여 기능성 광수용체의 수 또는 백분율을 증가시키는 것을 의미한다.
- [0144] 또 다른 양태에서, 본 발명은 대상체에서의 광수용체 구조를 개선하는 방법을 제공한다. 본 명세서에 사용된 바대로 "광수용체 구조를 개선하는"은 (치료되는 망막의 영역에서) 외부 핵 층(ONL) 두께의 증가 또는 감소, 또는 전체 망막에 걸쳐, 중앙 망막, 또는 주연부에서의 ONL 경화 또는 박화의 진행의 정지; 외부 망상 층(OPL) 두께의 증가 또는 감소, 또는 전체 망막에 걸쳐, 중앙 망막, 또는 주연부에서의 OPL 경화 또는 박화의 진행의 정지; 막대 및 원뿔 내부 세그먼트(IS) 짧아짐의 감소; 외부 세그먼트(OS)의 짧아짐 및 손실의 감소; 양극성 세포 수 지상 퇴축의 감소, 또는 양극성 세포 수지상 길이 또는 양의 증가; 및 옵신 불국소화의 역전 중 하나 이상을 의미한다.
- [0145] 또 다른 양태에서, 본 발명은 상기 질환을 발생시킬 위험에 있는 대상체에서 RDH12 연관된 LCA를 예방하는 방법을 제공한다. 이 눈 장애를 발생시킬 위험에 있는 대상체는 LCA의 가족 병력을 갖는 대상체 및 RDH12 유전자형의 하나 이상의 확증된 돌연변이를 갖는 대상체를 포함한다.

- [0146] 각각의 기재된 방법에 대해, 치료는 망막 손상의 발생을 예방하기 위해 또는 경증 또는 진행된 질환을 갖는 눈을 구제하기 위해 사용될 수 있다. 본 명세서에 사용된 바와 같은, 용어 "구제"는 전체 실명에 대한 질환의 진행을 예방하거나, 비손상된 광수용체 세포에 대한 손상의 확산을 예방하거나, 손상된 광수용체 세포에서 손상을 개선하는 것을 의미한다. 따라서, 일 실시형태에서, 조성물은 질환 발병 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 흡인 불국소화의 개시 후에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 광수용체 손실의 개시 전에 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 광수용체 손실의 개시 후에 투여된다. 더욱 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 90% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 80% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 70% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 60% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 50% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 40% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 30% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 20% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 비이환된 눈과 비교하여 광수용체의 10% 미만이 기능하거나 남아 있을 때 투여된다. 일 실시형태에서, 조성물은 눈의 하나 이상의 영역, 예를 들어 보유한 광수용체를 갖는 것에 오직 투여된다. 또 다른 실시형태에서, 조성물은 전체 눈에 투여된다.
- [0147] 또 다른 실시형태에서, 치료 또는 예방을 요하는 대상체에서 RDH12 연관된 LCA 또는 RP를 치료하거나 예방하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 RDH12 연관된 LCA 또는 RP를 갖거나 이를 발생시킬 위험에 있는 대상체를 확인하는 단계; 유전자형 분석을 수행하고 RDH12 유전자에서 적어도 하나의 돌연변이를 확인하는 단계; 비침윤성 망막 영상화 및 기능성 연구를 수행하고 치료에 표적화되는 보유한 광수용체의 영역을 확인하는 단계; 및 유효 농도의 조성물을 대상체에게 투여하는 단계(이로써, RDH12 연관된 LCA 또는 RP는 예방되거나 정지되거나 완화됨)를 포함한다. 조성물은 광수용체 세포에서 유전자의 생성물을 발현하는 촉진자 서열의 제어 하에 정상 광수용체 세포 특이적 유전자를 코딩하는 핵산 서열을 보유하는 재조합 바이러스, 및 약제학적으로 허용 가능한 담체를 포함한다. 유전자형 분석은 당해 분야에서 일상적이고, RDH12 유전자의 핵산 서열에서의 하나 이상의 돌연변이를 확인하기 위해 PCR의 사용을 포함할 수 있다. 예를 들어, 문헌[Meindl *et al*, Nat Gen, May 1996, 13:35, Vervoort, R. *et al*, 2000. Nat Genet 25(4): 462-466(상기 인용됨); 및 Vervoort, R. and Wright, A.F. 2002. Human Mutation 19: 486-500](이들 각각은 본 명세서에 참고로 포함됨)을 참조한다.
- [0148] 하기 실시예는 본 명세서에 기재된 눈 질환을 치료하는 데 사용하기 위한 핵산 서열, 발현 카세트, rAAV 게놈 및 바이러스 벡터의 구체적인 실시형태를 개시한다. 이 특정한 실시형태는 본 발명의 다양한 양태를 예시한다. 이 실시예는 본 명세서에 제공된 교시내용의 결과로서 명확해지는 임의의 및 모든 변형을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.
- [0149] 하기 실시예는 RDH12 녹아웃(RDH12 $-/-$) 마우스 및 HEK293 세포에서 유전자 증폭 치료의 개념 증명을 확립하였다. HEK293 세포에서의 코돈 최적화된 cDNA의 발현은 야생형 유전자보다 20% 더 높은 것으로 나타났다. 실질적으로 WO 제2012/158,757호에서처럼 변형을 갖지만, (과지 람다로부터 유래된) 상이한 스테퍼 서열을 갖는 프로 바이러스 플라스미드 골격이 기재되어 있다. RDH12 코딩 서열은 코돈 최적화되어서, 더 효율적인 발현을 허용한다. 또한, 본 발명자들은 플라스미드 설계에서의 네이티브 및 코돈 최적화된 hRDH12 서열 둘 다를 포함하였고, 시험관내 및 생체내 둘 다에서 효율 결과를 보여주었다.
- [0150] 프로바이러스 플라스미드는 개념 증명 데이터, 안전성 및 전임상 독성 데이터 및 궁극적으로 RDH12 환자에 대한 인간 임상 실험을 생성한다. 본 명세서에 기재된 발명은 기능성 RDH12 단백질을 코딩하는 망막 탈수소효소 12(RDH12)의 신규한 최적화된 cDNA를 수반한다. 일 실시형태에서, 코돈 최적화된 cDNA는 LCA13을 치료하도록 설계된다. 전이유전자 카세트는 유전자 조작에 의해 최적화되고, 코돈에서의 뉴클레오타이드의 상이한 서열이 동일한 아미노산을 코딩할 수 있으므로, 뉴클레오타이드 서열을 변경할 수 있지만, 동일한 단백질 생성물을 여전히 생성한다. 다시 말해, 동일한 단백질을 생성하기 위해 다수의 "동의" 코돈의 이점을 취할 수 있다.
- [0151] RDH12 환자로부터 유래된 유도 다능성 줄기 세포(iPC)에서 추가 실험을 또한 수행한다. 이 데이터는 RDH12 유도된 눈 병태를 치료하기 위한 방법으로서 AAV 벡터에서 패키징된 프로바이러스 플라스미드의 임상 관련성 및 유용성을 강하게 제안한다. 또한, 시험관내 모델, 예컨대 HEK293 및 iPS 세포는 벡터의 효력을 시험하는 데 유용하다.

