



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년02월15일

(11) 등록번호 10-2636351

(24) 등록일자 2024년02월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 48/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 48/005 (2013.01)

A61P 1/16 (2018.01)

(21) 출원번호 10-2019-7037368

(22) 출원일자(국제) 2018년05월18일

심사청구일자 2021년05월18일

(85) 번역문제출일자 2019년12월18일

(65) 공개번호 10-2020-0026814

(43) 공개일자 2020년03월11일

(86) 국제출원번호 PCT/US2018/033515

(87) 국제공개번호 WO 2018/213786

국제공개일자 2018년11월22일

(30) 우선권주장

62/508,968 2017년05월19일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

W02001036620 A2*

W02008073303 A2

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

엔코디드 테라퓨틱스, 인크.

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 오
이스터 포인트 블러바드 341

(72) 발명자

라마무르티, 카르티

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

태글리아텔라, 스테파니

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

양영준, 이상남

전체 청구항 수 : 총 22 항

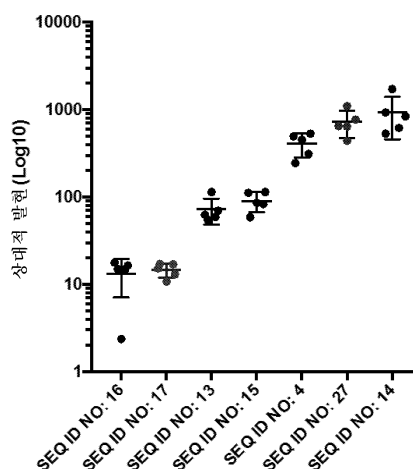
심사관 : 윤재욱

(54) 발명의 명칭 **교활성 조절 요소**

(57) 요약

트랜스진의 높은 발현을 구동시키기 위한 조성물 및 방법이 본원에서 제공된다. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우 하나 이상의 세포 유형 또는 조직에서 트랜스진의 높은 발현을 발생시킬 수 있는 하나 이상의 인간-유래 조절 요소를 포함하는, 트랜스진의 높은 발현을 구동시키기 위한 조성물 및 방법.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

C12N 15/86 (2013.01)

A01K 2217/075 (2013.01)

A01K 2227/105 (2013.01)

A01K 2267/0381 (2013.01)

C12N 2750/14143 (2013.01)

C12N 2830/00 (2013.01)

(72) 발명자

태넨하우스, 앤

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

영, 앤드류

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

첸, 슈-잉

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

장, 치

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

마틴, 스테파니

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

오버코플러, 데이비드

미국 94080 캘리포니아주 사우스 샌프란시스코 스
위트 100 오이스터 포인트 블러바드 343

명세서

청구범위

청구항 1

트랜스진에 작동가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 발현 카세트이며,
조절 요소는 서열식별번호: 14 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 95%인 서열을 포함하는 것인 발현 카세트.

청구항 2

제1항에 있어서, 조절 요소가 비-천연 발생인 발현 카세트.

청구항 3

제1항에 있어서, 조절 요소가 인트론 서열을 포함하는 것인 발현 카세트.

청구항 4

제3항에 있어서, 조절 요소가 프로모터와 트랜스진 사이에 위치하는 것인 발현 카세트.

청구항 5

제1항에 있어서, 조절 요소가 프로모터 서열을 포함하는 것인 발현 카세트.

청구항 6

제5항에 있어서, 조절 요소가 카세트 내의 유일한 프로모터인 발현 카세트.

청구항 7

제1항에 있어서, 조절 요소가 120 bp 이하인 발현 카세트.

청구항 8

제7항에 있어서, 조절 요소가 서열식별번호: 14를 포함하는 것인 발현 카세트.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 바이러스 입자의 일부분인 발현 카세트.

청구항 10

제9항에 있어서, 바이러스 입자가 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV), 재조합 렌티바이러스, 재조합 아데노바이러스, 또는 재조합 레트로바이러스인 발현 카세트.

청구항 11

제10항에 있어서, rAAV가 rAAV1, rAAV2, rAAV3, rAAV3b, rAAV4, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9, rAAV10, rAAV11, rAAV12, rAAV-DJ, 또는 rscAAV인 발현 카세트.

청구항 12

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 반수체기능부전(haploinsufficiency) 또는 유전적 결손과 연관된 유전자, 호르몬, 성장 또는 분화 인자, 신경영양 인자, 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 면역글로불린, 키메라 T 세포 수용체, 인터페론, DNA 결합 단백질, 유전자 편집 단백질, 전사 활성화인자, 전사 억제인자, 및 상기 트랜스진 중 어느 하나의 변이체 또는 기능성 단편으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 발현 카세트.

청구항 13

제1항에 있어서, 트랜스진이 치료용 트랜스진인 발현 카세트.

청구항 14

제13항에 있어서, 치료용 트랜스진이

(i)ATP7B, ATP7A, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 인자 1, 인자 2, 인자 3, 인자 4, 인자 5, 인자 6, 인자 7, 인자 8, 인자 9, 인자 10, 인자 11, 및 인자 12로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는

(ii)상기 (i)의 치료용 트랜스진 중 어느 하나의 변이체 또는 기능성 단편인

발현 카세트.

청구항 15

제14항에 있어서, 바이러스 입자의 일부분인 발현 카세트.

청구항 16

제15항에 있어서, 바이러스 입자가 재조합 아데노-연관 바이러스 (rAAV), 재조합 렌티바이러스, 재조합 아데노 바이러스, 또는 재조합 레트로바이러스인 발현 카세트.

청구항 17

제16항에 있어서, rAAV가 rAAV1, rAAV2, rAAV3, rAAV3b, rAAV4, rAAV5, rAAV6, rAAV7, rAAV8, rAAV9, rAAV10, rAAV11, rAAV12, rAAV-DJ, 또는 rscAAV인 발현 카세트.

청구항 18

제15항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ATP7B 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.

청구항 19

제15항에 있어서, 치료용 트랜스진이 인자 8 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.

청구항 20

반수체기능부전 또는 유전적 결손의 치료를 필요로 하는 대상체에서 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 제13항 내지 제19항 중 어느 한 항의 발현 카세트를 포함하는 의약.

청구항 21

윌슨병의 치료를 필요로 하는 대상체에서 윌슨병을 치료하는 방법에 사용하기 위한, 제18항의 발현 카세트를 포함하는 의약.

청구항 22

응혈 장애의 치료를 필요로 하는 대상체에서 응혈 장애를 치료하는 방법에 사용하기 위한, 제19항의 발현 카세트를 포함하는 의약.

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

청구항 80

삭제

청구항 81

삭제

청구항 82

삭제

청구항 83

삭제

청구항 84

삭제

청구항 85

삭제

청구항 86

삭제

청구항 87

삭제

청구항 88

삭제

청구항 89

삭제

청구항 90

삭제

청구항 91

삭제

청구항 92

삭제

청구항 93

삭제

청구항 94

삭제

청구항 95

삭제

청구항 96

삭제

청구항 97

삭제

청구항 98

삭제

청구항 99

삭제

청구항 100

삭제

청구항 101

삭제

청구항 102

삭제

청구항 103

삭제

청구항 104

삭제

청구항 105

삭제

청구항 106

삭제

청구항 107

삭제

청구항 108

삭제

청구항 109

삭제

청구항 110

삭제

청구항 111

삭제

청구항 112

삭제

청구항 113

삭제

청구항 114

삭제

청구항 115

삭제

청구항 116

삭제

청구항 117

삭제

청구항 118

삭제

청구항 119

삭제

청구항 120

삭제

청구항 121

삭제

청구항 122

삭제

청구항 123

삭제

청구항 124

삭제

청구항 125

삭제

청구항 126

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 상호 참조

[0002] 본 출원은 2017년 5월 19일에 출원된 미국 가출원 번호 62/508,968을 우선권 주장하고, 이는 전문이 본원에 참조로 포함된다.

[0003] 서열 목록

[0004] 본 출원은 ASCII 포맷으로 전자 제출되고, 이에 의해 전문이 참조로 포함되는 서열 목록을 함유한다. 2018년 5월 17일에 생성된 상기 ASCII 카피는 파일명이 46482-707_601_SL.txt 이고, 크기가 16,836 바이트이다.

배경 기술

[0005] 개시내용의 배경

[0006] 유전 공학은 질환 치료, 및 치료 또는 기타 용도를 위한 단백질의 생산을 위한 엄청난 잠재력이 있다. 약물 또는 수술에 의존하는 대신, 환자, 특히 근원적인 유전적 요인이 있는 환자가 근원적인 원인을 직접적으로 표적화함으로써 치료될 수 있다. 또한, 근원적인 원인 자체를 표적화함으로써, 유전자 요법은 환자를 효과적으로 치유할 잠재력이 있다. 그러나, 그럼에도 불구하고, 유전자 요법의 임상 적용은 여전히 여러 측면에서 개선을 필요로 한다. 한가지 난제는 하나 이상의 표적 조직에서의 높은 트랜스진 발현율, 또는 하나 이상의 표적 조직에서의 높은 유전자 편집 효율을 달성하는 것이다. 통상적으로 사용되는 벡터의 패키징 제약 (또는 클로닝 용량)에 의해 또 다른 난제가 도입된다. 작동가능하게 연결된 트랜스진의 높은 발현을 구동시킬 수 있는 짧은 조절 요소가 요구된다.

발명의 내용

[0007] 개시내용의 개요

[0008] 트랜스진의 높은 발현을 구동시키기 위한 조성물 및 방법이 본원에서 기술된다. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우, 하나 이상의 표적 세포 유형 또는 조직에서 트랜스진의 높은 (또는 증가된) 발현을 촉진하거나 발생시킬 수 있는 하나 이상의 인간 또는 인간-유래 조절 요소 (RE)를 포함하는, 트랜스진의 높은 발현을 구동시키기 위한 조성물 및 방법 또한 본원에서 기술된다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 높은 또는 증가된 트랜스진 발현은 대조군, 예를 들어, 구성적 프로모터, CAG, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터 (SCP), TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 비교되어 결정된다. 본원에 개시된 조절 요소에 의한 높은 또는 증가된 트랜스진 발현을 결정하기 위한 비교에 사용될 수 있는 다른 대조군은 완충제 단독, minCMV, EFS, 벡터 단독, 또는 발현을 구동시키지 않는 서열을 포함한다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소는 세포에서 또는 생체 내에서, 시험관 내에서 및/또는 생체 외에서 트랜스진의 높은

발현을 구동시킨다. 일부 실시양태에서, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 기술된 조절 요소를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터는 세포, 대상체 또는 동물 모델에서 트랜스진의 높은 발현을 구동시키도록 또는 세포, 대상체 또는 동물 모델에서 치료적으로 효과적인 수준의 트랜스진 발현을 발생시키도록 임의의 발현 시스템 또는 유전자 요법에서 사용하기 위해 개조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 대형 트랜스진 (예를 들어, 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb 초과인 트랜스진)에 작동가능하게 연결되어 세포에서 또는 생체 내에서 트랜스진의 높은 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 세포에서 또는 생체 내에서의 트랜스진의 이같은 높은 발현은 상기 RE가 없는 트랜스진 발현에 대해 상대적으로, 여기서 RE가 있는 트랜스진 발현은 RE가 없는 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 또는 100배 초과이다. 일부 경우에, 하나 이상의 RE는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 상이한 세포 유형에서 이같은 높은 트랜스진 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 전신 투여를 위해 개조된 유전자 요법 치료를 위한 트랜스진에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 간 또는 간세포에서의 발현을 위해 개조된 유전자 요법 치료를 위한 트랜스진에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자를 조정하는 DNA 결합 단백질, 예를 들어, 전사 조정인자이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 프로모터 서열, 인트론 서열, 5' UTR 서열, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 인간-유래 서열 (또는 인간 기준 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열)이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 길이가 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp 이하이다. 일부 경우에, 발현 구축물 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)은 본 개시내용의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 외인성 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 외인성 RE 서열은 표 1에 열거된 서열 또는 서열식별번호(SEQ ID NO): 1-2, 13-17, 및 22-41로부터 선택되거나, 또는 각각의 외인성 RE 서열은 표 1의 서열 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41을 포함하거나, 또는 각각의 외인성 RE 서열은 표 1의 서열 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41에 대한 서열 동일성 (예를 들어, 국소적 서열 동일성) (예를 들어, BLAST에 의해 측정된 바와 같은 서열 동일성)이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)는 임의의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RE 서열은 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, 표 1 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 경우에, 발현 구축물 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)은 본 개시내용의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 외인성 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RE 서열은 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, 표 1 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 국소적 서열 동일성은 BLAST를 사용하여 측정된다. 일부 경우에, 퍼센트 서열 동일성은 발현 카세트 내의 전체 외인성 RE를 포괄하는 전반적 서열 동일성을 지칭한다. 다른 경우에, 퍼센트 서열 동일성은 표 1에 열거된 서열 중 어느 하나에 상응하는 영역 또는 영역의 일부분을 포괄하는 국소적 서열 동일성을 지칭한다. 일부 경우에, 퍼센트 서열 동일성은 트랜스진을 포함하지 않는, 발현 카세트의 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하를 포함하는 영역을 포괄하는 국소적 서열 동일성을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 바람직하게는 본 개시내용의 RE를 기술하는 경우의 "비교적 짧은"은 45 bp, 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp,

250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하인 RE 서열이다. 비교적 짧은 RE의 예는 표 1에 열거된 서열, 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함하고, 또한 45 bp, 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이다.

[0009] 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE 서열은 트랜스진의 상류 또는 하류에 위치한다. 일부 경우에, 2개 이상의 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE가 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 여기서 RE 중 적어도 하나 이상이 트랜스진의 상류 또는 하류에 위치한다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 임의의 실시양태의 RE가 트랜스진의 전반적 발현을 구동시키도록 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 여기서 전반적 발현은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 세포 유형에서의 발현을 지칭한다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 임의의 실시양태의 RE가 트랜스진의 전반적 발현을 구동시키도록 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 여기서 RE 및 트랜스진을 포함하는 구축물은 전신으로, 예를 들어, 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장 또는 비경구 투여를 통해 전달될 수 있다. 다양한 실시양태에서, 본원에 개시된 RE는 인간-유래 (또는 인간 기준 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열)이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 비-천연 발생이다.

[0010] 일부 예에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 400 bp, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 조절 요소는 조절 요소가 없는 제2 발현 벡터에 비교하여 적어도 2배만큼 트랜스진의 전반적 발현 (예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 상이한 세포 유형에서의 발현)을 증가시킨다. 일부 경우에, 제2 발현 벡터는 대조군 프로모터, 예컨대 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 트랜스진을 포함한다.

[0011] 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 인간-유래 인트론 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 1-2를 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 1-2 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 서열식별번호: 1-2 중 어느 하나 이상을 포함하는 RE는 트랜스진의 상류, 하류, 또는 상류 및 하류 양쪽 모두에 위치한다.

[0012] 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 인간-유래 프로모터 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 13-17 및 22-41을 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 13-17 및 22-41 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 서열식별번호: 13-17 및 22-41 중 어느 하나 이상을 포함하는 RE는 트랜스진의 상류, 하류, 또는 상류 및 하류 양쪽 모두에 위치한다.

[0013] 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 인간-유래 인트론 서열 및/또는 프로모터 서열, 예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17 및 22-41 중 2개 이상; 또는 표 1에 열거된 서열 중 2개 이상을 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 표 1에 열거된 서열 중 하나 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상을 포함한다. 일부 경우에, 하나 이상의 표 1에 열거된 RE는 발현 카세트에서 트랜스진의 상류, 하류, 또는 상류 및 하류 양쪽 모두에 위치한다. 일부 경우에, 하나 이상의 표 1에 열거된 RE는 본원에 개시된 발현 카세트에서 트랜스진의 상류에 위치한다.

[0014] 일부 예에서, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 표 1 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 및 그의 임의의 조합으로부터 선택된 서열로 이루어진다. 일부 경우에, 2개 이상의 표 1에 열거된 RE가 링커 서열 없이 조합된다. 일부 경우에, 2개 이상의 표 1에 열거된 RE가 1-50 bp의 링커 서열을 사용하여 조합된다. 일부 경우에, 2개 이상의 표 1에 열거된 RE가 RE 서열의 5' 시작부가 2 bp, 5 bp, 10 bp, 20 bp, 30 bp, 40 bp, 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 400 bp, 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb 미만으로 떨어지도록 발현 구축물 내에 위치한다.

[0015] 일부 예에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp 또는 50 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 이에 의해 트랜스진 발현이 대조군 조절 요소, 예컨대 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프

로모터, UCL-HLP 프로모터 또는 CMVe 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높다. 일부 경우에, RE에 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현은 RE가 없는 UCL-HLP 프로모터에 연결된 동일한 트랜스진의 것보다 더 높다.

[0016] 일부 경우에, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질은 (i) 트랜스진을 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL, >1.5 IU/mL, >2.0 IU/mL, >2.5 IU/mL, 또는 >3.0 IU/mL의 농도; 및/또는 (ii) 코아테스트(Coatest) 검정법에 의해 측정 시 >20%, >25%, >30%, >35%, >40%, >45%, >50%, >55%, >60%, >65%, >70%, >75%, >80%, >85%, >90%, 또는 >95%의 활성을 갖는다. 일부 경우에, 이같은 활성 또는 트랜스진 발현은 동물 모델, 예컨대 마우스에서 검정된다. 일부 경우에, 본원에 기술된 트랜스진 발현 또는 활성은 세포 또는 마우스에 전달된 발현 카세트, 벡터, 바이러스 또는 DNA의 용량, 예컨대 마우스 당 16 μ g (또는 10-20 μ g)의 발현 벡터의 용량에 대해 정규화된다.

[0017] 일부 경우에, 벡터는 크기가 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp인 서열을 갖는 인간-유래 조절 요소가 세포에서 또는 생체 내에서 이러한 조절 요소의 맥락에서 발견되지 않거나 또는 정상적으로는 이러한 조절 요소에 연결되지 않는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 것을 포함한다.

[0018] 일부 경우에, 본원에 기술된 발현 카세트 또는 벡터는 인트론 서열, 프로모터 서열, 인핸서 서열, 또는 그의 조합인 조절 요소를 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 또는 41, 또는 그의 조합, 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열인 조절 요소를 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 리포터 유전자, 예를 들어, 루시페라제인 트랜스진을 포함한다. 일부 경우에, 리포터 유전자, 예를 들어, 루시페라제를 트랜스진으로서 사용하는 것은 전체 마우스에서 측정 시 1×10^8 개의 광자/초를 초과하는 전반적 발현을 발생시키거나, 또는 동물, 예를 들어, 마우스에서 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 세포 유형에서 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 본원에 기술된 발현 카세트 또는 벡터의 활성 또는 트랜스진 발현은 마우스에 전달된 발현 카세트, 벡터, 바이러스, 또는 DNA의 용량, 예컨대 마우스 당 12 μ g 또는 10-20 μ g의 발현 벡터의 용량에 대해 정규화된다. 일부 경우에, 본원에 개시된 트랜스진의 내인성 버전은 세포에서 또는 생체 내에서 이러한 조절 요소에 연결되지 않거나, 또는 세포에서 또는 생체 내에서 정상적으로는 이러한 조절 요소에 연결되지 않거나 이러한 조절 요소와 회합되지 않는다. 일부 경우에, 트랜스진의 전반적 발현은 CMV 프로모터, CMVe 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, 및 UCL-HLP 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 조절 요소가 있는 벡터를 사용하는 트랜스진 발현보다 더 큰 수준이다. 일부 경우에, 발현은 생체 내에서 (예를 들어, 마우스에서 또는 상이한 인간 세포주들에서) 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7개 이상의 상이한 세포 유형에서 검출가능하다. 일부 경우에, 상이한 세포 유형은 폐포 세포, 심근세포, 상피 세포, 간세포, 장 세포, 근세포, 뉴런, 및 신장 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 본원에 개시된 바와 같은 조절 요소는 인핸서, 프로모터, 5' UTR 서열, 인트론 서열, 또는 그의 임의의 조합이거나 또는 이를 포함한다. 일부 경우에, 본원에 개시된 바와 같은 조절 요소는 프로모터 서열이거나 또는 이를 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 CMV 프로모터, CMV, 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, EFS 프로모터, 또는 CMVe 인핸서/CMV 프로모터 조합, 또는 그의 임의의 조합, 변이체 또는 단편인 프로모터를 포함한다.

[0019] 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트는 하나 이상의 전사후 변형 부위를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 발현 벡터 또는 카세트는 Cas9, saCas9, 또는 dCas9인 트랜스진을 포함한다. 일부 경우에, 발현 벡터 또는 카세트는 DNA 결합 단백질 또는 전사 조정인자, 예를 들어, 전사 활성화인자인 트랜스진을 포함한다. 일부 경우에, 이같은 전사 조정인자 단백질은 세포 내에서 또는 생체 내에서 내인성 유전자의 발현을 증가시키도록 내인성 유전자 상에서 작용한다.

[0020] 다른 예에서, 발현 벡터는 생체 내에서 제VIII인자를 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL의 농도로 제VIII인자의 발현을 구동시킬 수 있는 본원에 개시된 조절 서열에 작동가능하게 연결된 제VIII인자 트랜스진을 포함한다.

[0021] 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태에서의 트랜스진은 반수체기능부전과 연관된 유전자이다. 일부 경우에, 이같은 반수체기능부전은 간 또는 간세포에 존재한다. 일부 경우에, 트랜스진은 제VIII인자, Cas9, 호르

몬, 성장 또는 분화 인자, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체, 남성 섬유증 막황단 조절인자, I, II, III, 또는 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자, 베타글로빈 또는 지질단백질 리파제, 또는 그의 변이체, 서브유닛 또는 기능성 단편 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체, 서브유닛 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다.

[0022] 일부 경우에, 본원에 기술된 바와 같은 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나는 바이러스 입자이거나, 또는 바이러스 입자를 사용하여 전달되거나, 또는 바이러스 입자 내에 캡시드화되거나 바이러스 입자 내에서 제공된다. 일부 경우에, 바이러스 입자는 아데노-연관 바이러스, 또는 AAV이다. 일부 경우에, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 및 scAAV로 이루어진 군으로부터 선택된다. 다른 경우에, 바이러스 입자는 렌티바이러스이다. 일부 경우에, 바이러스 입자는 아데노바이러스이다.

[0023] 일부 예에서, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나는 치료용 트랜스진인 트랜스진을 포함한다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 제VIII인자, Cas9, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장 또는 분화 인자, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체, 남성 섬유증 막황단 조절인자, I, II, III, 또는 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자, 베타글로빈 또는 지질단백질 리파제, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체, 서브유닛 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1 (또는 ATP8B1), MDR3 (또는 ABCB4), ABCBB (또는 ABCB11), CDKL5, CNTN2 (또는 CNTNAP2), ZEB2, 제V인자, 제VIII인자, 제IX인자, 또는 제X인자, 또는 그의 변이체, 서브유닛 또는 기능성 단편 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체, 서브유닛 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다.

[0024] 일부 예에서, 트랜스진을 동물 (예를 들어, 포유동물, 인간, 마우스 등) 내의 복수의 상이한 조직 또는 세포 유형으로 전달하는 방법은 상기 동물에게 본원에 개시된 발현 벡터 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 투여는, 예를 들어, 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장, 또는 비경구 투여를 통한, 전신 투여를 포함한다.

[0025] 일부 예에서, 단백질, 항체 또는 기타 생물체제의 생산 방법은 세포를 본원에 개시된 발현 벡터 중 어느 하나와 접촉시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 단백질 생산에 사용된 세포는 CHO 세포 또는 HEK293T 세포이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 발현 구축물은 유전자 요법 치료, 예를 들어, 간세포, 신장 세포 및/또는 뉴런 (또는 중추신경계 (CNS))에서의 발현에 사용된다. 다른 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 발현 구축물은 생체 외에서, 예를 들어, 임의의 포유동물 또는 임의의 인간 세포주, 예컨대 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 또는 CNS 세포에서 단백질을 생산하는데 사용된다.

[0026] 일부 예에서, 트랜스제닉 동물 또는 식물을 생산하는 방법은 동물 또는 식물에 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나에서 사용된 조절 요소는 비교적 짧은, 또는 40-50 bp, 50-60 bp, 60-70 bp, 70-80 bp, 80-90 bp, 90-100 bp, 100-110 bp, 110-120 bp, 또는 120-130 bp이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 카세트 내의 RE는 49 bp, 56 bp, 100 bp, 117 bp, 259 bp, 또는 266 bp이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나에서 사용된 조절 요소는 45-50 bp, 50-60 bp, 45-60 bp, 90-117 bp, 95-110 bp, 115-120 bp, 250-260 bp, 또는 260-270 bp이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나에서 사용된 조절 요소는 약 100 bp이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나에서 사용된 조절 요소는 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp 이하이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 벡터 또는 카세트 중 어느 하나에서 사용된 조절 요소는 100 bp 이하이다. 일부 경우에, 2개 이상의 비교적 짧은 본원에 개시된 RE가 조합되고, 트랜스진에 작동가능하게 연결

되어, 트랜스진의 높은 발현을 구동시킨다. 일부 경우에, 2개 이상의 RE는 어떠한 개재 뉴클레오티드도 없이 조합될 수 있거나, 또는 1-50 bp의 링커를 사용하여 조합된다.

[0027]

일부 측면에서, 본원에 개시된 발현 카세트는 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 조절 요소는 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 단편 또는 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%인 서열 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 hg19의 인간 서열로부터 유래된다. 일부 경우에, 조절 요소는 비-천연 발생이다. 일부 경우에, 조절 요소는 인트론 서열을 포함한다. 일부 경우에, 인트론 서열은 프로모터와 치료용 트랜스진 사이에 위치한다. 일부 경우에, 조절 요소는 프로모터 서열을 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 카세트 내의 유일한 프로모터이다. 일부 경우에, 조절 요소는 100 bp 이하이다. 일부 경우에, 조절 요소는 60 bp 이하이다. 일부 경우에, 조절 요소는 50 bp 이하이다. 일부 경우에, 발현 카세트는 rAAV의 일부분이다. 일부 경우에, rAAV는 rAAV8이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 ATP7B이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 제VIII인자이다. 일부 측면에서, 윌슨병을 치료하는 방법은 트랜스진이 ATP7B인 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, ATP7B에서의 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법은 트랜스진이 ATP7B인 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 응혈 장애를 치료하는 방법은 트랜스진이 제VIII인자인 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법은 트랜스진이 ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 및 제12인자; 및 그의 변이체 또는 기능성 단편으로부터 선택되는 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법은 트랜스진이 내인성 유전자의 발현을 조정하는 전사 조정인자인 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법은 트랜스진이 하기 내인성 유전자 중 어느 하나의 전사 활성화인자인 본원에 개시된 발현 카세트를 투여하는 것을 포함한다: ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 및 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 및 제12인자.

[0028]

일부 측면에서, AAV 발현 카세트는 적어도 3 kb의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 120 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 조절 요소는 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 경우의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 2배만큼 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 조절 요소는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41로부터 선택된다. 일부 경우에, 조절 요소는 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진 발현 증가는 적어도 50배이다. 일부 경우에, 트랜스진 발현 증가는 적어도 100배이다. 일부 경우에, 트랜스진 발현 증가는 적어도 2개의 상이한 세포 유형 (예를 들어, 간세포 및 신장 세포)에서 발생한다. 일부 경우에, 트랜스진 발현 증가는 적어도 3개의 상이한 세포 유형 (예를 들어, 간세포, 신장 세포, 뉴런, 및/또는 상피 세포)에서 발생한다. 일부 경우에, 조절 요소는 서열식별번호: 22-41 중 어느 하나 이상을 포함하고, 다른 프로모터 서열이 발현 카세트 내에 존재하지 않는다. 일부 경우에, 조절 요소는 트랜스진의 상류에 위치한다. 일부 경우에, 조절 요소는 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 프로모터의 하류에 위치한다. 일부 경우에, 트랜스진은 ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 및 제12인자; 및 그의 변이체 또는 기능성 단편으로부터 선택된다. 일부 경우에, 트랜스진은 ATP7A 또는 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 및 제12인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제8인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 유전자 편집 단백질이다. 일부 경우에, 유전자 편집 단백질은 Cas (예를 들어, Cas9)이다. 일부 경우에, 트랜스진은 DNA 결합 단백질이다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자의 발현을 증가시키는 전사 활성화인자이다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자의 발현을 감소시키는 전사 억제인자이다. 일부 경우에, 전사 활성화인자는 하기 내인성 유전자 중 어느 하나의 발현을 증가시킨다: ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 및 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 및 제12인자. 일부 경우에, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 및 scAAV로 이루어진 군으로부터 선택된다.

[0029]

일부 측면에서, 재조합 단백질을 생산하는 방법은 단백질을 코딩하는 서열을 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및

22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%인 서열 중 하나 이상과 작동가능하게 연결시키는 것을 포함한다.

[0030] 일부 측면에서, 간 질환 또는 병태를 치료하는 방법은 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%인 서열로부터 선택된 하나 이상의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 치료용 트랜스진을 포함하는 유전자 요법을 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 간 질환 또는 병태는 윌슨병이다. 일부 경우에, 간 질환 또는 병태는 응혈 장애이다. 일부 경우에, 트랜스진은 ATP7A 또는 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 제12인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제8인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 조절 요소는 적어도 2개의 세포 유형에서 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 조절 요소는 적어도 3개의 세포 유형에서 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 조절 요소는 간세포에서 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 조절 요소는 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 경우의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 2배인 수준으로 트랜스진 발현 증가를 발생시킨다. 일부 경우에, 유전자 요법은 AAV이다. 일부 경우에, AAV는 AAV8이다.

[0031] 일부 측면에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 100 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 조절 요소는 조절 요소가 없는 제2 발현 벡터에 비교하여 적어도 2배만큼 트랜스진의 전반적 발현을 증가시킨다. 일부 경우에, 제2 발현 벡터는 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 트랜스진을 포함한다.

[0032] 일부 측면에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 100 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 이에 의해 트랜스진 발현이 CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높다. 일부 경우에, 트랜스진 발현은 UCL-HLP 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높다. 일부 측면에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질은 (i) 트랜스진을 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL의 농도; 및/또는 (ii) 코아테스트 검정법에 의해 측정 시 $>25\%$ 의 활성을 갖는다. 일부 측면에서, 본원에 개시된 벡터는 크기가 100 bp 이하인 서열을 갖는 인간-유래 조절 요소가 세포에서 또는 생체 내에서 이러한 조절 요소의 맥락에서 발견되지 않는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 것을 포함한다. 일부 경우에, 본원에 개시된 벡터는 인트론 서열인 조절 요소를 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2, 또는 이에 대한 상동성이 적어도 80%인 서열이다. 일부 경우에, 루시페라제를 트랜스진으로서 사용하는 것은 전체 마우스에서 측정 시 1×10^8 개의 광자/초를 초과하는 전반적 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 활성 또는 트랜스진 발현은 마우스 당 16 μ g의 발현 벡터의 용량에 상응한다. 일부 경우에, 활성 또는 트랜스진 발현은 마우스 당 12 μ g의 발현 벡터의 용량에 상응한다. 일부 경우에, 트랜스진의 내인성 버전은 생체 내에서 이러한 조절 요소에 연결되지 않는다. 일부 경우에, 트랜스진의 전반적 발현은 CMV 프로모터, CMVe 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, 및 UCL-HLP 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 조절 요소가 있는 벡터를 사용하는 트랜스진 발현보다 더 큰 수준이다. 일부 경우에, 발현은 마우스에서, 생체 내에서, 또는 세포주에서 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 상이한 세포 유형에서 검출가능하다. 일부 경우에, 상이한 세포 유형은 폐포 세포, 심근 세포, 상피 세포, 간세포, 장 세포, 근세포, 뉴런, 및 신장 세포로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 조절 요소는 인핸서이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 벡터는 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 프로모터는 CMV 프로모터, CMV, 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, EFS 프로모터, 또는 CMVe 인핸서/CMV 프로모터 조합이다. 일부 경우에, 본원에 개시된 벡터는 하나 이상의 전사후 변형 부위를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진은 Cas9이다. 일부 경우에, 트랜스진은 saCas9이다.

[0033] 일부 측면에서, 발현 벡터는 생체 내에서 제VIII인자를 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL의 농도로 제VIII인자의 발현을 구동시킬 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 제VIII인자 트랜스진을 포함한다. 일부 경우에, 바이러스 입자가 본원에 개시된 발현 벡터를 포함한다. 일부 경우에, 바이러스 입자는 AAV이다. 일부 경우에, AAV는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 및 scAAV로 이루어진 군으로부터 선택된다. 일부 경우에, 바이러스 입자는 렌티바이러스이다. 일부 경우에, 바이러스 입자는 아데노바이러스이다. 일부 경우에, 트랜스진은 치료용 트랜스진이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 제VIII인자, Cas9, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장 또는 분화 인자, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항

체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체, 남성 섬유증 막횡단 조절인자, I, II, III, 또는 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자, 베타글로빈, 또는 지질단백질 리파제이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진을 동물 내의 복수의 상이한 조직 또는 세포 유형으로 전달하는 방법은 상기 동물에게 본원에 개시된 발현 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 단백질 생산 방법은 세포에 본원에 개시된 발현 벡터를 형질감염시키는 것을 포함한다. 일부 경우에, 세포는 CHO 세포 또는 HEK293T 세포이다. 일부 경우에, 트랜스제닉 동물 또는 식물을 생산하는 방법은 동물 또는 식물에 임의의 본원에 개시된 실시양태의 발현 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 40-50 bp이다. 일부 경우에, 조절 요소는 50-60 bp이다.

[0034] 일부 측면에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 여기서 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질은 (i) 트랜스진을 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >0.1 IU/mL의 농도; 및/또는 (ii) 코아테스트 검정법에 의해 측정 시 > 10%의 활성을 갖는다. 다른 측면에서, 발현 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 <120 bp의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 이에 의해 트랜스진 발현이 UCL-HLP 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높다. 일부 경우에, 조절 요소는 프로모터이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 DNA 결합 도메인 및 전사 조절 도메인을 포함하는 융합 단백질이다.

[0035] **참고로 포함됨**

[0036] 본 명세서에서 언급된 모든 간행물, 특허, 및 특허 출원은 각각의 개별적인 간행물, 특허 또는 특허 출원이 참조로 포함되는 것으로 명확하게, 그리고 개별적으로 지시되는 것과 동일한 정도로 본원에 참조로 포함된다.

도면의 간단한 설명

[0037] **도면의 간단한 설명**

본 발명의 신규 특색이 첨부된 청구범위에서 구체적으로 기재된다. 본 발명의 원리가 활용된 예시적인 실시양태가 기재된 하기의 상세한 설명, 및 하기와 같은 첨부된 도면을 참조로 본 발명의 특색 및 장점에 대한 더 양호한 이해가 수득될 것이다.

도 1a는 상이한 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2)를 포함하는 플라스미드의 정규화된 루시퍼라제 값을 도해하여, HEK293T 세포에서의 루시퍼라제 발현에 대한 RE의 효과를 실연한다. 예를 들어, 서열식별번호: 3 (최소 CMV (minCMV) 프로모터와 조합된 서열식별번호: 1을 포함함)은 minCMV 프로모터 단독에 의해 구동된 발현보다 약 1.4배 더 높고, SCP 프로모터에 의해 구동된 발현보다 약 60배 더 높은 수준으로 루시퍼라제 발현을 구동시켰다.

도 1b는 HEK293T 세포에서의 SCP, minCMV, 및 CAG에 비교된 각각의 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 4)의 크기-정규화 활성 (정규화된 루시퍼라제 활성을 염기 쌍 단위의 조절 요소의 길이로 나눔으로써 계산됨)을 도해한다. 서열식별번호: 4 (minCMV 프로모터에 연결된 서열식별번호: 2를 포함함)는 minCMV 프로모터 단독보다 약 3.5배 더 높고, SCP 프로모터보다 약 140배 더 높은 수준으로 크기-정규화 활성을 초래하였다.

도 1c는 음성 대조군 및 양성 대조군 (서열식별번호: 4)에 비교된 조합된 서열식별번호: 17 및 22, 조합된 서열식별번호: 16 및 23, 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 및 서열식별번호: 33 조절 요소의 정규화된 루시퍼라제 발현을 도해한다. 모든 RE가 높은 수준의 정규화된 루시퍼라제 발현을 발생시켰고, 이는 서열식별번호: 4에 의해 구동된 발현 수준에 필적하였다.

도 1d는 HEK293T 세포에서의 음성 대조군, 양성 대조군 (서열식별번호: 4), CMV+CMVe, 및 CMV 단독에 비교된 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 26, 또는 서열식별번호: 27 조절 요소의 정규화된 루시퍼라제 발현을 도해한다. 각각의 조절 요소가 CMV 단독 및 CMV+CMVe보다 더 높은 루시퍼라제 발현을 구동시켰다.

도 1e는 HEK293T 세포에서의 음성 대조군에 비교된 조합된 서열식별번호: 17 및 22, 조합된 서열식별번호: 16 및 23, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 35, 서열식별번호: 36, 서열식별번호: 37, 서열식별번호: 38, 서열식별번호: 39, 서열식별번호: 40, 또는 서열식별번호: 41 조절 요소의 정규화된 루시퍼라제 발현을 도해한다. 테스트된 각각의 조절 요소가 음성 대조군보다 더 높은 루시퍼라제 발현을 구동시켰다.

