

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2025년 1월 2일 (02.01.2025)



(10) 국제공개번호

WO 2025/005759 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/86 (2006.01)

(74) 대리인: 특허법인 정진 (JUNGJIN IP LAW FIRM);
08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul
(KR).

(21) 국제출원번호:

PCT/KR2024/009163

(22) 국제출원일:

2024년 7월 1일 (01.07.2024)

(25) 출원언어:

한국어

(26) 공개언어:

한국어

(30) 우선권정보:

10-2023-0084924 2023년 6월 30일 (30.06.2023) KR

(71) 출원인: 사회복지법인 삼성생명공익재단 (SAMSUNG
LIFE PUBLIC WELFARE FOUNDATION) [KR/KR];
04348 서울특별시 용산구 이태원로55길 48, Seoul (KR).

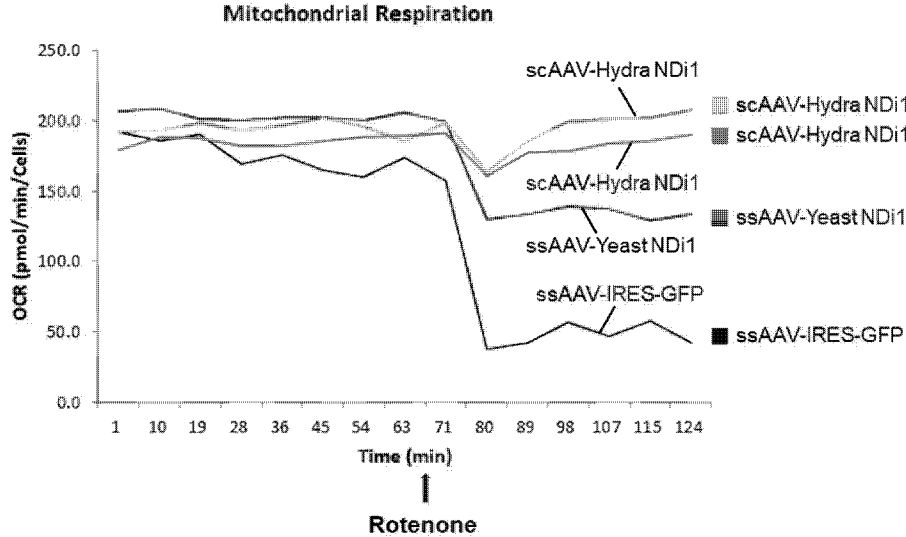
(72) 발명자: 기창원 (KEE, Chang Won); 06351 서울특별시
강남구 일원로 81, Seoul (KR). 손성수 (SOHN, Seong
Soo); 06351 서울특별시 강남구 일원로 81, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR,
HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH,
KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW,
SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의
역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, CV, GH, GM,
KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,

(54) Title: COMPOSITION FOR PREVENTING, ALLEVIATING, OR TREATING MITOCHONDRIAL COMPLEX I
DISORDERS, COMPRISING RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS VECTOR LOADED WITH HYDRA NDI1

(54) 발명의 명칭: HYDRA NDI1 가 탑재된 재조합 아데노부속바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 복합체 I
이상질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for the prevention, alleviation, or treatment of mitochondrial complex I disorders, including a recombinant adeno-associated virus (AAV) vector loaded with Hydra NDI1. The inventors have confirmed that the scAAV-Hydra NDI1 of the present invention has an effect of restoring cellular respiration reduction caused by rotenone and an effect of inhibiting the apoptosis of LHON patient-derived cells by rotenone. Thus, the scAAV-Hydra NDI1 is expected to be useful not only for LHON but also for preventing, alleviating, or treating diseases caused by abnormalities in mitochondrial complex I.

(57) 요약서: 본 발명은 Hydra NDI1 가 탑재된 재조합 아데노부속바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 복합체 I 이상질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다. 본 발명자들은 본 발명의 scAAV-hydra NDI1 이 로테논에 의한 세포호흡 감소를 복구하는 효과, 및 로테논에 의한 LHON 환자 유래 세포의 사멸을 억제하는 효과가 있음을 확인하였는바, 이를 LHON 뿐만 아니라 미토콘드리아 복합체 I 에 이상으로 인해 발생하는 질병의 예방, 개선, 또는 치료에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

[다음 쪽 계속]

ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

발명의 설명

발명의 명칭: HYDRA NDI1가 탑재된 재조합 아데노부속바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 복합체 1 이상질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 Hydra NDI1가 탑재된 재조합 아데노부속바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 복합체 1 이상질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물 등에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 미토콘드리아 유전체의 변이로 인하여 발생하는 미토콘드리아 유전병은 약 30년 전 처음으로 보고되었으며, 이후 미토콘드리아 유전체의 변이로 발생하는 수많은 질병과 미토콘드리아 유전체의 전달에 관여하는 미토콘드리아 유전학에 대한 이해가 비약적으로 이루어졌다. 세포 내에는 대략 수천 개의 미토콘드리아 유전체가 존재하고, 변이된 미토콘드리아 유전체는 대부분 세포 내에서 정상 유전체와 섞여 존재하며 이를 헤테로플라스미(heteroplasmy)라 한다. 질병의 증상은 변이된 유전체의 비율에 따라 그 심각도가 다르게 나타나는데, 변이된 유전체의 비율이 높을수록 즉, 헤테로플라스미가 높을수록 더욱 심한 증상이 나타난다. 동일하게 유발된 미토콘드리아 유전체 변이는 인체의 각 조직에 따라 또는 개체에 따라 그 헤테로플라스미가 매우 다양한데, 헤테로플라스미를 조절하는 기작을 밝히기 위해서는 아직도 많은 연구가 필요하다.
- [3] LHON(Leber's hereditary optic neuropathy)은 젊은 시기에 특징적인 시신경의 손상으로 인해 통증이 동반되지 않으면서 갑자기 양쪽 시력을 잃게 되는 사립체성 유전질환으로, 1871년 독일의 안과 의사 Theodore Leber에 의해 처음으로 기술되었다. 여자보다 주로 남자에게(약 80%) 발현되며, 여자의 경우는 좀 더 늦게 발현되고 더 심하게 영향을 받는다. 발현되는 시기는 보통 18세에서 30세 사이이지만, 모든 연령에서 예고없이 나타나며, 급성이나 아급성으로 양쪽 눈의 시력을 동시에, 또는 연속적으로 잃게 될 수 있다. 발생빈도는 아직까지 정확하게 알려져 있지 않다. LHON은 사립체 유전자(미토콘드리아 DNA, mtDNA)의 돌연변이에 의해 유전되는 유전질환 중 가장 먼저 발견된 질환으로, 모계로만 유전되는 질환이다. 대부분의 환자가 모계로부터 가족력을 가지지만 40%가 자연발생적이다.
- [4] 사립체는 생체활동에 사용되는 에너지(ATP)를 생산하는 중요한 세포내 소체로서, 핵 유전자와는 달리 독립적인 유전자를 가지고 있다. 대부분의 유전질환은 핵 내의 유전자에 생긴 결함으로 발생하지만 일부는 사립체 유전자의 이상으로 나타날 수 있다. 세포핵 안에 있는 한 쌍의 유전자는 부모에서 각각 물려받지만, 사립체 유전자는 수정 시 정자의 꼬리 안에 있는

부계의 유전자를 포함한 사립체가 떨어져 나가면서 난자 내로 들어가지 못하기 때문에 단지 모계에서만 유전된다. LHON은 양쪽 눈에서 발생하는 원인 불명의 시신경병증의 30~50%을 차지하고, 법적 실명의 2%를 차지한다. LHON의 90% 정도가 G11778A(전 세계적으로 70% 정도), G3460A, T14484C(프랑스와 캐나다인의 혼혈에게 가장 많음)의 세 가지 점 돌연변이 중 한 가지를 보유하고 있으며, 그 밖에도 여러 점 돌연변이 유전자가 밝혀져 있다. 대부분은 한 개의 돌연변이 유전자(homoplasic)를 가지지만 두 개 이상의 돌연변이 유전자(heteroplasic)를 가진 경우도 드물게 있다. 질환의 확실한 발생기전은 밝혀지지 않았지만, 정상적인 세포의 분열과 세포의 성장과정에 결함이 있는 사립체 유전자가 관여되어, 시신경 세포에서의 에너지 생산과정에 문제가 발생하게 되고, 그로 인해 세포가 파괴된다고 여겨진다.

- [5] 약물치료로 비타민 C, 비타민 B₁₂, 또는 이데베논(idebenone)의 투여는 질병이 발생한 환자에서 망막신경절 세포의 손상을 완화시키는 작용은 할 수는 있지만, 그 효과가 미미하기에 임상에서 잘 사용이 되지 않으며 근본적인 예방도 할 수 없다는 한계를 지니고 있다, 따라서, 현재까지 마땅한 치료법이 없는 실정이고, 유전자 치료만이 근본적인 치료가 될 수 있다.
- [6] 이에, 본 발명자들은 미토콘드리아 이상질환을 효과적으로 치료하기 위하여, hydra NDi1를 포함하는 재조합 바이러스 벡터를 제작하였고, 이를 이용하여 미토콘드리아 이상질환을 예방, 개선, 및 치료할 수 있음을 실험적으로 입증함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

기술적 과제

- [7] 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 또한, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환을 예방 또는 치료하는 방법을 제공하는 것이다.
- [9] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

- [11] 또한, 본 발명은 본 발명의 벡터를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물을 이를 필요로 하는 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.
- [12] 또한, 본 발명은 본 발명의 벡터를 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물의 미토콘드리아 이상질환의 예방 또는 치료 용도를 제공한다.
- [13] 또한, 본 발명은 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료 약제를 생산하기 위한 본 발명의 벡터의 용도를 제공한다.