- [0152] 실시예 1: 코돈 최적화된 RDH12 서열
- [0153] NotI 부위에서 임베딩된 5' 말단에서 완전한 Kozak 공통을 부가하도록 천연 인간 RDH12 서열을 변형시키고, 3' 말단에서 BclI 및 BamHI 부위(클로닝에 대한 제한 부위)를 첨가함으로써 기능성 RDH12 서열 번호 3을 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 생성하였다. TGA 중지 코돈을 최적 에피토프 태그화를 촉진하도록 BclI 부위에서 임베딩하였다. 이 실시형태는 또한 상기 확인된 소정의 제한 효소의 사용을 피한다.
- [0154] 코돈 최적화된 서열 번호 3의 오픈 리딩 프레임(ORF)은 네이티브 서열과 22% 다르고, 즉 이것은 도 1a 내지 도 1b에 도시된 바대로 네이티브 hRDH12와 오직 78%의 동일성을 공유한다.
- [0155] 실시예 2 - RDH12 발현 AAV의 작제
- [0156] 본 발명자들은 p618 골격에 기초하여 myc 태그가 있거나 없는 인간 네이티브 *RDH12* cDNA를 함유하는 아테노 연관된 바이러스 프로바이러스 시스-플라스미드를 생성하였다(미국 특허 제9,249,425호(p618에서 사용된 서열에 대해 본 명세서에 참고로 포함됨) 참조). 이 프로바이러스 플라스미드에서, hRDH12 cDNA는 구성적 CMV.CβA 촉진자(CBAe), 즉 pAAV.CMVe.네이티브-hRDH12 및 AAV.CBAe.h-네이티브 RDH12.myc에 의해 추진되었다.
- [0157] US 제9,249,425호에 기재된 바대로, 프로바이러스 플라스미드는 또한 5' AAV ITR 서열, 상류에서 제한 부위 1에 의해 및 하류에서 제한 부위 2에 의해 플랭킹된 ITR; (b) 상류에서 제한 부위 2에 의해 및 하류에서 제한 부위 3에 의해 플랭킹된 촉진자; (c) 제한 부위 3, 제한 부위 4 및 제한 부위 5를 포함하는 폴리링커 서열을 함유한다. 여기 기재된 실시형태에서, RDH12를 코딩하는 코돈 최적화된 핵산 서열을 포함하는 전이유전자는 이의 변형 없이 제한 부위 3, 4 및 5의 임의의 2개 사이에 위치하고, 여기서 전이유전자는 촉진자의 조절 제어 하에 (d) 상류에서 제한 부위 4 또는 5에 의해 및 하류에서 제한 부위 6에 의해 플랭킹된 폴리아데닐화 서열; 및 (e) 상류에서 제한 부위 6에 의해 및 하류에서 제한 부위 7에 의해 플랭킹된 3' AAV ITR 서열에 작동 가능하게 연결된다. 각각의 제한 부위 1 내지 7은 플라스미드에서 오직 한번 발생하고, 플라스미드에서 또 다른 제한 부위를 절단할 수 없는 상이한 효소에 의해 절단된다. 제한 부위 1 내지 7은 플라스미드로부터 요소 (a), (b), (c), (d) 및 (e) 또는 전체 AAV 게놈 (a) 내지 (e)의 하나 이상의 독립적인 및 반복된 제거, 대체 또는 치환을 허용하도록 위치한다. 이러한 프로바이러스 플라스미드는 추가로 내성 유전자 및 박테리아 세포에서 복제에 필요한 요소를 포함하는 플라스미드 골격을 포함한다. 또 다른 실시형태에서, 플라스미드 골격은 (a) 모듈식 재조합 AAV 게놈에서 전사로부터 골격에서 전사를 단리시키는 5' 및 3' 전사 종결자/절연체 서열; 또는 (b) 골격 길이를 증가시키고 비기능성 AAV 게놈의 리버스 패키징을 방지하는 비코딩 스텔퍼 서열 중 하나 이상을 포함한다. 이 전이유전자 카세트는 AAV 벡터의 카고(cargo) 역량과 적합하다. 작제물은 제한 맵핑 및 DNA 서열분석 분석에 의해 입증되었다.
- [0158] 예를 들어, 각각 도 10a-10c의 AAV.CBAe.h-네이티브-RDH12, AAV.CBAe.h-네이티브 RDH12-Myc 및 AAV.CBAe.h-코돈 opt-RDH12의 도식적 도면을 참조한다.
- [0159] 프로바이러스 작제물에서 코딩된 야생형(네이티브) 인간 RDH12 단백질의 발현을 확인하기 위해, COS-7 세포를 pAAV-CMVe -네이티브-hRDH12.myc에 의해 형질주입하였다. 형질주입된 세포를 myc-tag에 특이적인 항체를 사용한 면역 형광 분석 및 웨스턴 블롯 분석에 처리하였다.
- [0160] 이후, 세포를 염색하고 검정기로 조사하여서 성공적인 형질주입 및 유전자 전달의 효율을 보여주었다. pAAV.CMVe.네이티브-hRDH12.myc에 의해 형질주입된 세포의 면역형광 분석은 오직 형질주입된 세포에서의 RDH12 단백질의 발현을 입증하였다. 도 2A-2F는 세포에서의 RDH12의 발현을 나타내는 6 패널을 보여준다. 도 2A-2B는 비형질주입된 대조군을 보여주고; 도 2C-2D는 RDH12Myc 형질주입된 세포를 보여주고; 도 2E는 RDH12Myc 형질주입된 세포를 보여주고; 도 2F는 도 2D로부터의 2개의 세포의 확대이다.
- [0161] 웨스턴 블롯 분석은, 대조군, 비형질주입된 세포에서 관찰된 밴드 없이, 형질주입된 세포에서 예상된 크기 인간 RDH12 단백질의 발현을 추가로 확인시켜주었다. 도 2G는 RDH12Myc 형질주입된 COS-7 세포, 대조군 COS-7 세포, RDH12Myc 형질주입된 CHO 세포 및 대조군 CHO 세포 및 2개의 분자량 마커를 보여주는 젤이다. (도 2G).
- [0162] 이후, pAAV.CMVe.네이티브-hRDH12 및 pAAV.CMVe.네이티브-hRDH12.myc 프로바이러스 플라스미드를 사용하여, 관심 대상의 유전자를 코딩하는 AAV 시스-플라스미드, AAV rep 및 cap 유전자를 함유하는 AAV 트랜스-플라스미드 및 아테노바이러스 헬퍼 플라스미드인 3개의 플라스미드에 의해 준포화상태 HEK293 세포의 형질주입(이로써, AAV8-RDH12, AAV2-RDH12 및 AAV7m8-RDH12를 생성)을 수반하는 3중 형질주입 방법을 이용하여 재조합 AAV 혈청형 벡터(AAV2, AAV8 및 AAV7m8)를 제조하였다.