도 2a는 상이한 조절 요소 (SCP, SerpE_TTR, Protol, minCMV, UCL-HLP, CMVe, 서열식별번호: 3, 또는 서열식별번호: 4)의 제어 하의 루시퍼라제를 포함하는 발현 카세트가 투약된 마우스에서의 루시퍼라제 발현을 도해한다.

도 2b는 **도 2a**의 발현 카세트를 주사한 3마리의 마우스에서 관찰된 루시퍼라제 발현으로부터의 평균 총 발광 (광자/초)의 정량을 도해한다.

도 3a는 효소-결합 면역흡착 검정법에 의해 측정된 마우스에서의 인간 제8인자 (FVIII)의 발현에 대한 다양한 조절 요소 (UCL-HLP, 서열식별번호: 3, 또는 서열식별번호: 4)의 효과를 도해한다. 서열식별번호: 3 또는 서열식별번호: 4를 포함하는 발현 카세트가 상승된 수준의 인간 FVIII (IU/mL)를 발생시켰다

도 3b는 인간 FVIII의 퍼센트 활성을 검정한 코아테스트 검정법에 의해 측정된 마우스에서의 인간 제8인자 (FVIII)의 발현에 대한 다양한 조절 요소 (UCL-HLP, 서열식별번호: 3, 또는 서열식별번호: 4)의 효과를 도해한다.

도 4a는 tdTomato (적색 형광 단백질 (RFP)로도 지칭됨)의 상류에서 제공된 종료 서열을 결실시키도록 Cas9 효소, 가이드 RNA, 및 여러 조절 요소 중 하나 (minCMV, EFS, 또는 서열식별번호: 4)를 함유하는 단일 AAV로 마우스 뇌의 치아 이랑에서 수행된 유전자 편집을 도해한다. 담회색에 의해 RFP가 표현된다. 서열식별번호: 4를 포함하는 발현 카세트가 음성 대조군, minCMV, 및 EFS에 비교하여 더 높은 RFP 발현에 이르는 유전자 편집을 발생시켰다.

도 4b는 **도 4a**의 RFP-발현 세포의 평균 개수의 정량을 도해한다.

도 5a는 본 개시내용의 조절 요소를 포함하는 rAAV 발현 카세트를 사용하여 여 생체 내에서 FVIII 녹아웃 마우스의 응혈 결핍을 치료하기 위해 사용된 유전자 요법의 예를 도해한다. PBS 대조군 또는 3^{11} 개의 게놈 카피/kg (gc/kg)의 용량 또는 3^{12} gc/kg의 용량의 본 개시내용의 조절 요소를 포함하는 rAAV로 처리된 마우스의 혈액 상실 (g) 결과를 처리되지 않은 비-녹아웃 마우스에 비교하였다. 3^{12} gc/kg의 용량의 rAAV 유전자 요법으로의 마우스 처리가 대조군 (예를 들어, PBS 대조군 마우스)에 비교하여 혈액 상실의 감소를 발생시켰다.

도 5b는 응혈까지의 분 (min) 단위의 마우스의 출혈 시간을 도해한다.

도 6a는 AAV ITR-L 및 ITR-R 및 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 조절 요소, 예를 들어, 인핸서, 프로모터, 안정성 요소, 및 폴리A 신호를 포함하는, 본 개시내용의 예시적인 발현 카세트, 벡터, 또는 플라스미드를 도해한다. 이같은 rAAV 벡터가 유전자 요법에 사용될 수 있다.

도 6b는 서열식별번호: 1 조절 요소가 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 조절 요소가 프로모터의 하류 및 유전자 및 폴리아데닐화 신호의 상류에 위치하는 발현 카세트의 근접도를 도해한다.

도 6c는 서열식별번호: 2 조절 요소가 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 조절 요소가 프로모터의 하류 및 유전자 및 폴리아데닐화 신호의 상류에 위치하는 발현 카세트를 도해한다.

도 7은 AAV ITR-L 및 ITR-R 및 대형 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 비교적 짧은 본 개시내용의 인간-유래 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 13-17 및 22-41)를 포함하고, 트랜스진의 크기가 적어도 3 kb 또는 3-5 kb인, 본 개시내용의 예시적인 발현 카세트, 벡터, 또는 플라스미드를 도해한다. 이같은 rAAV 벡터가 유전자 요법 치료에 사용될 수 있다.

도 8은 처리되지 않은 녹아웃 마우스 및 서열식별번호: 9 (UCL-HLP)에 비교된, 다양한 본 개시내용의 발현 카세트, 예를 들어, 서열식별번호: 13-17 조절 요소 중 어느 하나를 포함하는 발현 카세트로 처리된 마우스에서 발현된 인간 FVIII (IU/mL)의 농도를 도해한다.

도 9는 다양한 본 개시내용의 발현 카세트로 처리된 마우스에서의 인간 FVIII의 퍼센트 활성을 도해하고, 여기서 서열식별번호: 13-17은 조절 요소를 지칭한다.

도 10은 다양한 본 개시내용의 발현 카세트로 처리된 마우스로의 그래프 (g) 단위로 측정된 혈액 상실 실험을 도해하고, 여기서 서열식별번호: 13-17은 조절 요소를 지칭한다.

도 11은 다양한 본 개시내용의 발현 카세트로 처리된 마우스에서의 응혈까지의 분 (min) 단위의 출혈 시간을 도해하고, 여기서 서열식별번호: 13-17은 조절 요소를 지칭한다.

도 12는 1E10 (또는 10^{10})개의 게놈 카피/마우스 (gc/마우스), 1E11 (또는 10^{11}) gc/마우스, 또는 1E12 (또는 10^{12}) gc/마우스의 용량의 서열식별번호: 13의 서열을 갖는 조절 요소를 포함하는 발현 카세트에 처리된 마우스에서의 ATP7B의 상대적 발현 (Log_2)을 도해한다. 데이터는 생체 내에서 서열식별번호: 13을 포함하는 발현 카세트의 용량과 ATP7B의 발현 사이의 양의 상관관계를 나타냈다.

도 13은 서열식별번호: 4, 13, 14, 15, 16, 17, 또는 27의 서열을 갖는 조절 요소를 포함하고 5E11 gc/마우스의 용량으로 투여된 발현 카세트에 처리된 마우스에서의 EGFP의 상대적 발현 (Log_{10})을 도해한다. 데이터는 RE가, RNA 전사체에 의해 측정 시, 생체 내에서 마우스의 간에서 상승된 수준의 EGFP 발현을 발생시켰음을 나타냈다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0038] 개시내용의 상세한 설명

[0039] 본 개시내용은 트랜스진의 높은 발현을 위한 조성물 및 방법을 구상한다. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우, 하나 이상의 표적 세포 유형 또는 조직에서 트랜스진의 높은 (또는 증가된) 발현을 촉진하거나 발생시킬 수 있는 하나 이상의 인간 또는 인간-유래 조절 요소 (RE)를 포함하는 트랜스진의 높은 발현을 위한 조성물 및 방법이 또한 본원에서 기술된다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소는 세포에서 또는 생체 내에서, 시험관 내에서, 및/또는 생체 외에서 트랜스진의 높은 발현을 구동시킨다. 일부 실시양태에서, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 기술된 조절 요소를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터는 세포, 대상체 또는 동물 모델에서 트랜스진의 높은 발현을 구동시키도록 또는 세포, 대상체 또는 동물 모델에서 치료적으로 효과적인 수준의 트랜스진 발현을 발생시키도록 임의의 발현 시스템 또는 유전자 요법에서 사용하기 위해 개조될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 대형 트랜스진 (예를 들어, 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb를 초과하는 트랜스진)에 작동가능하게 연결되어 세포에서 또는 생체 내에서 트랜스진의 높은 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 세포 또는 생체 내에서의 트랜스진의 이같은 높은 발현은 상기 RE가 없는 트랜스진 발현에 대해 상대적이며, 여기서 RE가 있는 트랜스진 발현은 RE가 없는 트랜스진 발현에 비교하여 또는 음성 대조군 (예를 들어, 완충제 단독, 벡터 단독, 또는 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열을 포함하는 벡터)에 의한 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 150배, 적어도 200배, 적어도 250배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 적어도 1000배, 적어도 1010배, 적어도 1020배, 적어도 1030배, 적어도 1040배, 또는 적어도 1050배이다.

[0040] 일부 경우에, 하나 이상의 RE는 적어도 2개, 적어도 3개, 적어도 4개, 적어도 5개, 적어도 6개, 적어도 7개, 적어도 8개, 적어도 9개, 또는 적어도 10개의 상이한 세포 유형에서 높은 트랜스진 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 전신 투여를 위해 개조된 유전자 요법 치료를 위한 트랜스진에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 간 또는 간세포에서의 발현을 위해 개조된 유전자 요법 치료를 위한 트랜스진에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 트랜스진은 간 또는 간세포에서 발현되는 유전자이거나, 또는 간 질환 또는 병태에 관련된 유전자, 예를 들어, 윌슨병과 연관된 ATP7B; 제3형 진행성 가족성 간내 담즙정체와 연관된 ABCB4; 유전성 프록토스 못건담증과 연관된 ALDOB; 제IV형 글리코겐 축적병과 연관된 GBE1; 제I형 티로신혈증과 연관된 FAH; 아르기니노숙시네이트 리아제 결핍증과 연관된 ASL; 시트린 결핍증 (CTLN2, NICCD)과 연관된 SLC25A13; 콜레스테릴 에스테르 축적병과 연관된 LIPA; 알파-1 항트립신 결핍증과 연관된 SERPINA1; 남성 섬유증과 연관된 CFTR; 유전성 혈색소증과 연관된 HFE; 또는 알스트롬 증후군과 연관된 ALMS1이다. 일부 경우에, 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소는 유전된 간 질환, 예를 들어, 담즙산 합성 장애, 탄수화물 대사 장애, 아미노산 대사 장애, 요소 회로 장애, 또는 지질 대사 장애를 치료하기 위한 유전자 요법 치료에 사용된다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자를 조정하는 DNA 결합 단백질, 예를 들어, 전사 조정인자이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 프로모터 서열, 인트론 서열, 5' UTR 서열, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 인간-유래 서열 (또는 인간 기준 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열)이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 길이가 50 bp, 60 bp, 100 bp, 120 bp, 260 bp, 또는 270 bp 이하이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp,

130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp 이하이다. 일부 경우에, 발현 카세트 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)는 본 개시내용의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RE 서열은 표 1에 열거된 서열 또는 표 1의 서열에 대한 서열 동일성 (예를 들어, 국소적 서열 동일성)이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 발현 구축물 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)는 본 개시내용의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RE 서열은 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 260 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, 표 1의 서열 중 어느 하나 이상에 따른 서열을 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트 (예를 들어, 벡터, AAV, 또는 바이러스 벡터)는 본 개시내용의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE 서열을 포함하고, 여기서 각각의 RE 서열은 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 260 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, 표 1에 열거된 서열 중 어느 하나에 대한 국소적 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 국소적 서열 동일성은 BLAST를 사용하여 측정된다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE 서열은 트랜스진의 상류 또는 하류에 위치한다. 일부 경우에, 2개 이상의 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE가 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 여기서 RE 중 적어도 하나 이상이 트랜스진의 상류, 하류, 또는 상류 및 하류 양쪽 모두에 위치한다.

[0041] 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 임의의 실시양태의 RE가 트랜스진의 전반적 발현을 구동시키도록 트랜스진에 작동가능하게 연결되고, 여기서 전반적 발현은 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 상이한 세포 유형에서의 트랜스진 발현을 지칭한다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 임의의 실시양태의 RE가 대상체 또는 동물 내로 전신 전달된 경우 트랜스진의 전반적 발현을 구동시키도록 트랜스진에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 카세트의 전신 전달 또는 투여는 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장 및/또는 비경구 투여를 통한 전달이다. 다양한 실시양태에서, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 인간-유래 (또는 인간 기준 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열)이다. 일부 경우에, 임의의 본원에 개시된 실시양태의 RE는 비-천연 발생이다.

[0042] 유전 공학 방법으로 원하는 결과를 달성하도록 유전자를 교체하거나, 유전자를 변형시키거나 또는 유전자를 부가할 수 있다. 유전자 요법은 질환 또는 장애를 치료하기 위해 유전공학을 사용하는 것이다. 유전 공학은 하나 이상의 관심 단백질의 생산을 위해 세포 또는 생물을 변형시키는데 또한 사용될 수 있다. 유전 공학의 한 난제는 치료 효과를 달성하는데 충분히 높은 수준으로 또는 산업적/생산 수준을 달성하는데 충분히 높은 수준으로 발현을 구동시키는 조절 요소가 있는 것이다. 유전 공학의 또 다른 난제는 원하는 벡터 내에 맞기에 충분히 작지만, 관심 단백질에 대한 전체 코딩 서열 및 높은 발현을 확실하게 하는 충분한 조절 서열을 함유하는 발현 카세트를 디자인하는 것이다. 벡터 또는 바이러스 발현 벡터의 클로닝 용량이 대형 트랜스진 발현을 위한 특별한 난제이다. 예를 들어, AAV 벡터는 패키징 용량이 ~4.8 kb이고, 렌티바이러스는 용량이 ~8 kb이고, 아데노바이러스는 용량이 ~7.5 kb이며, 알파바이러스는 용량이 ~7.5 kb이다. 일부 바이러스는 패키징 용량이 더 크고, 예를 들어 헤르페스바이러스는 용량이 >30 kb이고, 우두는 용량이 ~25 kb이지만, 다른 바이러스를 사용하는 것에 장점이 있을 수 있다. 예를 들어, AAV의 장점은 낮은 병원성, 숙주 게놈 내로의 매우 낮은 통합 빈도, 및 분열 및 비-분열 세포를 감염시키는 능력을 포함한다.

[0043] 유전자 요법의 한 난제는 트랜스진이 생체 내에서 치료 효과를 발생시키는 것을 확실하게 하기 위해 적어도 하나 이상의 표적 세포 유형 또는 조직에서 충분히 높은 수준으로 발현되는 것을 확실하게 하는 것이다. 일부 경우에, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 세포 유형 또는 조직, 예를 들어, 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 및/또는 CNS 세포에서 트랜스진 발현 증가가 요망된다. 일부 경우에, 단백질 합성을 위해 생체 외에서 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 세포주, 예를 들어, 포유 동물 또는 인간 세포주, 예컨대 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 면역 세포, 및/또는 CNS 세포에서 트랜스진 발현 증가가 요망된다. 유전자 요법을 위한 전통적인 방법은 종종 전달 방법 및/또는 비히클 (예를 들어, 사용된 바이러스 또는 바이러스의 캡시드 서열을 다양하게 하는 것)에 의존하였다. 이러한 분야의 한 기술적 난제는, 특히 트랜스진이 대형인 경우에, 치료 효과를 발휘하기 위해 하나 이상의 세포

유형 또는 조직에서 유전자 발현 수준을 증가시키는 것이다. 대형 트랜스진 발현이 기술적 난제와 연관되는데, 벡터, 예를 들어, 바이러스 또는 AAV 벡터의 클로닝 용량이 제한되기 때문이다. 더 큰 트랜스진 (예를 들어, 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb를 초과하는 트랜스진)을 발현시키기 위해, 벡터 내에 더 큰 트랜스진을 수용하도록 더 작은 조절 요소가 사용되어야 한다. 따라서, RE가 없는 발현, 음성 대조군 (예를 들어, 어떠한 발현도 구동시키지 않는 것으로 공지된 서열, 빈 벡터, 또는 완충제 단독 대조군)에 비교하여, 또는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 프로모터 (예를 들어, CMV 프로모터, SCP, UCL-HLP 등)에 비교하여 세포에서 또는 생체 내에서 트랜스진 발현 증가를 초래하는 신규한 짧은 조절 요소 (예를 들어, 300 bp, 250 bp, 200 bp, 150 bp, 140 bp, 130 bp, 120 bp, 110 bp, 100 bp, 70 bp, 또는 50 bp 이하인 RE)가 요구된다.

[0044] 본원에서 사용된 바와 같이, 문맥 상 명확하게 달리 지시되지 않는 한, 단수 형태는 복수 형태를 또한 포함하도록 의도된다. 또한, 용어 "~을 포함하는", "~을 포함한다", "~을 갖는", "~을 갖는다", "~이 있는" 또는 그의 변형이 상세한 설명 및/또는 청구범위에서 사용되는 한, 이같은 용어들은 용어 "~을 포함하는"과 유사한 방식으로 포괄적인 것으로 의도된다.

[0045] 용어 "약" 또는 "대략적으로"는 관련 분야의 통상의 기술자에 의해 결정된 바와 같은 특정 값에 대한 허용가능한 오차 범위 내인 것을 의미하고, 이는 어떻게 값이 측정 또는 결정되는지, 즉 측정 시스템의 한계에 부분적으로 좌우될 것이다. 예를 들어, "약"은 관련 분야의 관례에 따른 1 또는 1 초과의 표준 편차 내인 것을 의미할 수 있다. 대안적으로, "약"은 소정의 값의 20% 이하, 15% 이하, 10% 이하, 5% 이하, 또는 1% 이하의 범위를 의미할 수 있다.

[0046] 용어 "결정하는", "측정하는", "평가하는(evaluating)", "평가하는(assessing)", "검정하는", "분석하는" 및 이들의 문법적 등가물은 임의 형태의 측정을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있고, 요소가 존재하는지 또는 그렇지 않은지를 결정하는 것 (예를 들어, 검출)을 포함한다. 이러한 용어들은 정량적 및/또는 정성적 결정 양쪽 모두를 포함할 수 있다. 평가는 상대적 또는 절대적일 수 있다.

[0047] 용어 "발현"은 핵산 서열 또는 폴리뉴클레오티드가 DNA 주형으로부터 (예컨대 mRNA 또는 기타 RNA 전사체로) 전사되는 프로세스 및/또는 전사된 mRNA가 후속하여 펩티드, 폴리펩티드 또는 단백질로 번역되는 프로세스를 지칭한다. 전사체 및 코딩된 폴리펩티드는 총괄적으로 "유전자 산물"로 지칭될 수 있다. 폴리뉴클레오티드가 게놈 DNA로부터 유래되는 경우, 진핵생물 세포에서 발현은 mRNA의 스플라이싱을 포함할 수 있다. 일부 경우에, 전반적 발현이 요망되고, 이는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10개 이상의 상이한 세포 유형 또는 조직에서의 유전자 (예를 들어, 트랜스진)의 발현, 또는 복수의 세포 유형에서의 유전자의 발현을 지칭한다. 세포 유형은 상이한 세포 마커, 형태, 표현형, 유전자형, 기능을 갖는 것 및/또는 세포 유형을 분류하기 위한 임의의 다른 수단에 의해 구별된다. 일부 경우에, 상이한 세포 유형 또는 조직은 생체 내의 세포 유형 또는 조직을 지칭한다. 일부 경우에, 상이한 세포 유형 또는 조직은 생체 외의 세포 유형 또는 조직을 지칭한다. 일부 경우에, 상이한 세포 유형 또는 조직은 상이한 포유동물 세포주, 인간 세포주, 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 및/또는 CNS 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본원에서 사용된 바와 같이, "작동가능하게 연결된", "작동가능한 연결", "작동적으로 연결된" 또는 그의 문법적 등가물은 요소들이 이들이 예상되는 방식으로 작동하도록 허용하는 관계에 있는, 유전 요소, 예를 들어, 프로모터, 인핸서, 폴리아데닐화 서열 등의 병치를 지칭한다. 예를 들어, 프로모터 및/또는 인핸서 서열을 포함할 수 있는 조절 요소가 코딩 서열의 전사를 개시하는 것을 돕는 경우에 조절 요소가 코딩 영역에 작동적으로 연결된다. 이러한 기능적 관계가 유지되는 한 조절 요소와 코딩 영역 사이에 개재 잔기가 있을 수 있다.

[0049] 본원에서 사용된 바와 같은 "벡터"는 폴리뉴클레오티드를 포함하거나 이와 회합되고 이러한 폴리뉴클레오티드를 세포에 전달하는 것을 매개하는데 사용될 수 있는 거대분자 또는 거대분자들의 연합을 지칭한다. 벡터의 예는 플라스미드, 바이러스 벡터, 리포솜, 및 기타 유전자 전달 비히클을 포함한다. 일반적으로 벡터는 표적에서의 유전자의 발현을 용이하게 하기 위해 유전자에 작동적으로 연결된 유전 요소, 예를 들어, 조절 요소를 포함한다. 조절 요소 및 발현을 위해 이들이 작동가능하게 연결된 유전자 또는 유전자들의 조합이 "발현 카세트"로서 지칭된다.

[0050] 용어 "AAV"는 아데노-연관 바이러스의 약어이고, 바이러스 자체 또는 그의 유도체를 지칭하는데 사용될 수 있다. 이러한 용어는 다르게 요구되는 경우를 제외한 모든 혈청형, 아유형, 및 천연 발생 및 재조합 형태 양쪽 모두를 포괄한다. 약어 "rAAV"는 재조합 아데노-연관 바이러스를 지칭하고, 재조합 AAV 벡터 ("rAAV 벡터")로도 지칭된다. 용어 "AAV"는 AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12,

rh10, 및 그의 하이브리드, 조류 AAV, 소 AAV, 개 AAV, 말 AAV, 영장류 AAV, 비-영장류 AAV, 및 양 AAV를 포함한다. AAV의 다양한 혈청형의 게놈 서열, 뿐만 아니라 천연 말단 반복물 (TR), Rep 단백질, 및 캡시드 서브유닛의 서열이 관련 분야에 공지되어 있다. 이같은 서열들은 문헌에서 또는 공공 데이터베이스 예컨대 진뱅크 (GenBank)에서 확인될 수 있다. 본원에서 사용된 바와 같은 "rAAV 벡터"는 AAV 기원이 아닌 폴리뉴클레오티드 서열 (즉, AAV에 대해 이중성인 폴리뉴클레오티드), 전형적으로는 세포의 유전적 형질전환을 위한 관심 서열을 포함하는 AAV 벡터를 지칭한다. 일반적으로, 적어도 1개, 일반적으로는 2개의 AAV 역위 말단 반복 서열 (ITR)이 이중성 폴리뉴클레오티드에 플랭킹된다. 용어 rAAV 벡터는 rAAV 벡터 입자 및 rAAV 벡터 플라스미드 양쪽 모두를 포괄한다. rAAV 벡터는 단일-가닥 (ssAAV) 또는 자가-상보적 (scAAV)일 수 있다. "AAV 바이러스" 또는 "AAV 바이러스 입자" 또는 "rAAV 벡터 입자"는 적어도 하나의 AAV 캡시드 단백질 및 캡시드화 폴리뉴클레오티드 rAAV 벡터로 구성된 바이러스 입자를 지칭한다. 입자가 이중성 폴리뉴클레오티드 (즉, 야생형 AAV 게놈 이외의 폴리뉴클레오티드 예컨대 포유동물 세포에 전달될 트랜스진)를 포함하는 경우, 전형적으로 이는 "rAAV 벡터 입자" 또는 간단히 "rAAV 벡터"로 지칭된다. 따라서, rAAV 입자의 생산은 rAAV 벡터의 생산을 필수적으로 포함하는데, 이같은 벡터가 rAAV 입자 내에 함유되기 때문이다.

[0051] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료한다", "치료", "요법" 등은 완화시키는 것, 진행을 지연시키거나 느리게 하는 것, 효과 또는 증상을 감소시키는 것, 발병을 방지하는 것, 억제하는 것, 질환 또는 장애의 발병을 호전시키는 것, 질환, 장애 또는 의학적 병태와 관련된 이롭거나 원하는 결과, 예컨대 치료적 이익 및/또는 예방적 이익을 수득하는 것을 포함하지만 이에 제한되지 않는, 원하는 약리적 및/또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같은 "치료"는 포유동물, 특히 인간에서의 질환의 임의의 치료를 포괄하고, (a) 질환에 걸리기 쉬울 수 있거나 또는 질환에 걸릴 위험이 있을 수 있지만 아직 질환에 걸린 것으로 진단되지 않은 대상체에서 질환이 발생하는 것을 예방하는 것; (b) 질환을 억제하는 것, 즉, 그의 발달을 저지하는 것; 및 (c) 질환을 경감시키는 것, 즉 질환의 퇴행을 야기하는 것을 포함한다. 치료적 이익은 치료 중인 기저 장애의 근절 또는 호전을 포함한다. 또한, 기저 장애가 여전히 대상체를 괴롭힐 수 있음에도 불구하고, 개선이 대상체에서 관찰되도록 기저 장애와 연관된 생리학적 증상 중 하나 이상의 근절 또는 호전으로 치료적 이익이 달성된다. 일부 경우에, 예방적 이익을 위해, 특정 질환이 발달될 위험이 있는 대상체에게, 또는 질환 진단이 이루어지지 않았을 수 있더라도 이러한 질환의 생리학적 증상 중 하나 이상을 보고하는 대상체에게 조성물이 투여된다. 본 개시내용의 방법은 임의의 포유동물과 함께 사용될 수 있다. 일부 경우에, 치료는 증상의 감소 또는 중단 (예를 들어, 발작 빈도 또는 기간의 감소)을 발생시킬 수 있다. 예방적 효과는 질환 또는 병태의 출현을 지연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 병태의 증상의 발병을 지연시키거나 제거하는 것, 질환 또는 병태의 진행을 느리게 하거나, 정지시키거나 역전시키는 것, 또는 그의 임의의 조합을 포함한다.

[0052] 용어 "유효량" 또는 "치료적 유효량"은 하기 정의된 바와 같은, 질환 치료를 포함하지만 이에 제한되지 않는 의도된 용도에 영향을 미치는데 충분한 본원에 기술된 조성물의 양을 지칭한다. 치료적 유효량은 의도된 치료 용도 (세포 내 또는 생체 내), 또는 치료되는 대상체 및 질환 병태, 예를 들어, 대상체의 체중 및 연령, 질환 병태의 중증도, 투여 방식 등에 따라 변할 수 있고, 이는 관련 분야의 통상적인 기술자에 의해 쉽게 결정될 수 있다. 이러한 용어는 표적 세포에서 특정 반응을 유도할 용량에 또한 적용된다. 구체적인 용량은 선택된 특정 조성물, 파를 투약 요법, 다른 화합물과 조합되어 투여되는지 여부, 투여 시기, 투여되는 조직, 및 이를 보유하는 물리적 전달 시스템에 따라 변할 것이다.

[0053] 뉴클레오티드 또는 펩티드 서열의 "단편"은 "전장" 서열인 것으로 여겨지는 것보다 더 적은 서열을 지칭하도록 의도된다.

[0054] 분자의 "변이체"는 이같은 서열의 대립유전자 변형물, 즉, 전체 분자 또는 그의 단편과 구조 및 생물학적 활성 면에서 실질적으로 유사한 서열을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, 유전자의 변이체는 가장 통상적인 야생형 DNA 서열 (예를 들어, cDNA, 또는 그의 진뱅크에서 기준이 되는 서열 또는 그의 유니프روت(UniProt) 수탁 번호에서 기준이 되는 단백질 서열에 상응하는 서열)에 비교하여 유전자 변경 또는 돌연변이가 있는 서열을 지칭한다. 유전자 변이체는 돌연변이체, 예컨대 야생형 서열에 비교하여 활성 또는 기능이 강화된 돌연변이체; 단백질의 임의의 공지된 서브유닛; 및 대안적 스플라이싱으로부터 발생하는 유전자의 공지된 아이소형을 포함한다.

[0055] 용어 "기능성 단편"은 분자의 "단편", "변이체", "유사체" 또는 "화학적 유도체"를 포함하도록 의도된다. DNA 또는 단백질 서열의 "기능성 단편"은 서열의 생물학적으로 활성인 단편을 적어도 보유하고, 이는 전장 DNA 또는 단백질 서열의 생물학적 활성 (기능적 또는 구조적)과 실질적으로 유사한 생물학적 활성을 유지하는 단편을 지칭한다. DNA 서열의 생물학적 활성은 전장 서열에 기인하는 것으로 공지된 방식으로 발현에 영향을 미치는 그

의 능력일 수 있다. 예를 들어, 조절 요소의 기능성 단편은 전장 RE로서 전사에 영향을 미치는 능력을 유지할 것이다.

[0056] 용어 "대상체" 및 "개체"는 척추동물, 바람직하게는 포유동물, 더욱 바람직하게는 인간을 지칭하도록 본원에서 상호교환가능하게 사용된다. "대상체"는 동물, 예컨대 포유동물, 예를 들어 인간을 지칭한다. 본원에 기술된 방법은 인간 치료학, 척추동물 용도, 및/또는 질환 또는 병태의 동물 모델에서의 임상전 연구에서 유용할 수 있다. 일부 경우에 대상체는 포유동물이고, 일부 경우에 대상체는 인간이다.

[0057] 용어 "생체내"는 대상체의 신체 내에서 일어나는 이벤트를 지칭한다.

[0058] 용어 "시험관내"는 대상체의 신체 밖에서 일어나는 이벤트를 지칭한다. 예를 들어, 시험관내 검정법은 대상체의 외부에서 실행되는 임의의 검정법을 포함한다. 시험관내 검정법은 살아 있는 세포 또는 죽은 세포가 이용되는 세포-기반 검정법을 포함한다. 시험관내 검정법은 무손상 세포가 사용되지 않는 무세포 검정법을 또한 포함한다.

[0059] 서열 비교, 예컨대 신원, 돌연변이, 또는 기준 서열의 하나 이상의 특정 위치와 관련하여 테스트 서열의 하나 이상의 위치가 위치하는 장소를 평가하기 위한 목적의 비교가 니들만-분취(Needleman-Wunsch) 알고리즘 (예를 들어, 임의적으로 디폴트 설정과 함께, www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/에서 입수가능한 EMBOSS 니들(Needle) 정렬기를 참조한다), BLAST 알고리즘 (예를 들어, 임의적으로 디폴트 설정과 함께, blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi에서 입수가능한 BLAST 정렬 도구를 참조한다), 및 스미스-워터맨(Smith-Waterman) 알고리즘 (예를 들어, 임의적으로 디폴트 설정과 함께, www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/에서 입수가능한 EMBOSS 워터(Water) 정렬기를 참조한다)을 포함하지만 이에 제한되지 않는 임의의 적절한 정렬 알고리즘에 의해 수행될 수 있다. 디폴트 파라미터를 포함하여, 선택된 알고리즘의 임의의 적절한 파라미터를 사용하여 최적의 정렬을 평가할 수 있다.

[0060] 일반적으로, 상호교환가능하게 사용될 수 있는 "서열 동일성" 또는 "서열 상동성"은 각각 2개의 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드 서열의 정확한 뉴클레오티드-대-뉴클레오티드 또는 아미노산-대-아미노산 상응성을 지칭한다. 전형적으로, 서열 동일성을 결정하기 위한 기술은 폴리뉴클레오티드의 뉴클레오티드 서열을 결정하고/하거나 이에 의해 코딩되는 아미노산 서열을 결정하고, 이러한 서열을 제2의 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열과 비교하는 것을 포함한다. 2개 이상의 서열 (폴리뉴클레오티드 또는 아미노산)이 "퍼센트 상동성"으로도 지칭되는 이들의 "퍼센트 동일성"을 결정함으로써 비교될 수 있다. 더 긴 분자 (예를 들어, 폴리뉴클레오티드 또는 폴리펩티드) 내의 서열일 수 있는 기준 서열 (예를 들어, 핵산 또는 아미노산 서열)에 대한 퍼센트 동일성을 2개의 최적으로 정렬된 서열 사이의 정확한 매칭의 개수를 기준 서열의 길이로 나누고 100을 곱함으로써 계산할 수 있다. 예를 들어, 국립보건원(National Institutes of Health)으로부터 입수가능한 버전 2.2.9를 포함하는 고급 BLAST 컴퓨터 프로그램을 사용하여 서열 정보를 비교함으로써, 퍼센트 동일성이 또한 결정될 수 있다. BLAST 프로그램은 문헌 [Karlín and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990)]의 정렬 방법을 기초로 하고, 문헌 [Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]; [Karlín and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993)]; 및 [Altschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)]에 논의된 바와 같다. 간략하게, BLAST 프로그램은 동일한 정렬된 기호 (즉, 뉴클레오티드 또는 아미노산)의 개수를 2개의 서열 중 더 짧은 것 내의 기호의 총 개수로 나눈 것으로 동일성을 정의한다. 이러한 프로그램은 비교되는 서열들의 전체 길이에 걸쳐 퍼센트 동일성을 결정하는데 사용될 수 있다. 예를 들어, blastp 프로그램과 함께, 짧은 질의 서열로의 검색을 최적화하기 위해 디폴트 파라미터가 제공된다. 이러한 프로그램은 문헌 [Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17: 149-163 (1993)]의 SEG 프로그램에 의해 결정된 바와 같은 질의 서열의 분절을 차폐하기 위해 SEG 필터를 사용하는 것을 또한 허용한다. 원하는 정도의 서열 동일성의 범위는 대략적으로 80% 내지 100% 및 이들 사이의 정수값이다. 전형적으로, 개시된 서열과 청구된 서열 사이의 퍼센트 동일성은 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%이다. 일반적으로, 정확한 매칭은 기준 서열의 길이에 걸친 100% 동일성을 나타낸다. 일부 경우에, 퍼센트 서열 동일성에 대한 언급은 BLAST (기본 국소 정렬 검색 도구(Basic Local Alignment Search Tool))를 사용하여 측정된 바와 같은 서열 동일성을 지칭한다. 다른 경우에, ClustalW가 다중 서열 정렬에 사용될 수 있다.

[0061] 달리 지시되지 않는 한, 본원에서의 모든 용어는 관련 분야의 기술자에 대한 것과 동일한 의미를 갖고, 본 발명의 실행은 관련 분야의 기술자의 지식 내에 있는, 분자생물학, 미생물학 및 재조합 DNA 기술의 통상적인 기술을 사용할 것이다.

[0062] **조절 요소**

- [0063] 조절 요소는 DNA 및/또는 RNA 수준에서 기능할 수 있다. 조절 요소는 관심 세포 유형에서 유전자 발현 선택성을 조정하는 기능을 할 수 있다. 조절 요소는 유전자 발현의 전사 단계, 전사-후 단계, 또는 번역 단계에서 유전자 발현을 조정하는 기능을 할 수 있다. 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 인트론, 또는 기타 비-코딩 서열을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. RNA 수준에서, 조절은 번역 (예를 들어, 번역을 위해 mRNA를 안정화시키는 안정성 요소), RNA 절단, RNA 스플라이싱, 및/또는 전사 종결의 수준에서 일어날 수 있다. 일부 경우에, 조절 요소는 관심 세포 유형에서 유전자 발현 선택성을 증가시키는 전사 인자를 코딩 영역으로 동원할 수 있다. 일부 경우에, 조절 요소는 RNA 전사체가 생산되는 속도를 증가시킬 수 있고/있거나, 생산된 RNA의 안정성을 증가시킬 수 있고/있거나, RNA 전사체로부터 단백질이 합성되는 속도를 증가시킬 수 있다.
- [0064] 조절 요소는 하나 이상의 세포 유형 또는 조직에서 유전자 (예를 들어, 리포터 유전자 예컨대 EGFP 또는 루시페라제; 트랜스진; 또는 치료용 유전자)의 발현에 영향을 미칠 수 있는 (예를 들어, 이를 증가시킬 수 있는) 핵산 서열 또는 유전 요소이다. 일부 경우에, 조절 요소는 트랜스진, 인트론, 프로모터, 인핸서, UTR, 역위 말단 반복 (ITR) 서열, 긴 말단 반복 서열 (LTR), 안정성 요소, 번역후 반응 요소, 또는 폴리A 서열, 또는 그의 조합일 수 있다. 일부 경우에, 조절 요소는 프로모터, 인핸서, 인트론 서열, 또는 그의 조합이다. 일부 경우에, 조절 요소는 인간 서열 (예를 들어, hg19)로부터 유래된다.
- [0065] 조절 요소를 단리하는 한 방법은 하나 이상의 조직 또는 세포 유형을 단리하는 친화도 정제 방법 (예를 들어, 특정 세포 유형에 결합하는 비드)를 사용함으로써 달성될 수 있는, 동물 모델로부터의 하나 이상의 세포 유형으로부터 핵을 단리하는 단계, 고-처리량 천연 프라이밍 및 DNA 합성을 사용하여 핵 내의 개방된 염색질 영역으로부터의 서열의 풀을 생성시키는 단계, 서열 풀을 시퀀싱하여 하나 이상의 조직 또는 세포 유형에서 유전자 발현을 구동시키는 추정 서열을 확인하는 단계, 및 시험관 내의 하나 이상의 세포주에서 및/또는 동물 모델에서 리포터 시스템에서 발현시키는 단계를 포함한다. 일부 경우에, 2개 이상의 조절 요소가 더 큰 RE를 형성하도록 조합된다. 일부 경우에, 조합된 조절 요소는 복수의 세포 유형에서, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6개 이상의 세포 유형에서 유전자 발현 강화를 나타낸다. 일부 예에서, 조절 요소는 트랜스진 발현을 증가시키는 그의 능력을 유지하는 서열의 최소량을 결정하기 위해 한번에 하나 이상의 염기가 말단 절단된다. 트랜스진 발현 활성을 유지하는 더 작은 조절 요소가 대형 트랜스진을 포함하는 유전자 요법을 제조하는데, 또는 벡터 또는 플라스미드의 클로닝 용량이 유전자 요법을 사용하여 전달하려는 트랜스진의 크기의 관점에서 제한되는 경우에 도움이 된다. 예를 들어, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우, 트랜스진 발현 증가를 구동시키고, 여기서 트랜스진은 적어도 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb이다. 일부 경우에, 트랜스진 발현의 이같은 증가는 음성 대조군, 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배이다.
- [0066] 일부 경우에, 본 개시내용의 조절 요소는 작동가능하게 연결된 트랜스진의 높은 또는 증가된 발현을 발생시키고, 여기서 높은 또는 증가된 발현은 대조군, 예를 들어, 구성적 프로모터, CMV 프로모터, CAG, 수퍼 코어 프로모터 (SCP), TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, minCMV, EFS, 또는 CMVe 프로모터에 비교되어 결정된다. 본원에 개시된 조절 요소에 의한 높은 또는 증가된 트랜스진 발현을 결정하는데 사용될 수 있는 다른 대조군은 완충제 단독 또는 벡터 단독을 포함한다. 일부 경우에, 양성 대조군은 비교용으로 사용될 수 있는, 공지된 발현 활성이 있는 RE, 예컨대 서열식별번호: 4를 지칭한다. 일부 경우에, 조절 요소는 양성 대조군 (예를 들어, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 4 또는 공지된 프로모터)에 비교 시 필적하는 또는 더 높은 트랜스진 발현을 구동시킨다.
- [0067] 일부 경우에, 서열식별번호: 13-17의 가장 5'의 17개의 뉴클레오티드가 제거되어, 발현 활성을 유지하는 더 짧은 RE를 형성할 수 있다. 예를 들어, 가장 5'의 17개의 뉴클레오티드가 없는 서열식별번호: 13-17은 각각 서열식별번호: 30, 26, 28, 23, 및 22이다.
- [0068] 다른 경우에, 2개 이상의 비교적 짧은 RE가 조합되어, 높은 트랜스진 발현 활성 및/또는 크기-정규화 유전자 발현 활성을 갖는 더 큰 RE를 형성할 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 17이 서열식별번호: 22와 조합될 수 있거나; 또는 서열식별번호: 16이 서열식별번호: 22와 조합될 수 있다.
- [0069] 본 개시내용은 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 증가시키는 비교적 짧은 인간-유래 조절 요소를 구상한다.