발명의 효과

- [14] 본 발명자들은 본 발명의 scAAV-hydra NDi1이 로테논에 의한 세포호흡 감소를 복구하는 효과, 및 로테논에 의한 LHON 환자 유래 세포의 사멸을 억제하는 효과가 있음을 확인하였는 바, 이를 LHON 뿐만 아니라 미토콘드리아 복합체 1에 이상으로 인해 발병하는 질병의 예방, 개선, 또는 치료에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [15] 도 1은 ssAAV-2/DJ-GFP, ssAAV-2/DJ-IRES-GFP, 또는 scAAV-2/DJ-GFP 재조합 아데노부속바이러스 제작을 도식도로 나타낸 것이다.
- [16] 도 2는 ssAAV-2/DJ-yeast NDi1, ssAAV-2/DJ-hydra NDi1, scAAV-2/DJ-hydra NDi1 재조합 아데노부속바이러스 제작을 도식도로 나타낸 것이다.
- [17] 도 3a는 ssAAV 및 scAAV의 유전자 발현 강도 및 안정성 확인 실험에 사용한 재조합 아데노부속바이러스 벡터의 개열지도를 나타낸 것이다.
- [18] 도 3b는 ssAAV-GFP 및 scAAV-GFP의 녹색 형광 발현 정도를 확인한 결과를 나타낸 것이다.
- [19] 도 4는 ssAAV-IRES-GFP, ssAAV-yeast NDi1, 또는 scAAV-hydra NDi1로 감염된 LHON 환자에서 유래한 피부섬유아세포에 로테논을 첨가하고 산소 소모율 (oxygen consumption rate, OCR)을 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [20] 도 5a 내지 5d는 ssAAV-IRES-GFP, ssAAV-yeast NDi1, ssAAV-hydra NDi1, 및 scAAV-hydra NDi1로 감염된 LHON 환자에서 유래한 피부섬유아세포에 로테논을 첨가하고, 로테논 처리 1일 내지 4일 후의 세포사멸 정도를 관찰한 결과를 나타낸 것이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [21] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[22] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[23]

[24] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[25] 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[26] 본 발명에서, "NDi1(NADH dehydrogenase 또는 NADH-ubiquinone oxidoreductase)"은 포유동물의 미토콘드리아 복합체 1(mammalian complex 1)과 같은 거대효소복합체가 없는 생물의 미토콘드리아 내에 존재하는 NADH 탈수소효소로서, 미토콘드리아 복합체 1의 기능을 수행한다. 상기 NDi1은 NADH에서 유비퀴논(ubiquinone)으로 전자를 전달한다. 본 발명의 일 실시예에서는 *Hydra vulgaris* 유래 NDi1을 사용하였으며, 상기 *Hydra vulgaris* 유래 NDi1은 *Saccharomyces cerevisiae* 유래 NDi1 보다 분자량이 작다. 본 발명의 일 실시예에서는 하기 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자를 사용하였다.

[27]

[28] 서열번호 1:

[29] agttttagaa ttataccag cagctagta taagcgcaa atgccattct cttatcatc 60
 [30] tgtctgtat cggaaaagac ttgttttatt aggaacagga tggggatgtt atagtgtgtt 120
 [31] aaaaaatatt aacaagaagc ttatgatgtt gattgtgtt agtccacgaa atcattttct 180
 [32] ttftacaccc ttgttaaata gcacaactgt tgggacttta gaatttcgaa gcataattga 240
 [33] accgattcga aacactaagt ttcgggatga tcatcatttt caattggctg aagcaattca 300
 [34] cttaaatcca catgataaat tagttgtttg taaagcagtc tcatctgata aagaatatac 360
 [35] ttatcatcac gataaagttg taattgggtg tggagctgtt agtaatactt ttggaattcc 420
 [36] tgggtgccca aagtatgcat attttttgaa agaaatagca gatgctagaa aaatacgtaa 480
 [37] tcaaatcata tctaattttg agcaaagttt gttccatat gtaaatgaag aggaaaggtt 540
 [38] atcactgttg cattttgtca ttgttggtgg tggccaact ggtattgaat ttggagctga 600
 [39] gttgtatgac ttataacac atgatgttgc aagacttttt ccaggagaga agaattgatgt 660
 [40] tcatgtaaca ttagttgaag gagattcaat attaccttca ttgaccagc gattacgtaa 720
 [41] atttgcctgag agaaaaatta cacaagaga aaattccac ttaatcaaag attttgttgt 780
 [42] ggaaagttgt gaaaactatg tgaagttgaa atcaggaaaa gttcttttaa ctaagcttgt 840
 [43] agtgtgtgca accggtcttg gtcccagaaa gtttatagaa agtttagacc tacctaaagg 900
 [44] taaatcaaaa caactcaagg tagatgatca tcttcgtgta gttggttatg acagtatatt 960

[45] tgcaattggt gattgttcat acatagatgg atctccttta ccaagcacgg ctcaagtggc 1020
 [46] tgaaagacaa ggtcgatatg ttgcacagta cttatcctta ttagaaacaa attctaaaac 1080
 [47] agacagtaaa ccatttatgt ggtccaatgc tggatgctt gcatatattg gtggatataa 1140
 [48] agctgttgca gatcttccaa caaaagctgg gaagataact ggatttaaaa gttggttaat 1200
 [49] atggcgatcg gtttatctta ctgccttagg gagctggaga aatcgaatgc aagttccatt 1260
 [50] tgactgggct aggacttttt tttttggcag ggatafatct aggttttaaa ttacaaactt 1320
 [51] tatttaatat ttagtatctt ttgatctta ttaatttggt ttttaa

[52]

[53] 본 발명에 있어서, "재조합 벡터(recombinant vector)"는 유전자 삽입물이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물로서, 플라스미드 벡터, 코스미드 벡터, 박테리오파지 벡터, 또는 바이러스 벡터일 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에 따르면 바이러스 벡터일 수 있으며, 구체적으로는 아데노바이러스(adenovirus) 벡터, 아데노부속바이러스(adenovirus-associated virus) 벡터, 또는 레트로바이러스(retrovirus) 벡터일 수 있으며, 더 구체적으로는 아데노부속바이러스 벡터일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[54] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 서열번호 1로 표시되는 hydra NDi1 유전자를 포함한다. 상기 hydra NDi1 유전자 서열은 적합한 발현 컨스트럭트(expression construct) 내에 존재하는 것이 바람직하다. 상기 발현 컨스트럭트에서 hydra NDi1 유전자 서열은 프로모터에 작동적으로 연결되는(operatively linked) 것이 바람직하다.

[55] 본 발명에 있어서, "작동적으로 결합된"은 핵산 발현 조절 서열(예: 프로모터, 시그널 서열, 또는 전사조절인자 결합 위치의 어레이)과 다른 핵산 서열 사이의 기능적인 결합을 의미하며, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 핵산 서열의 전사 및/또는 번역을 조절하게 된다.

[56] 본 발명에 있어서, hydra NDi1 유전자 서열에 결합된 프로모터는 hydra NDi1의 발현을 개시할 수 있는 어떤 프로모터도 가능하나, 구체적으로 동물세포, 더 구체적으로는 포유동물 세포에서 작동하여 hydra NDi1 유전자 서열의 전사를 조절할 수 있는 것으로 선택하는 것이 좋다. 상기 프로모터는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 및 포유동물 세포의 게놈으로부터 유래된 프로모터를 포함하며, 예를 들어, U6 프로모터, T7 프로모터, H1 프로모터, CMV (cytomegalo virus) 프로모터, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, HSV의 tk 프로모터, RSV 프로모터, EF1 알파 프로모터, 메탈로티오닌 프로모터, 베타-액틴 프로모터, 인간 IL-2 유전자의 프로모터, 인간 IFN 유전자의 프로모터, 인간 IL-4 유전자의 프로모터, 인간 림포톡신 유전자의 프로모터, 인간 GM-CSF 유전자의 프로모터, 유도성(inducible) 프로모터, 또는 조직 특이적 프로모터(예컨대, 알부민 프로모터)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 상기 벡터는 당해 기술 분야에서 잘 알려진

유전자 재조합 기술을 이용하여 제조할 수 있으며, 부위-특이적 DNA 절단 및 연결은 당해 기술 분야에서 일반적으로 알려진 효소 등을 사용할 수 있다.