- [0163] 간단히 기재하여, AAV8-RDH12-myc 또는 AAV7m8-RDH12-myc 발현 카세트를 감염성 AAV 봉입체 또는 캡시드로 AAV 게놈의 패키징을 허용하는 충분한 바이러스 서열의 존재 하에 플라스미드를 보유하는 패키징 세포를 배양함으로써 선택된 AAV 캡시드에서 개별적으로 패키징하였다. 일 실시형태에서, rAAV를 제조하는 방법은 아데노바이러스 E1, E2a 및 E4ORF6 DNA에 의해 포유류 숙주 패키징 세포주(예컨대, 국제 특허 출원 공보 WO 제99/15685호에 기재된 바와 같은 B-50)를 발현하는 안정한 rep 및 cap에서의 패키징을 수반한다. 이오딧산을 구매 정제 또는 구매 원심분리를 이용하여 빈 것으로부터 DNA 함유 바이러스 입자를 분리하였다. 이것에 헤파린-세파로스 아가로스 칼럼 크로마토그래피가 후행하였다. 벡터 역가는 감염성 센터 검정을 이용하여 결정되었다. 벡터 게놈은 확립된 기준 로트에 대한 염색에 의해 결정되었다. 벡터의 순도는 웨스턴 젤의 투명성에 대해 다시 조사되었다. 바이러스 제제를 제조하고 합하여 원하는 전체 용적이 되었다.
- [0164] 이러한 rAAV 입자를 제조하는 더욱 다른 방법은 예컨대 하기 인용된 Smith et al., ref 11에 기재된 곤충 세포 패키징 세포주의 사용을 수반한다.
- [0165] rAAV 바이러스 입자를 0.0001% 내지 0.01%의 Pluronic F68(PF68)을 함유하는 적합한 부형제, 예컨대 180mM NaCl, 10mM NaPi(pH 7.3) 중에 현탁시켰다. 식염수 성분의 조성은 160mM 내지 180mM NaCl의 범위이다. 다른 완충제는 HEPE, 중탄산나트륨, TRIS, 또는 0.9% NaCl 용액을 함유하는 이러한 조성물 중에 유용하다.
- [0166] rAAV의 몇몇 제제는 조합되어 원하는 전체 용적이 되었다. 일 실시형태에서, 전체 용적은 완충제의 300마이크로리터의 용적 중에 1×10^{11} GC의 투약량이다. 또 다른 실시형태에서, 전체 용적은 완충제의 300마이크로리터의 용적 중에 1×10^8 GC의 투약량이다. 훨씬 또 다른 실시형태에서, 전체 용적은 완충제의 300마이크로리터의 용적 중에 1×10^6 내지 1×10^{13} GC의 투약량이다. 연속 희석 세포변성 효과 또는 감염성 센터 검정에 의해 검정된, 오염 헬퍼 아데노바이러스 및 네이티브 AAV는 각각 벡터 AAV보다 낮은 규모의 1 미만 또는 다수의 차수인 것으로 기대된다.
- [0167] 실시예 3 - 모델 시스템으로서의 iPSC
- [0168] 환자 특이적 유도 다능성 줄기 세포(iPSC)에서의 최근의 진전은 연구 질환 발병에 대한 적합한 시험관내 모델 시스템을 제공한다. RDH12의 기능을 연구하기 위한 시험관내 모델을 개발하기 위해, iPS 세포를 인간 RDH12 환자로부터 생성하고 규명하였다. AAV2.CMV.C β A-네이티브-hRDH12에 의한 감염이 외인성 RDH12의 생성을 발생시킨다는 것을 확인하기 위해, 본 발명자들은 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 또는 2×10^5 , 3×10^5 의 벡터 게놈(vg)/세포에 의해 AAV2 CMV.C β A-네이티브-hRDH12에 의해 iPS 세포의 분취량을 형질도입하였다. 48시간 후, 세포 용해물을 수집하고, myc 태그에 특이적인 항체를 사용하여 웨스턴 블로팅을 통해 분석하였다. 인간 RDH12의 명확한 용량 의존적 생성이 형질도입된 세포 용해물에서 관찰되었다. 도 4에서의 결과를 참조한다.
- [0169] 또 다른 시험관내 실험에서, 재조합 바이러스 AAV2-RDH12-Myc를 이후 형질주입 1×10^3 GC/세포, 1×10^4 GC/세포, 1×10^5 GC/세포, 2×10^5 GC/세포 및 3×10^5 GC/세포의 표시된 다중도에서 iPS 세포로 형질주입하였다. 양성 대조군이 또한 표시된다. 발현은 도 3에 도시된 바대로 확인된다.
- [0170] 실시예 4 - RDH12 KO 동물의 광 손상
- [0171] 오클라호마 대학교의 Anne Kasus-Jacobi 박사로부터 BALB/c 배경을 갖는 *Rdh12*^{-/-} 마우스를 얻었다. 이 동물은 정상 주기적 광 하에 키워질 때 인간 망막 퇴행 표현형을 나타내지 않지만, 밝은 광에 대한 노출 후 퇴행을 겪는다.
- [0172] RDH12^{-/-} 마우스에서의 유전자 증폭 치료의 효율을 평가하기 위해, 마우스를 실험 rAAV(AAV8.CMV.C β A-네이티브-hRDH12 또는 AAV7m8.CMV.C β A-네이티브-hRDH12)에 의해 편측으로 전치료하고, RDH12의 전달이 광 유도된 퇴행으로부터 이 이환된 망막을 보호하는지 결정되었다. 1 내지 2월령의 동물을 AAV8.CMV.C β A-네이티브-hRDH12에 의해 망막하 또는 편측으로 AAV7m8.CMV.C β A-네이티브-hRDH12에 의해 유리체내 주사하였다. 각각의 rAAV를 10^{11} - 10^{13} 바이러스 입자의 주사에 의해 RDH12 KO 마우스의 오른쪽 눈에서 또는 감염되지 않은 채 있는 왼쪽 눈에 의해 10^{11} - 10^{13} 바이러스 입자/㎖ 완충제 주사하였다. 주사 후 3 내지 4주에, 동물을 4시간 동안 밝은 광(10,000 Lux)에 노출시켰다.