일부 경우에, 짧은 인간-유래 RE는 표 1의 서열, 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 어느 하나이다.

[0070]

<표 1> 조절 요소 (RE)의 예

서열 식별 번호	서열 (5' → 3')	길이
1	GTAAGGTAAGAATTGAATTTCTCAGTTGAAGGATGCTTACACTCTTGTCCATCTAG	56bp
2	GTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGCTCCGGCTCAG	49bp
3	GTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACGCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCGTAAGGTAAGAATTGAATTTCTCAGTTGAAGGATGCTTACACTCTTGTCCATCTAG	266bp
4	GTGATGCGGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCAATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACGCCGCCCAATTGACGCAAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTGGTACCGTGTGTATGCTCAGGGGCTGGGAAAGGAGGGGAGGGAGCTCCGGCTCAG	259bp
13	GTGATGACGTGTCCCATAGGCCCTCGGTCTAAGGCTTCCCTATTTCCTGGTTCGCCGGCGGCCATTTTGGGTGGAAGCGATAGCTGAGTGGCGCGGCTGCTGATTGTGTTCTAG	117bp
14	GTGATGACGTGTCCCATCTTCCGGGTCAGGTGGGCCGGCTGTCTTGACCTTCTTTGCGGCTCGGCCATTTTGTCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAGTACCGCCTGCG	117bp
15	GTGATGACGTGTCCCATATTTTCATCTCGCGAGACTTGTGAGCGGCATCTTGGTCTCGCCCTGACAGATTCTCCTATCGGGGTCACAGGGACGCTAAGATTGCTACCTGGACTTTC	117bp
16	GTGATGACGTGTCCCATGGCCTCATTGGATGAGAGGTCCACCTCACGGCCCGAGGCGGGGCTTCTTTGCGCTTAAAAGCCGAGCCGGGCCAATGTTCAAATGCGCAGCTCTTAGTC	117bp
17	GTGATGACGTGTCCCATCCCCCTCCACCCCTAGCCCCGCGGAGCACGCTGGGATTTGGCGCCCTCCTCGGTGCAACCTATATAAGGCTCACAGTCTGCGCTCCTGGTACACGC	117bp
22	CCCCCTCCACCCCTAGCCCCGCGGAGCACGCTGGGATTTGGCGCCCTCCTCGGTGCAACCTATATAAGGCTCACAGTCTGCGCTCCTGTACACGC	100bp
23	GGCCTCATTGGATGAGAGGTCCACCTCACGGCCCCGAGGCGGGGCTTCTTTGCGCTTAAAAGCCGAGCCGGGCCAATGTTCAAATGCGCAGCTCTTAGTC	100bp
24	GGGTGGGGCCCGCGCGTATAAAGGGGGCGCAGGCGGGCTGGGCGTTCCACAGGCCAAGTGCCTGTGCTCGAGGGGTGCCGGCCAGGCC TGAGCGAGCGA	100bp
25	GGTGCGATATTTCGATTGGCTGGAGTCGGCCATCACGCTCCAGCTACGCCACTTCTTTTCGTGGCACTATAAAGGGTGCTGCACGGCGCTTGCATCTCT	100bp
26	ACTTCCGGGTGAGGTGGGCGGCTGTCTTGACCTTCTTTGCGGCTCGGCCATTTGTCCAGTCAGTCCGGAGGCTGCGGCTGCAGAAAGTACCGCCTGCG	100bp
27	GCTGAGCGCGCGATGGGGCGGGAGGTTTGGGGTCAAGGAGCAAACTCTGCACAAGATGGCGGCGGTAGCGGCAGTGGCGGCGCGTAGGAGCGGTGAG	100bp

[0071]

서열 식별 번호	서열 (5' → 3')	길이
28	ATTTTCATCTCGCGAGACTTGTGAGCGGCCATCTTGGTCCTGCCCTGACAGATTCTCCTATCGGGGTACAGGGACGCTAAGATTGCTACCTGGACTTTC	100bp
29	TGGGACCCCCGGAAGGCGGAAGTTCTAGGGCGGAAGTGGCCGAGAGGAGAGGAGAATGGCGGGCGGAAGGCTGGATTTGGCGTTGGGGCTGGGGCCGGCGG	100bp
30	AAGGCCCCCTCGGTCTAAGGCTTCCCTATTCTGTTTCGCCGGCGGCCATTTTGGGTGGAAGCGATAGCTGAGTGGCGGGCGGCTGCTGATTGTGTTCTAG	100bp
31	AGTGACCCGGAAGTAGAAGTGGCCCTTGACAGGCAAGAGTGCTGGAAGGCGGACGGCGACCGGAGCGGTAGGAGCAGCAATTTATCCGTGTGCAGCCCC	100bp
32	GGGAGGGGGCGCGCTGGGGAGCTTCGGCGCATGCGCGCTGAGGCCTGCCTGACCGACCTTACAGAGGGCTGTGGCTACCATGTTCTCTCGCGCGGGTGTCTG	100bp
33	ACTGCGCACGCGCGGTCGACCGATTACGCCCCCTTCCGGCGCCTAGAGCACCGCTGCCGCCATGTTGAGGGGGGGACCGCGACCACTGGGCCCCCT	100bp
34	CCCTCGAGGGGGCGGAGCAAAAAGTGAGGCAGCAACGCCTCCTTATCCTCGCTCCCGCTTTCAGTTCTCAATAAGGTCCGATGTTCTGTATAAATGCTCG	100bp
35	CTTGGTGACCAAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAACCGCGCCAATCATGTTGTTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTTGTATTTAAGGAACTGTTTCAGTTCATA	100bp
36	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTTGCTTGAGCCAATCAAAGTGCTCCGTGGACAATCGCCGTTCTGTCTATAAAAAGGTGAAGCAGCG	100bp
37	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTACCGGCGACGCCGATACGGTTCTCCACCGAGGCCCATGCGAAGCTTCCACTATGGCTTCCAGCACTGTC	100bp
38	CCCTCGAGGGGGCGGAGCAAAAAGTGAGGCAGCAACGCCTCCTTATCCTCGCTCCCGCTTTCAGTTCTCAATAAGGTCCGATGTTCTGTATAAATGCTCG	100bp
39	CTTGGTGACCAAATTTGAAAAAAAAAAAAAAAAACCGCGCCAATCATGTTGTTTCAATCAGGTCCGCCAAGTTTGTATTTAAGGAACTGTTTCAGTTCATA	100bp
40	GGCTGAGCTATCCTATTGGCTATCGGGACAAAATTTGCTTGAGCCAATCAAAGTGCTCCGTGGACAATCGCCGTTCTGTCTATAAAAAGGTGAAGCAGCG	100bp
41	GGAAGTGCCAGACCGGAGGTGCGTCATTACCGGCGACGCCGATACGGTTCTCCACCGAGGCCCATGCGAAGCTTCCACTATGGCTTCCAGCACTGTC	100bp

[0072]

[0073]

일부 경우에, 비교적 짧은 인간-유래 RE는 표 1의 서열 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; 또는 표 1의 서열 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41에 대한 서열 동일성 (예를 들어, 국소적 서열 동일성)이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 짧은 인간-유래 RE는 hg19의 인간 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 비-천연 발생 서열을 포함한다. 일부 경우에, 비교적 짧은 인간-유래 RE는 표 2에 열거된 하기의 게놈 또는 염색체 위치 중 하나에 위치하는 인간 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 50%, 적어도 55%, 적어도 60%, 적어도 65%, 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 비-천연 발생 서열을 포함한다.

[0074] <표 2> RE를 유도하기 위한 게놈 위치의 예

서열 식별 번호	게놈 위치	음성 대조군에 대한 배수 증가 (정규화된)
22	PEG10-cs:PEG10-he chr7:94285387-94285887-3	154
23	SAT1-he chrX:23801204-23801704-1	207
24	CDKN1C-he;CDKN1C-cs chr11:2906751-2907251-3	532
25	BTG1-cs;BTG1-he chr12:92539423-92539923-3	501
26	ATP5A1-he chr18:43678011-43678511-3	1049
27	GANAB-he chr11:62413828-62414328-3	54
28	ATP5F1-he chr1:111991856-111992356-3	675
29	LMAN2-cs chr5:176778403-176778903-3	
30	RAB1A-he chr2:65356988-65357488-3	1049
31	NEDD8-he chr14:24701287-24701787-3	253
32	ATP5C1-he chr10:7829892-7830392-3	
33	SSR4-he chrX:153059879-153060379-1	
34	HIST1H4B-he chr6:26027230-26027730(-)-2	
35	HIST1H4C-he chr6:26103854-26104354(+)-3	313
36	HIST2H2AA3-he chr1:149814228-149814728(-)-4	
37	TOMM6-he chr6:41755153-41755653(+)-3	
38	HIST1H4B-he chr6:26027230-26027730(-)-2	
39	HIST1H4C-he chr6:26103854-26104354(+)-3	
40	HIST2H2AA3-he chr1:149814228-149814728(-)-4	
41	TOMM6-he chr6:41755153-41755653(+)-3	

[0075]

[0076]

일부 경우에, 비교적 짧은 인간-유래 RE는 표 2에 열거된 게놈 위치의 프로모터로부터 유래되고, 음성 대조군 (예를 들어, 벡터 단독 대조군, 완충제 대조군, 또는 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열)에 비교하여 또는 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배의 트랜스진 발현을 나타낸다.

[0077]

일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE는 인트론 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2)을 포함하고, 발현 카세트 내의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우, SCP 또는 음성 대조군 (예를 들어, 벡터 단독, 완충제 단독, 또는 어떠한 발현 활성도 없는 서열)의 제어 하의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 50 배, 100배, 500배, 1000배, 또는 5000배, 또는 1000배 초과인 정규화된 유전자 (예를 들어, 루시퍼라제, ATP7B, 또는 FVIII) 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2)는, 발현 카세트 내의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우, SCP 또는 CAG의 크기-정규화 활성에 비교하여 적어도 1.5배, 2.5배, 5배, 10배, 15배, 또는 20배 이상인 크기-정규화 활성을 발생시킨다. 일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2)는, 발현 카세트 내의 트랜스진 (예를 들어, 루시퍼라제)에 작동가능하게 연결된 경우, SCP, SerpE-TTR, Proto1, minCMV, UCL-HLP, 또는 CMVe의 제어 하의 루시퍼라제에 비교하여 또는 완충제 대조군에 비교하여 적어도 1.5배, 2배, 2.5배, 3배, 4배, 5배, 10배 이상인 총 루시퍼라제 발광 (광자/초 단위)을 발생시킨다. 일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2)는, 발현 카세트 내의 인간 FVIII에 작동가능하게 연결된 경우, 생체 내에서 인간 FVIII 농도의 증가를 발생시키고, 여기서 농도 증가는 완충제 대조군 또는 FVIII에 작동가능하게 연결된 UCL-HLP에 비교하여 적어도 1 IU/mL, 1.2 IU/mL, 1.5 IU/mL, 또는 1 IU/mL 초과인 FVIII이다.

[0078]

일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE는 인간 프로모터 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 13-17 및 22-41)로부터 유래되고, 발현 카세트 내의 트랜스진 (예를 들어, 루시퍼라제, ATP7B, 또는 FVIII)에 작동가능하게 연결된 경우, 음성 대조군 (예를 들어, 벡터 단독, 완충제 단독, 또는 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열)에 비교하여 적어도 50배, 100배, 200배, 300배, 400배, 500배, 600배, 700배, 800배, 900배, 또는 1000배 이상의 정규화된 트랜스진 발현을 발생시킨다. 일부 예에서, RE는 CMV 또는 CMV+CMVe의 제어 하의 루시퍼라제 발현에 비교하여 적어도 5배, 10배, 또는 100배 이상의 정규화된 루시퍼라제 발현을 발생시킨다. 일부 실시양태에서, 2개 이상의 RE가 조합되어 더 큰 RE를 형성할 수 있다. 일부 경우에, RE는 트랜스진의 상류에 위치한다.

[0079]

일부 경우에, 본원에 개시된 비교적 짧은 인간-유래 RE는 40 bp, 45 bp, 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp,

80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하를 포함하고, **표 1** 중 어느 하나 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41에 따른 서열을 포함한다. 일부 경우에, **표 1**에 열거된 서열, 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 5개 이상, 6개 이상, 7개 이상, 8개 이상, 9개 이상, 또는 10개 이상이 발현 카세트 또는 벡터에서 조합되거나 또는 나란히 사용될 수 있다.

[0080] 다양한 측면에서, 비교적 짧은 인간-유래 조절 요소는 (AAV 유전자 요법에서와 같이) 벡터에 크기 제약이 있거나 또는 (생체의 단백질 생산에서와 같이) 매우 높은 수준의 발현이 요구되는 경우에 특히 유용하다. 본원에 개시된 조절 요소는 구성적이거나 또는 유도성일 수 있다. 따라서, 본 개시내용은 높은 발현, 뿐만 아니라 짧은 조절 요소 양쪽 모두의 이점을 제공한다. 일부 경우에, 본원에 개시된 RE는 대조군 조절 요소, 예컨대 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 비교하여 염기쌍 당 또는 뉴클레오타이드 당 더 높은 발현 수준을 나타낸다. 일부 경우에, 서열식별번호: 4가 유전자 발현 수준을 비교하기 위한 대조군으로서 사용된다.

[0081] 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 (예를 들어, 유전자 요법 또는 발현 카세트에서) 대형 트랜스진 발현을 증가시키기 위해 개조되는데, 이는 RE가 상당한 클로닝 용량을 차지하지 않으면서 트랜스진 발현을 강화하기 때문이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, **표 1** 중 어느 하나 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41에 따른 서열, 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열을 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 비교적 짧은 RE는 RE가 없는 트랜스진 발현에 비교하여, 또는 음성 대조군 (예를 들어, 벡터 단독 대조군, 완충제 단독, 또는 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열)에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 트랜스진 발현을 증가시킨다. 일부 경우에, 대조군은 동일한 트랜스진 (예를 들어, 루시퍼라제)에 작동가능하게 연결된 구성적 프로모터이다. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 RE의 트랜스진 발현에 비교하기 위한 대조군으로서 사용될 수 있는 다른 프로모터의 예는 CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, EFS 프로모터, 또는 CMVe 인핸서/CMV 프로모터 조합을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0082] 본원에서의 조절 요소는 프로모터일 수 있고, 발현 카세트 내에 포함된 경우, 하류 서열의 전사를 구동시킬 것이며, 이는 하류 서열 (예를 들어, 트랜스진)과 밀접하게 회합되거나 또는 이와 직접적으로 접촉될 것이다. 프로모터는 연결된 트랜스진의 높은 발현, 중등도의 발현 또는 낮은 발현을 구동시킬 수 있다. 일부 경우에, 프로모터는 하나 이상의 세포 유형에 대해 특이적일 수 있거나, 또는 다수 또는 복수의 세포 유형에서 (예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10개의 세포 유형에서) 유사한 수준으로 발현시킬 수 있다.

[0083] 일부 경우에, 본원에 개시된 RE는 인간-유래 서열을 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 비-천연 발생이다. 본원에서 사용된 바와 같은 용어 "인간-유래"는 인간 게놈 (또는 인간 게놈 구축물, 예컨대 hg19) 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열을 지칭한다. 상동성 서열은 인간 게놈의 영역에 비교하여 (예를 들어, BLAST에 의해 측정 시) 서열 동일성이 적어도 80%인 영역이 있는 서열일 수 있다. 예를 들어, 인간 서열에 대해 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99% 상동성인 서열이 인간 유래 서열로 간주된다.

[0084] 일부 경우에, 전체적으로는 조절 요소가 인간 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 낮은 한편, 조절 요소의 일부 부분은 인간 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성 (또는 국소적 서열 동일성)이 100%이도록, 조절 요소는 인간-유래 서열 및 추가적인 서열을 함유한다. 일부 예에서, 퍼센트 서열 동일성은 **표 1**에 열거된 서열 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 임의의 것의 적어도 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 또는 100%를 포괄하는 영역 내에서의 상동성을 지칭한다.

- [0085] 일부 경우에, 인간-유래 조절 요소는 인간 서열에 대해 100% 동일한 서열이다. 일부 예에서, 조절 요소의 서열은 100% 인간 유래이며, 여기서 RE는 적어도 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 또는 95개의 뉴클레오타이드 또는 염기쌍만큼 인간 서열과 상이하다.
- [0086] 다른 예에서, 조절 요소 서열의 적어도 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98%, 또는 99%가 인간 유래이다. 예를 들어, 조절 요소는 그의 서열의 50%가 인간 유래일 수 있고, 나머지 50%가 비-인간 유래일 수 있다 (예를 들어, 마우스 유래이거나 또는 완전히 합성일 수 있다). 추가 예를 위해, 50% 인간 유래인 것으로 간주되고 300 bp를 포함하는 조절 요소가 인간 게놈 내의 서열에 대한 전체적인 서열 동일성이 45%일 수 있는 한편, 이러한 RE의 염기쌍 1-150은 인간 게놈의 유사한 크기의 영역에 대한 동일성 (예를 들어, 국소적 서열 동일성)이 90%일 수 있다.
- [0087] 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 프로모터 서열, 인트론 서열, 인핸서 서열, 5' UTR 서열, 또는 그의 조합을 포함한다. 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 비-천연 발생이다. 일부 경우에, 본 개시내용의 RE는 인간-유래 (또는 인간 기준 게놈 내의 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 90%, 95% 또는 99%인 서열)이다.
- [0088] 일부 경우에, 본원에 개시된 비교적 짧은 조절 요소는 게놈 프로모터 서열 (예를 들어, **표 2**의 게놈 위치)로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 조절 요소는 게놈 프로모터 서열 및 3' 비번역 영역 (3' UTR) 양쪽 모두로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 조절 요소는 유전자간 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 조절 요소는 유전자 하류의 게놈 서열로부터, 또는 5' UTR 서열, 또는 5' UTR 및 하류 서열의 혼합물로부터 유래될 수 있다.
- [0089] 본원에서의 조절 요소는 인핸서일 수 있고, 이것이 프로모터와 함께 발현 벡터 또는 카세트 내에 존재하는 것은 인핸서가 없는 프로모터에 의한 동일한 트랜스진 발현에 비교하여 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 증가시킨다. 인핸서는 연결된 트랜스진 발현을 전사 메커니즘, 전사후 메커니즘 또는 양쪽 모두를 통해 증가시킬 수 있다.
- [0090] 일부 경우에, 본원에서의 조절 요소는 인트론 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 1-2)이거나, 또는 인트론을 포함하고, 이것이 프로모터와 함께 발현 벡터 또는 카세트 내에 존재하는 것은 인트론 서열이 없는 프로모터에 의한 동일한 트랜스진 발현에 비교하여 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 증가시킨다. 인트론 서열 또는 조절 요소는 연결된 트랜스진 발현을 전사 메커니즘, 전사후 메커니즘 또는 양쪽 모두를 통해 증가시킬 수 있다.
- [0091] 일부 경우에, 본원에서의 조절 요소는 프로모터 서열 (예를 들어, 서열식별번호: 13-17 및 22-41)이거나, 또는 프로모터 서열을 포함하고, 이는 트랜스진을 발현시키기 위해 어떠한 다른 프로모터 서열 및/또는 인핸서 서열도 없이 발현 카세트 내의 트랜스진에 작동가능하게 연결될 수 있다.
- [0092] 다양한 실시양태에서, **표 1**의 RE 중 하나 이상이 발현 카세트 내의 프로모터를 필요로 하지 않으면서 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현 증가를 구동시킬 수 있다. 일부 실시양태에서, 대형 트랜스진 (예를 들어, 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb를 초과하는 트랜스진)이 통상적인 발현 카세트에서 발현되기에 너무 큰 경우, 이같은 트랜스진이 통상적인 프로모터를 필요로 하지 않으면서 하나 이상의 **표 1**의 RE에 작동가능하게 연결될 수 있고, RE가 없는 발현 카세트에서의 트랜스진 발현에 비교하여 또는 대조군 (예를 들어, 빈 벡터, 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터)에 비교하여 더 높은 수준으로 발현될 수 있다.
- [0093] 본원에 개시된 조절 요소의 이점 중 하나는 그의 비교적 짧은 길이이다. 일부 예에서, 본 발명의 조절 요소는 길이가 40 bp, 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 200 bp, 300 bp, 또는 400 bp 이하이다. 일부 예에서, 조절 요소는 길이가 100 bp이하이거나, 길이가 <90 bp, <80 bp, <70 bp, <60 bp, 또는 <50 bp, 또는 48-57 bp, 또는 40-60 bp, 또는 50-100 bp이다. 일부 경우에, 본원에 기술된 조절 요소는 40-50 bp, 45-55 bp, 50-60 bp, 또는 55-65 bp이다. 일부 경우에, 조절 요소는 45-60 bp이다. 일부 경우에, 본원에 기술된 조절 요소는 49 bp 또는 56 bp이다. 예를 들어, 서열식별번호: 1 조절 요소는 길이가 56 bp이고, 서열식별번호: 2 조절 요소는 길이가 49 bp이다. 일부 경우에, 조절 요소는 100 bp 내지 150 bp, 110 bp 내지 140 bp, 110 bp 내지 130 bp, 또는 115 bp 내지 125 bp일 수 있다. 예를 들어, 서열식별번호: 13-17 조절 요소는 길이가 117 bp이다. 일부 경우에, 조절 요소는 100 bp 또는 약 100 bp이다. 예를 들어, 서열식별번호: 22-41는 각각 길이가

100 bp이다.

- [0094] 본 개시내용의 조절 요소는 바람직하게는 인간-유래 서열이다. 조절 요소는 전사 개시 부위의 상류의 게놈 서열, 5' UTR 서열, 엑손 서열, 인트론 서열, 또는 3' UTR 서열로부터 유래될 수 있다. 일부 실시양태에서, 인간-유래 조절 요소는 인간-유래 인트론 서열이다. 일부 경우에, 인간-유래 조절 요소는 인간 서열로부터 유래된 프로모터 서열이다. 일부 실시양태에서, 인간-유래 조절 요소는 서열식별번호: 1, 서열식별번호: 2, 또는 그의 조합, 또는 (예를 들어, BLAST에 의해 측정 시) 이에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열의 인트론 서열이다. 일부 실시양태에서, 인간-유래 조절 요소는 서열식별번호: 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 또는 그의 조합, 또는 (예를 들어, BLAST에 의해 측정 시) 이에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열의 프로모터 서열이다.
- [0095] 일부 경우에, 조절 요소는 5' 비번역 영역 (5' UTR)의 일부분 또는 전체를 포함한다. 5' UTR 조절 요소는 여러 상이한 방식으로 유전자 발현에 영향을 미칠 수 있다. 5' UTR 조절 요소는 RNA 결합 단백질에 대한 결합 부위를 함유할 수 있다. 추가로, 5' UTR 내의 조절 요소에 의해 형성된 2차 구조가 번역에 요구되는 RNA 결합 단백질의 결합에 영향을 미칠 수 있다. 일부 예에서, 조절 요소는 고도의 2차 구조를 가질 수 있다. 일부 경우에, 조절 요소는 2차 구조가 거의 없거나 없을 수 있다. 조절 요소는 내부 리보솜 진입 부위 (IRES)를 또한 함유하여, 5' 캡 독립적 번역을 허용할 수 있다. 조절 요소는 상류 번역 개시 코돈 (uAUG)을 함유할 수 있다. 일부 실시양태에서, 조절 요소는 상류 번역 개시 코돈을 함유하지 않는다. 일부 실시양태에서, 조절 요소는 AUG 코돈의 하나의 염기 내에 어떠한 코돈도 함유하지 않거나, AUG와 유사한 코돈을 우연히 예상되는 것보다 더 적게 함유한다. 일부 경우에, 조절 요소는 상류 AUG (또는 충분히 유사한 서열)가 존재하는 경우에 발생하는 상류 오픈 리딩 프레임에 이어지는 프레임 정지 코돈을 함유할 수 있다. 일부 예에서, 조절 요소는 uORF를 포함하지 않는다. 일부 경우에, 조절 요소는 마이크로RNA 결합 부위 또는 RNA 결합 단백질에 대한 결합 부위를 함유한다.
- [0096] 일부 예에서, 본 개시내용의 조절 요소는 인간-유래 서열에 상동성인 서열을 포함한다. 서열은 인간 서열에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99% 서열 동일성인 경우에 "인간-유래 서열에 상동성"이다. 바람직하게는, 인간-유래 조절 서열에 상동성인 서열은 인간 서열에 대해 적어도 90% 동일하다. 일부 실시양태에서, 본원에서 조절 요소는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 95%, 98% 또는 99%인 것이다. 조절 요소가 서열식별번호: 1-2 중 임의의 것에 상동성인 경우, 이같은 조절 요소는, 조절 요소가 없는 유사한 벡터에 비교하여, (발현 벡터 또는 카세트 내에 프로모터가 또한 존재하는 경우) 작동가능하게 연결된 트랜스진의 더 높은 발현을 여전히 발생시킨다. 트랜스진의 이같은 더 높은 발현은, 예를 들어, HEK293T 또는 CHO 세포에서의 발현에서 관찰될 수 있다. 일부 경우에, 트랜스진의 이같은 더 높은 발현은 복수의 세포 유형, 예를 들어, 2개 이상의 포유동물 세포주, 인간 세포주, 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 및/또는 CNS 세포에서 관찰될 수 있다.
- [0097] 일부 경우에, 조절 요소가 서열식별번호: 13-17 및 22-41 중 임의의 것에 상동성인 경우, 이같은 조절 요소는 조절 요소가 없는 유사한 벡터에 비교하여, (발현 벡터 또는 카세트 내에 다른 프로모터가 존재하지 않는 경우에도) 작동가능하게 연결된 트랜스진의 더 높은 발현을 여전히 발생시킨다. 트랜스진의 이같은 더 높은 발현은, 예를 들어, HEK293T 또는 CHO 세포에서의 발현에서 관찰될 수 있다. 일부 경우에, 트랜스진의 이같은 더 높은 발현은 복수의 세포 유형, 예를 들어, 2개 이상의 포유동물 세포주, 인간 세포주, 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 및/또는 CNS 세포에서 관찰될 수 있다.
- [0098] 본 개시내용의 조절 요소는 또한 상기 중 임의의 것의 기능성 단편, 예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41, 또는 그의 임의의 조합의 단편일 수 있다. 이같은 기능성 단편 또한 조절 요소가 없는 유사한 발현 카세트 또는 벡터에 비교된 경우에 발현 카세트 또는 벡터 내의 트랜스진 발현을 증가시킨다. 기능성 단편이 인헨서, 인트론 서열, 프로모터 서열, 또는 그의 조합인 경우, 기능성 단편이 없는 유사한 벡터 또는 카세트에 비교하여, 단편이 트랜스진에 작동가능하게 연결된 경우에 더 높은 발현이 관찰된다. 단편은 바람직하게는 길이가 25 bp, 30 bp, 40 bp, 50 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 또는 110 bp 이하이다. 일부 경우에, 인간 프로모터 서열로부터 유래된 본 개시내용의 RE는 발현 카세트 또는 벡터 내의 제2 프로모터를 필요로 하지 않으면서 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 통상적인 발현 카세트 또는 벡터 내의 프로모터가 하나 이상의 서열식별번호: 13-17 및 22-41, 그의 조합, 또는 (예를 들어, BLAST에 의해

측정 시) 서열식별번호: 13-17 및 22-41, 또는 그의 조합에 대한 서열 동일성이 적어도 70%, 적어도 75%, 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 91%, 적어도 92%, 적어도 93%, 적어도 94%, 적어도 95%, 적어도 96%, 적어도 97%, 적어도 98%, 또는 적어도 99%인 서열로 교체될 수 있다.

[0099]

일부 실시양태에서, 조절 요소는 (i) 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, (ii) 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%인 핵산 서열, (iii) (i) 또는 (ii) 중 임의의 서열의 기능성 단편, 또는 (iv) (i), (ii) 및 (iii) 중 임의의 서열의 조합 중 어느 하나이다. 일부 실시양태에서, 조절 요소의 2개 이상의 카피, 예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 하나 이상의 2개 이상의 카피가 트랜스진 발현을 강화하는데 사용된다. 일부 실시양태에서, 서열식별번호: 1 및 2의 조합, 또는 그의 기능성 단편의 조합이 조절 요소로서 사용되어 트랜스진 발현을 증가시킨다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 1 및/또는 2 중 하나 이상이 또 다른 조절 요소, 예컨대 프로모터 또는 인핸서에 커플링되거나 작동가능하게 연결되어 트랜스진 발현을 증가시킨다. 다른 실시양태에서, 서열식별번호: 1 및/또는 2 중 하나 이상이 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 하나 이상에 커플링되거나 작동가능하게 연결되어 트랜스진 발현을 증가시킨다. 일부 실시양태에서, 인트론 서열인 조절 요소가, 조절 요소가 임의의 프로모터에 커플링되거나 작동가능하게 연결된 경우, 트랜스진 발현을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 인간 프로모터 서열로부터 유래된 조절 요소가, 조절 요소가 어떠한 다른 프로모터 서열도 없이 트랜스진에 커플링되거나 작동가능하게 연결된 경우, 트랜스진 발현을 증가시킬 수 있다. 일부 경우에, 인간-유래 프로모터 서열 및 인트론 서열을 포함하는 조절 요소가, 조합된 조절 요소가 어떠한 다른 프로모터 서열도 없이 트랜스진에 커플링되거나 작동가능하게 연결된 경우, 트랜스진 발현을 증가시킬 수 있다.

[0100]

일부 실시양태에서, 하나 이상의 본원에 개시된 바와 같은 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 부가하여 유전자 요법으로부터의 트랜스진 발현을 개선하거나 증가시킴으로써 임의의 유전자 요법 또는 공지된 유전자 요법을 강화할 수 있다.

[0101]

일부 예에서, 조절 요소는 전체적으로 조절 요소가 인간 게놈에 대한 서열 동일성이 낮도록 인간-유래 서열 및 비-인간-유래 서열을 함유한다. 그러나, 조절 요소의 일부분은 인간 게놈에 대한 서열 동일성이 100%이다. 다른 예에서, 조절 요소 서열의 적어도 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% 또는 99%가 인간-유래이거나, 또는 적어도 10, 20, 30, 40, 또는 50개의 연속적인 뉴클레오타이드가 인간-유래이다. 예를 들어, 조절 요소에서 그의 서열의 50%는 인간-유래이고, 나머지 50%는 비-인간-유래 (예를 들어, 마우스 유래, 바이러스 유래 또는 완전히 합성)일 수 있다.

[0102]

발현 증가는 전사 또는 전사후 수준에서 일어날 수 있다. 예를 들어, 전사 수준에서, 조절 요소는 전사 인자 및/또는 RNA 중합효소를 동원함으로써, 전사 개시를 증가시킴으로써, 또는 전사 수준을 증가시키는 DNA 및/또는 히스톤 변형을 동원함으로써 발현을 증가시킬 수 있다. 트랜스진을 나타내는 RNA 전사체의 양의 증가를 측정함으로써 이같은 발현 증가를 검출할 수 있다. 전사후 수준에서, 조절 요소는 단백질로 번역되는 단백질의 양을 증가시킴으로써 발현을 증가시킬 수 있다. 이는 다양한 메커니즘을 통해, 예를 들어, mRNA의 안정성을 증가시킴으로써 또는 번역에 요구되는 단백질의 동원 및 어셈블리를 증가시킴으로써 달성될 수 있다. 트랜스진을 나타내는 발현된 단백질의 양을 측정함으로써 이같은 발현 증가를 검출할 수 있다. 생산된 단백질의 양을 직접적으로, 예를 들어, 효소 결합 면역흡착 검정법 (ELISA)에 의해, 또는 간접적으로, 예를 들어, 기능 검정법에 의해 측정할 수 있다. 기능 검정법에서 통상적으로 측정되는 단백질은 루시페라제이다. 그러나, 다른 단백질 예컨대 제VIII인자를 기능 검정법에 의해 또한 측정할 수 있다. 바람직하게는, 본원에서의 조절 요소는 발현 벡터 또는 카세트의 유전자, 트랜스진 또는 치료용 트랜스진 발현을 조절 요소를 뺀 동일한 발현 벡터를 사용하는 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 또는 10 배, 또는 5배 초과, 또는 10배 초과만큼 증가시킨다. 일부 경우에, 본원에서의 조절 요소는 발현 벡터 또는 카세트의 유전자, 트랜스진 또는 치료용 트랜스진 발현을 조절 요소를 뺀 동일한 발현 벡터를 사용하는 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 증가시킨다. 이같은 발현 벡터 또는 카세트는 조절 요소와 별개로 프로모터를 포함할 수 있다. 프로모터의 예는 minCMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터 (SCP), TTR 프로모터, Proto 1 프로모터

터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, 및 EFS 프로모터를 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 13-17 및 22-41 중 하나 이상을 포함하는 발현 벡터 또는 카세트는 트랜스진 발현을 위한 별개의 프로모터를 필요로 하지 않는다.

[0103] 일부 예에서, minCMV 프로모터와 함께 본원에서의 조절 요소 중 임의의 것에 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현은 본원에 기술된 조절 요소 없이 minCMV 프로모터에 연결된 트랜스진 발현보다 더 높다. 일부 경우에, minCMV 프로모터 및 본원에 기술된 바와 같은 조절 요소에 연결된 경우의 트랜스진 발현은 조절 요소 없이 하기 프로모터 중 어느 하나에 연결된 경우의 트랜스진 발현보다 더 높다: 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, 또는 EFS 프로모터.

[0104] 일부 예에서, 본원에서의 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41) 중 임의의 것에 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현은 UCL-HLP 프로모터에 연결된 경우의 트랜스진 발현보다 더 높다.