- [57] 본 발명에 있어서, 상기 아데노부속바이러스(adeno-associated virus, AAV)는 파르보바이러스(parvovirus)에 속하는 단일 가닥의 DNA 바이러스이다. 단독으로 복제를 할 수 없으며, 아데노바이러스나 백신시아(vaccinia), 혹은 헤르페스바이러스(herpesvirus) 등의 헬퍼(helper) 바이러스와 함께 감염되었을 때 복제, 증식할 수 있는 결함 바이러스이다. 상기 아데노부속바이러스는 분열 혹은 미분열 세포 모두 감염이 가능하다. 본 발명의 일 실시예에서 상기 아데노부속바이러스는 자가 상보적인 AAV(Self-complementary AAV, scAAV)일 수 있으며, 이는 발현의 안정성 및 발현 강도가 높으며, 면역원성(immunogenicity) 낮다.
- [58] 본 발명에 있어서, 상기 재조합 바이러스 벡터는 미토콘드리아 복합체 1 이상에 의한 세포호흡 감소 또는 세포사멸을 억제시킬 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 미토콘드리아 복합체 1 이상은 ND1, ND4, 또는 ND6 유전자 돌연변이에 의해 생길 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [59] 본 발명에 있어서, "미토콘드리아 이상질환"이란, 미토콘드리아 DNA(mtDNA, 사립체 유전자)의 돌연변이에 의한 질환으로, 다양한 조직에서 미토콘드리아 형태나 생화학적인 변화가 원인이 되어 여러 증상이 발현된다. 상기 미토콘드리아 이상질환은 미토콘드리아 복합체 1의 이상으로 인해서 발생할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 미토콘드리아 이상질환은 ND1(NADH dehydrogenase subunit 1), ND4(NADH dehydrogenase subunit 4), 및 ND6(NADH dehydrogenase subunit 6)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 대한 돌연변이로 발생할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 미토콘드리아 이상질환은 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON), MELAS(Mitochondrial Encephalopathy with Lactic acidosis and stroke-like episode) 증후군, 신경성 근육 위축(neurogenic muscle weakness), MERRF(Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber) 증후군, 미토콘드리아 뇌근병증(mitochondrial encephalomyopathy), 리 증후군(Leigh syndrome), 컨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome), 다발성경화증, 뇌척수염, 뇌신경근염, 말초신경변증, 프리드리히 보행실조, 알파 질환, 뇌졸중, 편두통, 정신병, 우울증, 발작, 치매, 중풍, 시신경위축, 시신경병증, 녹내장, 망막색소변성, 백내장, 고알도스테론혈증, 부갑상선기능저하증, 근육병증, 근육위축, 미오글로빈뇨, 근육긴장저해, 근육통, 운동내성저하, 세뇨관증, 신장기능부전, 간부전, 간기능부전, 간비대, 철적혈구 빈혈, 호중성백혈구 감소증, 저혈소판증, 설사, 융모위축, 다발성구토, 연하곤란, 변비, 감각신경 난청, 정신지체, 간질, 알츠하이머 질환, 파킨슨 질환, 및 헌팅턴 질환으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있으며, 바람직하게는 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON), MELAS(Mitochondrial Encephalopathy

with Lactic acidosis and stroke-like episode) 증후군, 신경성 근육 위축(neurogenic muscle weakness), MERRF(Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber) 증후군, 미토콘드리아 뇌근병증(mitochondrial encephalomyopathy), 리 증후군(Leigh syndrome), 및 컨스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택될 수 있으며, 본 발명의 일 실시예에서는 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)이었으나, 이에 제한되지 않는다.

- [60] 본 발명에서, 상기 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)은 레버씨 시신경 위축증 등으로 불릴 수 있으며, 미토콘드리아의 ND1, ND4, 또는 ND6 mtDNA(mitochondria-DNA) 돌연변이로 인하여 미토콘드리아 내의 복합체 1(complex1)이 제대로 작동하지 않아 시신경계에 이상이 초래되어 실명하게 되는 질환을 의미한다.
- [61] 본 발명의 조성물 내의 상기 본 발명의 벡터의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 중량을 기준으로 0.0001 내지 99.9중량%, 또는 0.001 내지 50중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [62] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 부형제는 예를 들어, 희석제, 결합제, 붕해제, 활택제, 흡착제, 보습제, 필름-코팅 물질, 및 제어방출첨가제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상일 수 있다.
- [63] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 서방형 과립제, 장용과립제, 액제, 점안제, 엘실릭제, 유제, 현탁액제, 주정제, 트로키제, 방향수제, 리모나아데제, 정제, 서방형정제, 장용정제, 설하정, 경질캡셀제, 연질캡셀제, 서방캡셀제, 장용캡셀제, 환제, 틸크제, 연조엑스제, 건조엑스제, 유동엑스제, 주사제, 캡슐제, 관류액, 경고제, 로션제, 파스타제, 분무제, 흡입제, 패취제, 멸균주사용액, 또는 에어로졸 등의 외용제 등의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 상기 외용제는 크림, 젤, 패치, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니먼트제, 파스타제 또는 카타플라스마제 등의 제형을 가질 수 있다.
- [64] 본 발명에 따른 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [65] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다.

- [66] 본 발명에 따른 정제, 산제, 과립제, 캡슐제, 환제, 트로키제의 첨가제로 옥수수전분, 감자전분, 밀전분, 유당, 백당, 포도당, 과당, 디-만니톨, 침강탄산칼슘, 합성규산알루미늄, 인산일수소칼슘, 황산칼슘, 염화나트륨, 탄산수소나트륨, 정제 라놀린, 미결정 셀룰로오스, 텍스트린, 알긴산나트륨, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 카올린, 요소, 콜로이드성실리카겔, 히드록시프로필스타치, 히드록시프로필메칠셀룰로오스 (HPMC) 1928, HPMC 2208, HPMC 2906, HPMC 2910, 프로필렌글리콜, 카제인, 젖산칼슘, 프리모젤 등 부형제; 젤라틴, 아라비아고무, 에탄올, 한천가루, 초산프탈산셀룰로오스,
- [67] 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 포도당, 정제수, 카제인나트륨, 글리세린, 스테아린산, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스나트륨, 메칠셀룰로오스, 미결정 셀룰로오스, 텍스트린, 히드록시셀룰로오스, 히드록시프로필스타치, 히드록시메칠셀룰로오스, 정제셀락, 전분호, 히드록시프로필셀룰로오스, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 폴리비닐알코올, 폴리비닐피롤리돈 등의 결합제가 사용될 수 있으며, 히드록시프로필메칠셀룰로오스, 옥수수전분, 한천가루, 메칠셀룰로오스, 벤토나이트, 히드록시프로필스타치, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 알긴산나트륨, 카르복시메칠셀룰로오스칼슘, 구연산칼슘, 라우릴황산나트륨, 무수규산, 1-히드록시프로필셀룰로오스, 텍스트란, 이온교환수지, 초산폴리비닐, 포름알데히드처리 카제인 및 젤라틴, 알긴산, 아밀로오스, 구아르고무(Guar gum), 중조, 폴리비닐피롤리돈, 인산칼슘, 겔화전분, 아라비아고무, 아밀로펙틴, 펙틴, 폴리인산나트륨, 에칠셀룰로오스, 백당, 규산마그네슘알루미늄, 디-소르비톨액, 경질무수규산 등 봉해제; 스테아린산칼슘, 스테아린산마그네슘, 스테아린산, 수소화식물유(Hydrogenated vegetable oil), 탈크, 석송자, 카올린, 바셀린, 스테아린산나트륨, 카카오지, 살리실산나트륨, 살리실산마그네슘, 폴리에틸렌글리콜 4000, 폴리에틸렌글리콜 6000, 유동파라핀, 수소첨가대두유(Lubri wax), 스테아린산알루미늄, 스테아린산아연, 라우릴황산나트륨, 산화마그네슘, 마크로골(Macrogol), 합성규산알루미늄, 무수규산, 고급지방산, 고급알코올, 실리콘유, 파라핀유, 폴리에틸렌글리콜지방산에테르, 전분, 염화나트륨, 초산나트륨, 올레인산나트륨, dl-로이신, 경질무수규산 등의 활택제;가 사용될 수 있다.
- [68] 본 발명에 따른 액제의 첨가제로는 물, 묽은 염산, 묽은 황산, 구연산나트륨, 모노스테아린산슈크로스류, 폴리옥시에칠렌소르비톨지방산에스테르류 (트윈에스테르), 폴리옥시에칠렌모노알킬에테르류, 라놀린에테르류, 라놀린에스테르류, 초산, 염산, 암모니아수, 탄산암모늄, 수산화칼륨, 수산화나트륨, 프롤아민, 폴리비닐피롤리돈, 에칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 등이 사용될 수 있다.