- [0173] 이 동물의 망막에서의 광의 효과를 광 손상 전 및 후 24시간에 망막 기능 연구(망막전도, (ERG))에 의해 평가하였다. 광에 노출된 망막은 광 손상의 증거를 입증해야 한다. 이때에 동물은 광 손상으로부터 10일 회복 기간으로 처리되었다. 이후, 본 발명자들은 ERG에 의한 망막 기능 및 망막 조직 절편에서 광수용체 세포사의 정도를 측정하였다. 마우스를 희생시키고, 저온절편화에 눈을 수집하였다. 저온절편화된 조직을 항-myc 항체에 의해 염색하였다. Myc는 비특이적이었다. 핵을 DAPI에 의해 염색하였다.
- [0174] 도 5a 및 도 5b는 AAV8 또는 AAV7m8에 의해 주사된 RDH12^{-/-} 마우스의 망막에서의 a-파 진폭 차이를 보여준다. CMV.CβA-네이티브-hRDH12(AAV-RDH12) 및 비치료된 눈. 망막전위도검사(ERG)는 광 노출 후 AAV-RDH12 치료된 망막에서 원뿔 광수용체 기능을 나타내는 a-파의 부분 기능성 구조를 밝혀냈다. 도 5a는 RDH12 KO 마우스(표백 전 및 블리치 후)의 RDH12.myc(AAV8-RDH12-Myc) 주사된 대 비주사된 망막에서의 A-파 비율의 그래프를 보여준다. 도 5b는 RDH12 KO 마우스의 RDH12.myc(AAV7m8-RDH12-Myc) 주사된 대 비주사된 망막의 A-파 표백 전 및 블리치 후 비율의 그래프를 보여준다.
- [0175] 벡터 치료된 RDH12^{-/-} 눈은 광 손상 후 광수용체 기능의 보존을 수반한 조직학적 구조의 정도에 대해 평가되었다 (도 6 내지 도 9 참조).
- [0176] 도 6A-6D는 왼쪽 눈(도 6A 및 도 6C)이 비주사된 단일 동물 136에 대한 실험 결과를 보여준다. 오른쪽 눈(도 6B 및 도 6D)을 AAV7m8-RDH12-Myc에 의해 주사하였다. ERG 기준선을 수행하고, 이후 광 손상, 이후 제2 ERG가 이어졌다. 동물을 10일 동안 감금하고, 제3 ERG를 수행하였다. 마우스를 희생시키고, 눈을 수집하고 고정하고 절편화하고 DAPI((도 6A 및 도 6B)) 또는 로돕신 및 DAPI((도 6C 및 도 6D))에 의해 염색하였다.
- [0177] 도 7a 내지 7c는 망막 구조가 광 손상 후 비주사된 망막과 비교하여 AAV7m8-RDH12-Myc 주사된 망막에서 보존된다는 것을 보여준다. 도 7a는 왼쪽 비주사된 눈을 보여준다. 도 7b는 얇은 ONL을 보여주는 왼쪽 눈의 더 높은 배율의 영상을 보여준다. 도 7c는 AAV7m8-RDH12-Myc에 의해 주사된 오른쪽 눈이다.
- [0178] 도 8A는 얇은 망막을 보여주는 비주사된 왼쪽 눈을 갖는 동물의 망막 구조를 보여준다. 도 8B는 AAV8-RDH12-Myc에 의해 주사된 동물의 오른쪽 눈을 보여준다.
- [0179] 도 9A 및 도 9B는 더 높은 배율의 영상을 갖는 단일 동물 147의 망막 구조를 보여준다. 도 9A는 비주사된 왼쪽 눈을 보여준다. 도 9B는 AAV8-RDH12-Myc에 의해 주사된 오른쪽 눈을 보여준다.
- [0180] 낮은 배율에서, 가장 잘 치료된 RDH12^{-/-} 망막이 비교적 정상 ONL을 유지하는 한편, 동일한 마우스의 비치료된 눈에서, ONL이 중앙 망막 영역에서 아주 적은 광수용체 세포 바디를 함유한다는 것이 명확하다. 더 높은 배율의 영상은 통상적인 치료된 망막이 실질적인 외부 핵 두께 및 외부 분절에 보유된다는 것을 보여주었다. 반대로, 동일한 마우스로부터의 비치료된 눈에서, 중앙 망막에서 잔류 외부 분절로 ONL 핵의 오직 1개 내지 3개의 열이 남았다.
- [0181] 동일한 시험은 RDH12 유전자 내의 코돈 용법의 최적화가 전이유전자 발현의 증가한 수준 및 망막 퇴행의 더 양호한 구조를 발생시킨다는 것을 확인하도록 수행되었다. 코돈 최적화는 RDH12의 효과적인 재구성에 필요한 바이러스 용량을 감소시키는 것으로 예상된다.
- [0182] 실시예 5 - 인간 대상체에서의 효율
- [0183] 적합한 완충 담체 중의 현탁액 중의 10^{10} - 10^{12} GC 또는 바이러스 입자의 망막하 주사에 의한 투여 후 인간 대상체의 망막의 세포를 형질도입하도록 rAAV 입자를 또한 사용하였다. 형질도입된 세포 또는 망막에서의 코돈 최적화된 hRDH12의 발현은 망막 및 시기능에 의해 평가되었다.
- [0184] 이 기능은 하나 이상의 기법을 이용하여 인간에서 조사된다: 막대 및 원뿔 광수용체 기능을 보는 망막전도(ERG), 동공축정법 시력, 대조 민감성 색상 시야 시험, 시야 시험(Humphrey 시야/Goldmann 시야), 시야측정법 이동성 시험(장애물 코스), 읽기 속도 시험. 다른 유용한 시험은 기능성 자기 공명 영상화(fMRI), 전면 광 민감성 시험, 망막 구조 연구, 예를 들어 광학 간섭 단층촬영술, 안저 사진촬영술, 안저 자가형광, 적응 광학 및 주사 레이저 검안경검사를 포함한다.

표 1(서열 목록 프리 텍스트)

하기 정보는 숫자 식별자 <223> 하에 프리 텍스트를 함유하는 서열에 대해 제공된다.

서열 번호 (프리 텍스트 함유)	<223> 하의 프리 텍스트
3	코돈 최적화된 RDH12 DNA 서열
4	코돈 최적화된 핵산 서열로부터의 번역된 기능성 RDH12 단백질 서열

[0185]

[0186]

각각의 및 모든 특허, 특허 출원, 예를 들어 2016년 7월 8일에 출원된 특허 출원 US 제62/359,777호, 및 공보, 예를 들어 본 명세서에 걸쳐 인용된 웹사이트는 본 명세서에 참고로 포함된다. 유사하게, 본 명세서에 언급되고 첨부된 서열 목록에 보이는 서열 번호는 참고로 포함된다. 본 발명이 특정한 실시형태와 관련하여 기재되지만, 본 발명의 정신으로부터 벗어나지 않고 변형이 이루어질 수 있는 것으로 이해될 것이다. 이러한 변형은 첨부된 청구항의 범위 내에 해당하도록 의도된다.

도면

도면1a

서열 번호 1에 대한 서열 번호 5

```

ATGTTGGTCACCCCTCGGACTCCTTACCTCATTTTCTCCTTCCTGTACATGGTCGCCCCG 72
ATGCTGGTCACCTTGGGACTGCTCACCTCCTTCTCTCGTTCCTGTATATGGTAGCTCCA 60

AGCATTAGAAAGTTCTTCGCGCGGCGAGTGTGTAGGACTAACGTGCAGTTGCCCGGGAAG
TCCATCAGGAAGTTCTTTGCTGGTGGAGTGTGTAGAACAAATGTGCAGCTTCCTGGCAAG 120

GTCGTGGTGATTACTGGCGCCAACACTGGTATCGGAAAGGAAACTGCGCGGGAACCTGGCG
GTAGTGGTGATCACTGGCGCCAACACGGGCATTTGGCAAGGAGACGGCCAGAGAGCTCGCT 180

TCCAGAGGTGCCCGCGTGTACATTGCATGCCGCGACGTGCTGAAGGGAGAATCCGCCGCG
AGCCGAGGAGCCCGAGTCTATATTGCCTGCAGAGATGTACTGAAGGGGGAGTCTGCTGCC 240

TCCGAGATCCGGGTGGACACCAAAATAGCCAGGTGCTCGTGCGGAAGCTGGATCTGTCC
AGTGAAATCCGAGTGGATACAAAGAACTCCAGGTGCTGGTGCAGAAATTGGACCTATCC 300

GACACCAAGTCAATCAGGGCCTTTGCGGAGGGTTCTTGGCTGAAGAGAAGCAGCTCCAC
GACACCAAATCTATCCGAGCCTTTGCTGAGGGCTTTCTGGCAGAGGAAAAGCAGCTCCAT 360

ATTCTGATCAACAACGCCGGGGTCATGATGTGCCCTACTCAAAGACCGCAGACGGCTTC
ATTCTGATCAACAATGCGGAGTAATGATGTGCCATATTCGAAGACAGCTGATGGCTTT 420

GAAACCCACCTGGGCGTGAACCATCTGGGACACTTCCTGCTGACCTATCTGCTGCTGGAG
GAAACCCACCTGGGAGTCAACCACCTGGGCCACTTCCTCCTCACCTACCTGCTCCTGGAG 480

```

도면 1b

CGACTGAAAGTGTCTGGCTCCTGCTCGGGTCGTGAACGTGTCCAGCGTGGCCCATCACATC
CGGCTAAAGGTGTCTGCCCCGTGCACGGTGGTTAATGTGTCTCGGTGGCTCACCACATT 540

GGAAAGATCCCATTCCACGATCTCCAATCCGAGAAGCGGTACAGCAGGGGCTTCGCGTAC
GGCAAGATTCCCTTCCACGACCTCCAGAGCGAGAAGCGCTACAGCAGGGGTTTTCCTAT 600