[0105] 일부 예에서, 본원에 기술된 조절 요소는 그의 길이에 비해 높은 발현을 구동시킨다. 예를 들어, CMV 프로모터의 길이의 절반인 본 개시내용의 조절 요소는 CMV 프로모터의 수준의 절반을 초과하는 발현을 구동시킨다. 일부 경우에, 조절 요소는 염기쌍 당 활성 (또는 트랜스진 발현)에 의해 정의되거나, 또는 크기-정규화 활성으로 지칭된다. 예를 들어, CMV 프로모터와 동일한 수준의 발현을 구동시키지만 CMV 프로모터의 길이의 절반인 조절 요소는 염기쌍 당 활성이 2배이다. 도 1a에 나타난 바와 같이, 서열식별번호: 3 (minCMV 프로모터와 조합된 서열식별번호: 1)은 5552의 정규화된 루시페라제 값을 발생시키고, 이는 도 1b에 나타난 바와 같이 ~21의 크기-정규화 활성 값을 산출한다 (서열식별번호: 3은 266 bp이다). 서열식별번호: 4 (minCMV 프로모터와 조합된 서열식별번호: 2)는 53의 크기-정규화 값을 발생시킨다. 도 1b에 나타난 바와 같이, minCMV 프로모터 단독은 19의 크기-정규화 값을 산출하고, SCP 프로모터 및 CAG 프로모터는 각각 1 및 10의 크기-정규화 값을 산출한다.

[0106] 관련 분야에 공지되어 있는 임의의 기술을 사용하여 발현, 특히 높은 유전자 발현을 측정할 수 있다. 일부 예에서, 본 개시내용의 조절 요소에 의해 제어되는 경우의 트랜스진의 상대적 발현 및 더 높은 발현은 RNA 정량/시퀀싱 기술, 예컨대 정량적 PCR, 노던 블롯팅, 또는 차세대 시퀀싱을 사용하여 측정된다.

[0107] 일부 예에서, 관심 트랜스진/유전자로부터 생산/발현된 단백질의 농도에 의해 높은 발현을 측정할 수 있다. 관련 분야에 공지되어 있는 임의의 방법에 의해 단백질의 농도를 측정할 수 있다. 단백질 발현을 측정하기 위한 방법의 비-제한적인 예는 ELISA, 방사성 면역검정법, 웨스턴 블롯팅, 또는 고성능 액체 크로마토그래피를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 문헌 [Noble JE, *Quantification of protein concentration using UV absorbance and Coomassie dyes*, Methods Enzymol. 2014;536:17-26]; [Kurien BT, Scofield RH. *A brief review of other notable protein detection methods on acrylamide gels*, Methods Mol Biol. 2012;869:617-20]; 및 [Daniel M. Bollag, Michael D. Rozycki and Stuart J. Edelstein, *Protein Methods*, 2 ed., Wiley Publishers (1996)]을 참조한다. 시험관 내에서 또는 생체 내에서 단백질 발현을 측정할 수 있다.

[0108] 다양한 실시양태에서, PCR 방법을 사용하여 트랜스진으로부터 생산된 mRNA 또는 RNA 전사체의 양을 측정함으로써 트랜스진 발현을 결정할 수 있다. 일부 경우에, 유전자 생성물과 상호작용하는 단백질 또는 면역검정법을 사용함으로써 트랜스진 유전자 발현을 측정할 수 있다. 일부 경우에, 노던 블롯 분석 및/또는 원위치 혼성화를 또한 사용하여 생체 내에서 트랜스진 발현을 분석할 수 있다. 트랜스진으로부터 발현된 단백질 (예를 들어, 형광 리포터 트랜스진으로부터의 형광)의 수준을 또한 모니터링하여, 세포에서 또는 생체 내에서 전사뿐만 아니라 단백질 합성 (즉, 번역)의 증가의 관점에서 트랜스진 발현의 증가를 결정할 수 있다. 웨스턴 블롯 분석, 면역조직화학, 면역형광 조직화학, 및/또는 ELISA 검정법을 포함하지만 이에 제한되지 않는 다양한 방법을 사용하여 단백질 수준을 또한 검정할 수 있다.

[0109] 일부 예에서, 본 개시내용의 조절 요소는 ELISA에 의해 측정 시 관련된 세포 유형에서 적어도 0.5, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 또는 3 IU/ml의 수준으로 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 발생시킨다. 관련된 세포 유형의 예는 간세포, 간 세포, 근육 세포, 폐 세포, 상피 세포, 및 신장 세포, 예를 들어, 293T 및 CHO 세포를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 실시양태에서, 조절 요소가 트랜스진 발현을 증가시키는 능력을 마우스에서 평가할 수 있고, 여기서 전체 마우스 내의 트랜스진 발현의 총량 및/또는 트랜스진 발현이 있는 세포 유형 또는 조직의 총 개수가 측정된다. 일부 경우에, 본 개시내용의 조절 요소는 ELISA에 의해 측정 시 마우스 또는 다른 생물의 혈액에서 적어도 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0, 1.1, 1.2, 1.3, 1.4, 1.5, 1.6, 1.7, 1.8, 1.9, 2.0, 2.5, 또는 3.0 IU/ml의 전체 수준으로 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 발생시킬 수 있다.

- [0110] 발현 카세트 또는 벡터의 활성을 평가하는 경우, 활성 또는 발현은 단위 용량 당 활성 또는 발현 수준으로 표현될 수 있거나, 또는 세포 또는 마우스 내로 투여 또는 전달된 발현 카세트 또는 벡터의 용량에 대해 정규화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 조절 요소의 존재 또는 부재 하의 상이한 발현 벡터 또는 카세트들에 걸친 비교를 허용하도록 사용된 플라스미드 또는 DNA (예를 들어, 마우스 당 $\mu\text{g/kg}$), 또는 바이러스 입자 (예를 들어, 마우스 당 계통 카피의 양/kg에 대해 정규화됨)의 양에 대해 트랜스진 발현 또는 활성이 정규화된다. 예를 들어, 마우스에서의 조절 요소의 활성을 평가하는 경우, 검정된 발현 또는 활성이 마우스 당 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 μg , 또는 10 또는 20 μg 초과 발현 벡터, 카세트, 또는 플라스미드의 용량에 대해 정규화될 수 있다. 일부 실시양태에서, 마우스 당 본원에 개시된 바와 같은 발현 벡터 또는 카세트를 함유하는 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} gc/kg의 바이러스 입자에 대해 발현 수준 또는 활성이 정규화될 수 있다.
- [0111] 다른 예에서, 발현된 단백질의 활성에 대한 기능 검정법에 의해 연결된 트랜스진 발현이 측정된다. 기능 검정법의 예는 루시퍼라제 활성을 정량하는 루시퍼라제 검정법, 및 제VIII인자 활성을 정량하는 코아테스트 검정법을 포함한다. 코아테스트 검정법에서, 보조 인자인 활성 제VIII인자의 발현은 발색단 기인 pNA를 방출하는 반응을 촉진한다. 방출된 발색단 기와 연관된 색을 405 nm에서 광도계로 관측하고, 색의 강도는 제VIII인자 활성의 양에 비례한다. 1.0 IU/mL의 제VIII인자를 함유하는 혈장이 나타내는 활성 수준의 백분율로서 제VIII인자 활성을 측정할 수 있다. minCMV 및 제VIII인자에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 조절 요소, 예를 들어, 서열식별번호: 1 또는 2는, 단백질이 1.0 IU/mL의 농도인 경우에, 조절 요소가 없는 유사한 발현 벡터, 예컨대 조절 요소가 없는 UCL-HLP에 비교하여 활성 수준의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250% 초과 또는 250% 초과인 제VIII인자 활성 수준을 발생시킬 수 있다. 일부 경우에, 제VIII인자에 작동가능하게 연결된 본 개시내용의 조절 요소, 예를 들어, 서열식별번호: 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41은, 예를 들어, 단백질이 1.0 IU/mL의 농도인 경우에, UCL-HLP 프로모터가 있는 유사한 발현 벡터에 비교하여 활성 수준의 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 110%, 120%, 130%, 140%, 150%, 160%, 170%, 180%, 190%, 200%, 250% 초과 또는 250% 초과인 제VIII인자 활성 수준을 발생시킬 수 있다.
- [0112] 본원에 개시된 조절 요소는 하나 이상의 상이한 세포 유형에서 트랜스진 발현을 구동 또는 증가시킬 수 있다. 조절 요소가 다중 세포 유형에서 트랜스진 발현을 증가시킬 수 있는 경우, 이같은 발현은 전반적 발현으로 간주된다. 전반적 발현은 생물 내의 모든 세포에서의 트랜스진 발현을 필요로 하지 않는다. 전반적 조절 요소는 상이한 발현 세포 유형에서 유사한 수준으로, 또는 상이한 세포 유형에서 다양한 발현 수준으로 트랜스진을 발현시킬 수 있다. 일부 경우에, 전반적 조절 요소는 적어도 2개, 3개, 4개, 5개, 10개, 15개, 또는 20개의 상이한 세포 유형에서 트랜스진 발현을 구동 또는 증가시킬 수 있다. 예를 들어, 전반적 발현의 조절 요소는 적어도 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개의 상이한 세포주에서 트랜스진 발현을 구동 또는 증가시킬 수 있다. 세포주의 예는 293 세포, CHO 세포, 암 세포주, 및 불멸화 세포주를 포함한다. 일부 예에서, 조절 요소는 생체 내에서 동물 내의 하나 이상의 세포 유형에서 트랜스진 발현을 구동 또는 증가시킨다.
- [0113] 일부 실시양태에서, 본원에서의 조절 요소는 간 세포에서 유전자의 발현을 구동시킨다. 일부 실시양태에서, 조절 요소는 하기 세포 유형 중 어느 하나 이상에서 유전자의 발현을 구동시킨다: 폐포 세포, 심근세포, 상피 세포, 간세포, 신장 세포, 장 세포, 근세포, 뉴런, 난소 세포, 및 신장 세포. 일부 실시양태에서, 조절 요소는 하기 세포주 중 어느 하나 이상에서 유전자의 발현을 구동시킨다: 차이니즈 햄스터 난소 세포 (CHO), 마우스 골수종 세포 (NSO), 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK), B16 흑색종 세포, HEK293T 세포, HeLa 세포, HT-1080 세포, 및 PER.C5 세포. 일부 예에서, 조절 요소는 생체 외에서 또는 시험관 내에서 세포주 내의 유전자의 발현을 구동시킨다.
- [0114] 본 개시내용의 조절 요소는 함께 또는 다른 조절 요소와 조합될 수 있다. 이같은 다른 조절 요소는, 예를 들어, 구성적 프로모터, 유도성 프로모터, 억제인자, 인핸서 또는 전사후 안정성 요소를 포함한다. 한 실시양태에서, 벡터는 연결된 트랜스진의 상류에 서열식별번호: 1 및 minCMV 프로모터를 포함하는 서열식별번호: 3의 조절 요소를 포함한다. 본원에서 구상되는 프로모터의 예는 minCMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, CMVe 인핸서/CMV 프로모터 조합, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, EFS 프로모터, 또는 CBA 프로모터를 포함한다.
- [0115] 본 개시내용의 조합된 조절 요소는 여전히 짧을 수 있다. 조합된 조절 요소는 총 길이가 약 50 내지 500개, 100 내지 400개, 50 내지 200개, 100 내지 200개, 또는 150 내지 300개의 염기쌍의 길이일 수 있다. 조합된

조절 요소는 조합된 길이가 약 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150 또는 100개의 염기쌍의 길이일 수 있다. 일부 실시양태에서, 조절 요소는 40-50 bp, 45-50, 49, 50-60, 56, 50-55, 또는 45-60 bp이다.

[0116] 조합된 조절 요소는 상이한 종들로부터 유래될 수 있다. 바람직한 예에서, 조합된 조절 요소의 적어도 하나의 부분이 인간-유래이다. 비-인간-유래 요소는 포유동물, 바이러스 또는 합성 서열로부터 유래될 수 있다.

[0117] 발현 카세트

[0118] 용어 "발현 카세트" 및 "핵산 카세트"는 폴리뉴클레오타이드 분자 또는 핵산 서열을 지칭하도록 상호교환가능하게 사용된다. 일부 경우에, 발현 카세트는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소를 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트는 프로모터를 추가로 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 및/또는 그의 임의의 조합 중 하나 이상의 서열을 포함한다. 일부 경우에, 발현 카세트는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41, (ii) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 또는 99%인 핵산 서열, (iii) (i) 또는 (ii) 중 임의의 서열의 기능성 단편, 또는 (iv) (i), (ii) 및/또는 (iii) 중 임의의 서열의 조합 중 하나 이상을 포함한다. 일부 경우에, 서열 동일성은 BLAST에 의해 측정된다. 일부 경우에, 조절 요소는 발현 카세트 내에서 트랜스진의 상류에 위치한다. 일부 경우에, 조절 요소는 발현 카세트 내에서 트랜스진의 하류에 위치한다.

[0119] 일부 측면에서, 하나 이상의 본원에 기술된 조절 요소 (예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)는 발현 카세트 내의 트랜스진 (예를 들어, 리포터 유전자 또는 치료용 트랜스진)에 작동가능하게 연결된다. 일부 경우에, 유전자 요법은 트랜스진, 예를 들어, 리포터 유전자, eGFP, RFP, 제VIII인자, Cas9, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장 또는 분화 인자, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체, 남성 섬유증 막황단 조절인자, I, II, III, 또는 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자, 베타글로빈 또는 지질단백질 리파제, 또는 그의 변이체 또는 단편의 발현 증가를 발생시키도록 1개 이상, 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상 또는 5개 이상의 본 개시내용의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 트랜스진을 포함하는 발현 카세트를 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편, 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%인 서열이다. 일부 경우에, 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편, 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 적어도 85%, 적어도 90%, 적어도 95%, 또는 적어도 99%인 서열이다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다.

[0120] 일부 경우에, 발현 카세트는 유전자 요법을 통한 전달을 위해 개조된다. 일부 경우에, 발현 카세트는 선형 또는 원형 구조물이다. 일부 경우에, 발현 카세트는 플라스미드, 벡터, 바이러스 벡터, 또는 rAAV의 일부분이다. 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함하는 발현 카세트는 복수의 세포, 예를 들어, 임의의 포유동물 또는 인간 세포주, 신장 세포, 상피 세포, 간 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 및/또는 CNS 세포에서의 발현을 위해 개조된다. 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 포함하는 발현 카세트는 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상의 포유동물 또는 인간 세포주 또는 세포 유형에서의 발현을 위해 개조된다. 일부 경우에, 트랜스진 발현은 하기 세포 유형 중 2개 이상, 3개 이상, 4개 이상, 또는 5개 이상에서 발생한다: 신장 세포, 상피 세포, 간세포, 뉴런, 섬유모세포, 심근세포, CNS 세포, 근육 세포, 혈액 세포, 및/또는 줄기 세포.

[0121] 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 포함하는 발현 카세트는 간 또는 간세포에서의 트랜스진 발현을 위해 개조된다. 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함하는 발현 카세트는, 예를 들어, 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장 또는 비경구 투여를 통한, 트랜스진의 전신 전달을 위해 개조된다. 일부 경우에, 트랜스진의 전신 전달은 간 또는 간세포에서의 트랜스진 발현 증가를 수반한다. 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함하는 발현 카세트는 RE가 없는 발현 카세트에 비교하여 또는 대조군 (예를 들어, 벡터 단독 대조군, 완충제 대조군, 또는 어떠한 발현 활성도 없는 서열)

에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배인 수준으로 간세포에서 트랜스진 발현을 발생시킨다. 일부 경우에, 비교적 짧은 RE에 의해 구동되는 발현은 동일한 트랜스진에 작동가능하게 연결된 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터의 것에 비교된다.

[0122] 일부 경우에, 본 개시내용의 조절 요소를 포함하는 발현 카세트는 작동가능하게 연결된 트랜스진의 높은 또는 증가된 발현을 발생시키고, 여기서 높은 또는 증가된 발현은 대조군, 예를 들어, 구성적 프로모터, CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터 (SCP), TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 비교하여 결정된다. 높은 또는 증가된 트랜스진 발현을 결정하기 위해 비교에 사용될 수 있는 다른 대조군은 완충제 단독, minCMV, EFS, 벡터 단독, 또는 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열을 포함한다. 일부 경우에, CAG 또는 서열식별번호: 4가 발현 수준 및/또는 크기-정규화 활성을 비교하기 위한 양성 대조군으로서 사용된다.

[0123] 관심 트랜스진 또는 유전자의 발현이 발현 벡터 또는 발현 카세트를 통해 발생할 수 있다. 이같은 발현 벡터 또는 카세트는 하기의 추가적인 요소 중 어느 하나 이상을 포함할 수 있다: 프로모터, 인핸서, 또는 전사후 조절 요소. 본 개시내용의 조절 요소는 트랜스진의 상류 또는 하류에 위치할 수 있고, 전사될 수 있거나 또는 전사되지 않을 수 있다. 일부 예에서, 본 개시내용의 조절 요소는 프로모터의 하류 및 트랜스진의 상류에 위치한다. 일부 예에서, 조절 요소는 트랜스진의 프로모터로서 위치한다. 일부 경우에, 하나 이상의 본 개시내용의 RE는 발현 벡터 또는 카세트 내의 어떠한 다른 프로모터도 없이 트랜스진에 작동가능하게 연결된다.

[0124] 발현 벡터 또는 카세트는 원형 또는 선형 핵산 분자일 수 있다. 일부 경우에, 벡터 또는 카세트는 세포 (예를 들어, 표적 세포 또는 세포 유형 및/또는 비-표적 세포 또는 세포 유형을 포함하는 복수의 상이한 세포 또는 세포 유형)에 전달된다. 벡터 또는 카세트가 부분적 또는 전체적인 발현 벡터 또는 카세트, 및/또는 트랜스진을 세포의 게놈 내로 통합시키는 능력과 관련하여, 벡터 또는 카세트는 통합 또는 비-통합 벡터일 수 있다. 통합 벡터 또는 비-통합 벡터가 조절 요소에 작동가능하게 연결된 트랜스진을 전달하는데 사용될 수 있다. 벡터 또는 카세트의 예는 (a) 비-바이러스 벡터 예컨대 선형 올리고뉴클레오타이드 및 원형 플라스미드를 포함하는 핵산 벡터; 인공 염색체 예컨대 인간 인공 염색체 (HAC), 효모 인공 염색체 (YAC), 및 박테리아 인공 염색체 (BAC 또는 PAC); 에피솜 벡터; 트랜스포존 (예를 들어, 피기백(PiggyBac)); 및 (b) 바이러스 벡터 예컨대 레트로바이러스 벡터, 렌티바이러스 벡터, 아데노바이러스 벡터, 및 아데노-연관 바이러스 벡터 (AAV)를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 바이러스는 높은 감염력을 포함하여 핵산 전달을 위한 여러 장점이 있다. 일부 실시양태에서, 바이러스는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 기술된 바와 같은 조절 요소를 포함하는 핵산 분자 또는 발현 카세트를 전달하는데 사용된다.

[0125] 본원에 기술된 벡터는 관심 세포에 직접적으로 또는 전달 시스템을 통해 전달될 수 있다. 전달 시스템의 예는 바이러스 벡터 (예를 들어, 레트로바이러스, 아데노바이러스, 아데노-연관 (AAV), 헬퍼-의존적 아데노바이러스 시스템, 하이브리드 아데노바이러스 시스템, 헤르페스 심플렉스, 폭스 바이러스, 렌티바이러스, 및 엡스타인-바 바이러스), 물리적 시스템 (네이키드 DNA, DNA 포격, 전기천공, 유체역학, 초음파, 및 마그네토펙션 (magnetofection)), 및 화학적 시스템 (양이온성 지질, 상이한 양이온성 중합체, 및 지질 중합체)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0126] 조절 요소(들) 및 작동가능하게 연결된 트랜스진, 또는 조절 요소 및 트랜스진을 포함하는 조성물을 관심 세포에 전달하여 관심 세포-유형, 조직 또는 생물에서 트랜스진의 시험관내, 생체내 또는 생체외 발현을 부여 또는 유도하기 위해 임의의 공지된 기술을 사용할 수 있다.

[0127] 바이러스 유전자 요법 벡터 또는 유전자 전달 벡터의 바람직한 특성은 재현가능하게, 그리고 안정적으로 번식되고, 높은 역가로 정제되는 능력; 표적화된 전달을 매개하는 능력 (예를 들어, 다른 곳으로의 광범위한 벡터 보급 없이 트랜스진을 관심 조직 또는 기관으로 특이적으로 전달하는 능력); 및 해로운 부작용을 유도하지 않으면서 유전자 전달 및/또는 트랜스진 발현을 매개하는 능력을 포함한다.

[0128] 여러 유형의 바이러스, 예를 들어, 비-병원성 파르보바이러스, 아데노-연관 바이러스가 유전자 전달의 목적을 위해 조작되었다. 다양한 유전자 요법 용도를 위한 바이러스-기반 벡터는 바이러스 감염 경로를 이용할 수 있지만, 복제 및 독성에 이를 수 있는 바이러스 유전자의 후속 발현을 피한다. 바이러스 게놈으로부터 코딩 영역 전체 또는 일부를 결실시키지만, 발현 벡터를 바이러스 캡시드 내로 패키징하는 것 또는 벡터 핵산 또는 이중성

유전자 또는 DNA의 숙주 게놈 내로의 통합과 같은 기능에 필요한 서열 (예를 들어, 말단 반복 서열)은 무손상으로 남김으로써 이같은 바이러스-기반 벡터를 수득할 수 있다. 트랜스진을 포함하는 발현 벡터 또는 카세트를, 예를 들어, 바이러스 유전자가 결합된 변형 또는 조작된 바이러스 백본과 같은 바이러스 백본 내로 클로닝할 수 있고, 추가적인 벡터 (예를 들어, 패키징 벡터)와 함께 사용할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 공동-형질감염되는 경우, 재조합 바이러스 벡터 입자를 생산할 수 있다.

[0129] 비-병원성 파르보바이러스인 AAV의 여러 혈청형이 유전자 전달의 목적을 위해 조작되었고, 이들 중 일부는 특정 조직 또는 세포 유형에 대한 향성이 있는 것으로 공지되어 있다. 다양한 유전자 요법 용도에 사용되는 바이러스는 복제-결핍성이도록 또는 대상체 또는 숙주 내에서 독성이 낮고 병원성이 낮도록 조작될 수 있다. 바이러스 게놈으로부터 코딩 영역 전체 또는 일부를 결실시키고, 벡터 게놈을 바이러스 캡시드 내로 패키징하는 것 또는 벡터 핵산 (예를 들어, 이중성 DNA 서열)의 숙주 게놈 내로의 통합과 같은 기능에 필요한 서열 (예를 들어, 역위 말단 반복 서열)을 무손상으로 남김으로써 이같은 바이러스-기반 벡터를 수득할 수 있다. 트랜스진을 포함하는 발현 벡터 또는 카세트를, 예를 들어, 바이러스 유전자가 결합된 변형 또는 조작된 바이러스 백본과 같은 바이러스 백본 내로 클로닝할 수 있고, 추가적인 벡터 (예를 들어, 패키징 벡터)와 함께 사용할 수 있으며, 이는, 예를 들어, 공동-형질감염되는 경우, 재조합 바이러스 벡터 입자를 생산할 수 있다.

[0130] 일부 실시양태에서, 생체 내에서, 생체 외에서 또는 시험관 내에서 세포, 세포 유형, 또는 조직 내로 하나 이상의 조절 요소 및 트랜스진을 전달하는데 사용된 AAV 벡터 또는 AAV 바이러스 입자, 또는 비리온은 바람직하게는 복제-결핍성이다. 일부 실시양태에서, AAV 바이러스는 헬퍼 인자의 존재 하에서만 복제 및 비리온 생성이 가능하도록 조작되거나 또는 유전적으로 변형될 수 있다.

[0131] 일부 실시양태에서, 발현 벡터 또는 카세트는 AAV 또는 재조합 AAV (rAAV)에 의한 전달용으로 디자인된다. 일부 실시양태에서, 발현 벡터 또는 카세트는 렌티바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 전달된다. 일부 실시양태에서, 더 큰 트랜스진, 즉, AAV의 클로닝 용량을 초과하는 유전자가 렌티바이러스 또는 렌티바이러스 벡터를 사용하여 바람직하게 전달된다.

[0132] 발현 벡터 또는 카세트는 AAV에 의한 전달용으로 디자인될 수 있다. AAV는 임의의 혈청형, 예를 들어, AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 또는 키메라, 하이브리드 또는 변이체 AAV일 수 있다. AAV는 자가-상보적 AAV (scAAV)일 수도 있다. AAV에 의한 전달용으로 디자인된 발현 벡터 또는 카세트는 5' ITR, 하나 이상의 조절 요소, 임의적인 최소 프로모터, 트랜스진, 임의적인 하나 이상의 인트론, 임의적인 폴리A 신호, 및 3' ITR을 포함할 수 있다. 일부 예에서, 발현 벡터 또는 카세트는 하나 이상의 전사후 RNA 조절 요소를 또한 함유한다.

[0133] 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2를 함유하는 예시적인 발현 벡터 또는 카세트가 각각 도 6b 및 도 6c에서 제시된다. 프로모터 위치에 서열식별번호: 13-17 및 22-41 중 어느 하나 이상을 함유할 수 있는 예시적인 발현 벡터가 도 7에서 제시된다. 이같은 발현 벡터 또는 카세트는 AAV, 렌티바이러스, 아데노바이러스, 또는 레트로바이러스를 포함하지만 이에 제한되지 않는 본원에 기술된 전달 시스템 또는 유전자 요법 중 어느 하나를 사용하여 트랜스진 발현을 위해 개조될 수 있다.

[0134] 발현 벡터 또는 카세트는 최적화된 치료용 레트로바이러스 벡터에 의한 전달용으로 디자인될 수 있다. 레트로바이러스 벡터는 좌측 (5') LTR; 바이러스의 패키징 및/또는 핵 유입을 보조하는 서열, 적어도 하나의 핵산 세포-유형 선택적 조절 요소, 임의적인 렌티바이러스 역반응 요소 (RRE); 임의적인 프로모터 또는 그의 활성 부분; 다양한 조절 요소에 작동가능하게 연결된 치료용 트랜스진; 임의적인 인슐레이터; 및 우측 (3') 레트로바이러스 LTR을 포함하는 렌티바이러스일 수 있다.

[0135] 일부 실시양태에서, 발현 벡터 또는 카세트는 하나 이상의 조절 요소를 포함한다. 일부 예에서, 벡터 또는 카세트는 조합된 2개 이상의 조절 요소를 함유한다. 일부 예에서, 벡터 또는 카세트는 조합되지 않은 2개 이상의 조절 요소, 예를 들어, 트랜스진의 상류의 프로모터 및 트랜스진의 하류에 위치하는 인헨서를 함유한다. 일부 실시양태에서, 인트론 서열이 프로모터의 하류에 위치한다.

[0136] 일부 경우에, 발현 벡터 또는 카세트는 고도의 드라이버 조절 요소, 전반적 조절 요소, 또는 짧은 조절 요소를 함유한다. 일부 경우에, 고도의 드라이버 조절 요소는 전반적 발현을 구동시키고/시키거나 켜다. 일부 경우에, 조절 요소는 짧은 전반적 조절 요소이다. 일부 실시양태에서, 조절 요소를 함유하는 발현 벡터 또는 카세트가 바이러스 벡터에서 사용되거나, 또는 바이러스 내에 패키징되고, 이는 동물 모델에서 전체적으로 또는 특정 세포 유형 또는 표적 세포 유형에서 조절 요소의 활성을 평가하기 위해 생체 내에서 동물 모델을 감염시키

는데 또는 생체 외에서 또는 시험관 내에서 세포를 형질감염시키는데 사용될 수 있다.

[0137] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조절 요소를 함유하는 발현 카세트는 하나 이상의 트랜스진을 또한 포함한다. 트랜스진은 단백질-코딩 유전자일 수 있다. 일부 경우에, 발현 카세트는 치료용 트랜스진을 함유한다. 치료용 트랜스진은 부재하거나 결함이 있는 유전자를 교체할 수 있거나, 또는 단백질의 부족한 발현을 보상할 수 있다. 치료용 트랜스진은 세포 신호전달 경로에서 수반될 수 있다. 일부 경우에, 발현 벡터 또는 카세트는 상업적 생산을 위한 트랜스진을 함유한다. 일부 실시양태에서, 상업적 생산을 위한 트랜스진은 치료용 단백질을 생산할 수 있거나, 또는 숙주 세포의 기능을 개선할 수 있거나, 또는 숙주 세포의 표현형을 복원시키거나 구조할 수 있다.

[0138] 본원에 개시된 조절 요소는 발현 벡터 또는 카세트 내의 임의의 위치에 위치할 수 있다. 예를 들어, 조절 요소는 인헨서의 상류, 인헨서의 하류이지만 프로모터의 상류, 트랜스진의 5' UTR 내, 트랜스진 내의 인트론 내, 트랜스진의 3' UTR 내, 또는 트랜스진의 하류에 위치할 수 있다. 일부 경우에, 하나 이상의 조절 요소는 작동가능하게 연결된 트랜스진의 상류 또는 하류에 위치한다. 예를 들어, 서열식별번호: 3 및 4는 minCMV 프로모터 하류의 서열식별번호: 1 및 2를 각각 함유한다. 조절 요소는 발현 카세트 또는 벡터 내의 상이한 위치로부터 트랜스진 발현에 대한 상이한 효과가 있을 수 있다. 각각의 조절 요소는 이러한 조절 요소로부터의 최적을 발현을 발생시키는 발현 벡터 또는 카세트 내의 바람직한 위치가 있을 수 있다.

[0139] 높은 활성이 있는 더 짧은 조절 요소를 이용하는 것은 트랜스진 발현 또는 높은 발현을 희생시키지 않으면서 동일한 패키징 용량 내에서 더 큰 트랜스진의 전달을 허용할 수 있다. 일부 경우에, 더 짧은 조절 요소를 사용하는 것은 2개 이상의 트랜스진을 단일 벡터에서 전달하는 것, 또는 조절 요소가 없는 유사한 벡터 또는 카세트에 비교하여 비교적 더 높은 수준의 발현으로 대형 트랜스진을 전달하는 것을 허용한다. 2개 이상의 트랜스진은 2개 이상의 상이한 단백질-코딩 유전자, 또는 단백질-코딩 유전자 및 비-코딩 요소를 포함할 수 있다. 한 예에서, 실시예 4에 기술된 바와 같이, 벡터는 Cas9 코딩 서열 및 하나 이상의 가이드 RNA를 포함한다. 일부 경우에, 조절 요소는 약 20 내지 100개, 30 내지 100개, 40 내지 80개, 또는 50 내지 60개의 염기쌍의 길이이다. 일부 경우에, 조절 요소는 150, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 또는 60개의 염기쌍 미만의 길이이다. 본 개시내용의 조합된 조절 요소는 짧을 수 있다. 조합된 조절 요소는 총 길이가 약 50 내지 500개, 100 내지 400개, 50 내지 200개, 100 내지 200개, 또는 150 내지 300개의 염기쌍의 길이일 수 있다. 조합된 조절 요소는 조합된 길이가 약 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 또는 100개의 염기쌍의 길이일 수 있다.

[0140] 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb를 초과하는 대형 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함한다. 일부 경우에, 대형 트랜스진이 하나 이상의 RE에 작동가능하게 연결되고, 여기서 각각의 RE는 49 bp, 50 bp, 56 bp, 60 bp, 70 bp, 80 bp, 90 bp, 100 bp, 110 bp, 117 bp, 120 bp, 130 bp, 140 bp, 150 bp, 160 bp, 170 bp, 180 bp, 190 bp, 200 bp, 210 bp, 220 bp, 230 bp, 240 bp, 250 bp, 259 bp, 260 bp, 265 bp, 270 bp, 280 bp, 290 bp, 300 bp, 310 bp, 320 bp, 330 bp, 340 bp, 350 bp, 360 bp, 370 bp, 380 bp, 390 bp, 또는 400 bp 이하이고, 표 1 또는 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41 중 어느 하나에 따른 서열을 포함한다. 일부 경우에, RE는 RE가 없는 발현 벡터 또는 카세트에 비교하여 또는 음성 대조군 (예를 들어, 벡터 단독 대조군 또는 공지된 발현 활성이 없는 서열을 포함하는 벡터)에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 트랜스진 발현을 증가시킨다.

[0141] 발현 카세트 또는 벡터의 활성을 평가하는 경우, 활성 또는 발현은 단위 용량 당 활성 또는 발현 수준으로 표현될 수 있거나, 또는 세포, 마우스 또는 대상체에게 투여 또는 전달된 발현 카세트 또는 벡터의 용량에 대해 정규화될 수 있다. 일부 경우에, 조절 요소의 존재 또는 부재 하의 상이한 발현 벡터 또는 카세트에 걸친 비교를 허용하도록 사용된 플라스미드 또는 DNA (예를 들어, 마우스 당 $\mu\text{g/kg}$), 또는 바이러스 입자 (예를 들어, 마우스 또는 대상체 당 게놈 카피/kg의 양에 대해 정규화된)의 양에 대해 트랜스진 발현 또는 활성이 정규화된다. 예를 들어, 마우스에서의 조절 요소의 활성을 평가하는 경우, 검정된 세포에서의 트랜스진 발현 또는 트랜스진 활성이 마우스 당 약 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 또는 20 μg , 또는 10 μg 초과 또는 20 μg 초과 발현 벡터, 카세트, 또는 플라스미드의 용량에 대해 정규화될 수 있다. 일부 경우에, 마우스 당 본원에 개시된 바와 같은 발현 벡터 또는 카세트를 함유하는 10^{10} , 10^{11} , 10^{12} , 10^{13} , 10^{14} , 또는 10^{15} gc/kg

의 바이러스 입자에 대해 발현 수준 또는 활성이 정규화될 수 있다.

[0142] 유전자 요법, 예를 들어, rAAV를 사용하여 본 개시내용의 발현 카세트를 전달하는 것의 한 장점은 이같은 요법이 더욱 표적화되고 지속되는 치료 효과를 경시적으로 제공할 수 있다는 것이다. 추가적으로, 하나 이상의 관심 세포 유형 또는 조직 (예를 들어, 간세포 또는 간)에 대한 향성이 있도록 바이러스 유전자 요법이 조작될 수 있다. 예를 들어, 페이로드 또는 치료제, 예를 들어, 전사 조정인자 또는 트랜스진을 생체 내에서 하나 이상의 영역, 조직 또는 세포 유형에 감염시키고 전달하도록 바이러스 유전자 요법이 조작될 수 있다.

[0143] 트랜스진

[0144] 본원에 개시된 구축물 (예를 들어, 발현 카세트 또는 벡터)은 관심 세포 또는 복수의 관심 세포에서 트랜스진 발현을 구동시키는데 사용될 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 구축물은 재조합 단백질 발현에 사용된다. 예를 들어, 본원에 개시된 조절 요소는 재조합 단백질의 발현을 구동시키는데 사용될 수 있다. 본 개시내용의 방법으로 생산된 재조합 단백질은 치료 목적, 연구 목적, 또는 상업적 목적을 위해 생산될 수 있다. 생체내, 생체외 또는 시험관내 단백질 발현 시스템의 일부로서 발현될 수 있는 트랜스진의 예는 Cas9, 제VIII인자, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장/분화 인자, 예를 들어, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 면역계를 조절 또는 조정하는 치료용 단백질, 예를 들어, 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체; 남성 섬유증 막형단 조절인자; I, II, III, 및 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자; 베타글로빈; 및 지질단백질 리파제를 포함하지만, 이에 제한되지 않는다. 일부 경우에, 발현된 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 발현된 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 그의 변이체 또는 기능성 단편이다.

[0145] 일부 경우에, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함하는 발현 카세트는 유전자 요법 치료를 위해 개조된다. 일부 경우에, 유전자 요법 치료는 전신 전달, 예컨대 정맥내 주입 또는 주사에 의한 전달을 위해 투여 또는 개조된다. 일부 경우에, 유전자 요법은 간 또는 간세포에서의 발현을 위해 개조된다. 일부 경우에, 작동가능하게 연결된 트랜스진은 간 또는 간세포에서 발현되는 유전자이거나, 또는 간 질환 또는 병태에서 관련되는 유전자, 예를 들어, 윌슨병과 연관된 ATP7B; 제3형 진행성 가족성 간내 담즙정체와 연관된 ABCB4; 유전성 프록토스 못건담증과 연관된 ALDOB; 제IV형 글리코겐 축적병과 연관된 GBE1; 제I형 티로신혈증과 연관된 FAH; 아르기니노숙시네이트 리아제 결핍증과 연관된 ASL; 시트린 결핍증 (CTLN2, NICCD)과 연관된 SLC25A13; 콜레스테릴 에스테르 축적병과 연관된 LIPA; 알파-1 항트립신 결핍증과 연관된 SERPINA1; 남성 섬유증과 연관된 CFTR; 유전성 혈색소증과 연관된 HFE; 또는 알스트롬 증후군과 연관된 ALMS1이다. 일부 경우에, 하나 이상의 조절 요소 또는 본원에 개시된 RE를 포함하는 발현 카세트는 유전된 간 질환, 예를 들어, 담즙산 합성 장애, 탄수화물 대사 장애, 아미노산 대사 장애, 요소 회로 장애, 또는 지질 대사 장애를 치료하기 위한 유전자 요법 치료에 사용된다. 일부 경우에, 하나 이상의 조절 요소 또는 본원에 개시된 RE를 포함하는 발현 카세트는 윌슨병; 제3형 진행성 가족성 간내 담즙정체; 유전성 프록토스 못건담증; 제IV형 글리코겐 축적병; 제I형 티로신혈증; 아르기니노숙시네이트 리아제 결핍증; 시트린 결핍증 (CTLN2, NICCD); 콜레스테릴 에스테르 축적병; 알파-1 항트립신 결핍증; 남성 섬유증; 유전성 혈색소증; 또는 알스트롬 증후군을 치료하기 위한 유전자 요법 치료 (예를 들어, AAV 유전자 요법)에 사용된다. 일부 경우에, 하나 이상의 조절 요소 또는 본원에 개시된 RE를 포함하는 발현 카세트는 응혈 장애 (예를 들어, 혈우병, 혈우병 A, 또는 혈우병 B) 또는 윌슨병을 치료하기 위한 유전자 요법 치료 (예를 들어, AAV 유전자 요법)에 사용된다.