- [69] 본 발명에 따른 시럽제에는 백당의 용액, 다른 당류 혹은 감미제 등이 사용될 수 있으며, 필요에 따라 방향제, 착색제, 보존제, 안정제, 현탁화제, 유화제, 점조제 등이 사용될 수 있다.
- [70] 본 발명에 따른 유제에는 정제수가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 유화제, 보존제, 안정제, 방향제 등이 사용될 수 있다.
- [71] 본 발명에 따른 현탁제에는 아카시아, 트라가칸타, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스나트륨, 미결정셀룰로오스, 알긴산나트륨, 히드록시프로필메칠셀룰로오스(HPMC), HPMC 1828, HPMC 2906, HPMC 2910 등 현탁화제가 사용될 수 있으며, 필요에 따라 계면활성제, 보존제, 안정제, 착색제, 방향제가 사용될 수 있다.
- [72] 본 발명에 따른 주사제에는 주사용 증류수, 0.9%염화나트륨주사액, 링겔주사액, 텍스트로스주사액, 텍스트로스+염화나트륨주사액, 피이지 (PEG), 락테이티드 링겔주사액, 에탄올, 프로필렌글리콜, 비휘발성유-참기름, 면실유, 낙화생유, 콩기름, 옥수수기름, 올레인산에칠, 미리스트산 이소프로필, 안식향산벤젠과 같은 용제; 안식향산나트륨, 살리실산나트륨, 초산나트륨, 요소, 우레탄, 모노에칠아세트아마이드, 부타졸리딘, 프로필렌글리콜, 트윈류, 니정틴산아미드, 헥사민, 디메칠아세트아마이드와 같은 용해보조제; 약산 및 그 염(초산과 초산나트륨), 약염기 및 그 염(암모니아 및 초산암모늄), 유기화합물, 단백질, 알부민, 펩톤, 검류와 같은 완충제; 염화나트륨과 같은 등장화제; 중아황산나트륨(NaHSO_3) 이산화탄소가스, 메타중아황산나트륨 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$), 아황산나트륨(Na_2SO_3), 질소가스(N_2), 에칠렌디아민테트라초산과 같은 안정제; 소듐비설과이드 0.1%, 소듐포름알데히드 설폭실레이트, 치오우레아, 에칠렌디아민테트라초산디나트륨, 아세톤소듐비설과이드와 같은 황산화제; 벤질알코올, 클로로부탄올, 염산프로카인, 포도당, 글루콘산칼슘과 같은 무통화제; 시엠시나트륨, 알긴산나트륨, 트윈 80, 모노스테아린산알루미늄과 같은 현탁화제를 포함할 수 있다.
- [73] 본 발명에 따른 좌제에는 카카오지, 라놀린, 위텟솔, 폴리에틸렌글리콜, 글리세로젤라틴, 메칠셀룰로오스, 카르복시메칠셀룰로오스, 스테아린산과 올레인산의 혼합물, 수바날(Subanal), 면실유, 낙화생유, 야자유, 카카오버터 +콜레스테롤, 레시틴, 라네트왁스, 모노스테아린산글리세롤, 트윈 또는 스팬, 임하우젠(Imhausen), 모놀렌(모노스테아린산프로필렌글리콜), 글리세린, 아덱스솔리두스(Adeps solidus), 부티룸 테고-G(Buetyrum Tego-G), 세베스파마 16(Cebes Pharma 16), 헥사라이드베이스 95, 코토마(Cotomar), 히드록코테 SP, S-70-XXA, S-70-XX75(S-70-XX95), 히드록코테(Hydrokote) 25, 히드록코테 711, 이드로포스탈(Idropostal), 마사에스트라리움(Massa estrarium, A, AS, B, C, D, E, I, T), 마사-MF, 마수폴, 마수폴-15, 네오수포스탈-엔, 파라마운드-B, 수포시로 (OSI, OSIX, A, B, C, D, H, L), 좌제기제 IV 타입(AB, B, A, BC, BBG, E, BGF, C, D,

299), 수포스탈(N, Es), 웨코비(W, R, S, M, Fs), 테제스터 트리글리세라이드 기재 (TG-95, MA, 57)와 같은 기재가 사용될 수 있다.

[74] 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테arate 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[75] 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.

[76] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, "약학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[77] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 본 발명이 속하는 기술분야에 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[78] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 복용, 피하 주사, 복강 투여, 정맥 주사, 근육 주사, 척수 주위 공간(경막내) 주사, 설하 투여, 볼점막 투여, 직장 내 삽입, 질 내 삽입, 안구 투여, 귀 투여, 비강 투여, 흡입, 입 또는 코를 통한 분무, 피부 투여, 경피 투여 등에 따라 투여될 수 있다.

[79] 본 발명의 약학적 조성물은 치료할 질환, 투여 경로, 환자의 연령, 성별, 체중 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자와 함께 활성성분인 약물의 종류에 따라 결정된다.

[80] 본 발명에서 "개체"란 질병의 치료를 필요로 하는 대상을 의미하고, 보다 구체적으로는 인간 또는 비-인간인 영장류, 생쥐(mouse), 쥐(rat), 개, 고양이, 말, 및 소 등의 포유류를 의미한다.

- [81] 본 발명에서 “투여”란 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [82] 본 발명에서 “예방”이란 목적하는 질환의 발병을 억제하거나 지연시키는 모든 행위를 의미하고, “치료”란 본 발명에 따른 약학적 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 그에 따른 대사 이상 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미하며, “개선”이란 본 발명에 따른 조성물의 투여에 의해 목적하는 질환과 관련된 파라미터, 예를 들면 증상의 정도를 감소시키는 모든 행위를 의미한다.
- [83]
- [84] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 하기 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

- [85] [실시예]
- [86] 실시예 1. 재조합 AAV(Adeno-associated virus)의 제작
- [87] 재조합 AAV(Adeno-associated virus)는 HEK293 세포에 벡터를 삼중 트랜스펙션(triple transfection)하여 제작한다. 구체적으로, 제1 벡터(pHelper 벡터)는 공통으로 포함되며, 제2 벡터(pRC 벡터)에 의해 서브타입(subtype)이 결정되며, 제3 벡터에 의해 단일 가닥 AAV(single-stranded AAV, ssAAV)와 자가 상보적인 AAV(Self-complementary AAV, scAAV)가 결정된다. 또한, 제3 벡터에 관심 유전자(gene of interest, GOI)를 포함하였다. 상기 pRC 벡터는 pAAV-DJ를 사용하였으며, 상기 관심 유전자는 GFP(Green fluorescent protein), IRES(internal ribosome entry site)-GFP, yeast NDi1(GenBank: X61590.1), 및 hydra NDi1(NCBI Reference Sequence: XM_002156815.3)을 사용하였다. 실험에 사용된 벡터의 개별지도는 도 1 및 2에 나타내었다.
- [88] 상기 AAV 제작용 벡터는 모두 Cell Biolabs (San Diego, CA)에서 구입하였고 293 세포는 AAV-293(Agilent, Santa Clara, CA)을 사용하였다. 150 mm 디쉬(dish)에 293 세포를 약 90% 컨플루언스(confluence)로 배양한 후, 제1 벡터, 제2 벡터, 및 제3 벡터를 각각 20 ug, 10 ug, 및 10 ug의 비율로 잘 혼합한 뒤 CaCl₂ 용액과 섞은 다음 293 세포에 골고루 뿌려 주었다. 3일 후, 293 세포를 셀 스크래퍼(cell scraper)로 긁어모은 다음, AAVpro Purification Kit (Takara, San Jose CA)로 정제한 후 동 회사의 AAVpro Titration Kit로 역가(titer)를 측정하였다. 그 후, 사용할 때까지 -80°C에 보관하였다.
- [89]
- [90] 실시예 2. scAAV의 유전자 발현 강도 및 안정성 확인
- [91] scAAV 및 ssAAV에 의한 유전자 발현의 강도 및 안정성을 확인하기 위해, scAAV-GFP 및 ssAAV-GFP를 섬유아세포에 감염시켜서 녹색 형광 발현 정도를

확인하였다. 이 때 도 3a에 나타난 재조합 AAV를 사용하여 실험을 진행하였다. 구체적으로, 12-웰 플레이트에 LHON 환자에서 유래한 피부섬유아세포(skin fibroblast cells)를 약 70% 컨플루언스(confluence)로 배양한 후, ssAAV-2/DJ-GFP 또는 scAAV-2/DJ-GFP를 각각 웰 당 약 10^9 viral genome(vg)씩 가하여 세포를 감염시켰다. 3일 후, 감염된 세포에서 각각의 재조합 AAV에 의한 GFP의 발현 정도를 도립 형광현미경으로 FITC filter하에서 관찰하였다. 그 결과는 도 3b에 나타내었다.

- [92] 도 3b에 나타난 바와 같이, scAAV-GFP가 ssAAV-GFP보다 더 강하게 녹색 형광을 세포 내에서 발현시키는 것을 관찰할 수 있다. 이는 scAAV가 유전자를 안정적으로 발현시키고(stability), 유전자 발현 강도가 높다는 것을 의미한다.

[93]

[94] **실시예 3. scAAV-hydra NDi1의 세포호흡 복구 효과 확인**

- [95] 세포호흡 측정 전용 24-웰 플레이트에서 LHON 환자에서 유래한 피부섬유아세포를 약 50% 컨플루언스(confluence)로 배양한 후, ssAAV-IRES-GFP, ssAAV-yeast NDi1, ssAAV-hydra NDi1, 및 scAAV-hydra NDi1을 각각 웰 당 약 10^8 vg의 역가로 감염시켰다. 배양액 상태에서 OCR (oxygen consumption rate)은 복합체 1 특이적 억제제(complex I-specific inhibitor)인 로테논(rotenone)을 첨가함에 따라 급격히 감소하게 된다. 따라서, AAV 감염 6일 후, 세포에 로테논을 첨가하여 yeast NDi1, 및 hydra NDi1에 의한 세포호흡 감소 억제효과를 확인하였다. 세포호흡은 Agilent社の Seahorse XF-24를 이용하여 산소 소모율(oxygen consumption rate, OCR)의 측정을 통해 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

- [96] 도 4에 나타난 바와 같이, scAAV-hydra NDi1이 ssAAV-yeast NDi1에 비해 로테논에 의한 세포호흡의 감소를 보다 효율적으로 억제하였다.