TGTCACTCGAAGTTGGCCAACGTGCTCTTTACCCGCGAACTGGCCAAGCGGTGCAGGGC
TGCCACAGCAAGCTGGCCAATGTGCTTTTTACTCGTGAGCTGGCCAAGAGGCTCCAAGGC 660

ACTGGCGTGACCACCTTACGCCGTGCACCTGGTGTCTGTGCGGTCCGAGCTGGTCCGCCAT
ACCGGGGTCAACACCTACGCAGTGCACCCAGGCGTCTCCGCTCTGAGCTGTTCCGGCAC 720

TCCTCTCTTCTGTGCTCCTGTGGAGACTCTTCTCCCCGTTCTCAAGACCGCAAGGGAA
TCCTCCCTGCTCTGCTGCTCTGGCGGCTCTTCTCCCCCTTTGTCAAGACGGCACGGGAG 780

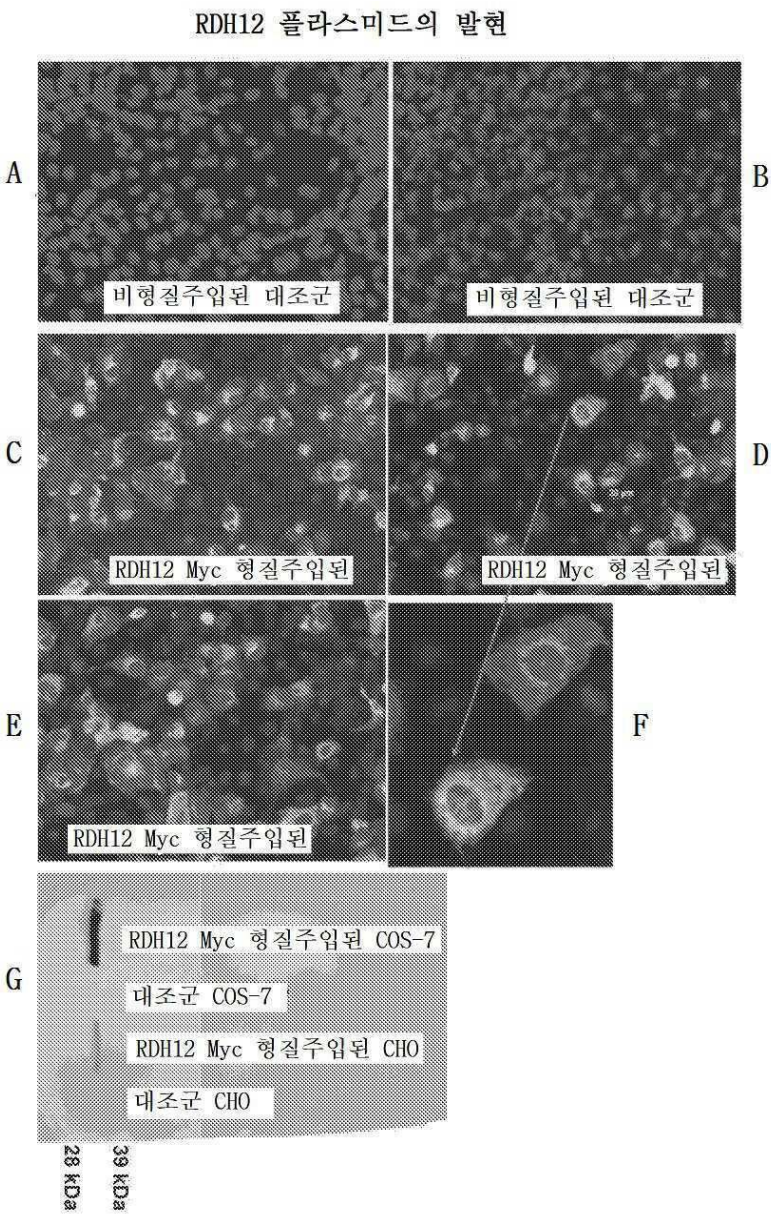
GGAGCCCAAACGAGCCTTCACTGTGCCCTGGCGGAAGGACTGGAGCCGCTTAGCGGAAAG
GGGGCGCAGACCAGCCTGCATGCGCCCTGGCTGAGGGCTGGAGCCCTGAGTGGCAAG 840

TACTTCTCGGACTGCAAGCGCACCTGGGTGTGCTTAGAGCTCGGAACAACAAGACTGCC
TACTTCAGTGACTGCAAGAGGACCTGGGTGTCTCAAGGGCCCGAAATAACAAAACAGCT 900