[0146] 일부 경우에, 재조합 단백질을 발현시키는 방법은 발현 카세트 또는 벡터를 세포 또는 복수의 세포 내로 도입하는 것을 포함하고, 여기서 발현 카세트 또는 벡터는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진은 Cas9, 제VIII인자, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장/분화 인자, 예를 들어, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 면역계를 조절 또는 조정하는 치료용 단백질, 예를 들어, 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체; 남성 섬유증 막형단 조절인자; I, II, III, 및 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자; 베타글로빈; 및 지질단백질 리파제 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 발현된 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 단편이다. 일부 경우에, 발현된 트랜스진은 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인

자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자)이다.

[0147] 본원에 개시된 인간 유전자의 뉴클레오타이드 및 단백질 서열을 진뱅크 (NCBI) 또는 유니프룻KB 데이터베이스를 포함하는 다양한 공공 데이터베이스에서 확인할 수 있다. 예를 들어, 인간 유니프룻KB 수탁 번호는 Q04656 (ATP7A); P35670 (ATP7B); O43520 (AT8B1); P21439 (MDR3, ABCB4로도 지칭됨); O95342 (ABCB11로도 지칭됨); O76039 (CDKL5); Q9UHC6 (CNTP2, CNTNAP2로도 지칭됨); O60315 (ZEB2); P12259 (F5 또는 제V인자); P00451 (F8 또는 제VIII인자); P00740 (F9 또는 제IX인자); P00742 (F10 또는 제X인자)를 포함한다. 이같은 단백질 서열 중 어느 하나가 본원에 개시된 발현 카세트 내의 핵산 서열 (또는 트랜스진)에 의해 코딩될 수 있다.

[0148] 재조합 단백질은 박테리아 세포, 효모 세포, 곤충 세포, 식물 세포, 또는 포유동물 세포에서 생산될 수 있다. 일부 예에서, 재조합 단백질은 포유동물 세포에서 생산된다. 일부 경우에, 단백질은 동물 모델에서 생산된다. 단백질을 생산하는데 사용될 수 있는 세포주의 예는 차이나이즈 햄스터 난소 세포 (CHO), 마우스 골수종 세포 (NSO), 베이비 햄스터 신장 세포 (BHK), 및 B16 흑색종 세포를 포함한다. 일부 예에서, 인간-유래 세포주가 사용된다. 단백질을 생산하는데 사용될 수 있는 인간 세포주의 예는 HEK293T, HeLa, HT-1080, 및 PER.C5를 포함한다. 재조합 단백질은 동물에서 또는 동물 제품에서 생산될 수도 있다. 재조합 단백질은 식물에서 또한 생산될 수 있다. 재조합 단백질은 식물의 잎, 줄기, 꽃, 열매, 종자에서 발현될 수 있다.

[0149] 일부 실시양태에서, 본 개시내용의 조절 요소는 리포터 유전자, 예컨대 루시페라제의 발현을 구동 또는 증가시키는 데 사용될 수 있다. 일부 실시양태에서, 하나 이상의 조절 요소가 작동가능하게 연결된 루시페라제 트랜스진 발현을 실시예 2의 방법에 따라 측정 시 10^{17} , 10^{18} , 10^{19} , 10^{20} , 또는 10^{21} 개의 광자/초/마우스를 초과하는 생산을 산출하는 수준으로 발생시킬 수 있다.

[0150] 반수체기능부전, 또는 불충분한 유전자 발현 및/또는 단백질 활성 또는 합성 (또는 유전자의 과소발현)과 연관된 임의의 장애 또는 병태를 치료하는 방법으로, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 또한 구상된다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자의 발현 증가를 발생시키는 DNA 결합 단백질 또는 전사 조정인자 (예를 들어, 전사 활성화인자)이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터 내의 트랜스진은 치료용 트랜스진이다. 일부 경우에, 치료용 트랜스진은 Cas9, 제VIII인자, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장/분화 인자, 예를 들어, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포상피 인자; 면역계를 조절 또는 조정하는 치료용 단백질, 예를 들어, 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체; 남성 섬유증 막형단 조절인자; I, II, III, 및 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자; 베타글로빈; 및 지질단백질 리파제 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 발현된 트랜스진은 ATP7A, ATP7B, AT8B1 (또는 ATP8B1), MDR3 (또는 ABCB4), ABCBB (또는 ABCB11), CDKL5, CNTP2 (또는 CNTNAP2), ZEB2, 제V인자, 제VIII인자, 제IX인자, 또는 제X인자, 또는 그의 변이체, 서브유닛, 아이소형 또는 기능성 단편이다. 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC)는 PFIC1, PFIC2, 및 PFIC3을 포함하고, 이들은 ATP8B1, ABCB11, 및 ABCB4 유전자에서의 돌연변이(들)와 연관된다. 제2형 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC2)는 ABCB11에서의 결합 또는 돌연변이와 연관된다. ATP8B1 유전자 돌연변이는 PFIC1을 야기할 수 있다. ABCB11 유전자에서의 돌연변이는 PFIC2를 야기할 수 있다. ABCB4 유전자 돌연변이는 PFIC3을 야기할 수 있다. 일부 경우에, 본원에 개시된 트랜스진은 CDKL5이고, CDKL5 결핍 장애를 치료하기 위한 유전자 요법에서 사용된다. CNTNAP2에서의 돌연변이 또는 결함은 자폐증 스펙트럼 장애를 발생시킬 수 있다. 일부 경우에, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편이다. 일부 경우에, 트랜스진은 간세포에서 우선적으로 발현된다. 일부 경우에, 예를 들어, 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장, 또는 비경구 투여를 통해, 투여는 전신 투여이다. 일부 경우에, 방법은 정맥내 주입 또는 주사를 통해 발현 카세트 또는 벡터를 전달하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 예를 들어, 간, CNS, 또는 신체 내의 기관 내로의 주사를 통해, 투여는 국소 투여이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 AAV, 예를 들어, AAV8이다.

[0151] 일부 경우에, 유전자의 과발현과 연관된 장애 또는 병태를 치료하는 방법으로, 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41)를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터를 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 방법이 본원에서 구상된다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자의 발현 감소를 발생시키는 DNA 결합 단백질 또는 전사 조정인자 (예를 들어, 전사 억제인자)이다.

일부 경우에, 트랜스진은 간세포에서 우선적으로 발현된다. 일부 경우에, 예를 들어, 경구, 정맥내, 근육내, 복막내, 경막내, 장, 또는 비경구 투여를 통해, 투여는 전신 투여이다. 일부 경우에, 방법은 정맥내 주입 또는 주사를 통해 발현 카세트 또는 벡터를 전달하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 예를 들어, 간, CNS, 또는 신체 내의 기관 내로의 주사를 통해, 투여는 국소 투여이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 AAV, 예를 들어, AAV8이다.

[0152] 일부 경우에, 하기 유전자 중 어느 하나에서의 결함과 연관된 유전 장애 또는 병태를 치료하는 방법이 본원에서 구상된다: ATP7A, ATP7B, AT8B1 (또는 ATP8B1), MDR3 (또는 ABCB4), ABCBB (또는 ABCB11), CDKL5, CNTP2 (또는 CNTNAP2), ZEB2, 제V인자, 제VIII인자, 제IX인자, 제X인자, 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자). 일부 경우에, 윌슨병을 치료하는 방법이 본원에 개시된다. 일부 경우에, 윌슨병 또는 ATP7A, ATP7B, AT8B1 (또는 ATP8B1), MDR3 (또는 ABCB4), ABCBB (또는 ABCB11), CDKL5, CNTP2 (또는 CNTNAP2), ZEB2, 제V인자, 제VIII인자, 제IX인자, 제X인자, 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자)와 연관된 임의의 다른 유전 장애 또는 병태를 치료하는 방법은 본원에 개시된 발현 카세트 또는 벡터를 이를 필요로 하는 대상체 (예를 들어, 동물 또는 인간) 내로 투여하는 것을 포함하고, 여기서 발현 카세트 또는 벡터는 본 개시내용의 트랜스진, 예를 들어, ATP7A, ATP7B, AT8B1 (또는 ATP8B1), MDR3 (또는 ABCB4), ABCBB (또는 ABCB11), CDKL5, CNTP2 (또는 CNTNAP2), ZEB2, 제V인자, 제VIII인자, 제IX인자, 제X인자, 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), DNA 결함 단백질, 또는 전사 조정인자에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE를 포함한다. 일부 경우에, 트랜스진은 내인성 유전자를 편집하는 Cas 단백질 (예를 들어, Cas9 또는 saCas9 단백질) 및/또는 가이드 RNA이다 (예를 들어, Cas가 내인성 유전자로부터 돌연변이를 제거한다). 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 트랜스진을 간에서 우선적으로 발현시킨다. 일부 경우에, 예를 들어, 정맥내 주입 또는 주사를 통해, 투여는 전신 투여이다. 일부 경우에, 투여는 국소 투여이고, 예를 들어, 조직 또는 기관 내로의 직접적인 주사, 예를 들어, 간 또는 CNS 내로의 주사이다.

[0153] 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 카세트 또는 벡터는 윌슨병을 치료하는데 사용되고, 여기서 발현 카세트 또는 벡터는 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)를 포함하고, 트랜스진은 ATP7B, 또는 세포에서 또는 생체 내에서 ATP7B 발현을 증가시키도록 내인성 ATP7B 유전자 상에 작용하는 전사 조정인자 또는 DNA 결함 단백질이다. 일부 경우에, 이같은 발현 카세트 또는 벡터는 윌슨병으로 진단되었거나 윌슨병의 위험이 있는 대상체 내로 전달된다. 일부 경우에, 이같은 발현 카세트 또는 벡터는 정맥내 주입 또는 주사를 통해 대상체 내로 전달된다. 일부 경우에, 전달은 전신 전달이다. 일부 경우에, 윌슨병 치료를 필요로 하는 대상체 내로 유전자 요법 (예를 들어, AAV 유전자 요법)을 투여하는 것을 포함하는 윌슨병을 치료하는 방법이며, 여기서 유전자 요법은 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)를 포함하고, 트랜스진은 ATP7B, 또는 세포에서 또는 생체 내에서 ATP7B 발현을 증가시키도록 내인성 ATP7B 유전자 상에 작용하는 전사 조정인자이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 AAV, 예를 들어, AAV8이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 간세포 또는 간에서 우선적으로 발현된다.

[0154] 일부 경우에, 본원에 개시된 발현 카세트 또는 벡터는 응혈 장애를 치료하는데 사용되고, 여기서 발현 카세트 또는 벡터는 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)를 포함하고, 트랜스진은 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자 (예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자), 또는 피브리노겐, 프로트롬빈, 응고 인자, 또는 응혈 인자(예를 들어, 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자)에 상응하는 내인성 유전자 상에 작용하는 전사 조정인자이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제VIII인자이다. 일부 경우에, 이같은 발현 카세트 또는 벡터는 응혈 장애로 진단되었거나 응혈 장애의 위험이 있는 대상체 내로 전달된다. 일부 경우에, 이같은 발현 카세트 또는 벡터는 정맥내 주입 또는 주사를 통해 대상체 내로 전달된다. 일부 경우에, 전달은 전신 전달이다. 일부 경우에, 응혈 장애 치료를 필요로 하는 대상체 내로 유전자 요법 (예를 들어, AAV 유전자

요법)을 투여하는 것을 포함하는 응혈 장애를 치료하는 방법이며, 여기서 유전자 요법은 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본 개시내용의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)를 포함하고, 트랜스진은 제VIII인자, 또는 세포에서 또는 생체 내에서 내인성 제VIII인자 유전자의 발현을 증가시키도록 내인성 제VIII인자 유전자 상에 작용하는 전사 조정인자이다. 일부 경우에, 트랜스진은 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자 중 어느 하나이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 AAV이다. 일부 경우에, 발현 카세트 또는 벡터는 간세포 또는 간에서 우선적으로 발현된다.

[0155] 일부 경우에, 트랜스진은 DNA 결합 단백질, 또는 DNA 결합과 연관된 단백질일 수 있다. 일부 경우에, DNA 결합 단백질은 전사 인자, 또는 전사 인자의 일부분일 수 있다. 일부 경우에, DNA 결합 단백질은 Cas9, Cas 패밀리의 단백질, saCas9, dCas9, dCas 패밀리의 단백질, 전사 활성화인자 유사 이펙터 (TALE) 단백질, 또는 아연 손가락 단백질, 또는 융합 단백질일 수 있다. 일부 경우에, 유전 장애를 치료하는 방법은 유전자 편집 단백질 (예를 들어, Cas9 및 가이드 RNA) 및 하나 이상의 본 개시내용의 RE (예를 들어, 서열식별번호: 1, 2, 3, 4, 13, 14, 15, 16, 17, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41)를 포함하는 발현 카세트 또는 벡터를 투여하는 것을 포함한다. 일부 경우에, 가이드 RNA는 Cas 단백질을 관심 내인성 유전자 또는 본원에 개시된 내인성 유전자에 표적화한다.

[0156] 일부 경우에, 본원에 개시된 구축물은 유전자 요법을 전달하는데 사용된다. 특히, 본 개시내용의 비교적 짧은 조절 요소는 대형 트랜스진, 예컨대 제VIII인자 또는 ATP7B의 발현을 요구하는 유전자 요법에 특히 유용할 수 있다. 일부 실시양태에서, 간 세포, 예컨대 간세포에서 대형 트랜스진이 발현된다. 다른 실시양태에서, 중추 신경계 (CNS), 예컨대 뉴런에서 대형 트랜스진이 발현된다. 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 트랜스진 중 어느 하나가 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소에 작동가능하게 연결되어 트랜스진 발현을 증가시킨다. 일부 경우에, 본원에 개시된 트랜스진은 세포에서 또는 생체 내에서, 시험관 내에서, 및/또는 생체 외에서 발현된다. 일부 경우에, 이같은 대형 트랜스진은 유전자 요법, 재조합 발현 벡터 또는 플라스미드, 또는 바이러스 벡터 또는 플라스미드를 사용하여 세포 내로 전달된다. 생체 외에서 또는 시험관 내에서 유전자 요법 또는 발현 시스템의 일부로서 발현될 수 있는 대형 트랜스진의 예는 멘케스(Menkes) 단백질 (ATP7A), ATP 결합 카세트 서브패밀리 b 구성원 4 (ABCB4), ATPase 인지질 수송 8B1 (ATP8B1), ATPase 구리 수송 베타 (ATP7B), 시클린-의존적 키나제-유사 5 (CDKL5), 콘택틴 연관 단백질-유사 2 (CNTNAP2), ATP 결합 카세트 서브패밀리 B 구성원 11 (ABCB11), 및 아연 손가락 E-박스-결합 호메오박스 2 (ZEB2), 및 그의 임의의 변이체, 서브유닛, 돌연변이체 또는 기능성 단편 (코돈 최적화 변이체 포함)을 포함하지만, 이에 제한되지 않는다.

[0157] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 구축물은 유전자 편집에 사용된다. 예를 들어, 구축물은 본원에 개시된 바와 같은 조절 요소, Cas9 코딩 서열, 및 가이드 RNA를 포함할 수 있다. 일부 경우에, Cas9 코딩 서열은 saCas9를 코딩한다. Cas9 또는 saCas9 코딩 서열 및 가이드 RNA가 있는 구축물은, 예를 들어, 돌연변이를 수정함으로써 (예를 들어, 조기성숙 정지 코돈을 제거함으로써), 기능장애 유전자를 수정하는데 사용될 수 있다.

[0158] 다양한 유전 장애, 예컨대 중증 복합성 면역 결핍증 (ADA-SCID), 멘케스병, 가족성 간내 담즙정체, 바일러 (Byler) 증후군, 윌슨병, 피질 형성이상-초점 간질 증후군, 모왓-윌슨(Mowat-Wilson) 증후군, PFIC2, PFIC3, 만성 육아종 장애, 혈우병, 선천성 시각상실, 대사 장애, 리소좀 축적병, 근육 디스트로피, 암, 바이러스 감염, 심장 질환, 및 당뇨병을 포함하는 다양한 질환을 치료하기 위한 하나 이상의 본원에 개시된 바와 같은 조절 요소를 포함하는 유전자 요법 또는 발현 벡터가 본원에서 또한 구상된다. 일부 경우에, 하나 이상의 본원에 개시된 조절 요소를 포함하는 유전자 요법이 윌슨병을 치료하는데 사용될 수 있다.

[0159] 일부 실시양태에서, 본원에 개시된 조절 요소는 응혈 장애가 있는 대상체를 치료하는데 사용된다. 예를 들어, 본 개시내용의 조절 요소 및 FVIII에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 카세트가 FVIII 결핍이 있는 대상체에서 응혈 장애 또는 질환을 구조하는데 사용될 수 있다. 도 5a 및 도 10에 나타난 바와 같이, 본 개시내용의 조절 요소 및 FVIII에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 카세트를 응혈 장애가 있는 대상체 내로 형질감염시키는 것이 손상 후 혈액 상실의 감소를 발생시킬 수 있다. 본 개시내용의 조절 요소 및 FVIII에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 카세트를 응혈 장애가 있는 대상체 내로 형질감염시키는 것이 적어도 약 10%, 20%, 30%의 혈액 상실을 발생시킬 수 있다. 도 5b 및 도 11에 나타난 바와 같이, 본 개시내용의 조절 요소 및 FVIII에 대한 코딩 서열을 함유하는 발현 카세트를 응혈 장애가 있는 대상체 내로 형질감염시키는 것이 손상 후 출혈이 정지하기까지의 시간의 감소를 발생시킬 수 있다.

- [0160] 본 개시내용의 구축물, 유전자 요법, 또는 발현 벡터/카세트 중 어느 하나로 치료될 수 있는 대상체는 인간, 영장류, 개, 고양이, 설치류, 말, 소, 양, 돼지 및 기타 가축을 포함한다. 일부 경우에, 대상체는 질환/장애에 걸렸거나, 또는 질환/장애의 위험이 있다. 예를 들어, 대상체는 유전 질환이 있을 수 있거나, 또는 유전 질환 또는 질환에 대한 소질에 연관되는 것으로 공지된 DNA 서열을 가질 수 있다. 일부 경우에, 대상체는 혈우병이다. 일부 경우에, 대상체는 혈우병 A이다. 일부 실시양태에서, 대상체는 제VIII인자의 결함이 있다. 일부 실시양태에서, 제VIII인자에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 기술된 조절 요소를 포함하는 유전자 요법이 혈우병 A로 진단된 대상체를 치료하는데 사용된다.
- [0161] **실시에**
- [0162] 이러한 실시예는 설명의 목적으로만 제공되고, 본원에서 제공되는 청구범위의 범주를 제한하지 않아야 한다.
- [0163] **실시예 1**
- [0164] **HEK293T 세포에서의 높은 발현**
- [0165] HEK293T 세포에 여러 상이한 조절 요소 중 하나, 즉, 프로모터 없음 대조군, SCP, CMV, 서열식별번호: 3 (minCMV에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 1), 서열식별번호: 4 (minCMV에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 2), 및 CAG의 제어 하의 루시퍼라제 유전자를 함유하는 플라스미드 DNA를 형질감염시켰다. 각각의 구축물로부터의 정규화된 루시퍼라제 값이 도 1a에서 도해된다. 각각의 구축물로부터의 크기-정규화 활성 값이 도 1b에서 도해된다. 본원에서 사용된 조절 요소 및 프로모터의 서열이 상기 표 1 및 하기 표 3에서 제공된다. minCMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 1 조절 요소 및 minCMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 2 조절 요소가 minCMV 단독 및 SCP 단독보다 더 높은 수준의 루시퍼라제 발현을 구동시켰다. 서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2 양쪽 모두, minCMV 프로모터에 연결된 경우에, 대조군, SCP, 또는 조절 요소 (즉, 서열식별번호: 1 또는 2)가 없는 minCMV 프로모터에 비교하여 HEK293T 신장 세포에서 루시퍼라제의 높은 발현을 구동시켰다.
- [0166] 도 1c, 도 1d, 및 도 1e에 도해된 바와 같이, 추가적인 대조군 및 조절 서열로 유사한 정규화된 루시퍼라제 발현 실험을 했다. 반딧불이 발현을 또한 검정하여, 테스트된 모든 샘플에서 유사한 형질감염 효율을 확실하게 하였다. 도 1c에서, 서열식별번호: 4, 조합된 서열식별번호: 17 및 22 (또는 서열식별번호: 17/22), 조합된 서열식별번호: 16 및 23 (또는 서열식별번호: 16/23), 서열식별번호: 24, 서열식별번호: 25, 서열식별번호: 26, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 29, 서열식별번호: 31, 서열식별번호: 32, 및 서열식별번호: 33 조절 요소의 정규화된 루시퍼라제 발현이 2개의 음성 대조군 (즉, 어떠한 발현도 구동시키지 않는 것으로 공지된 서열)과 비교되었다. 각각의 테스트된 조절 요소가, 예를 들어, 음성 대조군에 비교하여 적어도 10, 50, 또는 100배 이상 만큼, 높은 수준의 루시퍼라제 발현을 발생시켰다.
- [0167] 도 1d에서, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 26, 또는 서열식별번호: 27 조절 요소를 포함하는 플라스미드로부터의 정규화된 루시퍼라제 발현을 음성 대조군, 및 루시퍼라제에 작동가능하게 연결된, CMVe에 연결된 CMV 또는 CMV를 포함하는 유사한 플라스미드에 비교하였다. 각각의 테스트된 조절 요소 (즉, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 28, 서열식별번호: 30, 서열식별번호: 26, 및 서열식별번호: 27)가 음성 대조군, CMV 단독, 및 CMV+CMVe보다 더 높은 루시퍼라제 발현을 발생시켰다. 테스트된 비교적 짧은 RE가 루시퍼라제에 연결된 CMV 프로모터 또는 CMV+CMVe를 포함하는 플라스미드에 비교하여 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 30배, 적어도 40배, 또는 50배 초과 정규화된 루시퍼라제 발현을 나타냈다.
- [0168] 도 1e에서, 루시퍼라제에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 17/22, 서열식별번호: 16/23, 서열식별번호: 34, 서열식별번호: 35, 서열식별번호: 36, 서열식별번호: 37, 서열식별번호: 38, 서열식별번호: 39, 서열식별번호: 40, 또는 서열식별번호: 41 조절 요소를 포함하는 플라스미드로부터의 정규화된 루시퍼라제 발현을 음성 대조군 (즉, 발현 활성이 없는 것으로 공지된 서열)에 비교하였다. 각각의 조절 요소 (즉, 서열식별번호: 17/22, 16/23, 및 34-41)가 음성 대조군보다 더 높은 루시퍼라제 발현을 구동시킨 한편, 서열식별번호: 35 및 서열식별번호: 39 각각은 10²보다 높은 정규화된 루시퍼라제 발현 또는 음성 대조군보다 적어도 100배 더 높은 루시퍼라제 발현을 구동시켰다.

[0169]

<표 3> 본원에 개시된 추가적인 서열

서열 식별 번호	서열 (5' → 3')	명칭
5	GTACTTATATAAGGGGGTGGGGGCGCGTTCGTCCTCAGTCGCGA TCGAACACTCGAGCCGAGCAGACGTGCCTACGGACC	SCP
6	GGGGAGGCTGCTGGTGAATATTAACCAAGGTCACCCAGTTATC GGAGGAGCAAAACAGGGGCTAAGTCCACGCTAGCGTCTGTCTGCA CATTTTCGTAGAGCGAGTGTCCGATACTCTAATCTCCCTAGGCAA GGTTCATATTTGTGTAGGTTACTTATTCTCCTTTGTGTTGACTAAGT CAATAATCAGAATCAGCAGGTTTGGAGTCAGCTTGGCAGGGATC AGCAGCCTGGGTTGGAAGGAGGGGGTATAAAAGCCCTTCACCA GGAGAAGCCGTC	SerpE_TTR
7	GTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACAGGAC GCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGGCTAGCGGGCGACTCAGATCCCAG CCAGTGGACTTAGCCCCGTGTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGAC CTTGGTTAATATTCACCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGAT CCTACTGCTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGC TTCAGGCACCACCTGACCTGGGACAGTGAATCGCCAC	Proto1
8	TGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTT GACTCAGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGG GAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTC GTAACAACTCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGTGTA CGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCT	minCMV
9	GTTTGCTGCTTGCAATGTTTGCCCATTTTAGGGTGGACACAGGAC GCTGTGGTTTTCTGAGCCAGGGGGCGACTCAGATCCCAGCCAGTG GACTTAGCCCCGTGTTGCTCCTCCGATAACTGGGGTGACCTTGGT TAATATTACCCAGCAGCCTCCCCGTTGCCCTCTGGATCCACTG CTTAAATACGGACGAGGACAGGGCCCTGTCTCCTCAGCTTCAGG CACCACCACTGACCTGGGACAGTGAATC	UCL-HLP
10	CGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCA ACGACCCCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCATA GTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTA TTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATAT GCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCG CCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTT GGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATG	CMVe
11	GTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAA CGACCCCGCCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATT TACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATG CCAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGC CTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCTACTTG GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGGTCGAGG TGAGCCCCACGTTCTGCTTCACTCTCCCCATCTCCCCCCCCCTCCC ACCCCCAATTTTGATTTATTTATTTTAAATTATTTTGTGCAGCG ATGGGGGGCGGGGGGGGGGGGGGGCGCGCCAGGCGGGGCGGGG CGGGGCGAGGGGCGGGGCGGGGCGAGGCGGAGAGGTGCGGCGG CAGCCAATCAGAGCGGCGCGCTCCGAAAGTTTCTTTTATGGCG AGGCGGCGGGCGGGCGGCCCTATAAAAAGCGAAGCGCGCGGC GGGCGGGAGTCGCTGCGTTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGCTCCGC GCCGCCTCGCGCCGCCCCGCCCGGCTCTGACTGACCGCGTTACTC CCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAA	CAG

[0170]

서열 식별 번호	서열 (5' → 3')	명칭
	TTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTCGTTTCTTTCTGTGGCTGCGT GAAAGCCTTAAAGGGCTCCGGGAGGGCCCTTTGTGCGGGGGGGA GCGGCTCGGGGGGTGCGTGCCTGTGTGTGTGCGTGCGGAGCGCC GCGTGCGGGCCGCGCTGCCCGGGGCTGTGAGCGCTGCGGGGCGC GGCGCGGGGCTTTGTGCGCTCCGCGTGTGCGCGAGGGGAGCGCG GCCGGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGCTGCGAGGGGAA CAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGCGGGGGGTGAGCAGGG GGTGTGGGCGCGCGGTGCGGCTGTAACCCCCCTGCACCCCC CTCCCCAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTC CGTGCGGGGCGTGGCGCGGGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGGT GGCGGCAGGTGGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCGCTCGGGC CGGGGAGGGCTCGGGGGAGGGGCGCGCGGCCCGGAGCGCCG GCGGCTGTGAGGCGCGGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTATGG TAATCGTGCAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTG GCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCGCCGACCCCTCTAGCGG GCGCGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGCGAGGAAGGAAATGGGCG GGGAGGGCCTTCGTGCGTCCCGCGCCGCGTCCCCTTCTCCATC TCCAGCCTCGGGGCTGCCGAGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGG GACGGGGCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGGCGTGTACCGGCGGC TCTAGAGCCTCTGCTAACCATGTTTCATGCCTTCTCTTTTCTAC AGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTGTGTGCTGTCTCATCATTTG GCAAAGAATT	
12	GCTCCGGTGCCCGTCAGTGGGCAGAGCGCACATCGCCACAGTC CCCGAGAAGTTGGGGGAGGGGTGCGCAATTGAACCGGTGCCTA GAGAAGGTGGCGGGGTAACTGGGAAAGTGATGTGCTGTACT GGCTCCGCCTTTTCCGAGGGTGGGGGAGAACCGTATATAAGT GCAGTAGTCGCGTGAACGTTCTTTTCGCAACGGGTTGCGGCC AGAACACAGG	EFS

[0171]

[0172]

실시예 2

[0173]

전반적인 교도의 드라이버

[0174]

서열식별번호: 1 및 서열식별번호: 2 조절 요소의 발현 패턴을 평가하기 위해, 루시퍼라제에 연결된 각각의 조절 요소를 함유하는 제조합 AAV 벡터를 제조하였다. 사용된 조절 요소는 SCP, SERpE_TTR, Proto1, CMV, UCL-HLP, CMVe, 서열식별번호: 1, 및 서열식별번호: 2였다. 플라스미드 DNA를 유체역학적 꼬리 정맥 주사를 통해 SCID-베이지 마우스에 전달하고 (마우스 당 12 μ g의 발현 벡터), 주사 48시간 후에 마우스에 5 ug (~ 0.25 mg/kg)의 푸리마진을 주사함으로써 루시퍼라제 발현을 검정하였다. 도 2a는 상이한 조절 요소들의 제어 하의 루시퍼라제 발현을 도해하고, 서열식별번호: 1 및 2가, 각각의 RE가 minCMV에 연결된 경우에, 마우스 내의 다양한 조직에서의 루시퍼라제 발현을 가리키는 백색 영역에 의해 도해되는 바와 같이, 신장 세포뿐만 아니라 적어도 하나의 추가적인 세포 유형에서 작동가능하게 연결된 트랜스진 발현을 구동시킬 수 있었음을 도해한다. 도 2b에 도해된 바와 같이, 광자/초 단위의 루시퍼라제 발광에 의해 측정 시, 서열식별번호: 3 및 서열식별번호: 4 조절 요소 각각은 다른 조절 요소에 비교하여 높은 수준의 루시퍼라제 발현을 발생시켰다.

[0175]

실시예 3

[0176]

인간 제VIII인자의 발현

[0177]

SCID-베이지 마우스에 UCL-HLP; minCMV + 서열식별번호: 1; 또는 minCMV + 서열식별번호: 2에 작동가능하게 연결된 제VIII인자 (NIH 단백질 수탁 ID ABV90867.1)에 대한 코딩 서열을 함유하는 16 μ g의 발현 카세트 DNA를 주사하였다. 적어도 8마리의 마우스에 3가지 플라스미드 각각을 주사하였고, 적어도 추가적인 8마리의 마우스에 완충제를 주사하였다. 플라스미드 DNA 주사 24시간 후, 혈액 샘플을 취하고, 확립된 방법 (COATEST® SP4 FVIII, 크로모제닉스(Chromogenix); 비주얼라이즈(Visualize)™ DVIII 항원 키트, 어피니티 바이올로지컬스 인크(Affinity Biologicals INC.))을 사용하여 혈장을 제VIII인자 활성 및 농도에 대해 분석하였다. 도 3a에 도해된 바와 같이, minCMV + 서열식별번호: 1 및 minCMV + 서열식별번호: 2 발현 카세트 양쪽 모두가 1.5 IU/ml 이상의 수준으로 제VIII인자의 높은 혈장 농도를 발생시켰다. 도 3b는 서열식별번호: 3 (minCMV + 서열식별번호: 1) 및 서열식별번호: 4 (minCMV + 서열식별번호: 2) 양쪽 모두가 100% 이상의 혈장 제VIII인자 활성 수준을 발생시켰음을 도해한다. minCMV와 함께 제VIII인자 코딩 서열에 작동가능하게 연결된 경우에, 서열식별번호: 1 및/또는 2 조절 요소는 각각 114% 및 166%의 혈액 제VIII인자 활성 수준을 발생시켰고, 이는 UCL-HLP 프로모터로 나타난 활성보다 약 10배 및 15배 더 높았다.

[0178] 실시예 4

[0179] 유전자 편집

[0180] 트랜스제닉 마우스 Ai9 (잭스(Jax) 스톡 번호: 007909)에서 tdTomato 상류의 정지 카세트를 결실시키도록 올인원 재조합 AAV 비리온이 개발되었다. 정지 카세트가 saCas9에 의해 결실되면, tdTomato가 CAG 프로모터의 제어 하에 발현된다. EFS 프로모터, CMV 프로모터, 또는 CMV 프로모터 + 서열식별번호: 2의 제어 하의 saCas9를 함유하는 rAAV가 개발되었다. rAAV는 U6 프로모터의 제어 하의 2개의 Sa 가이드 RNA 스캐폴드를 추가로 포함하였다. 이러한 rAAV 비리온을 상기 기술된 트랜스제닉 마우스의 치아 이랑 내로 주사하였다. 3주 후에 뇌를 고정하고, 절편화하고, 치아 이랑에서의 tdTomato의 발현을 평가하였다. 도 4b에 도해진 바와 같이, CMV + 서열식별번호: 2 (또는 서열식별번호: 4)가 CMV 단독 또는 EFS보다 더 많은 tdTomato 발현 세포를 발생시켰다. 도 4a는 CMV에 연결된 경우의 서열식별번호: 2 (또는 서열식별번호: 4)가 적어도 뇌 세포의 하위집단, 예를 들어, 뉴런에서 연결된 트랜스진 (RFP)의 발현을 구동시켰다는 것을 도해한다.

[0181] 실시예 5

[0182] 응혈 장애의 유전자 요법 치료

[0183] 유전자 조작 FVIII 녹아웃 마우스 (F8tmlSrcmo, F8 유전자의 엑손 16-19의 결실; 중국 상하이의 상하이 모델 오르가니즘 센터 인크(Shanghai Model Organism Center, Inc.)로부터 획득됨)는 꼬리 끝을 자르고 응혈이 발생할 때까지 출혈시킴으로써 방출된 혈액의 부피, 또는 응혈이 발생할 때까지 경과된 시간을 측정함으로써 검정될 수 있는 응혈 결핍이 있다. FVIII 녹아웃 마우스에 포스페이트 완충 염수 (PBS 대조군) 또는 FVIII 트랜스진 발현을 구동시키는 서열식별번호: 4를 함유하는 재조합 AAV 비리온을 주사하였다. rAAV 비리온을 2개의 상이한 용량으로 주사하였다: 3^{11} gc/kg 또는 3^{12} gc/kg. 주사 3주 후, 처리된 FVIII-녹아웃 마우스의 꼬리를 자르고, 응혈까지의 시간 및 혈액 부피 상실을 측정하였다. 또한 일군의 비-녹아웃 마우스의 꼬리를 자르고, 응혈까지의 시간 및 혈액 부피에 대해 평가하였다. 도 5a에 나타난 바와 같이, PBS 처리 FVIII 녹아웃 마우스는 처리되지 않은 비-녹아웃 마우스보다 2배를 초과하는 부피의 혈액을 상실하였다. 그러나, rAAV 처리 FVIII 녹아웃 마우스는 PBS 처리 마우스보다 더 적은 혈액을 상실하였다. 더 높은 rAAV 용량에서, 처리된 마우스는 처리되지 않은 비-녹아웃 마우스와 동일한 혈액 부피를 상실하였다. 도 5b에 도해진 바와 같이, 출혈 시간 검정법에 대해 유사한 결과가 나타났다. 더 낮은 rAAV 용량은 출혈 시간에 대한 효과를 나타내지 않았지만, FVIII에 작동가능하게 연결된 서열식별번호: 4를 함유하는 더 높은 용량의 rAAV는 출혈 시간을 거의 비-녹아웃 마우스에 대한 시간까지 감소시켰다.

[0184] 실시예 6

[0185] 응혈 장애의 유전자 요법 치료

[0186] FVIII 녹아웃 마우스 (실시예 5에 기술된 바와 같음)에 포스페이트 완충 염수 또는 FVIII의 발현을 구동시키는 서열식별번호: 13-17 각각을 함유하는 재조합 AAV 비리온, 또는 FVIII의 발현을 구동시키는 서열식별번호: 9 (UCL-HLP)를 함유하는 대조군 비리온을 주사하였다. 도 8은 처리되지 않은 녹아웃 마우스 (KO) 및 다양한 비리온으로 처리된 마우스에 대한 형질감염 3주 후의 혈액 내의 FVIII의 농도를 도해한다. 서열식별번호: 13, 서열식별번호: 14, 또는 서열식별번호: 17을 함유하는 비리온이 생체 내에서 가장 높은 FVIII 발현을 발생시켰고; 서열식별번호: 15는 다른 조절 요소에 비교하여 중등도의 FVIII 발현을 발생시켰으며; 서열식별번호: 16은 다른 서열에 비교하여 낮은 FVIII 발현을 발생시켰다. 그러나, 서열식별번호: 16은 여전히 UCL-HLP 프로모터보다 약 2배 더 높은 FVIII 농도를 발생시켰다.