[97]

[98] **실시예 4. scAAV-hydra Ndi1의 세포사멸 억제 효과 확인**

- [99] 24-웰 플레이트에서 LHON 환자의 피부섬유아 세포를 약 70% 컨플루언스로 배양한 후 ssAAV-IRES-GFP, ssAAV-yeast NDi1, ssAAV-hydra NDi1, 및 scAAV-hydra NDi1을 각각 웰 당 약 10^9 vg의 역가로 감염시켰다. 6일 후에 로테논을 처리하였고, 로테논 처리 1일 후부터 세포사멸을 관찰하기 시작하였다. 그 결과는 도 5a 내지 5d에 나타내었다. 세포의 사멸 여부는 개개 세포의 모양과 형태, 바닥에 부착한 정도, 및 인접 세포와의 접촉 강도 등을 종합적으로 고려하여 판단하였다.

- [100] 도 5a에 나타난 바와 같이, 로테논 처리 1일 후, 대조군인 untransduced 세포군 또는 ssAAV-IRES-GFP로 감염된 세포군은 5 nM의 로테논에서 일부 세포가 사멸하기 시작하였으나, ssAAV-yeast NDi1 또는 ssAAV-hydra NDi1으로 감염된

세포는 20 nM의 로테논에서 약간의 사멸을 보였다. 반면에, 같은 조건에서 scAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포군은 사멸이 거의 관찰되지 않았다.

[101] 도 5b에 나타난 바와 같이, 로테논 처리 2일 후, untransduced 세포군 또는 ssAAV-IRES-GFP로 감염된 세포군은 5 nM의 로테논에서도 거의 모든 세포가 사멸하였으나, ssAAV-yeast NDi1 또는 ssAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포는 20 nM의 로테논에서 약간의 사멸을 보였다. 반면에, 같은 조건에서 scAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포군은 사멸이 거의 관찰되지 않았다.

[102] 도 5c에 나타난 바와 같이, 로테논 처리 3일 후, untransduced 세포군 또는 ssAAV-IRES-GFP로 감염된 세포군은 5 nM의 로테논에서 완전 사멸하였고, ssAAV-yeast NDi1 또는 ssAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포는 10 nM의 로테논에서도 많이 사멸되기 시작하였다. 반면에, 같은 조건에서 scAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포군은 20 nM의 로테논에서도 거의 사멸되지 않았다.

[103] 도 5d에 나타난 바와 같이, 로테논 처리 4일 후, ssAAV-yeast NDi1 또는 ssAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포도 5 nM의 로테논에서 일부 사멸을 보였고, 10 nM에서는 거의 사멸하였다. 반면에, scAAV-hydra NDi1으로 감염된 세포군은 20 nM에서도 거의 사멸하지 않았다.

[104] 이는 scAAV-hydra NDi1이 ssAAV-hydra NDi1 및 ssAAV-yeast NDi1에 비해 미토콘드리아 복합체 1 이상에 의한 LHON 환자 유래 세포사멸 억제 효과가 현저히 우수하다는 것을 의미한다.

[105]

[106] 상기 결과들을 통하여, 본 발명의 scAAV-hydra NDi1이 로테논에 의한 세포호흡 감소를 복구하는 효과, 및 로테논에 의한 LHON 환자 유래 세포의 사멸 억제 효과가 있음을 확인하였는바, 이를 LHON 뿐만 아니라 미토콘드리아 복합체 1에 이상으로 인해 발병하는 질병의 예방, 개선, 또는 치료에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

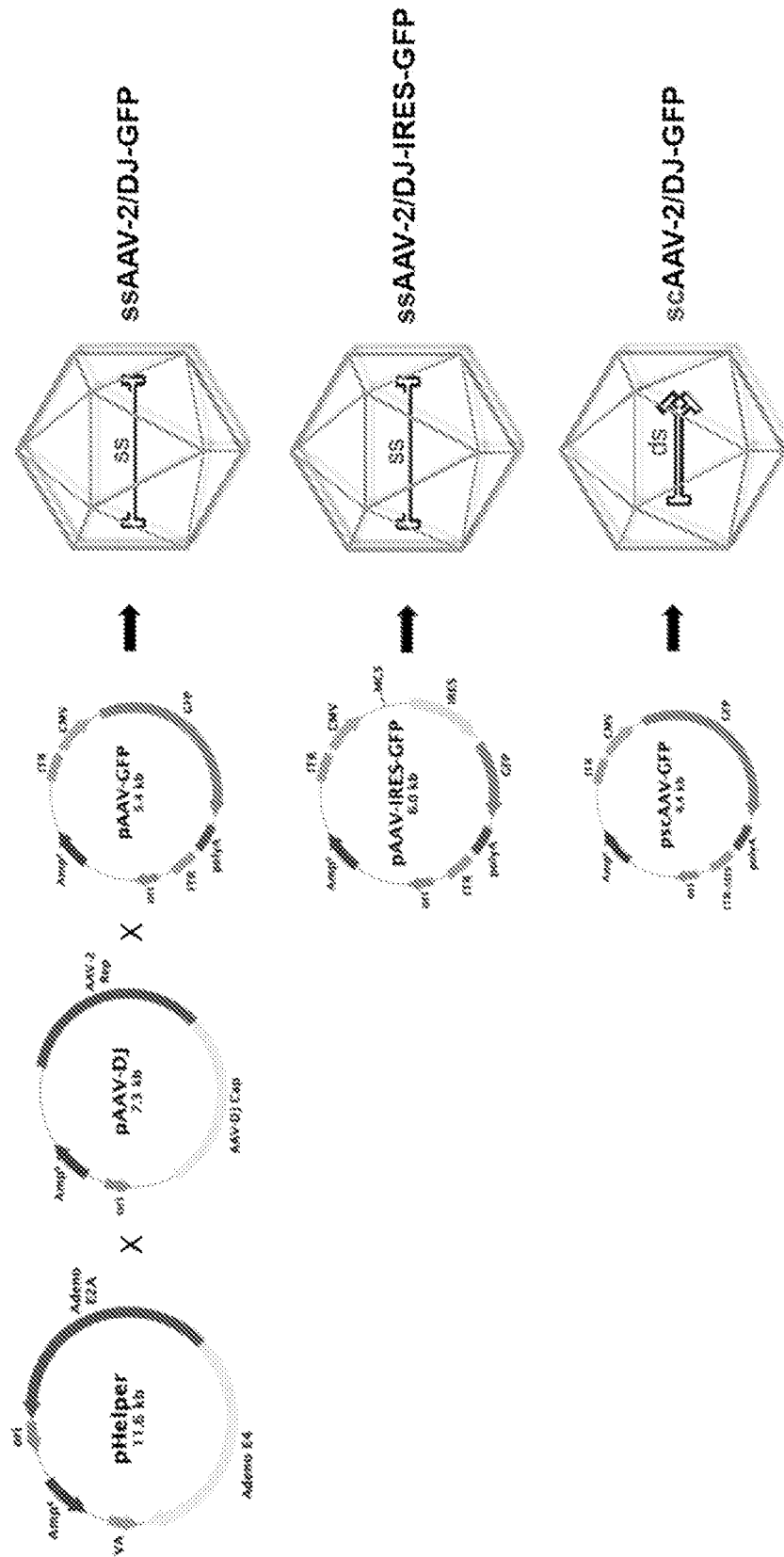
[107]