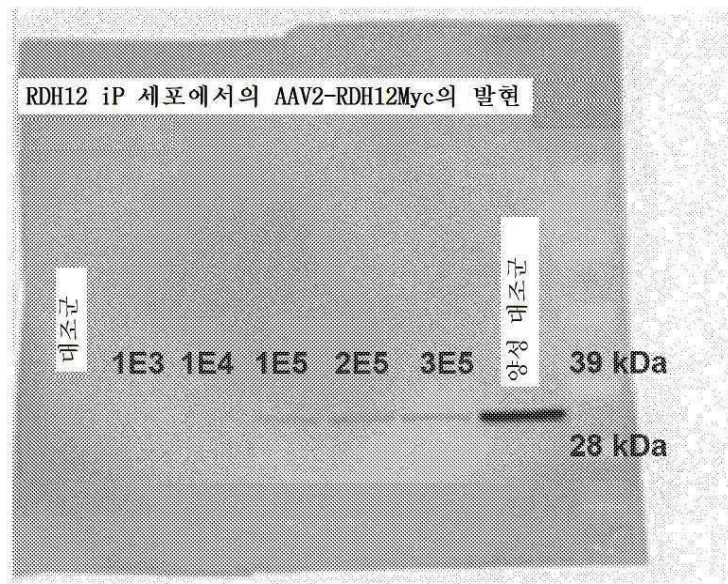
GAACGCCTCTGGAATGTGTCTGCGAGCTGCTGGGAATCAGATGGGAGT 961

GAGCGCCTATGGAATGTCAGCTGTGAGCTTCTAGGAATCCGGTGGGAGT 949

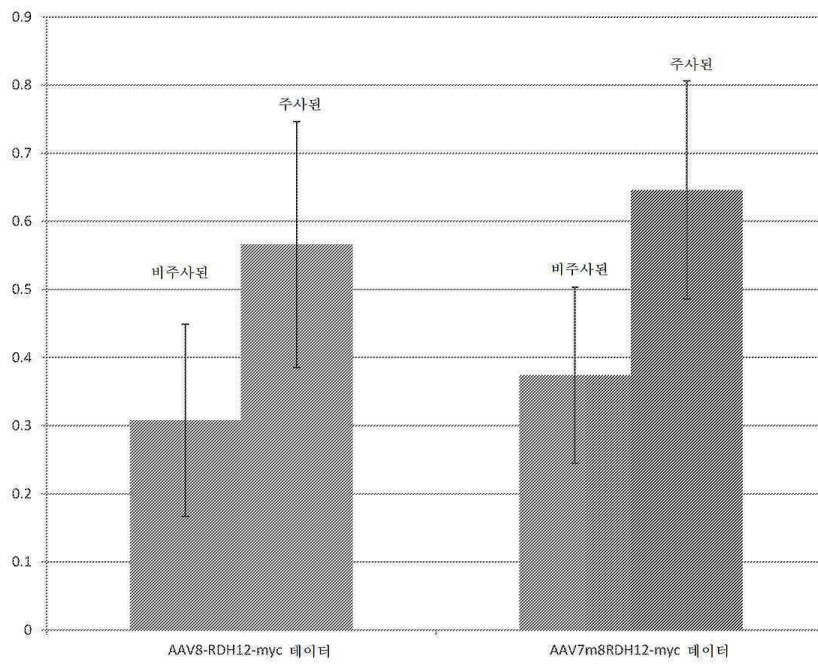
도면2



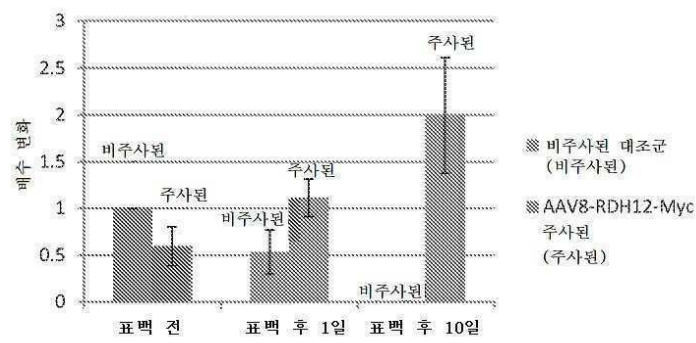
도면3



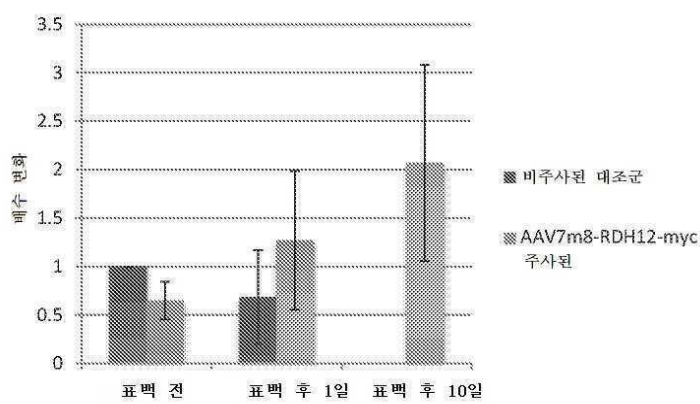
도면4



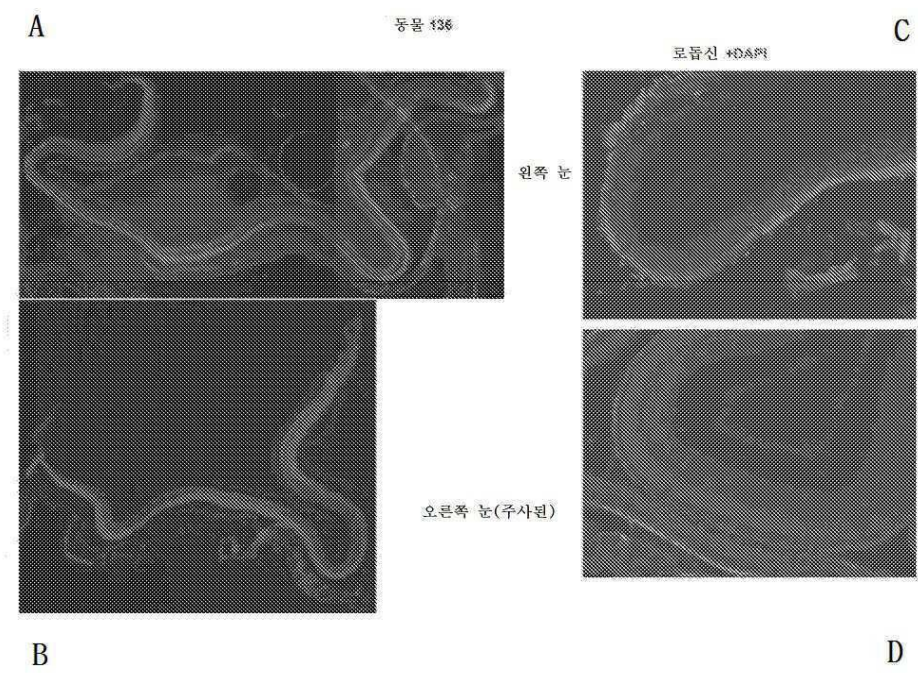
도면5a



도면5b



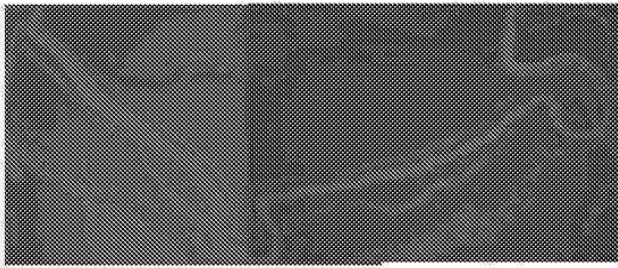
도면6



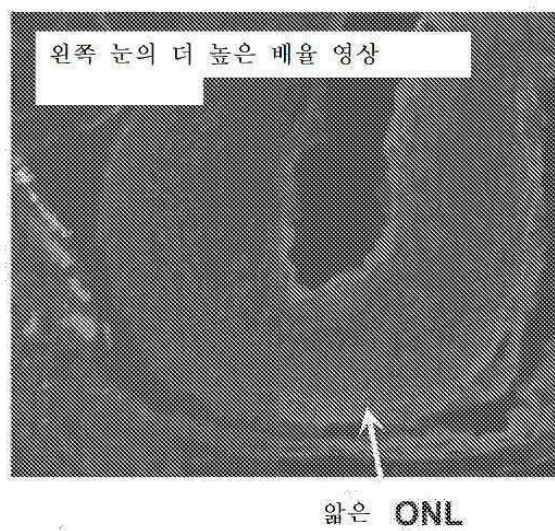
도면7a

왼쪽 눈(비주사된)