[0187] 도 9 및 표 4에 도해진 바와 같이, 발현된 FVIII의 활성을 실시예 3에 기술된 바와 같이 또한 검정하였다. 상이한 비리온들로부터의 활성 수준이 발현 수준과 동일한 패턴을 따랐다.

[0188] <표 4> 형질감염된 마우스의 혈액 내의 FVIII의 활성

	KO	서열식별 번호: 13	서열식별 번호: 14	서열식별 번호: 15	서열식별 번호: 16	서열식별 번호: 17	서열식별 번호: 9
상이한 마우스들에서의 FVIII의 활성 수준 (야생형의 %)	-1.4019	-1.1497	172.7369	19.9399	1.0077	5.2719	-0.7564
	-1.412	93.1133	46.0407	14.038	0.8576	6.1928	-0.4091
	-1.0884	62.7729	198.6102	3.0212	0.8175	20.677	-0.2897
	-1.9783	2.2538	4.9381	9.5587	0.6174	23.1995	-0.7022
	-2.1097	86.574	6.5522	12.6458	2.6694	12.9859	-0.8216
	-1.8427	14.8857	35.0801	4.5446	3.4701	154.5709	-0.4308
	-1.9392	64.9174	13.806	12.3936	2.0187	53.9879	0.3508
	-1.6585	12.4836	31.4121	2.9909	-0.8641	15.8733	-0.7347
	-1.5796	1.2449	26.6502	18.2246	-0.794	44.1145	-0.5285
			1.2355	8.8654	1.0177	63.181	-0.192
평균	-1.6678	37.4551	53.7062	10.62227	1.0818	40.00547	-0.45142

[0189]

[0190] 주사 3주 후, 처리된 FVIII 녹아웃 마우스의 꼬리를 자르고, 응혈까지의 시간 및 혈액 부피를 측정하였다. 또한 일군의 비-녹아웃 마우스의 꼬리를 자르고, 응혈까지의 혈액 부피 및 시간에 대해 평가하였다. 도 10 및 표 5에 도해된 바와 같이, PBS 처리 FVIII 녹아웃 마우스는 처리되지 않은 비-녹아웃 마우스 (또는 WT 마우스)보다 2배를 초과하는 부피의 혈액을 상실하였다. 그러나, rAAV 처리 FVIII 녹아웃 마우스는 PBS 처리 마우스보다 더 적은 혈액을 상실하였다. 서열식별번호: 17을 함유하는 비리온이 제공된 마우스는 처리되지 않은 비-녹아웃 마우스와 유사한 혈액 부피를 상실하였다. 도 11 및 표 6에 나타난 바와 같이, 출혈 시간 검정법에 대해 유사한 결과가 관찰되었다. 서열식별번호: 15를 포함하는 비리온으로 처리된 마우스에 대한 출혈 시간이 출혈 시간 및 혈액 상실에서 가장 강한 감소를 나타냈다.

[0191] <표 5> 상이한 비리온들로 형질감염된 마우스에서의 응혈 전에 상실된 혈액 부피

	KO	서열식별 번호: 13	서열식별 번호: 14	서열식별 번호: 15	서열식별 번호: 16	서열식별 번호: 17	서열식별 번호: 9	WT
상이한 마우스로부터 상실된 혈액 부피 (g)	0.0814	0.3264	0.1107	0.0223	0.3606	-0.0114	0.5145	0.0447
	0.4122	0.05	0.1479	0.1471	0.1367	0.0145	1.1232	0.0001
	-0.0522	0.6822	0.2897	0.0136	0.6372	0.0341	0.4819	-0.0357
	0.6397	0.0178	0.0526	0.0449	0.219	0.0575	0.486	0.0836
	0.3505	0.0356	0.2819	0.3934	0.2606	0.0963	0.4708	0.1065
	0.4982	0.1057	0.1665	0.0331	0.201	0.0837	0.0806	0.0693
	-0.0116	0.2129	0.0934	0.0919	0.0827	0.0288	0.34	0.061
	0.1827	0.0133	0.197	0.0748	0.438	0.103	0.2327	0.0423
	0.2793	0.0573	0.0355	0.0782	0.0275	0.0223	0.4931	0.0919
			0.1657	0.0456	0.1477	0.191	0.0281	0.1329
평균	0.264	0.167	0.154	0.094	0.251	0.062	0.425	0.060

[0192]

[0193] <표 6> 상이한 비리온들로 형질감염된 마우스에 대한 응혈까지의 출혈 시간

	KO	서열식별 번호: 13	서열식별 번호: 14	서열식별 번호: 15	서열식별 번호: 16	서열식별 번호: 17	서열식별 번호: 9	WT
상이한 마우스로부터의 출혈 시간 (분)	6.42	13.25	3.28	6.78	11.22	2.38	27.63	4.55
	25.23	8.3	11.02	9.5	15.6	1.95	26.88	0.38
	0	28.4	14.78	1.28	24.27	18.93	20.4	0.63
	26.17	0.92	2.52	3.62	27.5	17.73	20.2	5.15
	19.98	4.22	19.02	13.28	19.17	6.7	30	4.6
	30	16.95	3.27	1.15	23.5	9.95	13.15	2.13
	14.65	30	6.38	14.1	13.23	3.87	29.67	3.7
	21.93	7.58	8.17	1.58	22.45	21.43	14.43	4.68
	22.35	17.82	4.73	11.52	12.43	8.5	30	2.33
			14.6	0.35	13.32	13.33	1.66	8.63
평균	18.52	14.16	8.13	6.97	18.81	10.16	23.59	3.12

[0194] 실시예 7

[0195] 간에서의 ATP7B 발현

[0196]

[0197] C57BL6/J 마우스에 서열식별번호: 13의 제어 하의 ATP7B를 함유하는 AAV8 벡터를 정맥내 주사하였다. 바이러스 전달 2주 후, 간을 수확하였다. 10 u1/mL 베타-메르캅토에탄올이 보충된 600 u1의 RLT에서 간 천공물을 파괴

및 균질화하고, 온-컬럼 DNase 처리를 포함하여, 제조사의 프로토콜에 따라 RNeasy 미니 키트 (키아젠(Qiagen))를 사용하여 RNA를 추출하였다. 각각의 샘플에 대해, 올리고DT 프라이머를 사용하여, RNA (3 ug)를 수퍼스크립트(Superscript) IV (인비트로젠(Invitrogen))로 역전사시켰다 (65℃ 5분, 55℃ 10분, 85℃ 10분). 인간 ATP7B (5'-CATTCCAGGACTGTCCATTCT-3' (서열식별번호: 18); 5'-GGCCTGAACGTAGAAGTACCA-3' (서열식별번호: 19)), 및 GAPDH (5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (서열식별번호: 20); 5'-TCCACCACCCTGTGCTGTA-3' (서열식별번호: 21))에 대한 프라이머를 표준 곡선으로 검증하여 신뢰도를 보장하고, 하기 증폭 조건 하에 qPCR (퓨전(Phusion), SYBR 그린)에 사용하였다: (98℃ 2분, 40×[98℃ 10초, 67℃ 30초, 92℃ 15초]). ATP7B 발현을 GAPDH에 대해 정규화하였고, 델타-델타 Ct 방법을 사용하여 기준선에 대한 배수 변화로서 나타냈다. 도 12 및 표 7에 도해진 바와 같이, 서열식별번호: 13이 3가지 상이한 용량에서 간에서의 ATP7B 발현을 구동시켰고, 가장 높은 바이러스 용량이 가장 높은 ATP7B 발현을 발생시키면서 용량 반응을 나타냈다.

[0198] <표 7> 형질감염된 마우스의 간에서의 ATP7B 발현

	완충제	서열식별번호 13; 1E10 gc/마우스	서열식별번호 13; 1E11 gc/마우스	서열식별번호 13; 1E12 gc/마우스
형질감염된 마우스의 간에서의 상대적 ATP7B 발현 (log2)	3.214475452	111.7850412	87.30041862	5639.103082
	1.992504985	7.333913922	375.1308235	6142.385453
	2.857162979	20.64780715	306.8202728	1207.591395
	3.20705701	27.24494487	183.2814118	4273.64098
	0.339445061	1.698879272	3.813855015	2376.435176
	0.45520343	0.501590988	2.734448707	1352.347313
	0.405540152		19.17626705	26577.47941
	0.271919214		0.5721968	128.407293
평균	1.592913535	28.20202957	122.3537118	5962.17376

[0199]

[0200]

실시예 7은 ATP7B 트랜스진에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 본원에 개시된 RE를 포함하는 발현 카세트가 ATP7B 결핍과 연관된 장애 또는 병태, 예를 들어, 윌슨병 치료를 필요로 하는 동물, 포유동물, 또는 인간 대상체에서 이를 치료하는데 사용될 수 있다는 것을 예시한다. 추가로, 이같은 발현 카세트는, 예를 들어, 정맥내 주사 또는 주입을 통해, rAAV8를 사용하여 생체 내에 전신으로 전달될 수 있다.

[0201]

실시예 8

[0202]

간에서의 높은 EGFP 전사

[0203]

C57BL6/J 마우스에 서열식별번호: 4, 13, 14, 15, 16, 17, 및 27의 다양한 RE의 제어 하의 EGFP를 함유하는 AAV8 벡터를 정맥내 주사하였다. 각각의 AAV8 벡터를 5×10^{11} gc/마우스의 용량으로 투여하였다. 바이러스 전달 2주 후, 간을 수확하였다. 10 ul/mL 베타-메르캅토에탄올이 보충된 600 ul의 RLT에서 간 천공물을 파괴 및 균질화하고, 온-컬럼 DNase 처리를 포함하여, 제조사의 프로토콜에 따라 RNeasy 미니 키트 (키아젠)를 사용하여 RNA를 추출하였다. 각각의 샘플에 대해, 올리고DT 프라이머를 사용하여, RNA (3 ug)를 수퍼스크립트 IV (인비트로젠)로 역전사시켰다 (65℃ 5분, 55℃ 10분, 85℃ 10분). EGFP (5'-GCTACCCGACCACATGAAG-3' (서열식별번호: 42); 5'-TCTTGATGTTGCCGTCGTCC-3' (서열식별번호: 43)), 및 GAPDH (서열식별번호: 20 및 서열식별번호: 21)에 대한 프라이머를 하기 증폭 조건 하에 qPCR (퓨전, SYBR 그린)에 사용하였다: (98℃ 2분, 40×[98℃ 10초, 65℃ 30초, 92℃ 15초]). EGFP 발현을 GAPDH에 대해 정규화하였고, 델타-델타 Ct 방법을 사용하여 기준선에 대한 배수 변화로서 나타냈다 (도 13). 도 13에 도해진 바와 같이, RNA 전사체에 의해 측정 시, 각각의 테스트된 RE가 간에서 EGFP 발현을 증가시켰다. 추가로, 서열식별번호: 4, 서열식별번호: 27, 및 서열식별번호: 14가 유사한 수준의 EGFP를 발생시켰다.

[0204]

실시예 8은 본 개시내용의 비교적 짧은 RE가, RNA 전사체에 의해 측정 시, 간에서 높은 수준의 트랜스진 발현을 발생시킬 수 있다는 것을 예시한다.

[0205]

본 발명의 바람직한 실시양태가 본원에서 제시되고 기술되었지만, 이같은 실시양태는 예로서만 제공된다는 것이 관련 분야의 기술자에게 명백할 것이다. 본 발명을 벗어나지 않으면서 다수의 변경, 변화, 및 치환이 이제 관련 분야의 기술자에게 발생할 것이다. 본원에 기술된 발명의 실시양태에 대한 다양한 대안이 본 발명을 실행하는데 사용될 수 있다는 것을 이해하여야 한다. 하기의 청구범위가 본 발명의 범주를 규정하는 것으로, 그리고 이러한 청구범위 및 그의 등가물의 범주 내의 방법 및 구조가 이에 의해 포함되는 것으로 의도된다.

[0206]

본 개시내용의 다양한 실시양태가 하기의 번호가 매겨진 조항을 참조로 정의된다.

- [0207] 1. 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 조절 요소를 포함하는 발현 카세트이며, 여기서 조절 요소가 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; 또는 (ii) (i) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열 중 하나 이상을 포함하는 것인 발현 카세트.
- [0208] 2. 조항 1에 있어서, 조절 요소가 비-천연 발생인 발현 카세트.
- [0209] 3. 조항 1 또는 2에 있어서, 조절 요소가 인트론 서열을 포함하는 발현 카세트.
- [0210] 4. 조항 1-3 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 프로모터와 치료용 트랜스진 사이에 위치하는 발현 카세트.
- [0211] 5. 조항 1 또는 2에 있어서, 조절 요소가 프로모터 서열을 포함하는 발현 카세트.
- [0212] 6. 조항 5에 있어서, 조절 요소가 카세트 내의 유일한 프로모터인 발현 카세트.
- [0213] 7. 조항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 비교적 짧은 발현 카세트.
- [0214] 8. 조항 1-6 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 100 bp 이하인 발현 카세트.
- [0215] 9. 조항 1-8 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 60 bp 이하인 발현 카세트.
- [0216] 10. 조항 1-9 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 50 bp 이하인 발현 카세트.
- [0217] 11. 조항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 rAAV의 일부분인 발현 카세트.
- [0218] 12. 조항 11에 있어서, rAAV가 rAAV8인 발현 카세트.
- [0219] 13. 조항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 아데노바이러스의 일부분인 발현 카세트.
- [0220] 14. 조항 1-10 중 어느 한 항에 있어서, 발현 카세트가 렌티바이러스의 일부분인 발현 카세트.
- [0221] 15. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb보다 큰 발현 카세트.
- [0222] 16. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0223] 17. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ATP7A, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0224] 18. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ATP8B1, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0225] 19. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ABCB4, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0226] 20. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0227] 21. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 CDKL5, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0228] 22. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 CNTNAP2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0229] 23. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0230] 24. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 제V인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0231] 25. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 제VIII인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0232] 26. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 제IX인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.

- [0233] 27. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 제X인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 카세트.
- [0234] 28. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 응혈 인자인 발현 카세트.
- [0235] 29. 조항 28에 있어서, 응혈 인자가 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편 중 어느 하나인 발현 카세트.
- [0236] 30. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 DNA 결합 단백질인 발현 카세트.
- [0237] 31. 조항 30에 있어서, DNA 결합 단백질이 내인성 유전자의 전사 조정인자인 발현 카세트.
- [0238] 32. 조항 31에 있어서, 전사 조정인자가 전사 활성화인자인 발현 카세트.
- [0239] 33. 조항 32에 있어서, 내인성 유전자가 생체 내에서 과소발현되는 발현 카세트.
- [0240] 34. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 간 질환 또는 병태와 연관되는 발현 카세트.
- [0241] 35. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 제1형, 제2형 또는 제3형 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC)와 연관되는 발현 카세트.
- [0242] 36. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 자폐증 스펙트럼 장애와 연관되는 발현 카세트.
- [0243] 37. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 혈우병과 연관되는 발현 카세트.
- [0244] 38. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 윌슨병과 연관되는 발현 카세트.
- [0245] 39. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 멘케스병 또는 후두각 증후군과 연관되는 발현 카세트.
- [0246] 40. 조항 30-33 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 CDKL5인 발현 카세트.
- [0247] 41. 조항 35에 있어서, 내인성 유전자가 제2형 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC2)와 연관된 ABCB11인 발현 카세트.
- [0248] 42. 조항 35에 있어서, 내인성 유전자가 제1형 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC1)와 연관된 ATP8B1인 발현 카세트.
- [0249] 43. 조항 35에 있어서, 내인성 유전자가 제3형 진행성 가족성 간내 담즙정체 (PFIC3)와 연관된 ABCB4인 발현 카세트.
- [0250] 44. 조항 36에 있어서, 내인성 유전자가 자폐증 스펙트럼 장애와 연관된 CNTNAP2인 발현 카세트.
- [0251] 45. 조항 37에 있어서, 내인성 유전자가 혈우병 A와 연관된 제VIII인자 또는 그의 변이체인 발현 카세트.
- [0252] 46. 조항 37에 있어서, 내인성 유전자가 혈우병 B와 연관된 제IX인자 또는 그의 변이체인 발현 카세트.
- [0253] 47. 조항 37에 있어서, 내인성 유전자가 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자 중 어느 하나인 발현 카세트.
- [0254] 48. 조항 38에 있어서, 내인성 유전자가 윌슨병과 연관된 ATP7B 또는 그의 변이체인 발현 카세트.
- [0255] 49. 조항 39에 있어서, 내인성 유전자가 멘케스병 또는 후두각 증후군과 연관된 ATP7A 또는 그의 변이체인 발현 카세트.
- [0256] 50. 조항 1-14 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 유전자 편집 단백질인 발현 카세트.
- [0257] 51. 조항 50에 있어서, 유전자 편집 단백질이 Cas 단백질인 발현 카세트.
- [0258] 52. 조항 51에 있어서, Cas 단백질을 내인성 유전자를 포함하는 게놈 유전자좌에 표적화하는 가이드 RNA를 추가로 포함하는 발현 카세트.
- [0259] 53. 조항 52에 있어서, 내인성 유전자가 돌연변이를 포함하거나 또는 비정상적으로 발현되는 발현 카세트.
- [0260] 54. 조항 53에 있어서, 돌연변이가 내인성 유전자의 과소발현을 발생시키는 발현 카세트.

- [0261] 55. 조항 51-54 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 제VIII인자인 발현 카세트.
- [0262] 56. 조항 51-54 중 어느 한 항에 있어서, 내인성 유전자가 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자인 발현 카세트.
- [0263] 57. 조항 1-56 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 조절 요소가 없는 발현 카세트에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 치료용 트랜스진 또는 내인성 유전자의 발현 증가를 발생시키는 발현 카세트.
- [0264] 58. 조항 57에 있어서, 발현 증가가 PCR 검정법을 사용하여 치료용 트랜스진 또는 내인성 유전자로부터의 RNA 전사체의 양에 의해 결정되는 발현 카세트.
- [0265] 59. 조항 57에 있어서, 발현 증가가 면역검정법을 사용하여 치료용 트랜스진 또는 내인성 유전자로부터 합성된 단백질의 수준에 의해 결정되는 발현 카세트.
- [0266] 60. 조항 30-56 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 조절 요소가 없는 발현 카세트에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 내인성 유전자의 발현 증가를 발생시키는 발현 카세트.
- [0267] 61. 조항 30-56 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 건강한 대상체에서의 내인성 유전자의 발현에 필적하는 수준으로 내인성 유전자의 발현 증가를 발생시키는 발현 카세트.
- [0268] 62. 조항 60 또는 61에 있어서, 발현 증가가 PCR 검정법을 사용하여 내인성 유전자로부터의 RNA 전사체의 양에 의해 결정되는 발현 카세트.
- [0269] 63. 조항 60 또는 61에 있어서, 발현 증가가 면역검정법을 사용하여 내인성 유전자로부터 합성된 단백질의 수준에 의해 결정되는 발현 카세트.
- [0270] 64. 조항 1-16, 30-34, 38, 48, 50-55, 및 57-63에 따른 발현 카세트를 투여하는 것을 포함하는, 윌슨병을 치료하는 방법.
- [0271] 65. 조항 1-16, 30-34, 38, 48, 50-55, 및 57-63 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 투여하는 것을 포함하는, ATP7B에서의 유전적 결손을 치료하는 방법.
- [0272] 66. 조항 1-15, 24-34, 37, 45-47, 및 50-63 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 투여하는 것을 포함하는, 응혈 장애를 치료하는 방법.
- [0273] 67. 조항 1-66 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 투여하는 것을 포함하는, 반수체기능부전 또는 유전적 결손을 치료하는 방법.
- [0274] 68. 조항 67에 있어서, 치료용 트랜스진 또는 내인성 유전자가 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 제VIII인자, 또는 그의 변이체인 방법.
- [0275] 69. 조항 67에 있어서, 치료용 트랜스진 또는 내인성 유전자가 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자, 또는 그의 변이체인 방법.
- [0276] 70. 조항 67 또는 68에 있어서, 트랜스진이 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 방법.
- [0277] 71. 조항 67 또는 68에 있어서, 트랜스진이 내인성 유전자의 발현을 조정하는 전사 조정인자인 방법.
- [0278] 72. 조항 71에 있어서, 내인성 유전자가 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 제VIII인자, 또는 그의 변이체인 방법.
- [0279] 73. 조항 1-63 중 어느 한 항에 따른 발현 카세트를 세포 내로 도입하는 것을 포함하는, 재조합 단백질 또는 생물체제를 생산하는 방법.
- [0280] 74. 적어도 3 kb의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 120 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하는 AAV 발현

카세트이며, 여기서 조절 요소가 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 경우의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 AAV 발현 카세트.

- [0281] 75. 적어도 3 kb의 트랜스진에 작동가능하게 연결된 비교적 짧은 인간-유래 조절 요소를 포함하는 AAV 발현 카세트이며, 여기서 비교적 짧은 조절 요소가 조절 요소가 없는 유사한 발현 카세트에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 적어도 100배, 적어도 200배, 적어도 300배, 적어도 400배, 적어도 500배, 적어도 600배, 적어도 700배, 적어도 800배, 적어도 900배, 또는 적어도 1000배만큼 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 AAV 발현 카세트.
- [0282] 76. 조항 74 또는 75에 있어서, 조절 요소가 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열을 포함하는 AAV 발현 카세트
- [0283] 77. 조항 74-76 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진 발현 증가가 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 경우의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 50배인 AAV 발현 카세트.
- [0284] 78. 조항 77에 있어서, 트랜스진 발현 증가가 적어도 100배인 AAV 발현 카세트.
- [0285] 79. 조항 74-78 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 트랜스진에 작동가능하게 연결된 CMV 프로모터의 크기-정규화 발현 활성에 비교하여 적어도 1.5배, 적어도 2배, 적어도 3배, 적어도 4배, 적어도 5배, 적어도 6배, 적어도 7배, 적어도 8배, 적어도 9배, 적어도 10배, 적어도 15배, 적어도 20배, 적어도 25배, 적어도 50배, 또는 적어도 100배인 크기-정규화 발현 활성을 나타내는 AAV 발현 카세트.
- [0286] 80. 조항 74-79 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진 발현 증가가 적어도 2개의 세포 유형에서 발생하는 AAV 발현 카세트.
- [0287] 81. 조항 80에 있어서, 적어도 2개의 세포 유형이 신장 세포, 상피 세포, 뉴런, 및 간 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 발현 카세트.
- [0288] 82. 조항 74-81 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 서열식별번호: 22-41 중 어느 하나 이상을 포함하고, 다른 프로모터 서열이 발현 카세트 내에 존재하지 않는 AAV 발현 카세트.
- [0289] 83. 조항 74-82 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2를 포함하는 AAV 발현 카세트.
- [0290] 84. 조항 83에 있어서, 조절 요소가 프로모터의 하류에 위치하는 AAV 발현 카세트.
- [0291] 85. 조항 74-84 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 트랜스진의 상류에 위치하는 AAV 발현 카세트.
- [0292] 86. 조항 74-85 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자; 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 AAV 발현 카세트.
- [0293] 87. 조항 86에 있어서, 트랜스진이 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 AAV 발현 카세트.
- [0294] 88. 조항 86에 있어서, 트랜스진이 FVIII, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 AAV 발현 카세트.
- [0295] 89. 조항 74-85 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 유전자 편집 단백질인 AAV 발현 카세트.
- [0296] 90. 조항 89에 있어서, 유전자 편집 단백질이 Cas인 AAV 발현 카세트.
- [0297] 91. 조항 74-85 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 DNA 결합 단백질인 AAV 발현 카세트.
- [0298] 92. 조항 91에 있어서, DNA 결합 단백질이 내인성 유전자의 발현을 증가시키는 전사 활성화인자인 AAV 발현 카세트.
- [0299] 93. 조항 91에 있어서, DNA 결합 단백질이 내인성 유전자의 발현을 감소시키는 전사 억제인자인 AAV 발현 카세트.

- [0300] 94. 조항 92에 있어서, 전사 활성화인자가 ATP7A; ATP7B; ATP8B1; ABCB4; ABCB11; CDKL5; CNTNAP2; ZEB2; 또는 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 또는 제12인자, 또는 그의 변이체의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0301] 95. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 ATP7A의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0302] 96. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 ATP7B의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0303] 97. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 ATP8B1의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0304] 98. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 ABCB4의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0305] 99. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 ABCB11의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0306] 100. 조항 94에 있어서, 전사 활성화인자가 내인성 FVIII의 발현을 증가시키는 AAV 발현 카세트.
- [0307] 101. 조항 74-100 중 어느 한 항에 있어서, AAV가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 및 scAAV로 이루어진 군으로부터 선택되는 AAV 발현 카세트.
- [0308] 102. 조항 101에 있어서, AAV가 AAV8인 AAV 발현 카세트.
- [0309] 103. 제조합 단백질을 코딩하는 서열을 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열 중 하나 이상과 작동 가능하게 연결시키는 것을 포함하는, 제조합 단백질을 생산하는 방법.
- [0310] 104. 조항 103에 있어서, 단백질을 코딩하는 서열이 1 kb, 1.5 kb, 2 kb, 2.5 kb, 3 kb, 3.5 kb, 4 kb, 4.5 kb, 5 kb, 5.5 kb, 6 kb, 6.5 kb, 7 kb, 또는 7.5 kb를 초과하는 방법.
- [0311] 105. (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; (ii) 그의 조합; 또는 (iii) (i) 및 (ii) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열로부터 선택된 하나 이상의 조절 요소에 작동가능하게 연결된 치료용 트랜스진을 포함하는 유전자 요법을 투여하는 것을 포함하는, 간 질환 또는 병태를 치료하는 방법.
- [0312] 106. 조항 105에 있어서, 간 질환 또는 병태가 윌슨병인 방법.
- [0313] 107. 조항 105에 있어서, 간 질환 또는 병태가 응혈 장애인 방법.
- [0314] 108. 조항 105에 있어서, 트랜스진이 ATP7A 또는 ATP7B, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 방법.
- [0315] 109. 조항 105에 있어서, 트랜스진이 제1인자, 제2인자, 제3인자, 제4인자, 제5인자, 제6인자, 제7인자, 제8인자, 제9인자, 제10인자, 제11인자, 제12인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 방법.
- [0316] 110. 조항 109에 있어서, 트랜스진이 제8인자, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 방법.
- [0317] 111. 조항 105-110 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 적어도 2개의 세포 유형에서 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 방법.
- [0318] 112. 조항 105-110 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 적어도 3개의 세포 유형에서 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 방법.
- [0319] 113. 조항 105-112 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 간세포에서 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 방법.
- [0320] 114. 조항 105-113 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 경우의 트랜스진 발현에 비교하여 적어도 2배인 수준으로 트랜스진 발현 증가를 발생시키는 방법.
- [0321] 115. 조항 105-114 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법이 AAV를 이용하는 방법.
- [0322] 116. 조항 115에 있어서, AAV가 AAV8인 방법.
- [0323] 117. 조항 105-114 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법이 아데노바이러스를 이용하는 방법.
- [0324] 118. 조항 105-114 중 어느 한 항에 있어서, 유전자 요법이 렌티바이러스를 이용하는 방법.
- [0325] 119. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 100 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하는 발현 벡터이며, 여기서 조절 요소가 조절 요소가 없는 제2 발현 벡터에 비교하여 적어도 2배만큼 트랜스진의 전반적 발현을 증가시키는 발현 벡터.

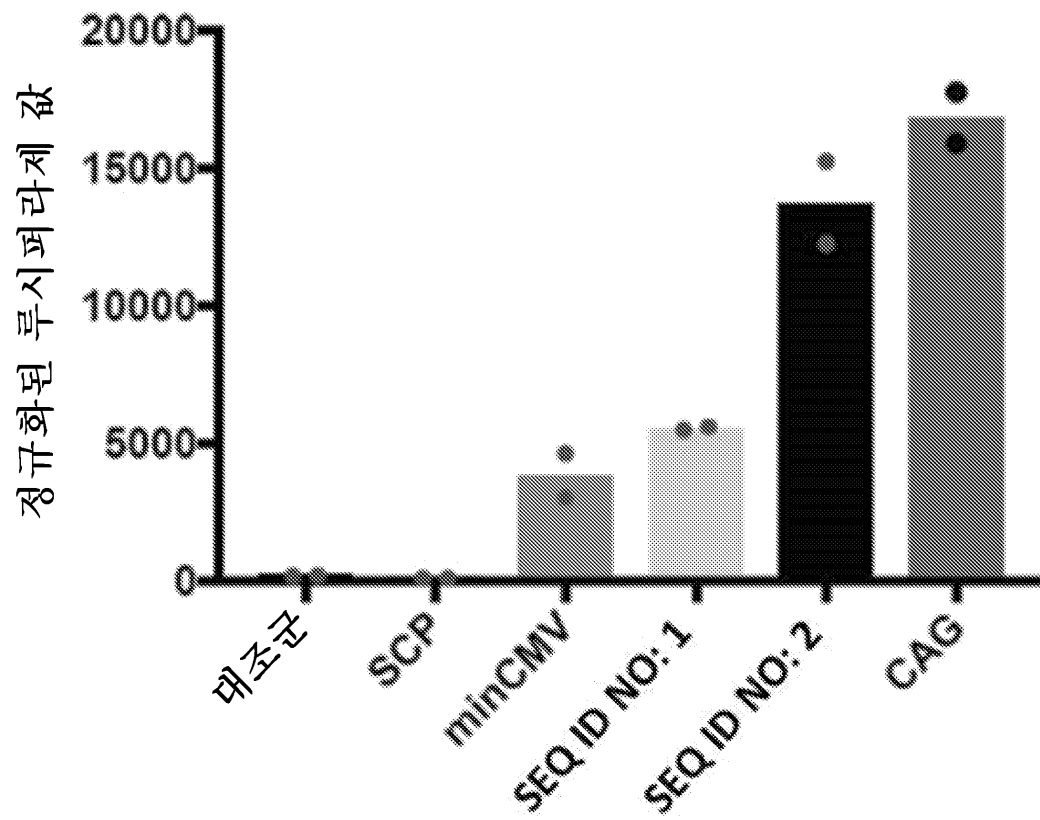
- [0326] 120. 조항 119에 있어서, 제2 발현 벡터가 CMV 프로모터에 작동가능하게 연결된 트랜스진을 포함하는 발현 벡터.
- [0327] 121. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 100 bp 이하의 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 이에 의해 트랜스진 발현이 CMV 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, 또는 CMVe 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높은 발현 벡터.
- [0328] 122. 조항 121에 있어서, 트랜스진 발현이 UCL-HLP 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높은 발현 벡터.
- [0329] 123. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하는 발현 벡터이며, 여기서 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질이 (i) 트랜스진을 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL의 농도; 또는 (ii) 코아테스트 검정법에 의해 측정 시 > 25%의 활성을 갖는 발현 벡터.
- [0330] 124. 크기가 100 bp 이하인 서열을 갖는 인간-유래 조절 요소가 세포에서 또는 생체 내에서 이러한 조절 요소의 맥락에서 발견되지 않는 트랜스진에 작동가능하게 연결된 것을 포함하는 벡터.
- [0331] 125. 조항 119-124 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 인트론 서열인 벡터.
- [0332] 126. 조항 125에 있어서, 조절 요소가 서열식별번호: 1 또는 서열식별번호: 2, 또는 이에 대한 상동성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열인 벡터.
- [0333] 127. 조항 1-63, 74-102, 및 119-126 중 어느 한 항에 있어서, 루시퍼라제를 트랜스진으로서 사용하는 것이 전 체 마우스에서 측정 시 1×10^8 개의 광자/초를 초과하는 전반적 발현을 발생시키는 발현 벡터 또는 카세트
- [0334] 128. 조항 127에 있어서, 활성 또는 트랜스진 발현이 마우스 당 16 μ g의 발현 벡터의 용량에 상응하는 발현 벡터 또는 카세트.
- [0335] 129. 조항 127에 있어서, 활성 또는 트랜스진 발현이 마우스 당 12 μ g의 발현 벡터의 용량에 상응하는 발현 벡터 또는 카세트.
- [0336] 130. 조항 1-63, 74-102, 및 119-129 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진의 내인성 버전이 생체 내에서 이러한 조절 요소에 연결되지 않는 발현 벡터 또는 카세트.
- [0337] 131. 조항 127에 있어서, 트랜스진의 전반적 발현이 CMV 프로모터, CMVe 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, 및 UCL-HLP 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택된 조절 요소가 있는 벡터 또는 카세트를 사용하는 트랜스진 발현보다 더 큰 수준인 발현 벡터 또는 카세트.
- [0338] 132. 조항 1-63, 74-102, 및 119-131 중 어느 한 항에 있어서, 발현이 마우스 생체 내에서 적어도 3, 4, 5, 6, 또는 7개의 상이한 세포 유형에서 검출가능한 발현 벡터 또는 카세트.
- [0339] 133. 조항 132에 있어서, 상이한 세포 유형이 폐포 세포, 심근세포, 상피 세포, 간세포, 장 세포, 근세포, 뉴런, 및 신장 세포로 이루어진 군으로부터 선택되는 발현 벡터 또는 카세트.
- [0340] 134. 조항 119-133 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 인헨서인 발현 벡터 또는 카세트.
- [0341] 135. 조항 134에 있어서, 프로모터를 추가로 포함하는 발현 벡터 또는 카세트.
- [0342] 136. 조항 135에 있어서, 프로모터가 CMV 프로모터, CMV, 프로모터, 수퍼 코어 프로모터, TTR 프로모터, Proto 1 프로모터, UCL-HLP 프로모터, AAT 프로모터, KAR 프로모터, EF1 α 프로모터, EFS 프로모터, 또는 CMVe 인헨서/CMV 프로모터 조합인 발현 벡터 또는 카세트.
- [0343] 137. 조항 119-136 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 전사후 변형 부위를 추가로 포함하는 발현 벡터.
- [0344] 138. 조항 119-137 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 Cas9인 발현 벡터.
- [0345] 139. 조항 138에 있어서, 트랜스진이 saCas9인 발현 벡터.
- [0346] 140. 세포 내에서 또는 생체 내에서 제VIII인자를 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >1.0 IU/mL의 농도로 제VIII인자의 발현을 구동시킬 수 있는 조절 서열에 작동가능하게 연결된 제VIII인자 트랜스진을 포함하는 발현 벡터.

- [0347] 141. 조항 140에 있어서, 조절 서열이 비교적 짧은 발현 벡터.
- [0348] 142. 조항 140 또는 141에 있어서, 조절 서열이 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41, 또는 그의 조합; 또는 이에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열 중 하나 이상을 포함하는 발현 벡터.
- [0349] 143. 조항 119-142 중 어느 한 항의 발현 벡터를 포함하는 바이러스 입자.
- [0350] 144. 조항 143에 있어서, 바이러스 입자가 AAV인 바이러스 입자.
- [0351] 145. 조항 144에 있어서, AAV가 AAV1, AAV2, AAV3, AAV3b, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV-DJ, 및 scAAV로 이루어진 군으로부터 선택되는 바이러스 입자.
- [0352] 146. 조항 143에 있어서, 바이러스 입자가 렌티바이러스인 바이러스 입자.
- [0353] 147. 조항 143에 있어서, 바이러스 입자가 아데노바이러스인 바이러스 입자.
- [0354] 148. 조항 119-147 중 어느 한 항에 있어서, 트랜스진이 치료용 트랜스진인 발현 벡터.
- [0355] 149. 조항 148에 있어서, 치료용 트랜스진이 제VIII인자, Cas9, DNA 결합 단백질, 호르몬, 성장 또는 분화 인자, 인슐린, 성장 호르몬, VEGF, 신경영양 인자, 섬유모세포 상피 인자; 시토카인, 인터루킨, 림포카인, 종양 괴사 인자, 항체, 면역글로불린, 인터페론, 키메라 T 세포 수용체; 지질단백질 수용체, 남성 섬유증 막형단 조절인자, I, II, III, 또는 IV형 점액다당류증과 연관된 유전자, 베타글로빈 또는 지질단백질 리파제인 발현 벡터.
- [0356] 150. 조항 148에 있어서, 치료용 트랜스진이 ATP7A, ATP7B, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 벡터.
- [0357] 151. 조항 148에 있어서, 치료용 트랜스진이 CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 또는 그의 변이체 또는 기능성 단편인 발현 벡터.
- [0358] 152. 조항 119-151 중 어느 한 항의 발현 벡터를 동물에게 투여하는 것을 포함하는, 동물 내의 복수의 상이한 조직으로 트랜스진을 전달하는 방법.
- [0359] 153. 세포를 조항 119-151 중 어느 한 항의 발현 벡터와 접촉시키는 것을 포함하는, 단백질, 항체 또는 기타 생물체제를 생산하는 방법.
- [0360] 154. 조항 153에 있어서, 세포가 CHO 세포 또는 HEK293T 세포인 방법.
- [0361] 155. 조항 119-151 중 어느 한 항의 발현 벡터를 동물 또는 식물에게 투여하는 것을 포함하는, 트랜스제닉 동물 또는 식물을 생산하는 방법.
- [0362] 156. 조항 119-151 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 40-50 bp인 발현 벡터.
- [0363] 157. 조항 119-151 중 어느 한 항에 있어서, 조절 요소가 50-60 bp인 발현 벡터.
- [0364] 158. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 인간-유래 조절 요소를 포함하는 발현 벡터이며, 여기서 트랜스진에 의해 코딩되는 단백질이 (i) 트랜스진을 검출하도록 구성된 ELISA 검정법에 의해 측정 시 >0.1 IU/mL의 농도; 또는 (ii) 코아테스트 검정법에 의해 측정 시 > 10%의 활성을 갖는 발현 벡터.
- [0365] 159. 트랜스진에 작동가능하게 연결된 120 bp 이하를 갖는 인간-유래 조절 요소를 포함하고, 이에 의해 트랜스진 발현이 UCL-HLP 프로모터에 의해 발현되는 동일한 트랜스진의 것보다 더 높은 발현 벡터.
- [0366] 160. 조항 158 또는 159에 있어서, 조절 요소가 프로모터인 발현 벡터.
- [0367] 161. 조항 158-160 중 어느 한 항에 있어서, 치료용 트랜스진이 DNA 결합 도메인 및 전사 조절 도메인을 포함하는 융합 단백질인 발현 벡터.
- [0368] 162. 치료용 트랜스진에 작동가능하게 연결된 비교적 짧은 조절 요소 (RE)를 포함하는 발현 카세트.
- [0369] 163. 조항 162에 있어서, 비교적 짧은 RE가 (i) 서열식별번호: 1-2, 13-17, 및 22-41; 또는 (ii) (i) 중 어느 하나에 대한 서열 동일성이 적어도 80%, 85%, 90%, 또는 95%인 서열 중 하나 이상을 포함하는 발현 카세트.
- [0370] 164. 조항 64-72 및 105-118 중 어느 한 항에 있어서, 투여가 전신 투여인 방법.