[108] 상기 진술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

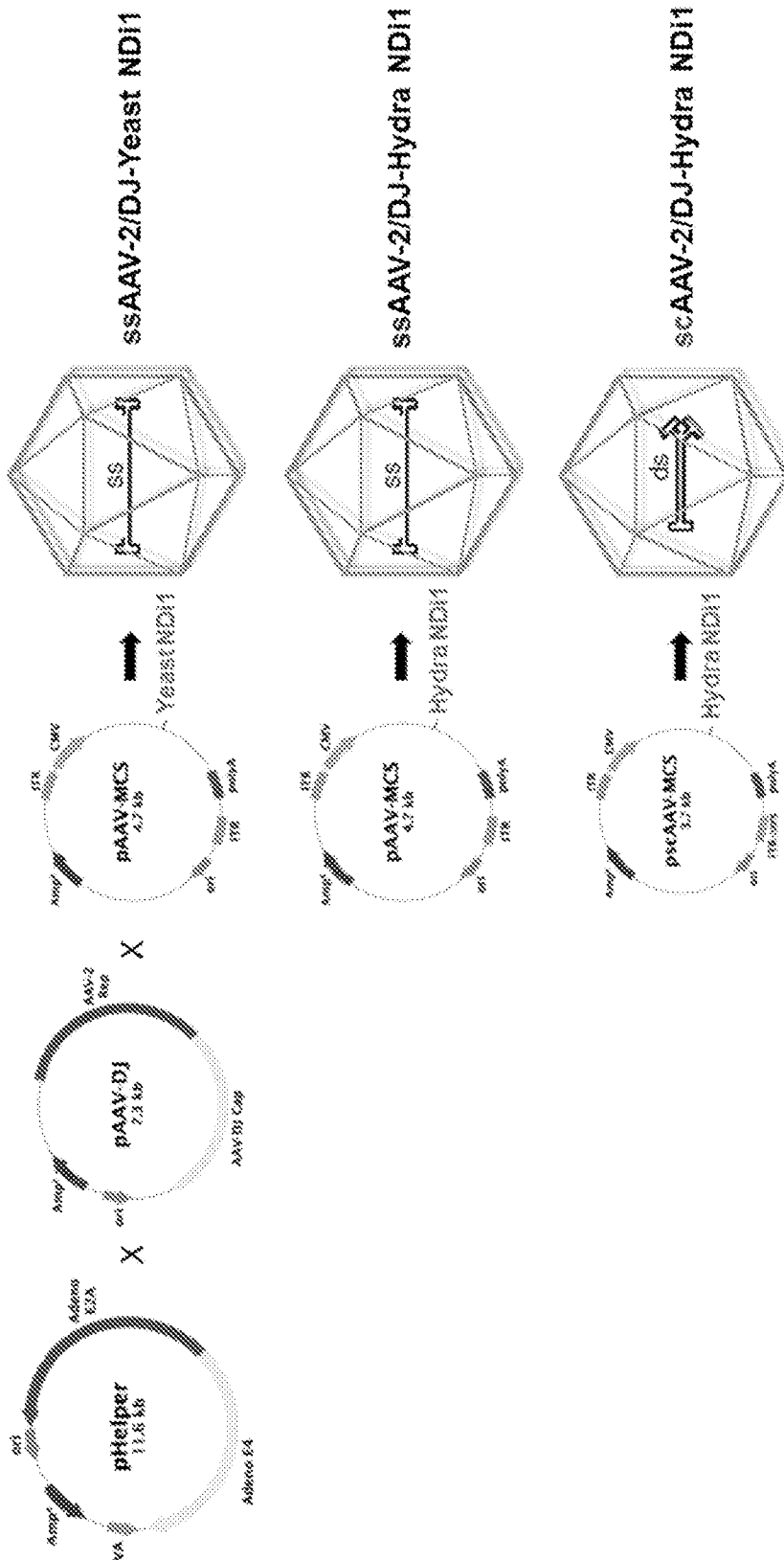
청구범위

- [청구항 1] 서열번호 1로 표시되는 hydra NDI1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 재조합 바이러스는 아데노부속바이러스(Adeno-associated virus)인, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 3] 제2항에 있어서,
상기 아데노부속바이러스는 자가 상보적인 AAV(Self-complementary AAV, scAAV)인, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 재조합 바이러스 벡터는 세포호흡 감소를 억제시키는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 재조합 바이러스 벡터는 세포사멸을 억제시키는, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 미토콘드리아 이상질환은 ND1(NADH dehydrogenase subunit 1), ND4(NADH dehydrogenase subunit 4), 및 ND6(NADH dehydrogenase subunit 6)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 유전자에 돌연변이가 있는 것인, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 미토콘드리아 이상질환은 레버 유전성 시신경병증(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON), MELAS(Mitochondrial Encephalopathy with Lactic acidosis and stroke-like episode) 증후군, 신경성 근육 위축(neurogenic muscle weakness), MERRF(Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fiber) 증후군, 미토콘드리아 뇌근병증(mitochondrial encephalomyopathy), 리 증후군(Leigh syndrome), 및 켄스-세이어 증후군(Kearns-Sayre syndrome)으로 이루어지는 군으로부터 선택된, 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.
- [청구항 8] 서열번호 1로 표시되는 hydra NDI1 유전자가 탑재된 재조합 바이러스 벡터를 포함하는 미토콘드리아 이상질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는, 미토콘드리아 이상질환을 예방 또는 치료하는 방법.

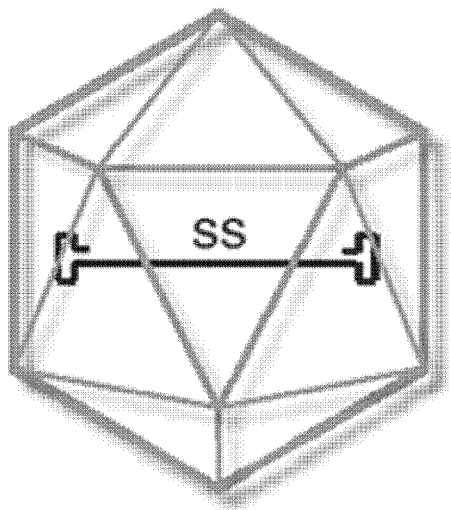
[도1]



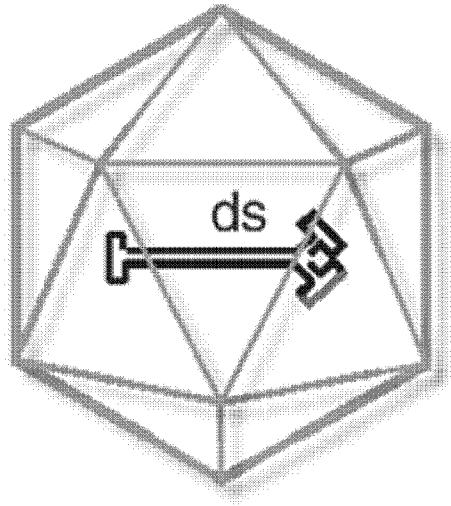
[도2]



[도3a]

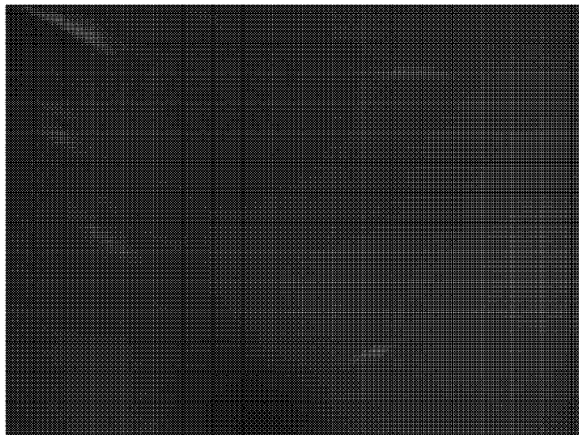


ssAAV

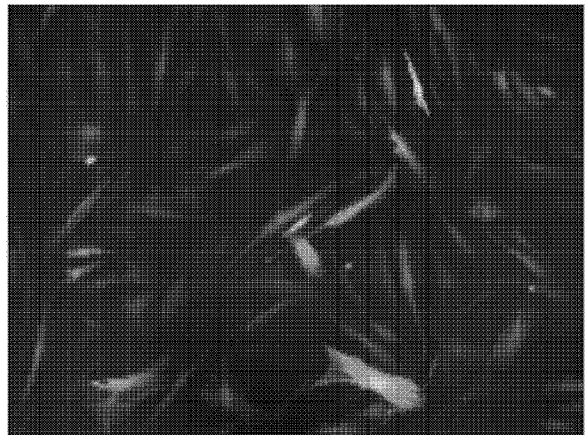


scAAV

[도3b]