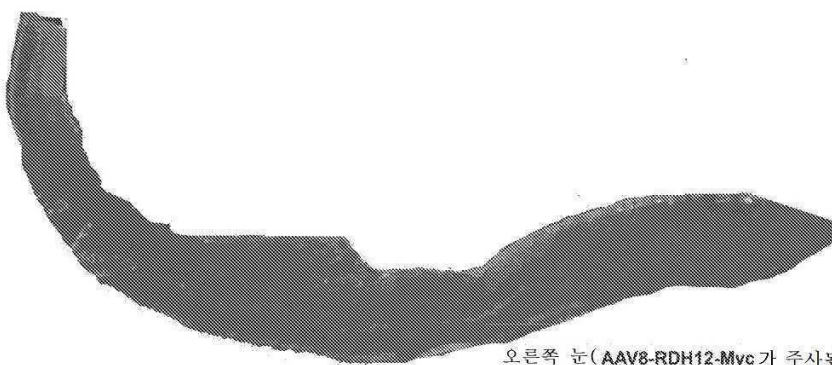
동물 134



도면7b

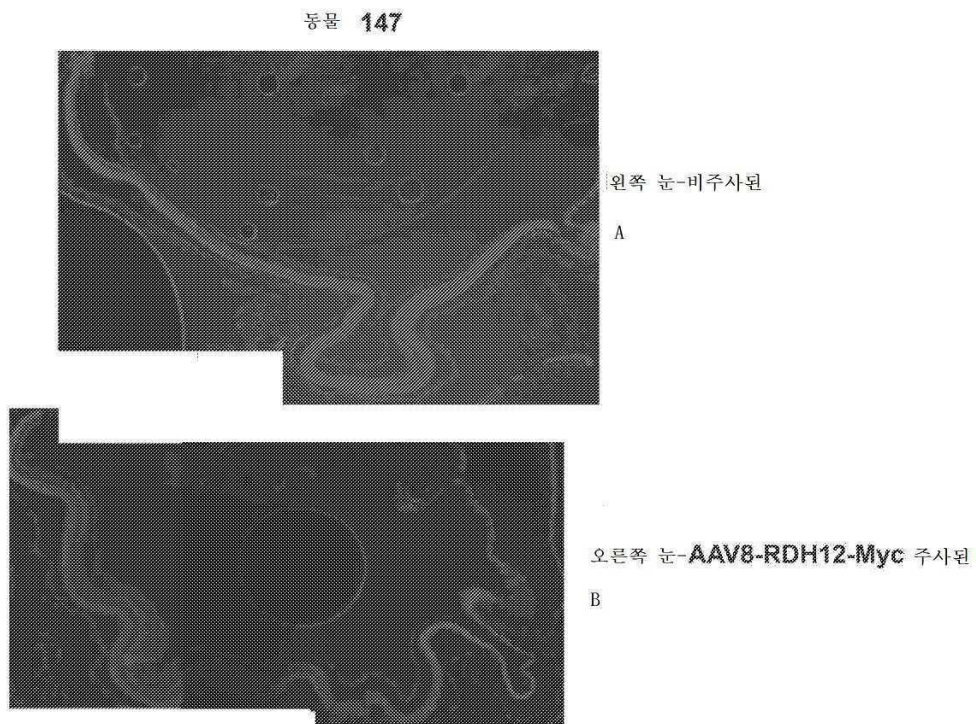


도면7c



오른쪽 눈(AAV8-RDH12-Myc가 주사됨)

도면8

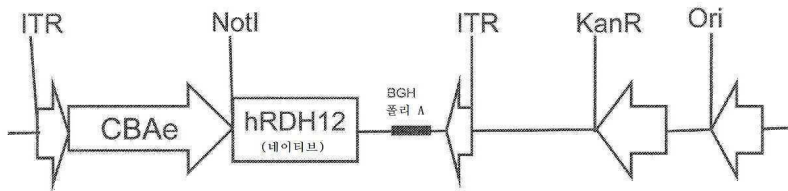


도면9



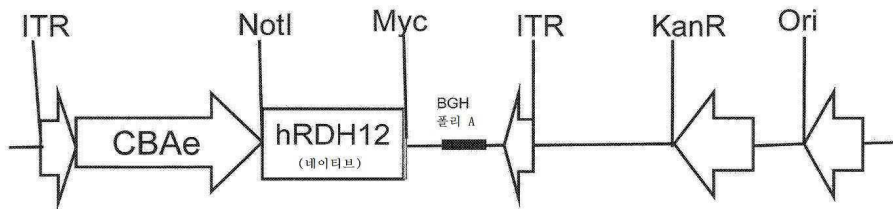
도면10a

AAV.CBAe.h-네이티브-RDH12



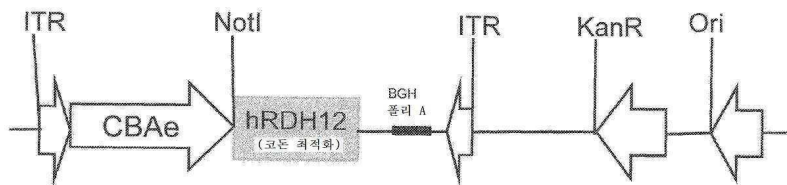
도면10b

AAV.CBAe.h-네이티브-RDH12-Myc



도면10c

AAV.CBAe.h-코돈 최적화-RDH12



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> The Trustees of the University of Pennsylvania

<120> METHODS AND COMPOSITIONS FOR TREATMENT OF DISORDERS AND DISEASES
INVOLVING RDH12

<130> UPN-16-7699.KR

<150> PCT/US2017/041122

<151> 2017-07-07

<150> US 62/359,777

<151> 2016-07-08

<160> 5

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 949

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

atgctggtea ccttgggact gctcacctcc ttcttctcgt tctgtatat ggtagctcca      60
tccatcagga agttctttgc tggtaggagtg ttagaacaac atgtgcagct tctggcaag      120

gtagtgggta tcaactgggc caacacgggc attggcaagg agacggccag agagctcgt      180
agccgaggag cccgagtcta tattgcctgc agagatgtac tgaaggggga gctgtctgcc      240
agtgaatcc gagtggatac aaagaactcc caggtgctgg tgcggaaatt ggacctatcc      300
gacacaaat ctatccgagc ctttctgag ggctttctgg cagaggaaaa gcagctccat      360
attctgatca acaatgcggg agtaatgatg tgcctatatt ccaagacagc tgatggcttt      420
gaaacccacc tgggagtcaa ccacctgggc cacttctcc tcacctacct gctcctggag      480
cggtctaaagg tgctgcccc tgcacgggtg gttaatgtgt cctcgggtggc tcaccacatt      540

ggcaagattc cttccacga cctccagagc gagaagcgt acagcagggg ttttgcctat      600
tgccacagca agctggccaa tgtgcttttt actcgtgagc tggccaagag gctccaaggc      660
accggggtca ccacctacgc agtgcaccca ggcgtcgtcc gctctgagct ggtccggcac      720
tcctccctgc tctgctgct ctggcggtc ttctccccct ttgtcaagac ggcacgggag      780
ggggcgagca ccagcctgca ctgcgccctg gctgagggcc tggagcccct gagtggcaag      840
tacttcagtg actgcaagag gacctgggtg tctccaaggg ccgaaataa caaacagct      900
gagcgctat ggaatgtcag ctgtgagctt ctaggaaatcc ggtgggagt      949

```

<210> 2

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Leu Val Thr Leu Gly Leu Leu Thr Ser Phe Phe Ser Phe Leu Tyr
1           5           10           15
Met Val Ala Pro Ser Ile Arg Lys Phe Phe Ala Gly Gly Val Cys Arg

```

20 25 30
 Thr Asn Val Gln Leu Pro Gly Lys Val Val Val Ile Thr Gly Ala Asn
 35 40 45
 Thr Gly Ile Gly Lys Glu Thr Ala Arg Glu Leu Ala Ser Arg Gly Ala

 50 55 60
 Arg Val Tyr Ile Ala Cys Arg Asp Val Leu Lys Gly Glu Ser Ala Ala
 65 70 75 80
 Ser Glu Ile Arg Val Asp Thr Lys Asn Ser Gln Val Leu Val Arg Lys
 85 90 95
 Leu Asp Leu Ser Asp Thr Lys Ser Ile Arg Ala Phe Ala Glu Gly Phe
 100 105 110
 Leu Ala Glu Glu Lys Gln Leu His Ile Leu Ile Asn Asn Ala Gly Val

 115 120 125
 Met Met Cys Pro Tyr Ser Lys Thr Ala Asp Gly Phe Glu Thr His Leu
 130 135 140
 Gly Val Asn His Leu Gly His Phe Leu Leu Thr Tyr Leu Leu Leu Glu
 145 150 155 160
 Arg Leu Lys Val Ser Ala Pro Ala Arg Val Val Asn Val Ser Ser Val
 165 170 175
 Ala His His Ile Gly Lys Ile Pro Phe His Asp Leu Gln Ser Glu Lys