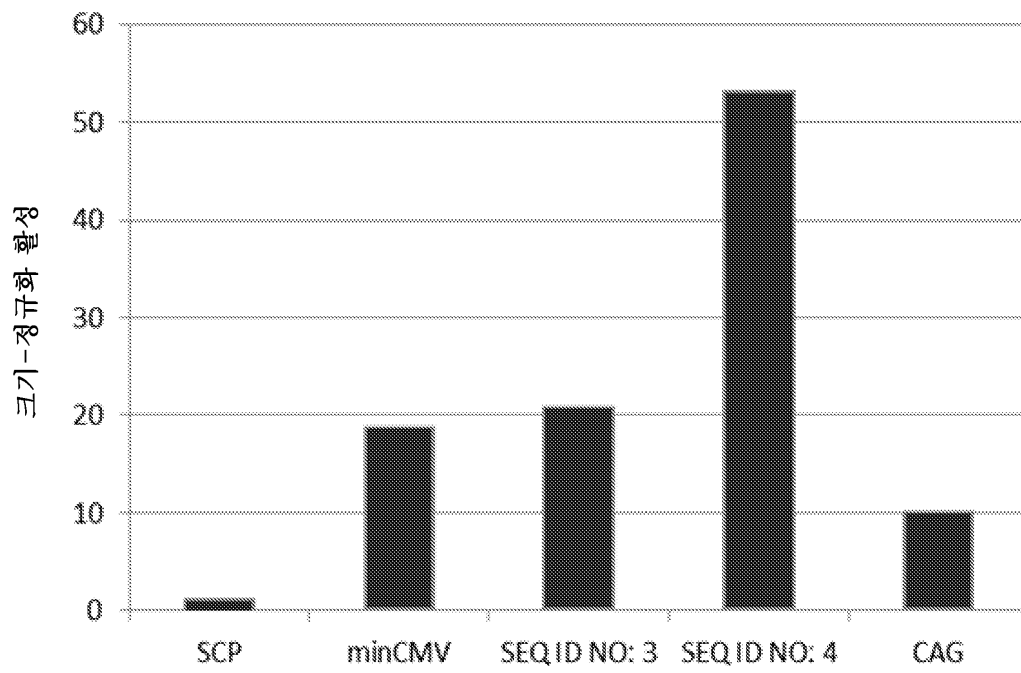
- [0371] 165. 조항 164에 있어서, 투여가 대상체에서의 정맥내 주사 또는 주입을 포함하는 방법.
- [0372] 166. 조항 165에 있어서, 대상체가 인간인 방법.
- [0373] 167. 조항 165에 있어서, 대상체가 동물인 방법.

도면

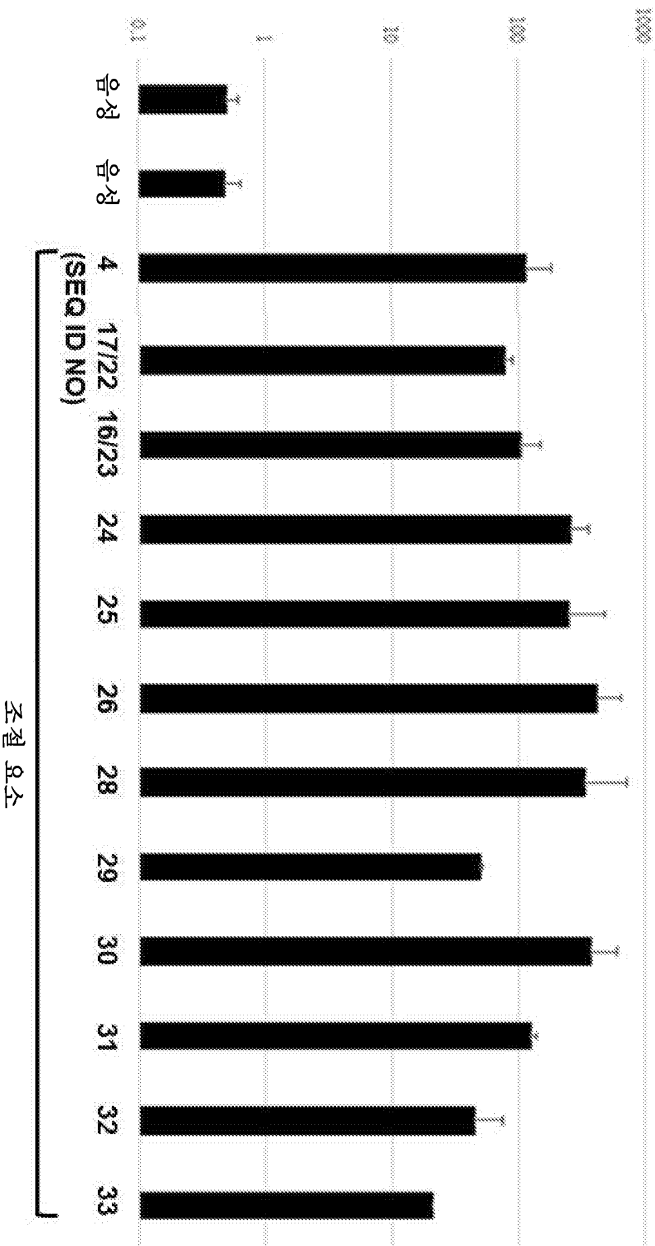
도면1a



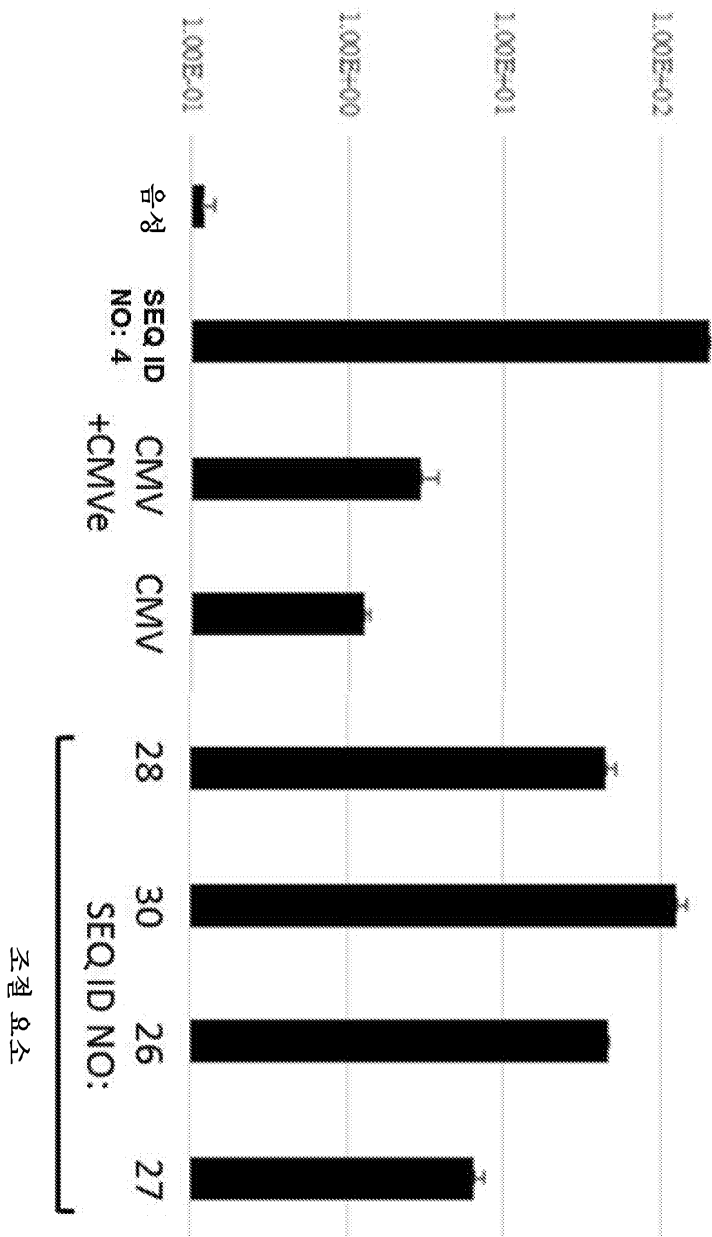
도면1b



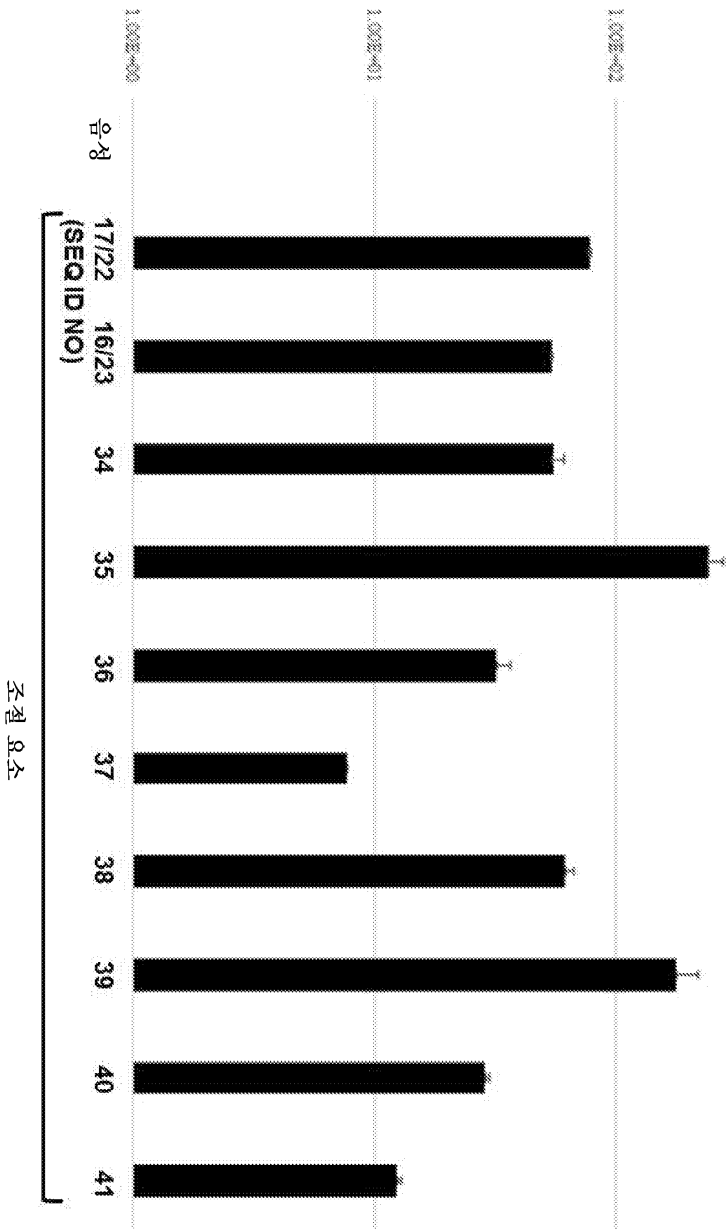
도면1c



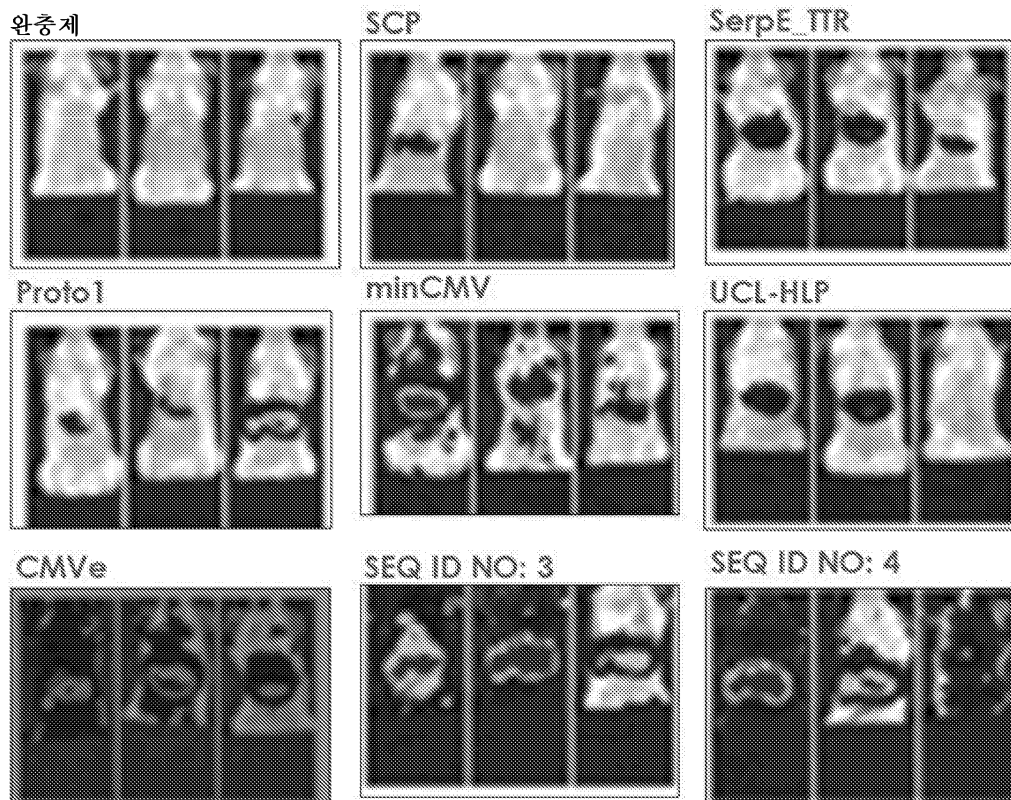
도면1d



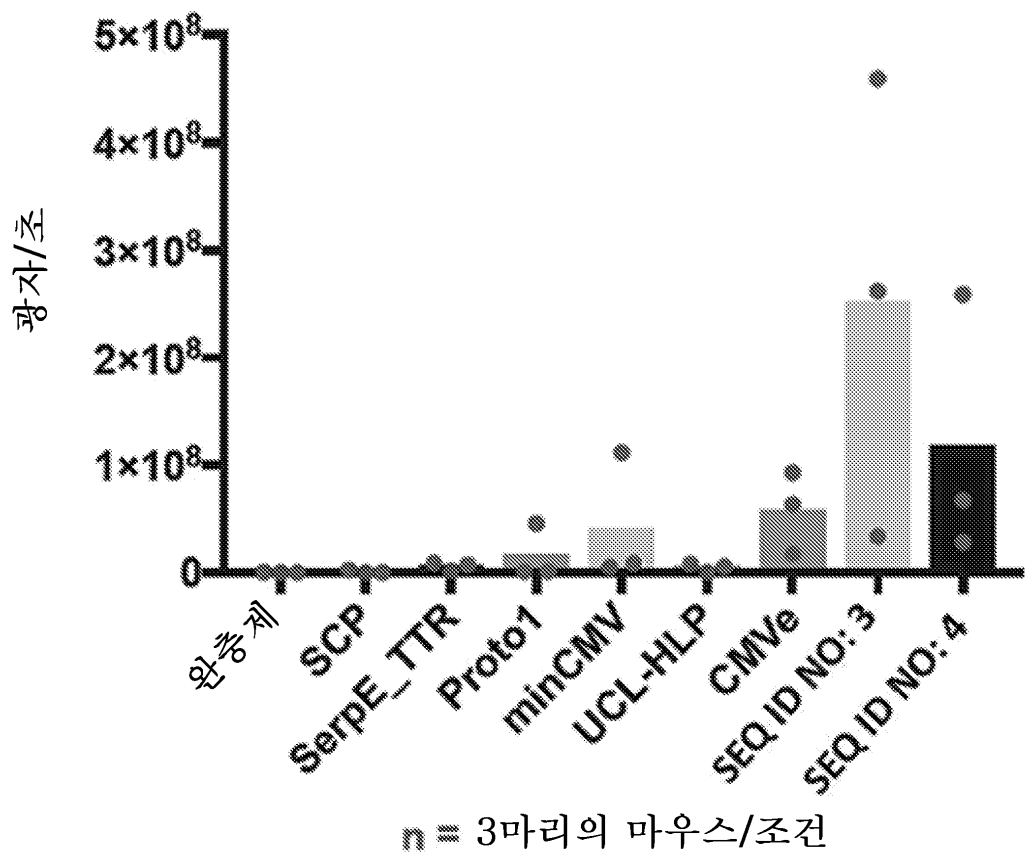
도면1e



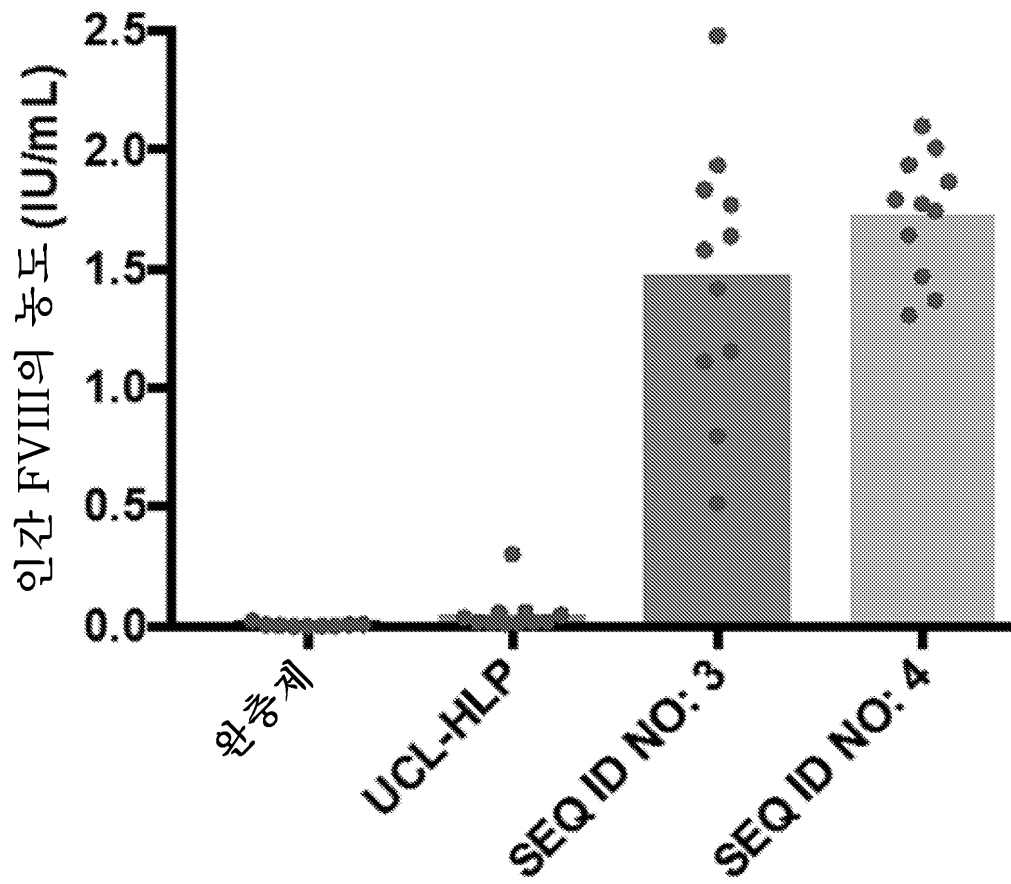
도면2a



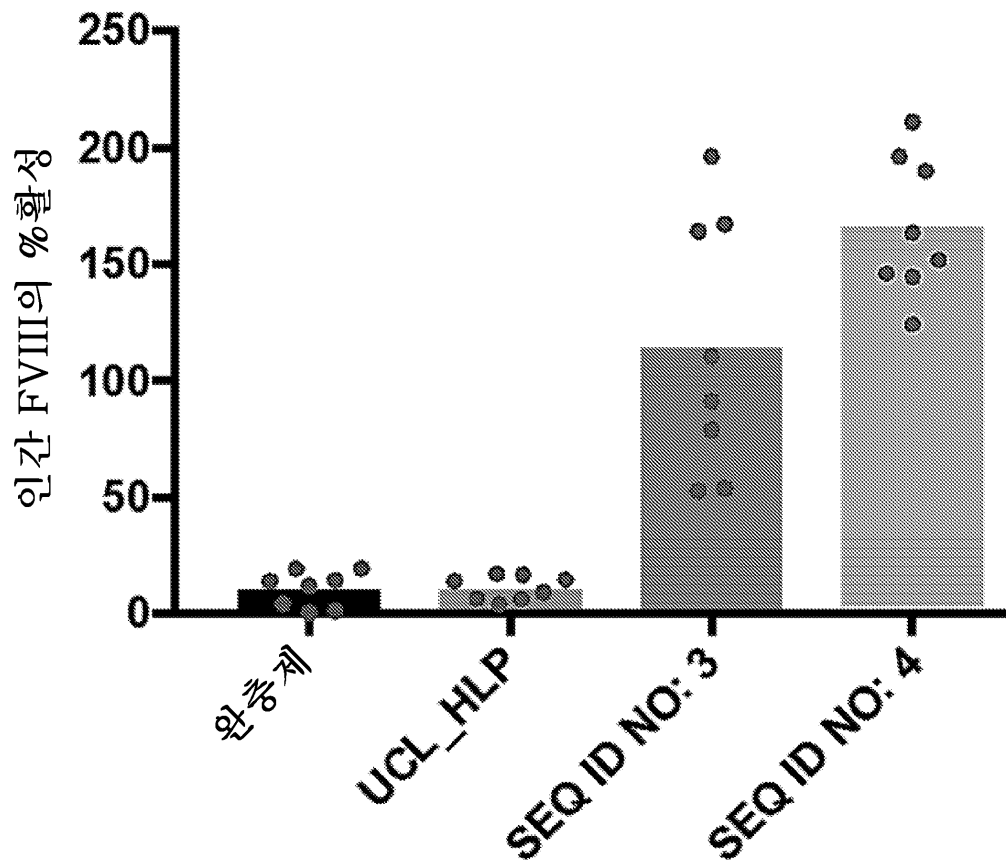
도면2b



도면3a



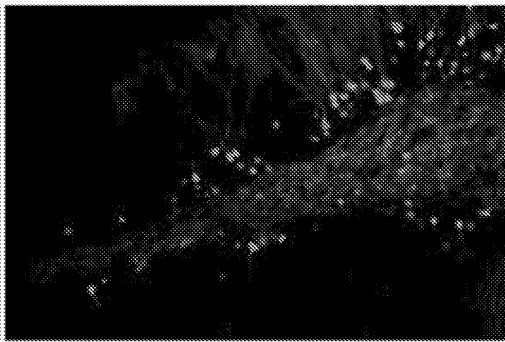
도면3b



도면4a

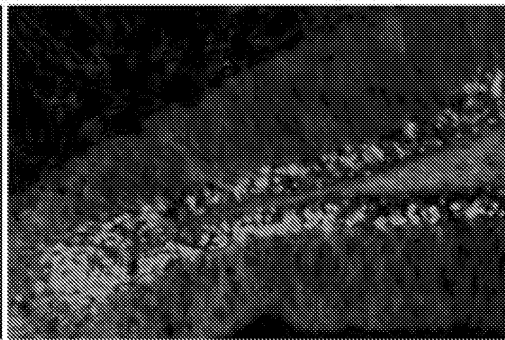
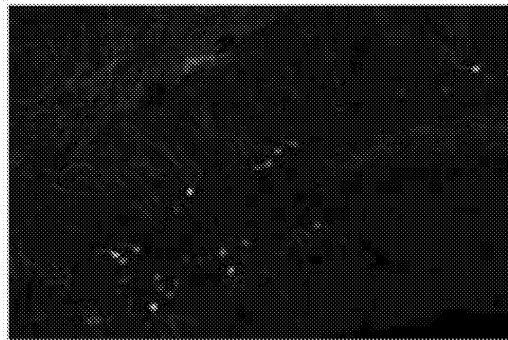
음성