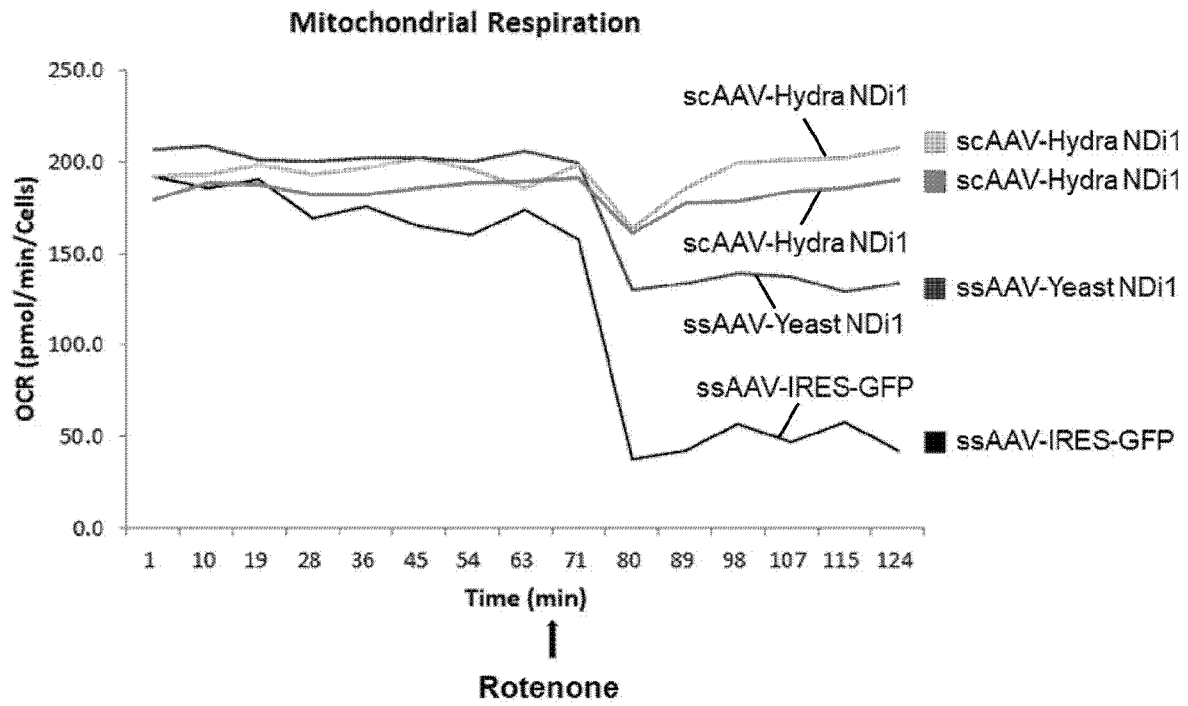


ssAAV-GFP

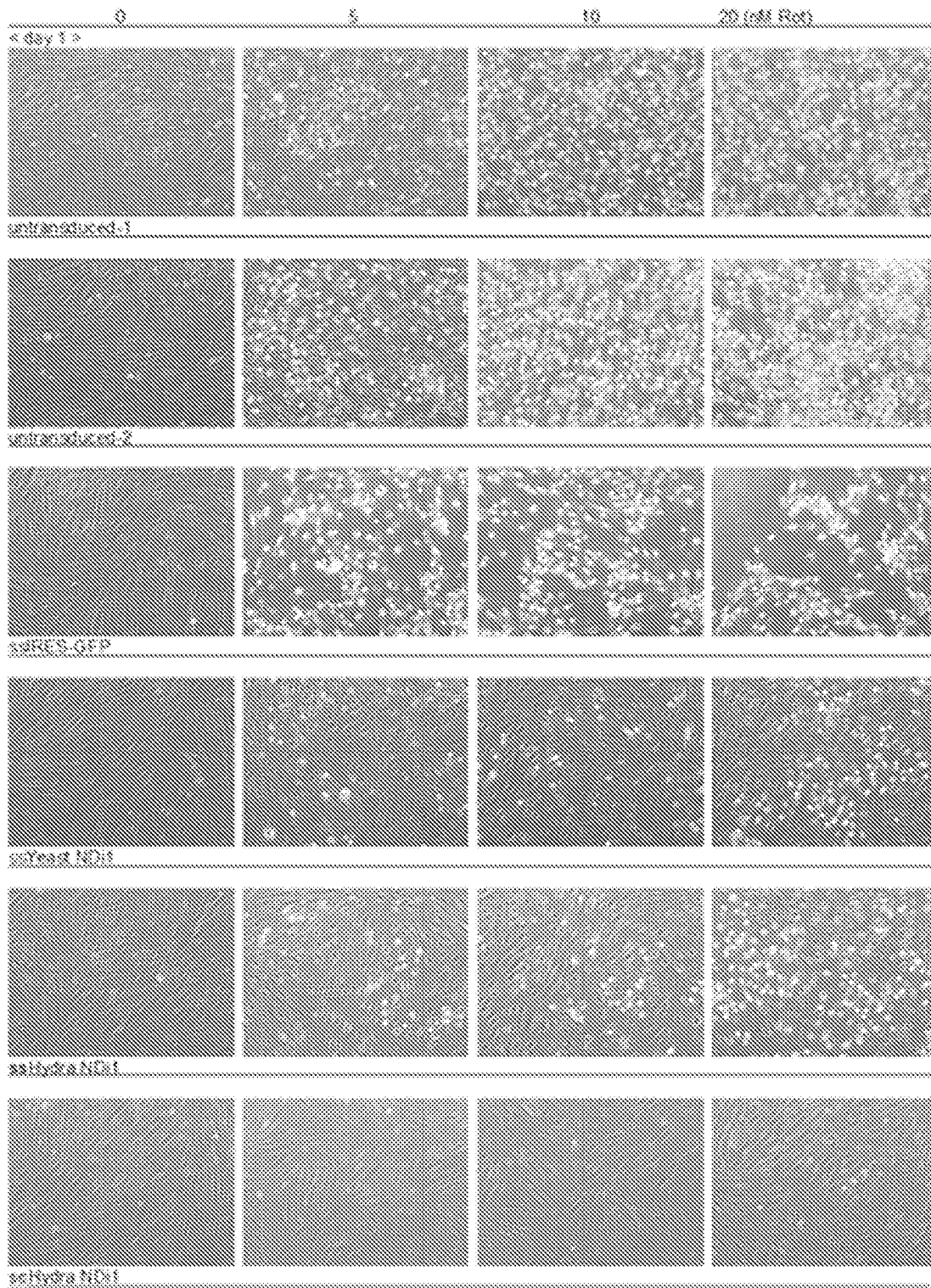


scAAV-GFP

[도4]



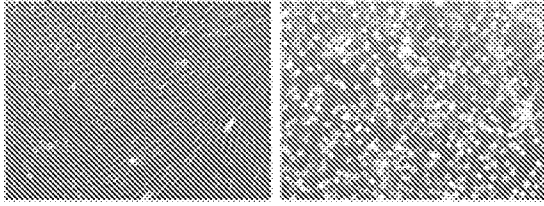
[도5a]

규칙 91,
11.07.2024

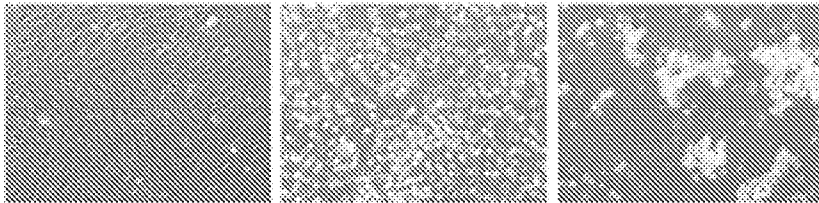
[도5b]

규칙 91,
11.07.2024

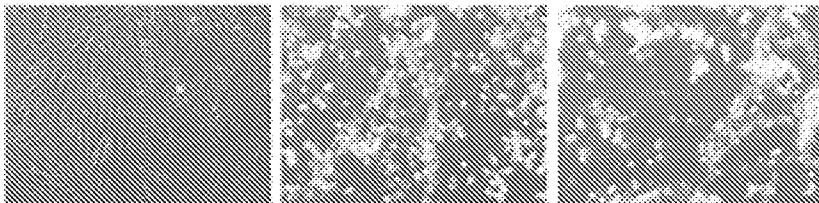
< day 2 >



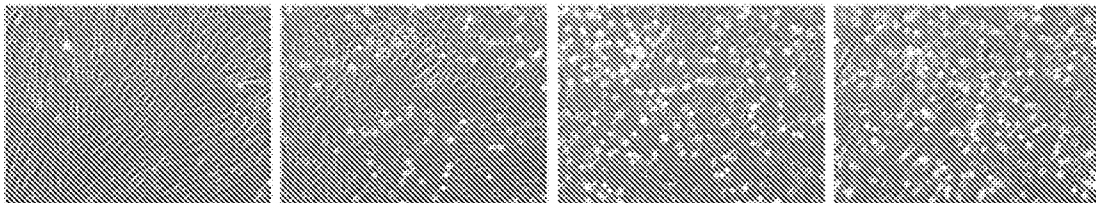
untransduced.1



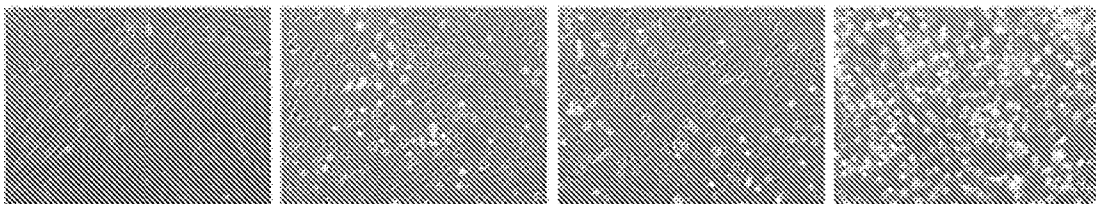
untransduced.2



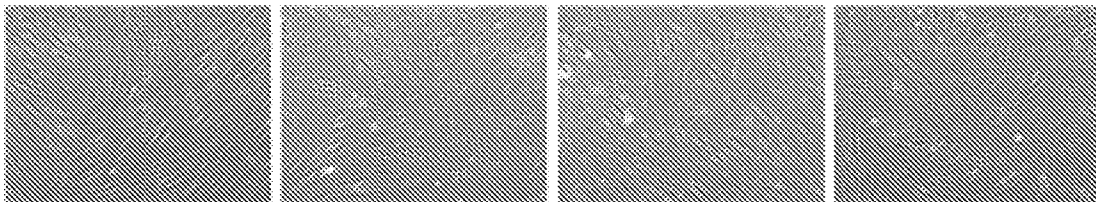
ssRES-GFP



ssYeast NDx1



ssHydra NDx1

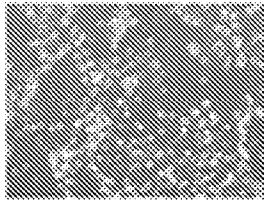


ssHydra NDx1

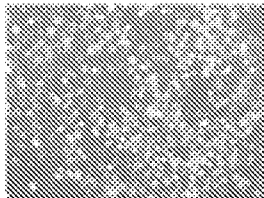
[도5c]