 180 185 190
 Arg Tyr Ser Arg Gly Phe Ala Tyr Cys His Ser Lys Leu Ala Asn Val
 195 200 205
 Leu Phe Thr Arg Glu Leu Ala Lys Arg Leu Gln Gly Thr Gly Val Thr
 210 215 220
 Thr Tyr Ala Val His Pro Gly Val Val Arg Ser Glu Leu Val Arg His
 225 230 235 240
 Ser Ser Leu Leu Cys Leu Leu Trp Arg Leu Phe Ser Pro Phe Val Lys

 245 250 255
 Thr Ala Arg Glu Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Cys Ala Leu Ala Glu
 260 265 270

Gly Leu Glu Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Phe Ser Asp Cys Lys Arg Thr
275 280 285
Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr Ala Glu Arg Leu Trp
290 295 300
Asn Val Ser Cys Glu Leu Leu Gly Ile Arg Trp Glu

305 310 315
<210> 3
<211> 977
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Codon-optimized RDH12 DNA sequence
<400> 3

gcggccgcc ccatgttgg caccctcgga ctcttacct cattttctc ctctctgtac 60
atggtcgccc cgagcattag aaagtcttc gccggcggag tgtgtaggac taacgtgcag 120
ttgcccgga aggtcgtgt gattactggc gccaacactg gtatcgaaa ggaaactgcg 180
cgggaactgg cgtccagagg tgccgcgtg tacattgcat gccgcgacgt gctgaaggga 240
gaatccgcc cgtccgagat ccgggtggac accaaaaata gccaggtgct cgtgcggaag 300

ctggatctgt ccgacaccaa gtcaatcagg gcctttgccg aggggttcct ggctgaagag 360
aagcagctcc acattctgat caacaacgcc ggggtcatga tgtgcccta ctcaaagacc 420
gcagacggct tcgaaaccca cctgggcgtg aaccatctgg gacacttct gctgacctat 480
ctgctgctgg agcgactgaa agtgtcggct cctgctcggg tcgtgaacgt gtccagcgtg 540
gccccacaca tcggaagat ccattccac gatctccaat ccgagaagcg gtacagcagg 600
ggcttcgcgt acgtcactc gaagttggcc aacgtgctct ttacccgca actggccaag 660
cggctgcagg gactggcgt gaccacttac gccgtgcacc ctggtgtcgt gcggtccgag 720

ctggtccgcc attcctctct tctgtgcctc ctgtggagac tcttctcccc gtctgtcaag 780
accgcaaggg aaggagccca aacgagcctt cactgtgccc tggcggaagg actggagccg 840
cttagcgga agtacttctc ggactgcaag cgcacctggg tgtgcctag agctcggaac 900
aacaagactg ccgaacgcct ctggaatgtg tctgcgagc tgctgggaat cagatgggag 960
tgatgatcat gagatct 977

<210> 4
<211> 320
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> Translated functional RDH12 protein sequence.

<400

> 4

```

Ala Ala Ala Thr Met Leu Val Thr Leu Gly Leu Leu Thr Ser Phe Phe
1           5           10           15
Ser Phe Leu Tyr Met Val Ala Pro Ser Ile Arg Lys Phe Phe Ala Gly
           20           25           30
Gly Val Cys Arg Thr Asn Val Gln Leu Pro Gly Lys Val Val Val Ile
           35           40           45
Thr Gly Ala Asn Thr Gly Ile Gly Lys Glu Thr Ala Arg Glu Leu Ala
           50           55           60

Ser Arg Gly Ala Arg Val Tyr Ile Ala Cys Arg Asp Val Leu Lys Gly
65           70           75           80
Glu Ser Ala Ala Ser Glu Ile Arg Val Asp Thr Lys Asn Ser Gln Val
           85           90           95
Leu Val Arg Lys Leu Asp Leu Ser Asp Thr Lys Ser Ile Arg Ala Phe
           100          105          110
Ala Glu Gly Phe Leu Ala Glu Glu Lys Gln Leu His Ile Leu Ile Asn
           115          120          125

Asn Ala Gly Val Met Met Cys Pro Tyr Ser Lys Thr Ala Asp Gly Phe
           130          135          140
Glu Thr His Leu Gly Val Asn His Leu Gly His Phe Leu Leu Thr Tyr
           145          150          155          160
Leu Leu Leu Glu Arg Leu Lys Val Ser Ala Pro Ala Arg Val Val Asn
           165          170          175
Val Ser Ser Val Ala His His Ile Gly Lys Ile Pro Phe His Asp Leu
           180          185          190

Gln Ser Glu Lys Arg Tyr Ser Arg Gly Phe Ala Tyr Cys His Ser Lys
           195          200          205
Leu Ala Asn Val Leu Phe Thr Arg Glu Leu Ala Lys Arg Leu Gln Gly
           210          215          220

```

Thr Gly Val Thr Thr Tyr Ala Val His Pro Gly Val Val Arg Ser Glu
 225 230 235 240
 Leu Val Arg His Ser Ser Leu Leu Cys Leu Leu Trp Arg Leu Phe Ser
 245 250 255

Pro Phe Val Lys Thr Ala Arg Glu Gly Ala Gln Thr Ser Leu His Cys
 260 265 270
 Ala Leu Ala Glu Gly Leu Glu Pro Leu Ser Gly Lys Tyr Phe Ser Asp
 275 280 285
 Cys Lys Arg Thr Trp Val Ser Pro Arg Ala Arg Asn Asn Lys Thr Ala
 290 295 300
 Glu Arg Leu Trp Asn Val Ser Cys Glu Leu Leu Gly Ile Arg Trp Glu
 305 310 315 320

<210> 5

<211> 949

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> RDH12 coding sequence

<400> 5

atgttggatca ccctcggact ccttacctca tttttctcct tctgtacat ggtcgccccg 60
 agcattagaa agttcttcgc cggcggagtg ttaggacta acgtgcagtt gcccgggaag 120
 gtcgtggtga ttactggcgc caaactggt atcggaagg aaactgcgcg ggaactggcg 180
 tccagaggatg cccgcgtgta cattgcatgc cgcgacgtgc tgaagggaga atccgccgcg 240
 tccgagatcc ggggtggacac caaaaatagc caggtgctcg tgcggaagct ggatctgtcc 300
 gacaccaagt caatcagggc ctttgccgag gggttcctgg ctgaagagaa gcagctccac 360

attctgatca acaacgccgg ggtcatgatg tgcccctact caaagaccgc agacggcttc 420
 gaaaccacc tgggcgtgaa ccatctggga cacttctgc tgacctatct gctgctggag 480
 cgactgaaag tgtcggctcc tctcgggtc gtgaacgtgt ccagcgtggc ccatcacatc 540
 ggaaagatcc cattccaga tctccaatcc gagaagcggg acagcagggg cttcgcgtac 600
 tgtcactcga agttggccaa cgtgctcttt acccgcgaa tggccaagcg gctgcagggc 660
 actggcgtga ccacttacgc cgtgcaccct ggtgtcgtgc ggtccgagct ggtccgcat 720
 tcctctcttc tgtcctcct gtggagactc ttctccccgt tcgtcaagac cgcaaggga 780

ggagcccaaa cgagccttca ctgtgccctg gcggaaggac tggagccgct tagcggaaag	840
tacttctcgg actgcaagcg cacctgggtg tgcctagag ctcggaacaa caagactgcc	900
gaacgcctct ggaatgtgtc ctgcgagctg ctgggaatca gatgggagt	949