EFS

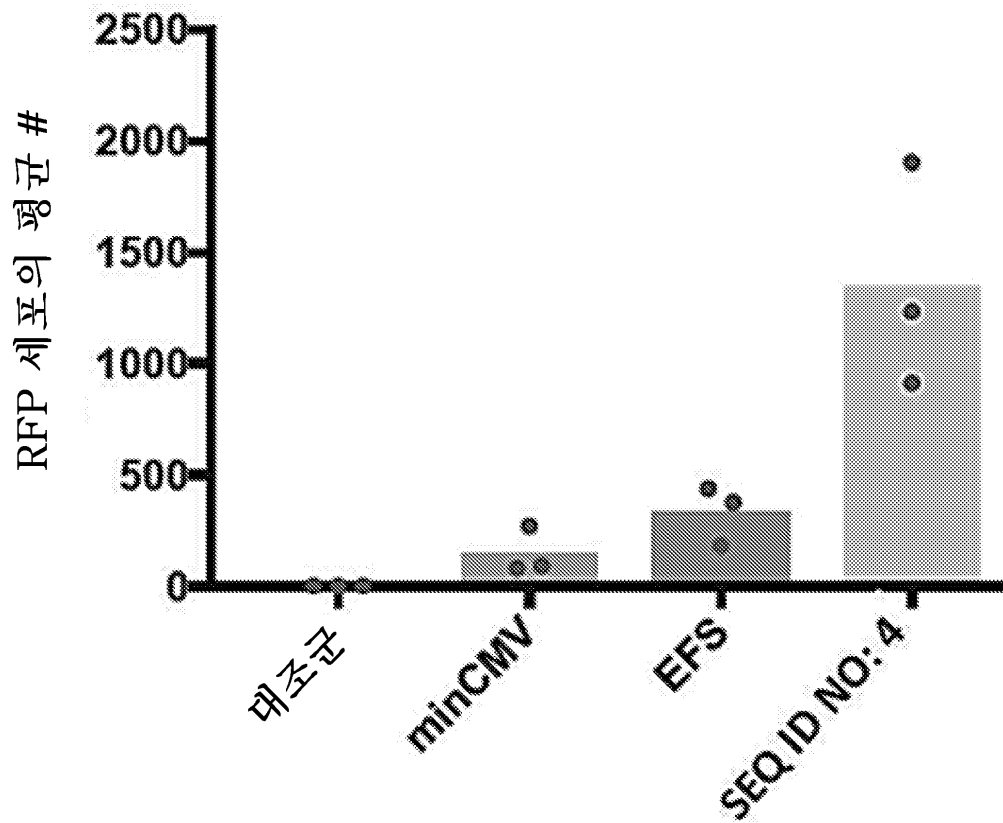


minCMV

SEQ ID NO: 4

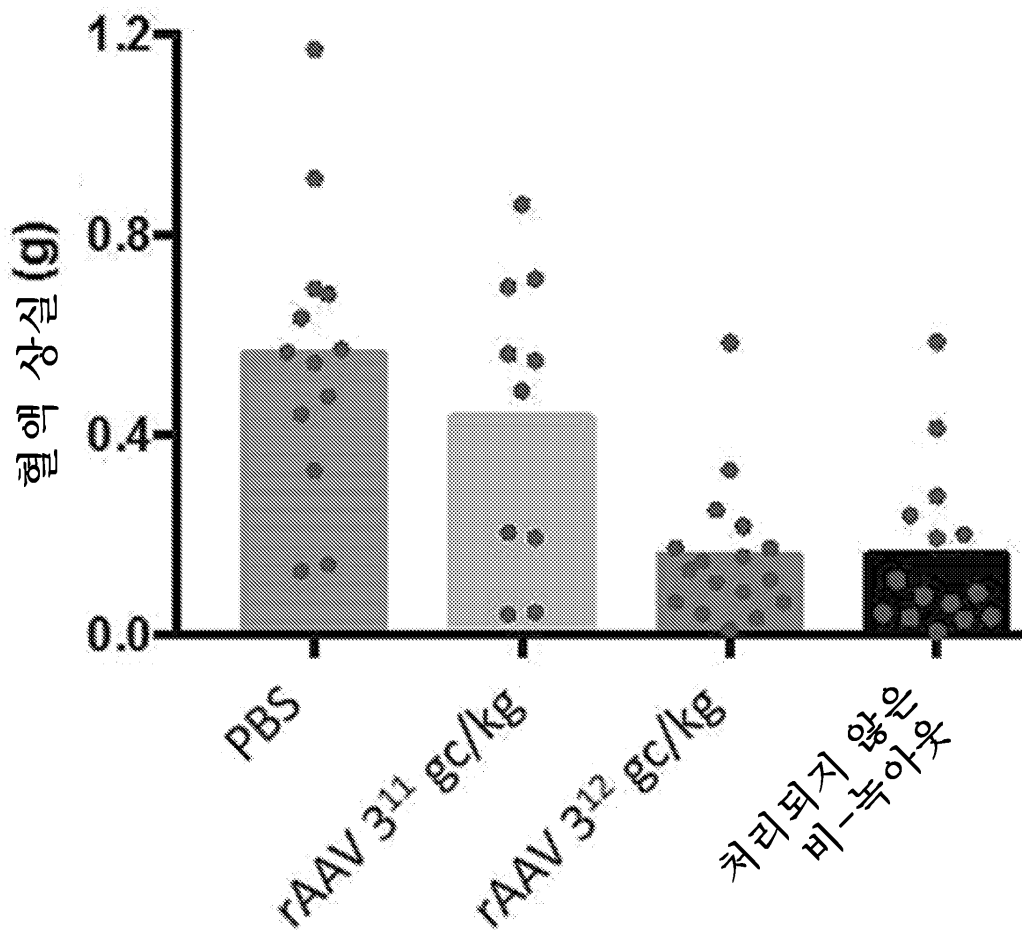


도면4b

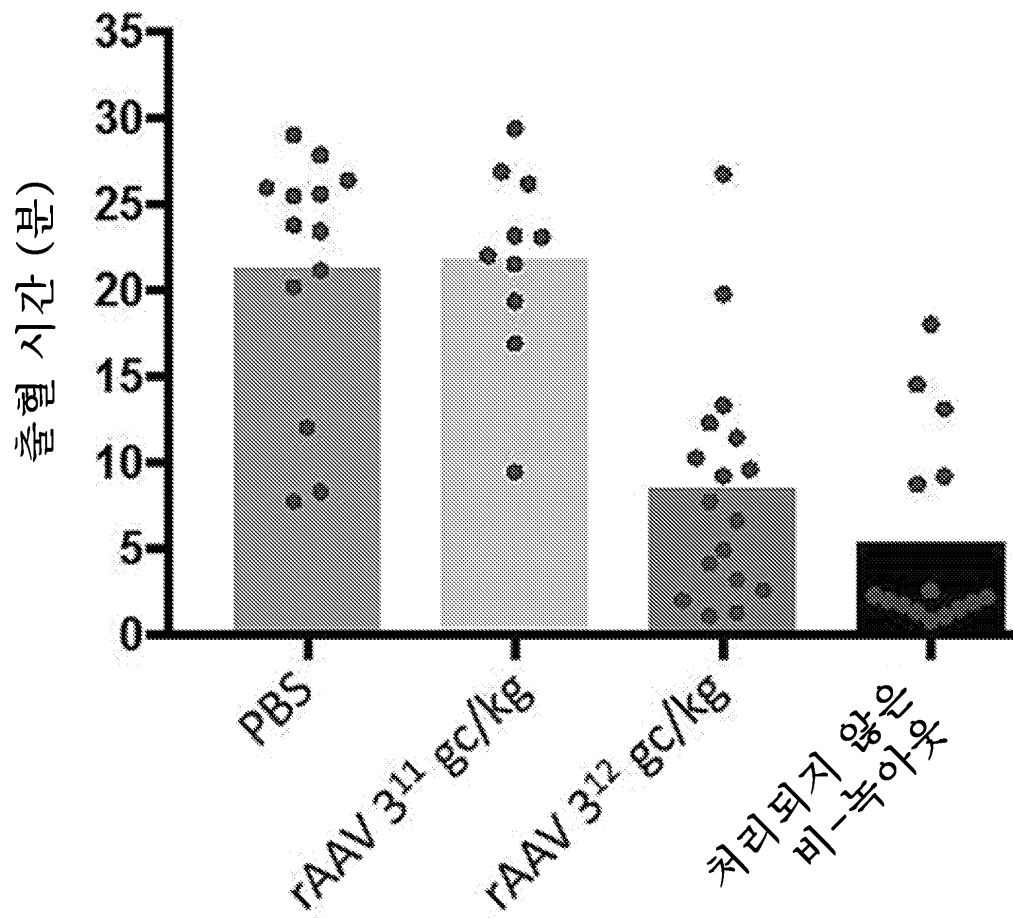


n = 3마리의 마우스/조건

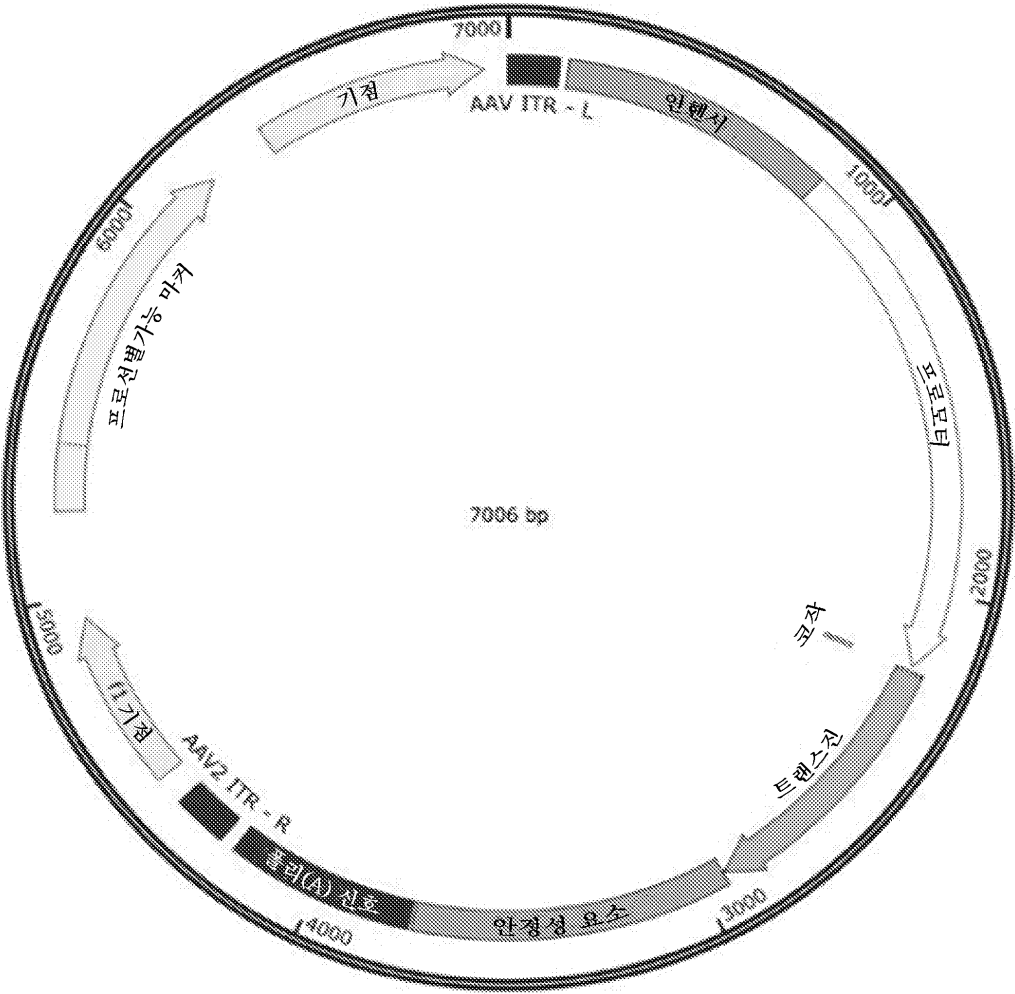
도면5a



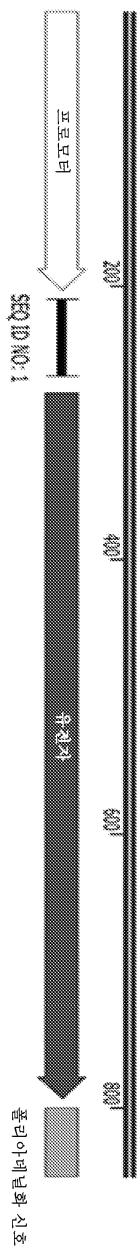
도면5b



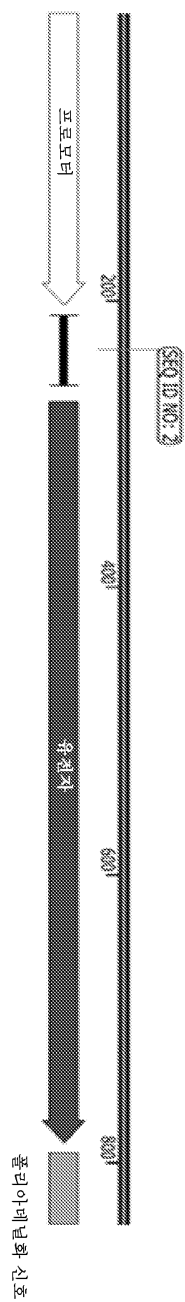
도면6a



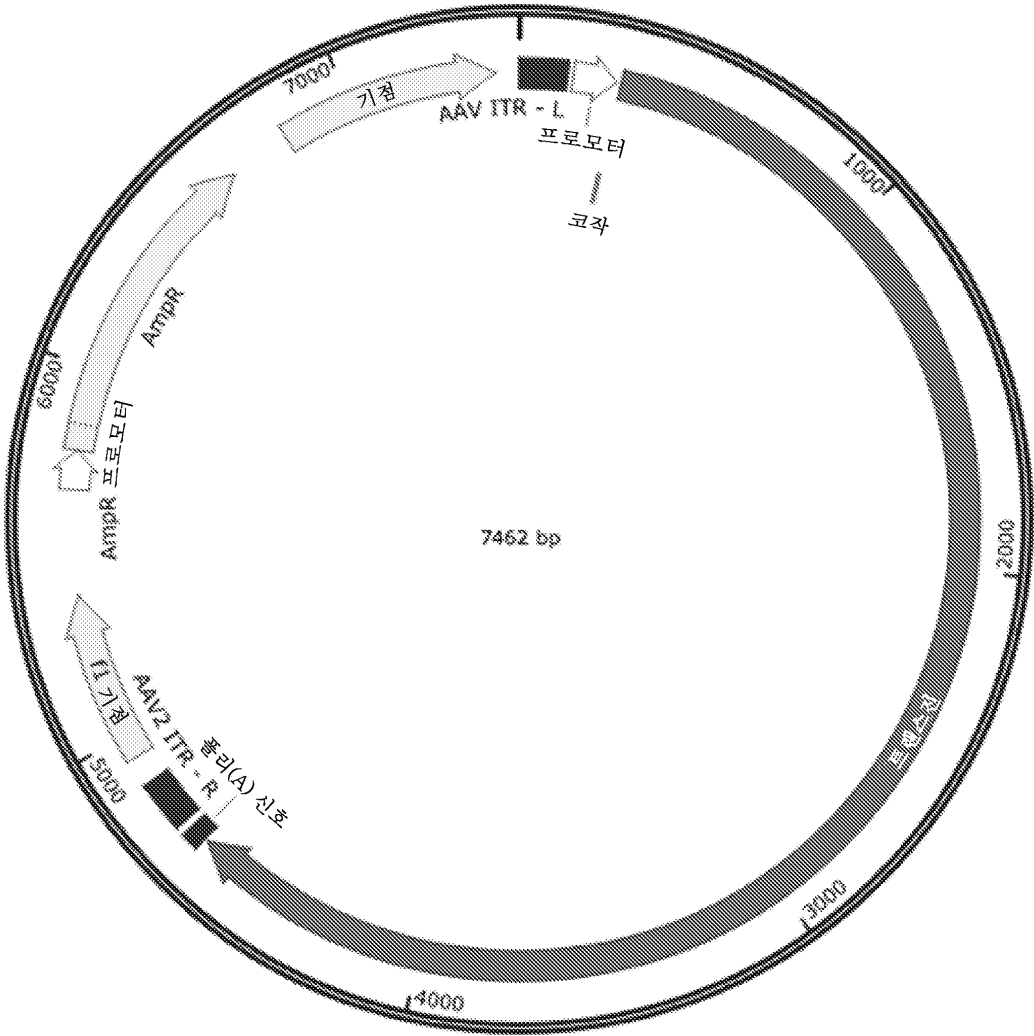
도면6b



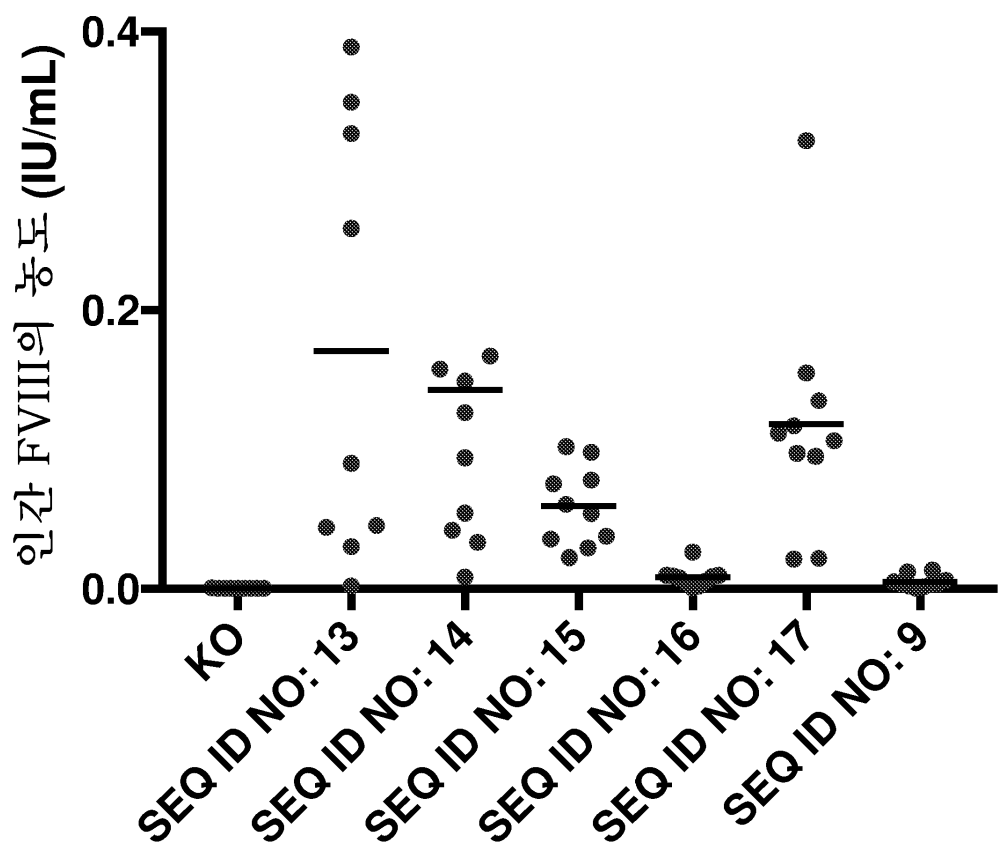
도면6c



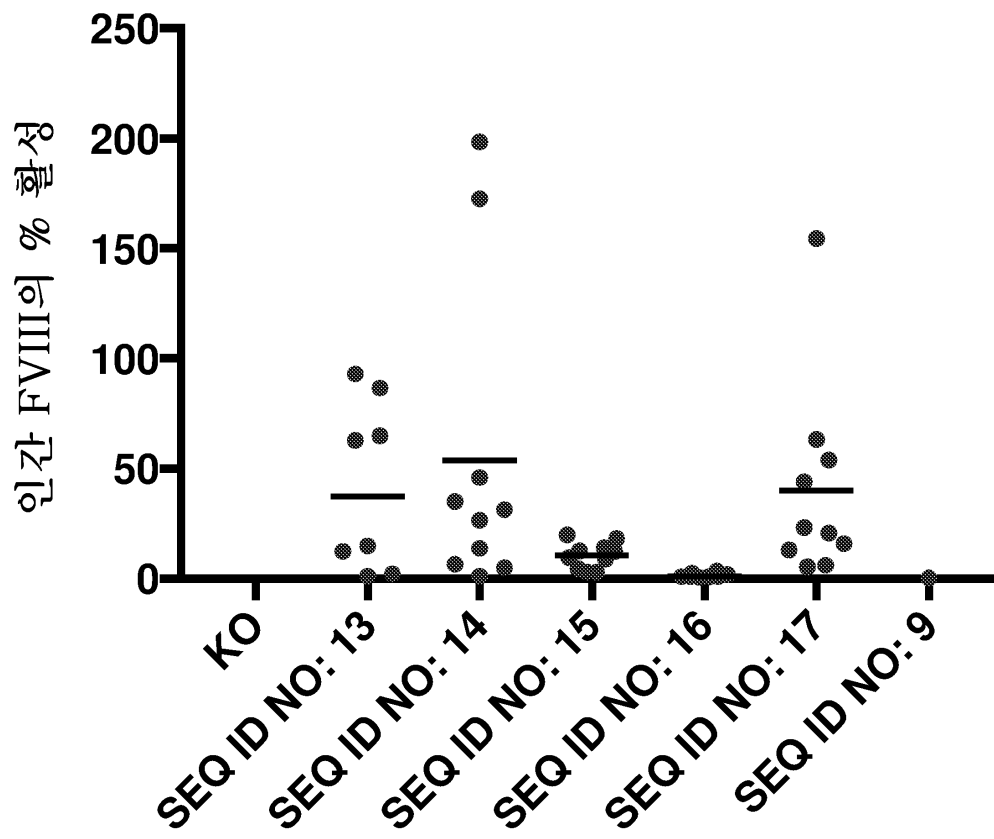
도면7



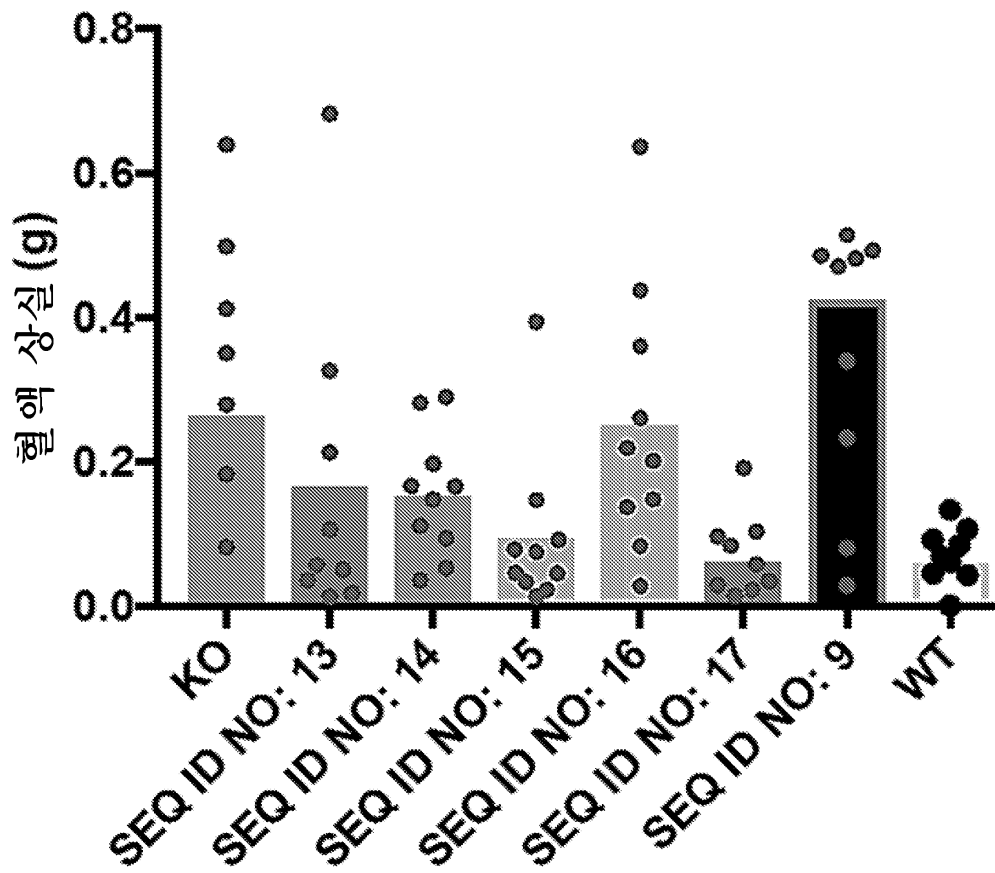
도면8



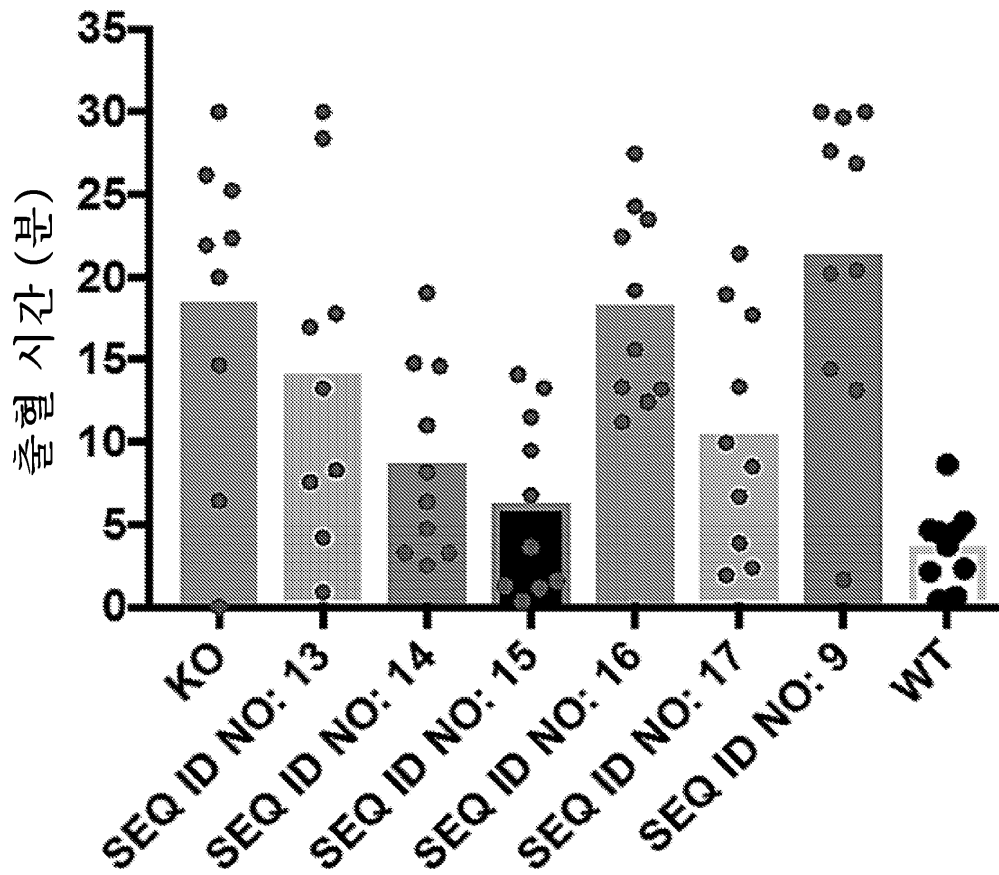
도면9



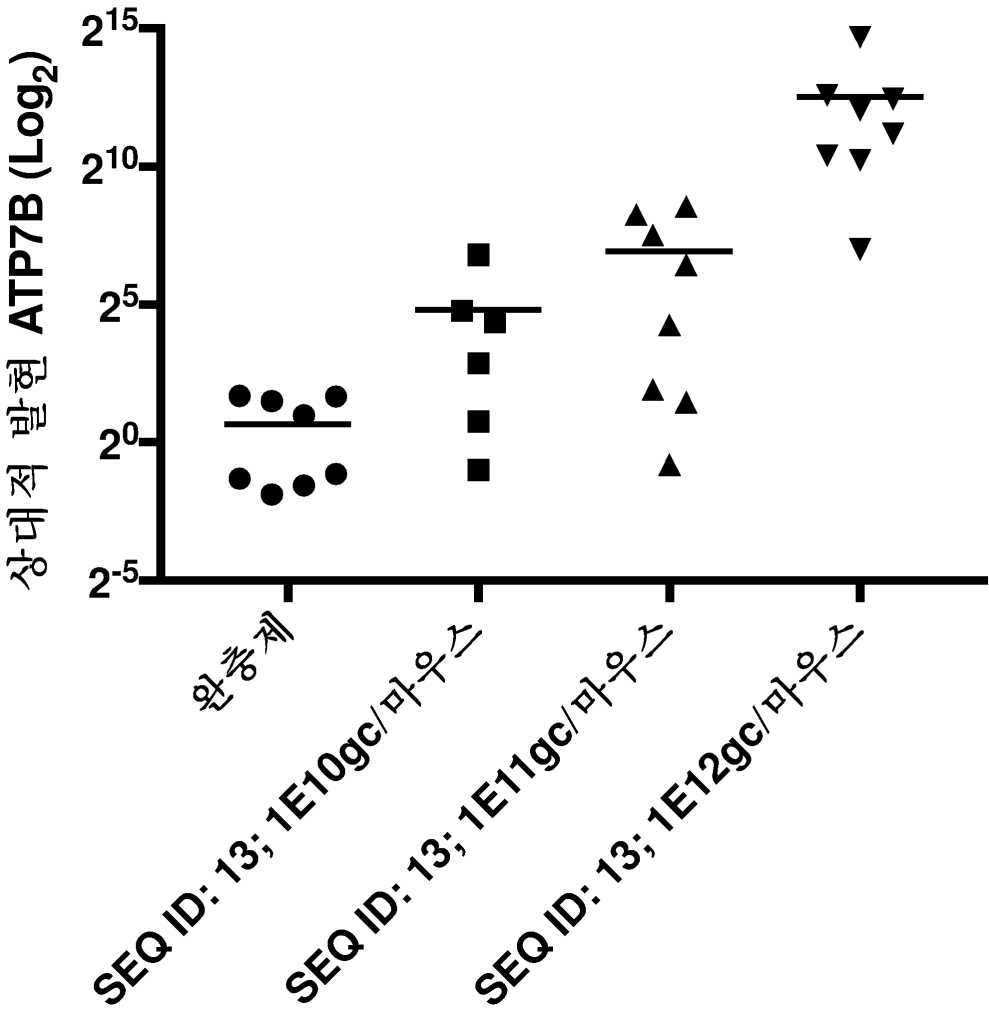
도면10



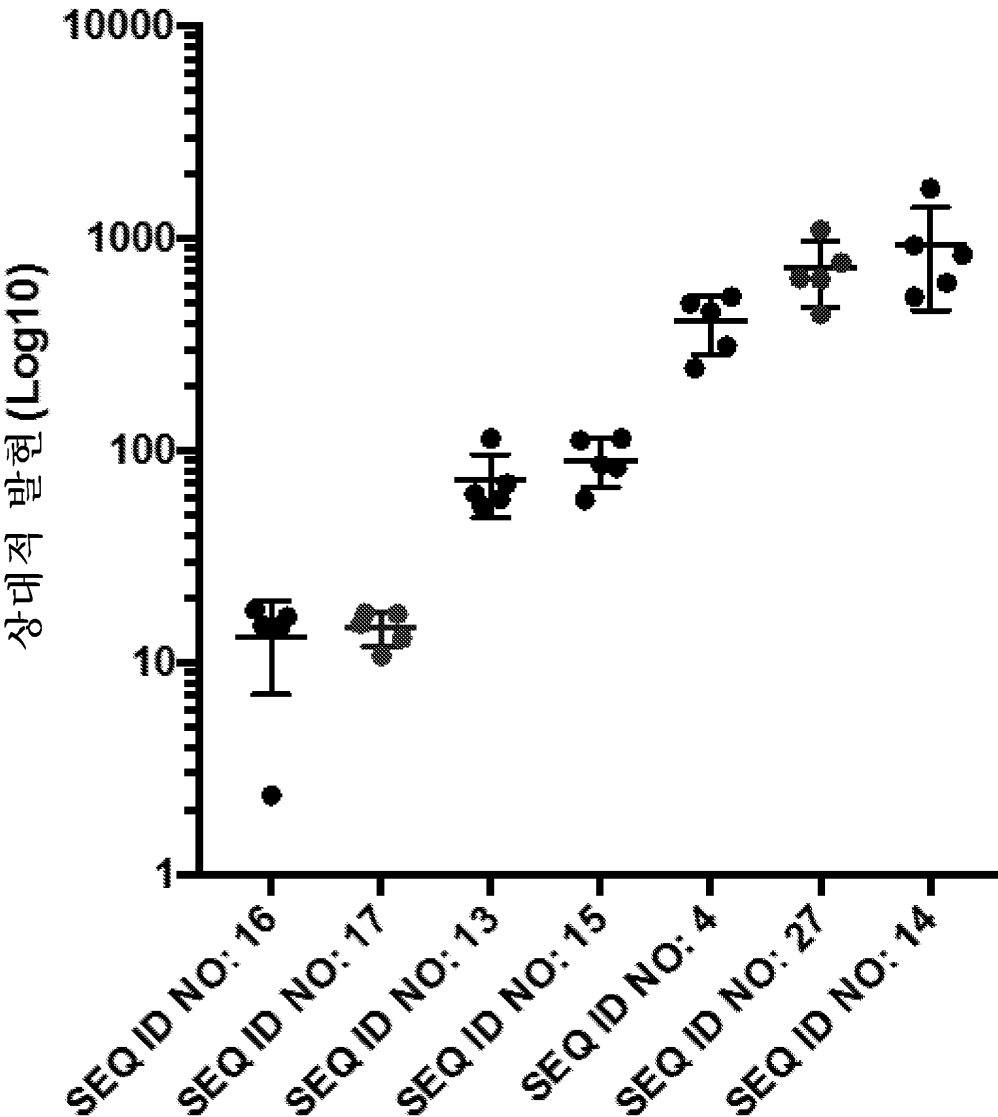
도면11



도면12



도면13



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ENCODED GENOMICS, INC.

<120> HIGH ACTIVITY REGULATORY ELEMENTS

<130> 46482-707.601

<140><141><150> 62/508,968

<151> 2017-05-19

<160> 43

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 56

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 1

gtaagtaag aattgaattt ctcagttgaa ggatgcttac actcttgtcc atctag 56

<210> 2

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 2

gtgtgtatgc tcaggggctg ggaaaggagg ggaggagct ccggctcag 49

<210> 3

<211> 266

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 3

gtgatgcggt ttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt 60

ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcaccaaaa tcaacgggac 120

tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgcccc a ttgacgcaaa tgggcggtag gcgtgtacgg 180

tgggaggtct atataagcag agctgggtacc gtaaggtaag aattgaattt ctcagttgaa 240

ggatgcttac actcttgtcc atctag 266

<210> 4

<211> 259

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 4

gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc acggggattt	60
ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacacaaa tcaacgggac	120
tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggcggttag gcgtgtacgg	180
tgggaggtct atataagcag agctggtacc gtgtgtatgc tcaggggctg ggaaaggagg	240

ggaggaggct ccggctcag	259
----------------------	-----

<210> 5

<211> 80

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

oligonucleotide

<400> 5

gtacttatat aaggggtgg gggcgcttc gtcctcagtc gcgatcgaac actcgagccg	60
agcagacgtg cctacggacc	80

<210> 6

<211> 279

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 6

ggggaggctg ctggtgaata ttaaccaagg tcacccagtc tatcgaggga gcaaacaggg	60
gctaagtcca cgctagcgtc tgtctgcaca ttctgtagag cgagtgttcc gatactctaa	120
tctccctagg caaggttcat atttgtgtag gttacttatt ctcttttgt tgactaagtc	180
aataatcaga atcagcaggt ttggagtcag cttggcaggg atcagcagcc tgggttgga	240
ggagggggta taaaagcccc ttaccaggga gaagccgtc	279

<210> 7

<211> 262

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 7

gtttgctgct tgcaatgttt gcccatTTTA gggTggacac aggacgctgt ggtttctgag	60
ccagggctag cgggcgactc agatcccagc cagtggactt agcccctgtt tgcTcctccg	120
ataactgggg tgaccttggT taatattcac cagcagcctc ccccgTtgcc cctctggatc	180
cactgcttaa atacggacga ggacagggcc ctgtctctc agcttcaggc accaccactg	240
acctgggaca gtgaatcgcc ac	262

<210> 8

<211> 203

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 8

tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc gtggatagcg gtttgactca cggggatttc	60
caagtctcca cccattgac gtcaatggga gtttgttttg gcacaaaat caacgggact	120
ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat tgacgcaaT gggcggtagg cgtgtacggt	180
gggaggtcta tataagcaga gct	203

<210> 9

<211> 251

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 9

gtttgctgct tgcaatgttt gcccatTTTA gggTggacac aggacgctgt ggtttctgag	60
ccagggggcg actcagatcc cagccagtgg acttagcccc tgtttgctcc tccgataact	120
ggggTgacct tggttaatat tcaccagcag cctccccctg tgcctctctg gatccactgc	180
ttaaatacgg acgaggacag ggccctgtct cctcagcttc aggcaccacc actgacctgg	240
gacagtgaat c	251

<210> 10

<211> 304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 10

cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg cccaacgacc ccgcccatt	60
gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata gggactttcc attgacgtca	120
atgggtggag tatttacggt aaactgccca ctgggcagta catcaagtgt atcatatgcc	180
aagtagcccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc gcctggcatt atgccagta	240
catgacctta tgggacttcc ctacttgcca gtacatctac gtattagtca tcgtattac	300
catg	304

<210> 11

<211> 1643

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 11

gttacataac ttacggtaaa tggcccgccct ggctgaccgc ccaacgaccc ccgcccattg	60
acgtcaataa tgacgtatgt tcccatagta acgccaatag ggactttcca ttgacgtcaa	120
tgggtggagt atttacggta aactgcccac ttggcagtac atcaagtgt tcatatgcca	180
agtacgcccc ctattgacgt caatgacggt aaatggcccg cctggcatta tgcccagtac	240
atgaccttat gggactttcc tacttggcag tacatctacg tattagtcat cgctattacc	300
atgggtcgag gtgagcccca cgttctgctt cactctcccc atctcccccc cctccccacc	360
cccaattttg tatttattta tttttaatt attttgtga gcgatggggg cggggggggg	420
gggggcgcg gcaggcggg gcggggcggg gcgaggggcg gggcggggcg aggcggagag	480
gtgcggcggc agccaatcag agcggcgcg tccgaaagt ttcttttatg gcgagcggc	540
ggcggcggc gccctataaa aagcgaagcg cgcggcgggc gggagtcgct gcgttgctt	600
cgccccgtgc cccgctccgc gccgcctgc gccgcccgc ccggtctga ctgaccgct	660
tactcccaca ggtgagcggg cgggacggcc cttctctcc gggctgtaat tagcgcttg	720
tttaatgacg gtcgctttct tttctgtggc tgcgtgaaag ccttaaagg ctccgggagg	780

gccctttgtg cgggggggag cggctcgggg ggtgcgtgcg tgtgtgtgtg cgtggggagc 840

gccgcgtgcg gccgcgctg cccggcggct gtgagcgtg cgggcgcggc gcggggcttt 900

gtgcgtccg cgtgtgcgag aggggagcgc ggccgggggc ggtgccccgc ggtgcggggg 960

ggctgcgagg ggaacaaagg ctgcgtgcgg ggtgtgtgcg tgggggggtg agcaggggggt 1020

gtgggcgcgg cggtcgggct gtaaccccc cctgcacccc cctccccgag ttgctgagca 1080

cggcccggtc tcgggtgcgg ggctccgtgc ggggcgtggc gcggggctcg ccgtgccggg 1140

cgggggggtg cggcaggtgg ggggtccggg cggggcgggg ccgcctcggg ccggggaggg 1200

ctcgggggag gggcgcggcg gccccggagc gccggcggct gtcgaggcgc ggcgagccgc 1260

agccattgcc ttttatggta atcgtgcgag agggcgcagg gacttccttt gtcccaaadc 1320

tggcggagcc gaaatctggg aggcgccgcc gcaccccctc tagcgggcgc gggcgaagcg 1380

gtgcggcgcc ggcaggaagg aaatgggcgg ggagggcctt cgtgcgtcgc cgcgcccgcc 1440

tcccccttc cactccagc ctccgggctg ccgcaggggg acggctgcct tcggggggga 1500

cggggcaggg cgggggttcg cttctggcgt gtgaccggcg gctctagagc ctctgtaac 1560

catgttcag ccttctctt tttctacag ctctgggca acgtgctggt tgttgtgtg 1620

tctcatcatt ttggcaaaga att 1643

<210> 12

<211> 231

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 12

gtcccggtgc ccgtcagtg gcagagcgca catcgccac agtccccgag aagttggggg 60

gaggggtcgg caattgaacc ggtgcctaga gaaggtggcg cggggtaaac tgggaaagt 120

atgtcgtgta ctggctccgc ctttttcccg aggggtgggg agaaccgtat ataagtgcag 180

tagtcgccgt gaacgttctt tttcgcaacg ggtttgccgc cagaacacag g 231

<210> 13

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 13

gtgatgacgt gtcccataag gccctcgggt ctaaggttc cctatttcct ggttcgccgg 60

cggccatttt ggggtggaagc gatagctgag tggcggcggc tgctgattgt gttctag 117

<210> 14

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 14

gtgatgacgt gtcccatact tccgggtcag gtgggcgggc tgtcttgacc ttctttgcgg 60

ctcggccatt ttgtccagc cagtccggag gctgcggctg cagaagtacc gcctgcg 117

<210> 15

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 15

gtgatgacgt gtcccatatt ttcatctgc gagacttgag agcggccatc ttggtcctgc 60

cctgacagat tctcctatcg gggtcacagg gacgctaaga ttgctacctg gactttc 117

<210> 16

<211> 117

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 16

gtgatgacgt gtcccatggc ctcatggat gagaggtccc acctcacggc ccgaggcggg 60

gcttctttgc gcttaaaagc cgagccgggc caatgttcaa atgcgcagct cttagtc 117

<210> 17

<211> 117

<212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide
 <400> 17
 gtgatgacgt gtcccatccc cctccaccc cctagccgc ggagcacgt gggatttggc 60
 gccccctcc tcggtgcaac ctatataagg ctacagtct gcgctcctgg tacacgc 117
 <210> 18
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 18
 cattccagga ctgtccattc t 21
 <210> 19
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 19
 ggctgaacg tagaagtacc a 21
 <210> 20
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 primer
 <400> 20
 accacagtcc atgcatcac 20
 <210> 21
 <211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 21

tccaccaccc tgttgctgta 20

<210> 22

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 22

ccccctcca cccctagcc cgcggagcac gctgggattt ggcgccccc tcctcgggtgc 60

aacctatata aggtcacag tctgcgctcc tggtagacgc 100

<210> 23

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 23

ggcctcattg gatgagaggt cccacacac ggcccagagc ggggcttctt tgcgcttaaa 60

agccgagccg ggccaatgtt caaatgcgca gctcttagtc 100

<210> 24

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 24

gggtggggcc cgcgcgtata aagggggcgc aggcgggctg ggcgttcac aggccaagtg 60

cgctgtgctc gaggggtgcc ggccaggcct gagcgagcga 100

<210> 25

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 25

ggtgcgatat tcggattggc tggagtcggc catcacgctc cagctacgcc acttcctttt 60

cgtggcacta taaaggtgc tgcacggcgc ttgcatctct 100

<210> 26

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 26

acttcgggt caggtgggcc ggctgtcttg acctcttttg cgctcggcc atttgtccc 60

agtcagtccg gaggtgcgg ctgcagaagt accgcctgcg 100

<210> 27

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 27

gtgagcgcg cgcgatgggg cgggaggttt ggggtcaagg agcaaactct gcacaagatg 60

gcggcggtag cggcagtggc ggcgcgtagg aggcggtgag 100

<210> 28

<211> 100

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 28
 attttcatct cgcgagactt gtgagcggcc atcttggtcc tgccctgaca gatttccta 60
 tcgggggtcac agggacgcta agattgctac ctggactttc 100

<210> 29
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 29
 tgggaccccc ggaaggcggg agttctaggg cggaagtggc cgagaggaga ggagaatggc 60
 ggccggaaggc tggatttggc gttggggctg gggccggcgg 100

<210> 30
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 30
 aaggccccctc ggtctaaggc ttccctatct cctggttcgc cggcggccat ttgggtgga 60
 agcgatagct gattggcggc ggctgctgat tgtgttctag 100

<210> 31
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
 polynucleotide

<400> 31
 agtgaccggg aagtagaagt ggcccttgca ggcaagagtg ctggagggcg gcagcggcga 60
 ccggagcggg aggagcagca atttatccgt gtgcagcccc 100

<210> 32
 <211> 100
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 32

gggaggggcg cgctggggag ctteggcgca tgcgcgctga ggctgcctg accgaccttc 60

agcagggtcg tggctacat gttctctcgc gcgggtgtcg 100

<210> 33

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 33

actgcgcacg cgcgcggtcg caccgattca cgecccttc cggcgcctag agcaccgctg 60

ccgccatgtt gaggggggga ccgcgaccag ctgggccctt 100

<210> 34

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 34

ccctcgaggg gcggagcaaa aagtgaggca gcaacgcctc cttatcctcg ctcccgtttt 60

cagtttctcaa taagggtccga tggtcgtgta taaatgctcg 100

<210> 35

<211> 100

<212> DNA

<213>

> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 35

cttggtgacc aaatttgaaa aaaaaaaaaa accgcgcca ctcattgtgt tttcaatcag 60

gtccgccaag tttgtattta aggaactgtt tcagttcata 100

<210> 36

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 36

ggctgagcta tcctattggc tatcgggaca aaatttgctt gagccaatca aagtgtccg 60

tggacaatcg ccgttctgtc tataaaaagg tgaagcagcg 100

<210> 37

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 37

ggaagtgcc aaccggaggt gcgtcattca ccggcgacgc cgatacggtt cctccaccga 60

ggcccatgcg aagctttcca ctatggcttc cagcactgtc 100

<210> 38

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 38

ccctcgaggg gcggagcaaa aagtgaggca gcaacgcctc cttatcctcg ctcccgttt 60

cagttctcaa taaggtccga tggtcgtgta taaatgctcg 100

<210> 39

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

polynucleotide

<400> 39
cttgggtgacc aaatttgaaa aaaaaaaaa accgcgcca ctcattgtt tttcaatcag 60
gtccgccaag tttgtattta aggaactgtt tcagttcata 100

<210> 40
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 40
ggctgagcta tcctattggc tatcgggaca aaatttgctt gagccaatca aagtgtccg 60
tgacaatcg ccgttctgtc tataaaaagg tgaagcagcg 100

<210> 41
<211> 100
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
polynucleotide

<400> 41
ggaagtgcc gaccggaggt gcgtcattca ccggcgacgc cgatacgggt cctccaccga 60
ggcccatgcg aagctttcca ctatggcttc cagcactgtc 100

<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213>
> Artificial Sequence
<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic
primer

<400> 42
gtacccccga ccacatgaag 20

<210> 43
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220><223> Description of Artificial Sequence: Synthetic

primer

<400> 43

tcttgtagtt gccgtcgtcc

20

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 14

【변경전】

제13항에 있어서, 치료용 트랜스진이

(i)ATP7B, ATP7A, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CKDL5, CNTNAP2, ZEB2, 인자 1, 인자 2, 인자 3, 인자 4, 인자 5, 인자 6, 인자 7, 인자 8, 인자 9, 인자 10, 인자 11, 및 인자 12로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는

(ii)상기 (i)의 치료용 트랜스진 중 어느 하나의 변이체 또는 기능성 단편인

발현 카세트.

【변경후】

제13항에 있어서, 치료용 트랜스진이

(i)ATP7B, ATP7A, ATP8B1, ABCB4, ABCB11, CDKL5, CNTNAP2, ZEB2, 인자 1, 인자 2, 인자 3, 인자 4, 인자 5, 인자 6, 인자 7, 인자 8, 인자 9, 인자 10, 인자 11, 및 인자 12로 이루어진 군으로부터 선택되거나, 또는

(ii)상기 (i)의 치료용 트랜스진 중 어느 하나의 변이체 또는 기능성 단편인

발현 카세트.