규칙 91,
11.07.2024

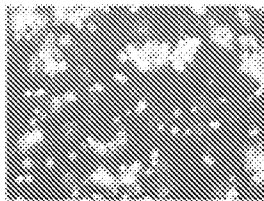
< ssy 3 >



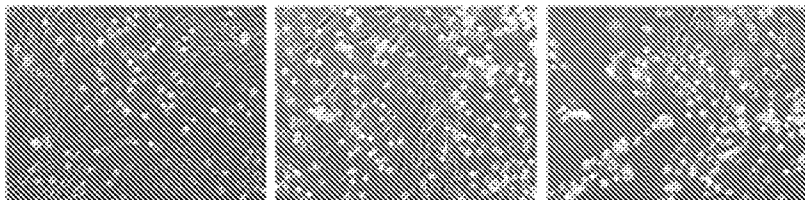
untransduced.1



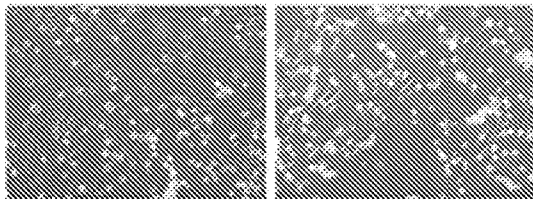
untransduced.2



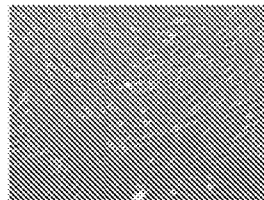
ssRES-GFP



ssYeast NO1



ssHydra NO1

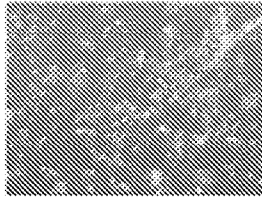


ssHydra NO1

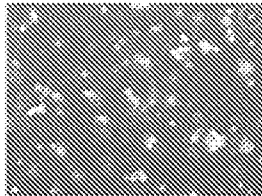
[도5d]

규칙 91,
11.07.2024

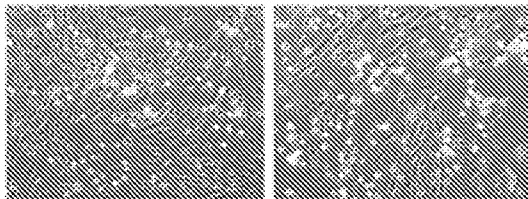
< Day 4 >



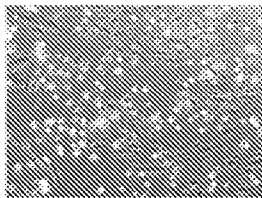
uninduced-2



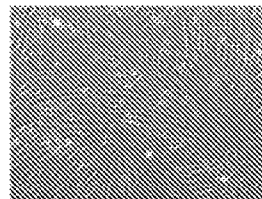
ssRES-GFP



ssYeast NDH1



ssHydra NDH1



ssHydra NDH1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009163

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61K 48/00(2006.01); A61K 31/711(2006.01); A61K 38/16(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 15/861(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12P 19/36(2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 미토콘드리아 이상질환(mitochondrial dysfunction), NDI1(NADH dehydrogenase subunit 1), 헤테로플라스미(heteroplasm), 재조합(recombinant), 벡터(vector), 아데노 부속 바이러스(adeno-associated virus), 세포사멸(apoptosis)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KR 10-2015-0042598 A (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 21 April 2015 (2015-04-21) See abstract; and claims 4-6.	1-7
A	JP 2021-522173 A (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 30 August 2021 (2021-08-30) See abstract; and claims 1, 4, 13, 14, 84 and 94-97.	1-7
A	JP 2016-507522 A (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) et al.) 10 March 2016 (2016-03-10) See abstract; and claims 1, 8, 9 and 15.	1-7
A	CN 115927401 A (NEWFORCE (SUZHOU) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 07 April 2023 (2023-04-07) See abstract; and claims 1, 4, 5 and 8-10.	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

07 October 2024

Date of mailing of the international search report

07 October 2024

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208

Facsimile No. +82-42-481-8578

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009163

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017-023855 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 09 February 2017 (2017-02-09) See abstract; and claims 1, 4, 8, 30-36, 54, 73 and 92.	1-7
A	NCBI Reference Sequence: XM_002156815.4. PREDICTED: Hydra vulgaris probable NADH dehydroge nase (LOC100210639), mRNA. (28 March 2022). See pages 1-3.	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009163

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2024/009163

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **8**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claim 8 pertains to a method for treatment of the human body, and thus pertains to a subject matter on which the International Searching Authority is not required to carry out an international search under the provisions of PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv).
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2024/009163

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
KR	10-2015-0042598	A	21 April 2015	KR	10-1567921	B1	10 November 2015
JP	2021-522173	A	30 August 2021	CN	112312929	A	02 February 2021
				EP	3781671	A1	24 February 2021
				EP	3781671	A4	26 January 2022
				KR	10-2021-0009317	A	26 January 2021
				US	2021-0100917	A1	08 April 2021
				WO	2019-204593	A1	24 October 2019
JP	2016-507522	A	10 March 2016	EP	2951197	A1	09 December 2015
				US	2016-0031955	A1	04 February 2016
				WO	2014-118296	A1	07 August 2014
CN	115927401	A	07 April 2023	None			
WO	2017-023855	A1	09 February 2017	US	11866736	B2	09 January 2024
				US	2019-0017034	A1	17 January 2019
				US	2024-0158765	A1	16 May 2024

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; C12N 15/86(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/711(2006.01); A61K 38/16(2006.01); A61K 38/17(2006.01); C07K 14/47(2006.01); C07K 19/00(2006.01); C12N 15/53(2006.01); C12N 15/86(2006.01); C12N 15/861(2006.01); C12N 5/00(2006.01); C12P 19/36(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 미토콘드리아 이상질환(mitochondrial dysfunction), NDI1(NADH dehydrogenase subunit 1), 헤테로플라스미(heteroplasmy), 재조합(recombinant), 벡터(vector), 아데노 부속 바이러스(adenovirus), 세포사멸(apoptosis)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	KR 10-2015-0042598 A (한국과학기술원) 2015.04.21 요약; 청구항 4-6	1-7
A	JP 2021-522173 A (THE TRUSTEES OF COLUMBIA UNIVERSITY IN THE CITY OF NEW YORK) 2021.08.30 요약; 청구항 1, 4, 13, 14, 84, 94-97	1-7
A	JP 2016-507522 A (INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE) 등) 2016.03.10 요약; 청구항 1, 8, 9, 15	1-7
A	CN 115927401 A (NEWFORCE (SUZHOU) BIOTECHNOLOGY CO.,LTD.) 2023.04.07 요약; 청구항 1, 4, 5, 8-10	1-7
☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2024년10월07일(07.10.2024)		국제조사보고서 발송일 2024년10월07일(07.10.2024)
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578		심사관 허주형 전화번호 +82-42-481-5373

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	WO 2017-023855 A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION) 2017.02.09 요약; 청구항 1, 4, 8, 30-36, 54, 73, 92	1-7
A	NCBI Reference Sequence: XM_002156815.4 "PREDICTED: Hydra vulgaris probable NADH dehydroge nase (LOC100210639), mRNA" (2022.03.28) 페이지 1-3	1-7

제1기제란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
- a. ☒ 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
- b. ☐ 국제조사를 목적으로 국제출원일 이후에 제출된 서열목록(규칙 13의3.1(a))
- ☐ 서열목록이 출원시 국제출원의 개시 범위를 넘지 않는다는 취지의 진술서를 첨부
2. ☐ 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열에 대해, 본 보고서는 WIPO 표준 ST.26을 준수하는 서열목록이 없이 유효한 조사를 할 수 있는 범위에서 작성되었습니다
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. ☒ 청구항: 8
이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
청구항 8은 인체의 치료방법에 관한 것이므로, PCT 제17조(2)(a)(i) 및 규칙 39.1(i)의 규정에 의하여
국제조사기관이 국제조사할 의무가 없는 대상에 해당됩니다.
2. ☐ 청구항:
이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과
관련됩니다. 구체적으로는,
3. ☐ 청구항:
이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2015-0042598 A	2015/04/21	KR 10-1567921 B1	2015/11/10
JP 2021-522173 A	2021/08/30	CN 112312929 A	2021/02/02
		EP 3781671 A1	2021/02/24
		EP 3781671 A4	2022/01/26
		KR 10-2021-0009317 A	2021/01/26
		US 2021-0100917 A1	2021/04/08
		WO 2019-204593 A1	2019/10/24
JP 2016-507522 A	2016/03/10	EP 2951197 A1	2015/12/09
		US 2016-0031955 A1	2016/02/04
		WO 2014-118296 A1	2014/08/07
CN 115927401 A	2023/04/07	없음	
WO 2017-023855 A1	2017/02/09	US 11866736 B2	2024/01/09
		US 2019-0017034 A1	2019/01/17
		US 2024-0158765 A1	2024/05/16